NaN₃ 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织 生长和生理特性的影响

李波, 邬婷婷

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 为了解 NaN₃ 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长和生理特性的影响, 利用叠氮化钠 (NaN₃) 诱变和盐碱 (NaCl、NaHCO₃、Na₂CO₃) 胁迫处理“中苜1号”苜蓿愈伤组织, 测定相关生长和生理指标。结果表明: 随着 NaN₃ 和盐碱浓度的增加, 愈伤组织的存活率降低, 在 NaN₃ 浓度为 3.0 mmol · L⁻¹ (处理 8 d), 愈伤组织存活率为 54.55%, 此 NaN₃ 浓度和处理时间为 NaN₃ 诱变半致死浓度; 在 200 mmol · L⁻¹ 盐碱浓度胁迫下 (胁迫 12 d), 愈伤组织存活率低于 5%, 此盐碱浓度和胁迫时间为各盐碱致死浓度; 除低浓度 NaCl 胁迫组外, 随着 NaN₃ 和盐碱胁迫浓度的增加, 愈伤组织生物量降低, NaN₃ 降低范围为 60.85%~81.88%, NaCl 胁迫组降低了 13.90%~65.63%, NaHCO₃ 胁迫组降低了 21.71%~67.37%, Na₂CO₃ 胁迫组降低了 61.54%~73.20%, 盐碱对愈伤组织生物量的影响为 NaCl>NaHCO₃>Na₂CO₃。经 NaN₃ 诱变和盐碱胁迫, 愈伤组织可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量显著增加, MDA 含量和电导率降低, NaN₃、NaN₃+NaCl、NaN₃+Na₂CO₃、NaN₃+NaHCO₃ 各处理可溶性蛋白含量分别增加了 47.07%、53.57%、22.31%、47.69%, 可溶性糖含量分别增加了 24.79%、162.86%、58.36%、109.54%, 脯氨酸含量分别增加了 47.78%、162.86%、80.00%、107.25%, MDA 含量分别降低了 2.35%、11.17%、3.64%、5.54%, 相对电导率分别降低了 15.13%、17.96%、16.79%、17.28%。NaN₃ 诱变促进愈伤组织渗透调节物质积累和降低膜的透性。

关键词: 苜蓿; 愈伤组织; NaN₃ 诱变; 盐碱胁迫; 存活率; 生物量; 生理特性

中图分类号: Q813.5; S551⁺.7 **文献标志码:** A

Effects of NaN₃ mutagenesis and saline-alkali stress on growth and physiological characteristics of alfalfa callus

LI Bo, WU Ting-ting

(College of Agriculture, Forestry and Life Sciences, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: In order to decipher the effect of NaN₃ mutagenesis and saline-alkali stress on the growth and physiological characteristics of alfalfa callus, we conducted an experiment that the growth and physiological indexes of alfalfa callus, “Zhongmu No.1” were treated by NaN₃ and saline-alkali (NaCl, NaHCO₃, and Na₂CO₃) stresses. The results showed that increasing NaN₃ and salt concentration decreased the survival rate of callus. When the concentration of NaN₃ was at 3 mmol · L⁻¹, 8 d treatment decreased the survival rate of callus to 54.55%. This treatment combination is NaN₃ mutagenic semi-lethal conditions. The survival rate of callus was lower than 5% at 200 mmol · L⁻¹ of NaN₃ after 12 d treatment that is the lethal concentration of each salt and stress time. In addition to the low concentration of NaCl stress group, the biomass of the callus decreased with the increase of NaN₃ and salt stress concentration, NaN₃ treatment decreased the biomass in a range of 60.85% to 81.88%, the NaCl stress group decreased that by 13.90%~65.63%, the NaHCO₃ stress group decreased that by 21.71%~67.37%, and the Na₂CO₃ stress group decreased that by 61.54%~73.20%. The effect of salt and alkali on the biomass of alfalfa callus ranked in this order: NaCl>NaHCO₃>Na₂CO₃. The content of soluble protein, soluble sugar and proline in the callus increased significantly, and the content of MDA and electrical conductivity decreased by NaN₃ mutation and salt

stress. The soluble protein content in treatments of NaN₃, NaN₃+NaCl, NaN₃+ Na₂CO₃ and NaN₃+ NaHCO₃ increased by 47.07%, 53.57%, 22.31%, and 47.69%, respectively. The soluble sugar content increased by 24.79%, 162.86%, 58.36% and 109.54%, respectively. The proline content increased by 47.78%, 162.86%, 80.00%, and 107.25%, respectively. The MDA content decreased by 2.35%, 11.17%, 3.64%, 5.54%, respectively. The relative conductivity decreased by 15.13%, 17.96%, 16.79% and 17.28% in all treatments, respectively. The NaN₃ induced the accumulation of osmotic substances in the callus and decreased the permeability of membrane.

Keywords: alfalfa; callus; NaN₃ mutagenesis; saline alkali stress; survival rate; biomass; physiology characteristics

苜蓿为重要的豆科牧草,营养价值高,除作为饲草外,还具有多重生态功能,是生态价值潜力巨大的生态牧草^[1-2]。但苜蓿优良种苗较少,其开发和利用均受到了不同程度的制约。诱变育种技术可以通过人为诱导加快变异的发生,不仅可以获得新的突变材料,还有可能产生生物学上有用的变异体。利用人工诱变技术,可丰富苜蓿种质资源,现已成为选育苜蓿新品种的重要来源。目前,对植物的抗盐研究多以氯化钠为主,如张学云等^[3]对新疆大叶苜蓿愈伤组织进行不同⁶⁰Co- γ 射线和不同浓度 NaCl 筛选得到了高达 1%耐盐性突变株;杨静慧等^[4]发现耐 NaCl 的松散型苜蓿愈伤组织具有更高的可溶性糖和游离脯氨酸含量。我国北方有相当大面积盐碱土,其主要盐分是碱性盐,在增加了土壤盐度的同时还造成土壤 pH 值的明显提高,表现出比中性盐更大的生态破坏力,但目前针对生理碱性盐的研究相对较少^[5-7]。针对北方地区的盐碱土壤,探讨苜蓿在盐碱胁迫下的适应性,筛选抗盐碱的苜蓿突变体,培育综合性状优良的苜蓿显得尤为重要。

叠氮化钠(NaN₃)可透过膜进入细胞内,使 DNA 碱基替换方式发生改变,引起点突变的产生^[8]。NaN₃ 的诱变率比较高,如付凤玲等^[9]用 NaN₃ 诱变玉米愈伤组织,获得 22 个再生植株株系,对再生植株株系进行耐旱性鉴定,筛选出 5 个耐旱性高于未诱变对照的诱变株系;韩晓玲^[10]将 NaN₃ 应用于小冠花子叶的愈伤组织诱变,分别以 NaCl 和脯氨酸类似物 L-羟基脯氨酸(Hyp)为筛选剂,获得了耐盐性较对照明显增强的细胞系,后代与对照系相比,生理生化特性方面耐盐系抗氧化系统 SOD 和 POD 酶活性显著提高。同时 NaN₃ 具有无残毒、便宜、高效、使用安全等优点^[11],因此本试验以 NaN₃ 为诱变剂,对愈伤组织进行诱变处理,探讨 NaN₃ 对苜蓿愈伤组织耐盐碱的诱变效果,通过对耐盐碱苜蓿突变体愈伤组织的生长和生理指标的变化分析,了解突变体在生长生理代谢上的变化规律,为进一步开展

苜蓿诱变育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以“中苜 1 号”苜蓿品种的无菌苗的叶片诱导出的愈伤组织为材料,由齐齐哈尔大学植物组织培养研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的继代培养 将愈伤组织切割成 0.5 cm³左右小块,转接到继代培养基中,20 d 继代 1 次。愈伤组织的继代培养基为 MS +2,4-D 1.0 mg · L⁻¹+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+30 g 蔗糖+8.5 g 琼脂(pH=5.8)。培养条件为(25±1)°C 恒温培养箱,光照强度为 81~162 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间为 14 h · d⁻¹。

1.2.2 NaN₃ 诱变和盐碱胁迫愈伤组织 配置 NaN₃ 诱变培养基,用 pH=7.0,0.2M 磷酸缓冲液配置 NaN₃ 溶液,加于愈伤组织继代培养基内,使 NaN₃ 溶液浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0 mmol · L⁻¹ 和 5.0 mmol · L⁻¹。将愈伤组织小块置于含不同浓度 NaN₃ 的液体培养基中,在 80 rpm · min⁻¹ 摇床上震荡 1 h 后将愈伤组织转到愈伤组织继代培养基上培养,分别在 4、8 d 和 12 d 统计愈伤组织存活率,确定 NaN₃ 诱变愈伤组织的致死浓度(LC₁₀₀)和半致死浓度(LC₅₀)。将存活的愈伤组织继代培养,每瓶接种 1 g 左右愈伤组织,分别在 10、15、20 d 和 25 d 测定每瓶愈伤组织的鲜重,即为其生物量。

配置含有一定浓度的中性盐 NaCl、碱性盐 Na₂CO₃和 NaHCO₃ 的愈伤组织盐碱胁迫的 MS 培养基,3 种盐碱浓度分别为 50、100、150 mmol · L⁻¹ 和 200 mmol · L⁻¹。将 0.5 cm³ 愈伤组织小块置入盐碱梯度培养基中,每种浓度 5~6 瓶,每瓶接种 5~6 块愈伤组织,25°C 恒温培养,分别在 4、8 d 和 12 d 统计愈伤组织的存活率,确定盐碱胁迫愈伤组织致死浓度(LC₁₀₀)和半致死浓度(LC₅₀)。将处理后存活的愈伤组织转入到未加盐碱的 MS 培养基中继续培养,每瓶

接种 2 g 左右愈伤组织,采用称量法分别在 10、15、20 d 和 25 d 称量愈伤组织的鲜重即为其生物量。

将 NaN_3 诱变 (LC_{50}) 的愈伤组织植入不同盐碱 (LC_{100}) 培养基中进行胁迫处理,后转入愈伤组织继代培养基,培养过程同前。20 d 左右继代 1 次,继代培养 3~4 次获得一定数量的诱变+盐碱胁迫愈伤组织即可用于生理指标测定。

1.2.3 生理指标测定 采用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白含量^[12],采用硫代巴比妥酸法测定可溶性糖和丙二醛 (MDA) 含量^[13],采用茚三酮法测定脯氨酸含量^[12],采用电导仪法测定相对电导率^[12],各指标测定重复 3 次。

1.3 统计学分析

利用统计分析软件 SPSS 17.0 对所测定各项指标的数据进行方差分析,比较各项指标变化的差异显著性。

对其抗盐碱性的综合评价采用隶属函数法,计算抗盐碱性相关指标的隶属函数值。

隶属函数值计算公式: $R(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$; 反隶属函数值计算公式: $R(X_i) = 1 - (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$ (式中, X_i 为指标测定值, $X_{\min}$ 、 $X_{\max}$ 为所有试验材料某项指标的最小值和最大值)。将抗性隶属值进行累加求出平均值:

$$X = \sum U(X_i) / n$$

式中, X 是所求平均抗性的隶属值,隶属值越大其抗盐碱性越强。

2 结果与分析

2.1 NaN_3 诱变对苜蓿愈伤组织生长的影响

随着 NaN_3 浓度和培养时间的增加,愈伤组织的存活率下降(见表 1)。诱变处理后培养 4~12 d, NaN_3 浓度为 1.0~3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的存

活率均在 50% 以上, NaN_3 浓度为 4.0~5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的存活率均在 50% 以下,特别是 NaN_3 浓度为 5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表现为生活力急剧降低,颜色由淡黄色转变为褐色。愈伤组织在 NaN_3 浓度为 3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 8 d 和 12 d 时,其存活率分别为 54.55% 和 50.00%, NaN_3 浓度为 5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 8 d 时,愈伤组织的存活率为 12.00%, 3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaN}_3$ (8 d) 为 NaN_3 诱变愈伤组织的半致死浓度, 5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaN}_3$ (8 d) 为其致死浓度。

NaN_3 诱变抑制了愈伤组织的生长,导致愈伤组织的生物量低于对照组(见表 1), 诱变处理后培养 10 d 的愈伤组织, NaN_3 浓度为 1.0~3.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织生物量与对照相比下降幅度在 50% 以内,其余处理浓度和处理时间愈伤组织生物量与对照相比下降幅度均在 50% 以上,尤其在 NaN_3 浓度为 4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱变 20 d 和 25 d 时,生物量下降幅度均在 80% 以上。随着 NaN_3 浓度的增加和培养时间的延长,愈伤组织生物量增加的幅度不同,在 4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaN}_3$ 浓度下,愈伤组织几乎不生长。不同浓度 NaN_3 诱变后的 20 d 愈伤组织的生物量分别比对照降低了 60.85%、67.35%、70.77% 和 81.88%。在培养相同天数下, NaN_3 浓度越高,愈伤组织的生物量积累的越少。

2.2 盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长的影响

不同浓度 NaCl 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 胁迫下苜蓿愈伤组织存活率见表 2。随着 NaCl 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 浓度的增加和培养时间延长,愈伤组织存活率呈下降趋势,在胁迫 12 d 时, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 各盐、碱胁迫下愈伤组织的存活率均低于 5%, NaCl 和 NaHCO_3 浓度为 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其存活率分别为 52.14% 和 51.22%, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{CO}_3$ 胁迫存活率为 50.33%, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 (12 d) 为其

表 1 NaN_3 诱变对苜蓿愈伤组织的存活率和生物量的影响

Table 1 Effects of survival rate and biomass of alfalfa callus under NaN_3 mutagenesis

NaN_3 浓度 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) NaN_3 concentration	存活率 Survival rate / %			生物量 Biomass / g				
	4 d	8 d	12 d	0 d	10 d	15 d	20 d	25 d
0.0	100.00	95.00	95.00	1.01±0.01a	2.36±0.04a	4.38±0.20a	5.85±0.10a	6.94±0.20a
1.0	91.30	87.50	79.17	1.01±0.01a	1.36±0.04b	1.98±0.08b	2.29±0.04b	2.70±0.03b
2.0	81.82	72.73	63.64	1.02±0.02a	1.24±0.02b	1.68±0.05c	1.91±0.05c	2.48±0.04b
3.0	81.82	54.55	50.00	1.01±0.01a	1.18±0.02b	1.35±0.04d	1.71±0.02c	2.29±0.04c
4.0	66.67	41.67	33.33	1.01±0.03a	1.04±0.02c	1.06±0.05e	1.06±0.04d	1.07±0.02d
5.0	40.00	12.00	12.00	1.02±0.02a	—	—	—	—

注: 同列不同小写字母表示各处理间的差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters within the same column mean significant difference among treatments at 0.05 level. The same below.

致死浓度,150 mmol · L⁻¹ NaCl 和 NaHCO₃、100 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃ (12 d) 为其半致死浓度。盐碱胁迫愈伤组织的存活率变化为 NaCl>NaHCO₃>Na₂CO₃。

不同浓度 NaCl、NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 胁迫下愈伤组织生物量变化见表 2,除 50 mmol · L⁻¹ NaCl 外,随着 NaCl、NaHCO₃ 和 Na₂CO₃ 浓度的增加,愈伤组织的生物量呈下降趋势。20 d 盐碱胁迫下愈伤组织,100、150 mmol · L⁻¹ 和 200 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫愈伤组织的生物量比对照分别降低 13.90%、36.10% 和 65.63%,50、100、150 mmol · L⁻¹ 和 200 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ 胁迫愈伤组织的生物量比对照分别降低 21.71%、46.03%、64.39% 和 67.37%,50、100、150 mmol · L⁻¹ 和 200 mmol · L⁻¹ Na₂CO₃ 胁迫愈伤组织的生物量比对照分别降低 61.54%、65.88%、73.20% 和 71.34%,诱变处理后培养 20 d 和 25 d 的愈伤组织,200 mmol · L⁻¹ NaCl、150 mmol · L⁻¹ 和 200 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ 及 Na₂CO₃ 胁迫下生物量下降幅度均在 60% 以上。3 种盐碱胁迫愈伤组织的生物量的变化为 NaCl>NaHCO₃>Na₂CO₃,说明碱性盐对愈伤组织生物量的影响更大。差异显著性分析显示,除 NaCl 50 mmol · L⁻¹ 胁迫组外,其它盐碱浓度胁迫组

与对照组愈伤组织生物量比较差异均显著 ($P < 0.05$)。

2.3 盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织渗透相关生理指标的影响

3 种盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织的 5 项生理指标的变化见表 3,在 3 种盐碱的半致死浓度胁迫 (NaCl:150 mmol · L⁻¹,12 d;Na₂CO₃:100 mmol · L⁻¹,12 d;NaHCO₃:150 mmol · L⁻¹,12 d) 下,愈伤组织可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量均高于对照组,MDA 含量和相对电导率均低于对照组,其中 NaCl 胁迫处理的可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量最高,MDA 含量和相对电导率最低。NaCl、Na₂CO₃ 和 NaHCO₃ 胁迫后的愈伤组织的可溶性蛋白含量分别比对照组增加了 42.65%、28.20% 和 32.94%,可溶性糖含量分别比对照组增加了 154.20%、49.69% 和 101.81%,脯氨酸含量分别比对照组增加了 150.55%、69.01% 和 93.85%,MDA 含量分别比对照组降低了 9.97%、2.95% 和 5.01%,相对电导率分别比对照组降低了 16.65%、12.63% 和 14.98%。盐碱胁迫通过提高可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸 3 种渗透调节物质的积累,降低了愈伤组织的 MDA 和电

表 2 盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织的存活率和生物量的影响

Table 2 Effects of survival rate and biomass of alfalfa callus under saline-alkali stress

盐碱浓度/(mmol · L ⁻¹) Saline alkali concentration	存活率 Survival rate/%			生物量 Biomass/g					
	4 d	8 d	12 d	0 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
氯化钠 Sodium chloride	0	100.00	95.00	85.00	2.00±0.00 a	4.13±0.10b	6.29±0.21ab	8.06±0.05a	6.26±0.07ab
	50	96.23	82.33	76.21	2.01±0.02a	4.55±0.02a	6.61±0.47a	8.07±0.09a	6.86±0.05a
	100	92.56	77.35	63.48	2.02±0.02a	4.24±0.03b	5.84±0.12b	6.94±0.08b	5.86±0.05b
	150	83.48	71.38	52.14	2.00±0.07a	3.08±0.02c	4.44±0.12c	5.15±0.12c	4.65±0.77c
	200	72.46	36.75	3.73	2.00±0.00a	2.36±0.05d	3.83±0.07c	2.77±0.33d	2.44±0.01d
碳酸氢钠 Sodium bicarbonate	0	100.00	95.00	85.00	2.00±0.00a	4.13±0.10a	6.29±0.21a	8.06±0.05a	6.26±0.07a
	50	92.34	78.22	65.41	2.00±0.08a	3.06±0.23b	4.78±0.05b	6.31±0.10b	5.72±0.09b
	100	89.67	75.76	60.53	2.02±0.04a	2.96±0.06bc	4.83±0.06b	4.35±0.11c	3.78±0.08c
	150	83.44	65.54	51.22	2.04±0.05a	2.19±0.05c	4.31±0.03c	2.87±0.04d	2.70±0.10d
	200	76.36	35.48	3.55	2.04±0.04a	2.58±0.50c	3.73±0.09d	2.63±0.09e	2.13±0.02e
碳酸钠 Sodium carbonate	0	100.00	95.00	85.00	2.00±0.00a	4.13±0.10a	6.29±0.21a	8.06±0.05a	6.26±0.07a
	50	85.67	66.53	54.84	2.00±0.01a	3.21±0.01b	3.73±0.05b	3.10±0.02b	2.85±0.05b
	100	80.74	63.22	50.33	2.01±0.06a	2.92±0.01c	3.57±0.40bc	2.75±0.08bc	2.70±0.09c
	150	76.56	59.63	38.91	2.05±0.05a	2.67±0.01d	2.68±0.02c	2.16±0.57c	2.42±0.02d
	200	70.23	34.55	2.63	2.00±0.00a	2.36±0.03e	2.40±0.01c	2.31±0.01c	2.30±0.01e

表 3 盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织渗透相关生理指标的影响

Table 3 Effects of saline-alkali stress on permeation-related physiological indicators of alfalfa callus

处理 Treatment	可溶性蛋白含量/(mg · g ⁻¹) Soluble protein content	可溶性糖含量/(μmol · g ⁻¹) Soluble sugar content	脯氨酸含量/(μg · g ⁻¹) Proline content	MDA 含量/(μmol · g ⁻¹) MDA content	相对电导率/% Relative conductivity
对照 Control	4.366±0.068d	29.283±1.095d	32.230±1.415d	8.297±0.027a	73.787±3.806a
NaCl(LC ₅₀)	6.228±0.034a	74.437±0.110a	80.753±0.974a	7.470±0.104d	61.500±0.954c
Na ₂ CO ₃ (LC ₅₀)	5.597±0.162c	43.834±0.295c	54.472±1.769c	8.052±0.084b	64.467±0.987b
NaHCO ₃ (LC ₅₀)	5.804±0.122b	59.096±0.244b	62.477±1.686b	7.881±0.011c	62.733±0.896bc

注:LC₅₀代表相关胁迫的半致死浓度。下同。

Note:LC₅₀ is the semi-lethal concentration of related stress. The same below.

导率。对于盐碱胁迫下愈伤组织可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸、MDA 和相对电导率的方差分析显示,不同胁迫处理间差异均显著($P<0.05$)。

2.4 NaN_3 与盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织渗透相关生理指标的影响

NaN_3 诱变苜蓿愈伤组织对 3 种盐碱胁迫 5 项渗透相关生理指标的变化见表 4, 3 种盐碱对 NaN_3 诱变苜蓿愈伤组织生理变化反应不一, NaN_3 诱变组和叠加 3 种盐碱诱变组的可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸含量均高于对照组, MDA 含量和相对电导率均低于对照组, 可溶性蛋白含量分别增加了 47.07%、53.57%、22.31% 和 47.69%, 可溶性糖含量分别增加了 24.79%、162.86%、58.36% 和 109.54%, 脯氨酸含量分别增加了 47.78%、162.86%、80.00% 和 107.25%, MDA 含量分别降低了 2.35%、11.17%、3.64% 和 5.54%, 相对电导率分别降低了 15.13%、17.96%、16.79% 和 17.28%。

除 $\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{Na}_2\text{CO}_3(\text{LC}_{100})$ 组外, 其它各诱变组的愈伤组织可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量均高于 NaN_3 诱变组和对照组, MDA 含量和相对电导率均低于 NaN_3 诱变组和对照组。在诱变的愈伤组织中, NaCl 和 NaHCO_3 胁迫组与 NaN_3 诱变组比较, 愈伤组织可溶性蛋白含量分别增加了 4.42% 和 0.42%, Na_2CO_3 胁迫组愈伤组织可溶性蛋

白含量降低了 16.84%; NaCl 、 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 3 种单盐胁迫后的愈伤组织可溶性糖含量分别增加了 110.64%、26.90% 和 67.91%, 脯氨酸含量分别增加了 77.87%、21.80% 和 40.24%, MDA 含量分别降低了 9.03%、1.32% 和 3.27%, 相对电导率分别下降了 3.34%、1.95% 和 2.54%。 NaN_3 诱变和盐碱胁迫可以促进愈伤组织可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸 3 种渗透物质的积累, 降低细胞膜电导率和细胞 MDA 含量, 诱变后 3 种盐碱比较, NaCl 胁迫下积累的渗透物质最多, 诱变与盐碱胁迫组方差分析显示, 3 种渗透调节物质差异显著($P<0.05$), MDA 和相对电导率差异显著($P<0.05$)。

2.5 苜蓿愈伤组织盐碱抗性的综合评价

游离脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖含量等渗透调节物质和相对电导率、MDA 含量均能反映植物渗透调节或细胞膜受到的伤害, 同时各指标中存在着一定的相关性和差异性, 在具体进行植物耐盐性评价时需要综合考虑。将苜蓿愈伤组织在各个处理下测定的可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸、MDA 和相对电导率等 5 项生理指标的数据代入隶属函数公式中计算出隶属度, 5 项生理指标隶属值见表 5。单一盐碱胁迫下的隶属值均高于对照组, NaN_3 + 盐碱胁迫的苜蓿愈伤组织的隶属值均高于对照和 NaN_3 诱变组, 说明苜蓿对盐碱胁迫有一定的抗性, 且 NaN_3

表 4 NaN_3 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织渗透相关生理指标的影响

Table 4 Effects of permeation-related physiological characteristics of alfalfa callus under NaN_3 mutagenesis and saline-alkali stress

处理 Treatment	可溶性蛋白含量 Soluble protein content $/(mg \cdot g^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(μmol \cdot g^{-1})$	脯氨酸含量 Proline content $/(μg \cdot g^{-1})$	MDA 含量 MDA content $/(μmol \cdot g^{-1})$	相对电导率/% Relative conductivity
对照 Control	4.366±0.068d	29.283±1.095e	32.230±1.415e	8.297±0.027a	73.787±3.806a
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50})$	6.421±0.108bc	36.543±0.979d	47.630±0.776d	8.102±0.054b	62.623±0.220bc
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{NaCl}(\text{LC}_{100})$	6.705±0.156a	76.974±0.179a	84.720±0.958a	7.370±0.040d	60.533±0.462c
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{Na}_2\text{CO}_3(\text{LC}_{100})$	5.340±0.108c	46.372±0.117c	58.015±0.850c	7.995±0.104b	61.400±0.458c
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{NaHCO}_3(\text{LC}_{100})$	6.448±0.130b	61.360±0.118b	66.798±0.958b	7.837±0.006cd	61.033±0.577c

注: LC_{100} 代表相关胁迫的致死浓度。下同。

Note: LC_{100} is the lethal concentration of related stress. The same below.

表 5 渗透相关生理指标隶属函数值

Table 5 Membership function values of permeation-related physiological indicators

处理 Treatment	可溶性蛋白 Soluble protein	可溶性糖 Soluble sugar	脯氨酸 Proline	丙二醛 MDA	相对电导率 Relative conductivity	隶属值 Membership value	排序 Order
对照 Control	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	8
$\text{NaCl}(\text{LC}_{50})$	0.796	0.947	0.924	0.892	0.927	0.897	2
$\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{LC}_{50})$	0.526	0.305	0.424	0.264	0.703	0.444	7
$\text{NaHCO}_3(\text{LC}_{50})$	0.615	0.625	0.576	0.449	0.834	0.620	4
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50})$	0.879	0.152	0.293	0.210	0.842	0.475	6
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{NaCl}(\text{LC}_{100})$	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{Na}_2\text{CO}_3(\text{LC}_{100})$	0.416	0.358	0.491	0.326	0.935	0.505	5
$\text{NaN}_3(\text{LC}_{50}) + \text{NaHCO}_3(\text{LC}_{100})$	0.890	0.673	0.659	0.496	0.962	0.736	3

诱变可以提高苜蓿愈伤组织对盐碱的抵抗能力。综合分析可知,隶属函数综合评价价值越大,表明抗盐碱性对苜蓿的渗透调节物质积累越多和膜脂透性的影响越小,则植物抗盐碱性越强。苜蓿愈伤组织在 NaN_3 诱变和单一盐碱胁迫下,抗盐碱的强弱顺序为: $\text{NaCl} > \text{NaHCO}_3 > \text{Na}_2\text{CO}_3$ 。

3 讨论与结论

3.1 NaN_3 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织生长的影响

组织培养技术与化学诱变育种结合,可提高突变频率和育种效率,不同的外植体对化学诱变剂的敏感性不同^[14-15],浓度高毒害大,诱变材料存活率低,浓度低,诱变效果差。因此,在诱导前应确定合适的处理浓度。本试验采用 NaN_3 作为诱变剂,依据愈伤组织在含 NaN_3 诱变培养基的存活率,确定其半致死浓度为 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,在相同 NaN_3 浓度处理下,愈伤组织随着处理时间的增加存活率和生物量降低,在同一处理时间下,愈伤组织随着 NaN_3 浓度增加存活率和生物量降低,这与罗雷等^[16]利用化学诱变剂诱导番茄耐低温突变体研究结果一致,说明 NaN_3 对愈伤组织的增殖有一定阻碍作用。

诱变突变发生的方向是不定向的,可根据实际需求选育突变类型做定向筛选,以获得所希望的具有某些性状改良的突变体。本试验在耐盐碱苜蓿突变体的筛选上,通过 NaN_3 诱变作用改变愈伤组织的生理特性,再经盐碱选择压力筛选抗盐碱突变体,以提高苜蓿愈伤组织对盐碱的耐逆性。因此,在诱导前对胁迫愈伤组织的盐碱浓度进行筛选,确定合适的盐碱胁迫浓度。常采用盐碱胁迫致死浓度作为处理浓度,对愈伤组织在含 NaCl 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 胁迫培养基上依据愈伤组织的存活率,确定苜蓿愈伤组织的致死浓度, NaCl 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 胁迫的致死浓度均为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这与赵邯邯等^[17]对玉米愈伤组织的耐盐性筛选研究,确定愈伤组织适宜 NaCl 选择压为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的研究结果相同。低 NaCl 、 NaHCO_3 盐碱浓度对愈伤组织的存活率和生物量影响相对较小,高浓度对愈伤组织的存活率和生物量影响较大, Na_2CO_3 胁迫对愈伤组织的存活率和生物量影响更大,与范小峰等^[18]研究 NaCl 胁迫下唐古特白刺愈伤组织生物量变化存在一定的差异:前者研究高浓度 ($> 200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) NaCl 胁迫愈伤组织生物量低于对照,而本研究中 NaCl 胁迫愈伤组织生物量均高于对照,可能是不同植物的耐受性不同。苜蓿具有一定

适应盐渍生境的能力,但对 3 种盐碱的抗性存在一定的差异性。

3.2 NaN_3 诱变和盐碱胁迫对苜蓿愈伤组织渗透相关生理代谢的影响

盐碱等逆境对植物产生直接或间接的水分胁迫,使植物体内主动积累各种有机物来提高细胞液浓度,降低细胞渗透势,提高细胞保水力,以适应逆境胁迫作用,即为渗透调节。细胞内合成的可溶性糖、脯氨酸等多种有机物质是多种植物体内最有效的渗透调节物质^[19-21]。同时,植物在受到逆境胁迫时,膜透性发生改变,膜脂过氧化产物 MDA 含量和相对电导率增加,因此,MDA 含量和相对电导率的高低与细胞膜的受伤害程度呈正相关。试验结果显示,在 3 种盐碱胁迫的半致死浓度下,MDA 含量和相对电导率均低于对照,可能是由于中苜 1 号对盐碱具有一定的抗性,使 3 种渗透调节物质大量积累,降低了膜质的过氧化程度和质膜的透性,增强了质膜应对逆境伤害程度的反应能力。与张玉霞等^[22]研究盐碱对芦笋胁迫效应时所发现的,低浓度的中性盐、碱性盐和混合盐处理均有利于芦笋的生长,降低了 MDA 和电导率的含量等结果一致。

化学诱变对植物的生理代谢途径和植物的抗逆性能产生一定的影响,温日宇等^[23]研究表明, NaN_3 能够引起绿豆的生理损伤,在低浓度诱变下损伤效应随浓度增加而提高。综合分析本试验的结果可以看出, NaN_3 诱变可以增强对细胞膜的保护能力,在应对盐碱胁迫压力下,苜蓿愈伤组织启动防御机制,通过可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸的积累调节细胞渗透势,降低伤害程度,保护原生质,减轻质膜受盐碱胁迫的伤害,防止细胞失水,保护生物大分子结构与功能的稳定,缓解苜蓿愈伤组织抵御盐碱胁迫带来的伤害。从苜蓿愈伤组织的 MDA 和相对电导率的变化分析,盐碱胁迫降低了愈伤组织 MDA 和相对电导率,在 NaN_3 诱变下,苜蓿愈伤组织的 MDA 和相对电导率含量下降的幅度不同,说明在同一胁迫反应条件下,愈伤组织对不同盐碱的反应不同。

试验通过 NaN_3 化学诱变和 3 种盐碱选择压力的筛选,确定 NaN_3 诱变半致死浓度为 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,致死浓度为 $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NaCl 和 NaHCO_3 胁迫半致死浓度为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Na_2CO_3 胁迫半致死浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 种盐碱胁迫致死浓度为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。一定浓度 NaN_3 诱变可以提高苜蓿愈伤组织的脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白的积累和降低 MDA 和相对电导率,以提高愈伤组织对 NaCl 、 NaHCO_3 和 Na_2CO_3 的抵抗能力。