

# DES 诱变与离体培养结合筛选 柱花草抗寒突变体的研究

王小华, 庄南生\*, 王英, 高和琼, 韩平原

(海南大学农学院, 海南 儋州 571737)

**摘要:**采用硫酸二乙酯(DES)在不同温度下对柱花草愈伤组织进行化学诱变处理,并结合添加有不同浓度 L-羟脯氨酸的培养基进行离体筛选,将经两步法筛选后存活的愈伤组织诱导成小苗,采用 1℃ 下光照培养 8 d 对小苗进行低温筛选,根据寒害程度将小苗分为 4 个等级。随机选取寒害程度最低的(一级伤害)小苗 2 株,分别切取其一部分茎段为外植体进行愈伤的诱导,其愈伤组织作为测定抗寒生理指标的材料。结果表明,DES 的浓度与愈伤组织的存活率呈负相关,处理的温度与愈伤组织的存活率亦呈负相关,0.4%DES(10℃, 2 h)处理的愈伤组织经两步筛选后其存活率最高,为 18.6%,而对照为 6.6%。经过两步法筛选后存活的愈伤组织诱导的小苗在低温筛选后得到 14 株一级伤害苗,而对照植株中未获得一级伤害苗。抗寒生理指标的测试表明,一级伤害小苗的抗寒能力显著强于对照株。

**关键词:**柱花草;硫酸二乙酯;L-羟脯氨酸;低温筛选;抗寒生理指标

**中图分类号:**S541.903.4;Q945.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-5759(2010)01-0263-05

\* 柱花草(*Stylosanthes guianensis*)是优良的热带、亚热带豆科牧草,原产于中、南美洲<sup>[1]</sup>。柱花草怕霜冻,耐寒性能差,在广东、广西等省区易受寒害,难结籽,严重地影响了柱花草的进一步推广种植和产量的提高<sup>[2]</sup>。因此,柱花草耐寒新品种的选育已提上新议程。虽然柱花草的植株再生体系已经成功建立<sup>[3]</sup>,但是利用组织培养和化学诱变相结合的方法对柱花草进行抗寒育种在国内外尚未见报道。在本实验中,笔者利用硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES)化学诱变结合添加 L-羟脯氨酸(L-hydroxyproline, L-Hyp)的筛选培养基对柱花草愈伤组织进行处理,旨在获得柱花草抗寒无性系变异植株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

热研 2 号柱花草(*S. guianensis* cv. Reyan 2)种子由中国热带科学院农牧研究所提供,DES 购自上海生物工程公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 愈伤组织及再生植株的获得** 参照蒋昌顺等<sup>[4]</sup>的方法诱导柱花草愈伤组织及再生植株,以柱花草愈伤组织作为化学诱变的材料。

**1.2.2 DES 溶液的配制与诱变处理** 利用过滤灭菌法配制成 0.2%, 0.4% 和 0.6% 的 DES (pH 值 7) 溶液,将愈伤组织切成 3 mm<sup>3</sup> 的小块后,浸泡于诱变液中,放入恒温摇床,转速 100 r/min。利用 3 种浓度的 DES 溶液对愈伤组织分别在 25, 20, 15 和 10℃ 四个温度梯度处理 2 h, 每个处理重复 3 次, 处理完后用无菌水洗净, 接种在愈伤组织诱导培养基, 1 周后观察其存活率, 存活率为经筛选存活的愈伤组织块数占筛选总数的百分比。

**1.2.3 筛选压力浓度的确定及抗性愈伤组织的筛选** 将对照愈伤组织接入添加有 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 和 0.6 g/L 浓度 L-Hyp 的愈伤组织诱导培养基中, 将褐化面积小于 50% 的愈伤记作为存活愈伤, 1 周后观察其存活率。参照郭岩等<sup>[5]</sup>的方法, 用两步法筛选抗性愈伤组织, 将诱变恢复 1 周后的愈伤组织切开转接到添加有较大致死剂

\* 收稿日期:2009-01-13;改回日期:2009-03-06

基金项目:华南热带农业大学博士科研启动基金项目(Rndy0502)资助。

作者简介:王小华(1984-),男,江西吉安人,在读硕士。E-mail:tedy\_cc@163.com

\* 通讯作者。E-mail:zhuangns@163.com

量 L-Hyp 的培养基,1 周后挑选存活的愈伤组织转接到不含 L-Hyp 的培养基,恢复 1 周后再挑选生长良好的愈伤组织切开转接到添加有临界致死剂量 L-Hyp 的培养基。

**1.2.4 抗寒小植株筛选及抗寒等级的划分** 将两步法筛选得到的抗性愈伤组织增殖后,用芽诱导和芽增殖培养基诱导得到小苗,将长出的小苗放入 1℃低温光照培养箱中 8 d,以未经诱变处理和筛选的愈伤组织诱导的小苗作为对照,再将小苗放入 25℃下光照培养箱恢复 1 周。根据低温处理后小苗的萎蔫部分占整个植株的百分比,将低温伤害分为 4 个等级。一级、二级、三级和四级伤害,萎蔫部分分别占整个植株的 0~5%,5%~15%,15%~50%和 50%~100%。

**1.2.5 小植株抗寒生理指标的测定** 从一级伤害小植株和对照小植株中分别随机选取 2 株,分别记为 DES<sub>1</sub>、DES<sub>2</sub>、CK<sub>1</sub> 和 CK<sub>2</sub>,分别切取一部分植株的茎秆,接种于愈伤组织诱导培养基:MS (Murashige & Skoog media) +6-BA (6-benzylaminopurine) 4.0 mg/L+NAA (naphthyl acetic acid) 1.0 mg/L,取其愈伤组织用于各项抗寒生理指标的测定。

本实验采用测定常温下,以及在 1℃下光照培养 1,3,5,7 d 后的愈伤组织游离脯氨酸含量和超氧化物歧化酶活性。游离脯氨酸含量测定采用王韶唐<sup>[6]</sup>的方法。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用张志良和瞿伟菁<sup>[7]</sup>的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗 L-Hyp 愈伤组织的获得和抗寒再生苗的筛选

#### 2.1.1 利用 DES 对柱花草愈伤组织处理后的存活率

愈伤组织的存活率随着 DES 溶液浓度和处理温度的升高呈降低趋势(表 1)。参照 Bhagwat 和 Duncan<sup>[8]</sup>的研究结果,本实验采用表 1 中的 7 种不同的 DES 浓度和处理温度进行大量实验。7 种处理分别为 A:0.2%DES(25℃, 2 h)、B:0.2%DES(20℃, 2 h)、C:0.2%DES(15℃, 2 h)、D:0.2%DES(10℃, 2 h)、E:0.4%DES(15℃, 2 h)、F:0.4%DES(10℃, 2 h)和 G:0.6%DES(10℃, 2 h)。

**2.1.2 不同浓度 L-Hyp 培养基对对照柱花草愈伤组织的影响** 当 L-Hyp 浓度超过 0.3 g/L 时,愈伤的存活率急剧降低(图 1),当浓度达到 0.4 g/L 时存活率为 20%,并且在这些存活的愈伤中 90%左右都存在部分褐化现象,当浓度达到 0.5 g/L 时存活率仅为 3%,且存活的愈伤组织块全部都存在部分褐化现象,表明 L-Hyp 对柱花草愈伤组织的临界致死剂量大概是 0.5 g/L。本实验采用的两步筛选法,0.4 g/L 作为第 1 次筛选的浓度,0.5 g/L 作为第 2 次筛选的浓度。

**2.1.3 DES 处理愈伤后两步法筛选的结果** A、B、C 和 G 四个处理的愈伤组织经两步筛选后的存活率低于对照(表 2),这可能是因为 DES 药剂本身对愈伤组织有毒害作用,但值得注意的是,B 和 C 两个处理的愈伤组织经两步筛选后存活的愈伤组织块中存在有完全无褐化、生长良好的愈伤组织块,而对照处理经两步筛选后存活的愈伤组织块全都存在部分褐化现象。D、E 和 F 三种处理的愈伤组织经两步筛选后的存活率高于对照,这可能是因为 DES 药剂使愈伤组织发生了一

表 1 DES 对柱花草愈伤组织存活率的影响

Table 1 Effect of DES on the survival rate of callus from *Stylosanthes*

DES 浓度 Concentration of DES (%)	处理温度 Temperature of treatment (℃)	总数 Total number (块 Bit)	存活数 Surviving number (块 Bit)	存活率 Survival rate (%)
0.2	25	702	56	8
0.2	20	680	68	10
0.2	15	691	553	80
0.2	10	689	620	90
0.4	25	697	14	2
0.4	20	710	78	11
0.4	15	702	400	57
0.4	10	730	635	87
0.6	25	482	0	0
0.6	20	462	9	2
0.6	15	706	92	13
0.6	10	707	106	15

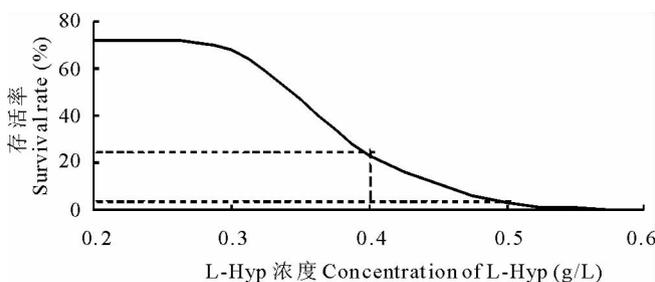


图 1 不同浓度 L-Hyp 培养基对对照柱花草愈伤组织的影响

Fig. 1 Effect of concentration's L-Hyp on the survival rate of callus from *Stylosanthes*

定的抗 L-Hyp 变异,其中 F 处理的愈伤组织存活率最高,为 18.6%,且大部分都是完全无褐化、生长良好的愈伤组织块。

**2.1.4 低温处理对再生苗的影响** C、D 和 F 三个处理最终都得到了表型抗寒能力最高(一级伤害)的小苗(表 3),总计 14 株,D 处理的一级伤害小苗获得率最高,为 3%。B、C、E、F 和 G 五个处理共得到 28 株二级伤害小苗,F 处理的二级伤害小苗获得率最高,为 4.7%。而对照苗中均未筛选出一级或二级伤害小苗。7 种处理得到的再生苗在总体上都表现出比对照高的表型抗寒能力。Dorffling 等<sup>[9]</sup>采用未经任何处理的小麦(*Triticum aestivum*)愈伤组织进行 L-Hyp 离体筛选,亦能获得抗寒突变体,而本实验对照经两步法筛选得到的愈伤只诱导出 2 株再生苗,经 1℃ 下 8 d 低温筛选后,发现皆为表型抗寒最弱的四级伤害苗,未得到抗寒再生苗。

**2.2 抗寒生理指标检测结果**

现阶段所有低温筛选得到的苗都未进行移栽,主要是因为一级伤害苗的数量太少,宜采用离体扩增得到更多的苗。瓶苗本身都是比较小的,不宜直接取其茎秆或叶片来测生理指标,通过切取其部分茎段诱导愈伤组织用于生理指标检测。

**表 3 1℃ 下 8 d 低温处理对具有抗 L-Hyp 愈伤组织诱导出的小苗的影响**

**Table 3 Effect of 1℃ -8 d-low temperature treatment on the plantlets induced from the L-Hyp resistant calluses**

处理 Treatment	诱导小苗植株数 Number of plantlets induced	筛选后存活植株数 Survival number after indoor selection			
		一级伤害 1 <sup>st</sup> injury	二级伤害 2 <sup>nd</sup> injury	三级伤害 3 <sup>rd</sup> injury	四级伤害 4 <sup>th</sup> injury
A 0.2%DES(25℃,2 h)	13	0(0)	0(0)	1(7.7)	12(92.3)
B 0.2%DES(20℃,2 h)	186	0(0)	2(1.1)	6(3.2)	178(95.7)
C 0.2%DES(15℃,2 h)	236	2(1.0)	6(2.5)	22(9.3)	206(87.3)
D 0.2%DES(10℃,2 h)	202	6(3.0)	0(0)	6(3.0)	190(94.0)
E 0.4%DES(15℃,2 h)	148	0(0)	6(4.0)	12(8.1)	130(87.8)
F 0.4%DES(10℃,2 h)	256	6(2.3)	12(4.7)	26(10.2)	212(82.8)
G 0.6%DES(10℃,2 h)	12	0(0)	2(16.6)	2(16.6)	8(66.6)
CK	246	0(0)	0(0)	14(5.7)	232(94.3)

注:括号内数字为各级伤害苗占该处理苗总数的百分数。

Note: Figures in brackets refer to each injury plantlets as percentages of total number of each treatments.

**2.2.1 小苗诱导愈伤组织的游离脯氨酸含量** 随着低温胁迫时间的增加,愈伤组织体内的游离脯氨酸含量不断增加(表 4)。在 1℃ 下 1 d 后,DES<sub>1</sub> 和 DES<sub>2</sub> 分别是 CK<sub>2</sub> 的 7.06 和 6.35 倍,在 1℃ 下 7 d 后,DES<sub>1</sub> 和 DES<sub>2</sub> 虽分别由峰值降为 278.81 和 300.34 μg/g,但是这 2 个值都高于 CK<sub>1</sub> 和 CK<sub>2</sub> 在整个过程的峰值。以上结果表明,低温胁迫下,一级伤害小苗具有显著高于对照的累计脯氨酸的能力。

**2.2.2 各级伤害小苗诱导愈伤组织的 SOD 活性** 在低温处理前 5 d,SOD 活性都不断增加(表 5),低温处理 5 d

**表 2 两步法筛选对不同浓度 DES 不同温度下处理过的愈伤组织的影响**

**Table 2 Effect of the 2 step selection of the L-Hyp callus treated by DES under different temperature on the survival rate of callus from *Stylosanthes***

处理 Treatment	处理总数 Total number (块 Bit)	筛选后存活数 Number of surviving callus after selections (块 Bit)	存活率 Survival rate (%)
A 0.2%DES(25℃,2 h)	2 756	3	1.1
B 0.2%DES(20℃,2 h)	1 567	5	3.2
C 0.2%DES(15℃,2 h)	2 365	11	4.6
D 0.2%DES(10℃,2 h)	2 004	20	10.0
E 0.4%DES(15℃,2 h)	1 980	14	7.1
F 0.4%DES(10℃,2 h)	1 235	23	18.6
G 0.6%DES(10℃,2 h)	987	2	2.0
CK	302	2	6.6

注:处理总数是第 1 次筛选时的愈伤总数,筛选后的存活数是经两步筛选后存活的愈伤总数。

Note: The total number was the number of the callus for the first step selection, and the surviving number after selections was the number of the surviving callus after the 2 steps selection.

后,都减少,在整个过程中,同一低温处理下,抗寒系的 SOD 活性都高于对照。1℃下 3 d,CK<sub>1</sub>、CK<sub>2</sub> 和 DES<sub>1</sub> 的差异未达到极显著,1℃下 7 d,CK<sub>2</sub> 和 DES<sub>2</sub> 的差异也未达到极显著,在 1℃下 7 d,DES<sub>1</sub> 是 CK<sub>1</sub> 的 1.86 倍,为各时期差异最大值。值得注意的是,当低温胁迫 7 d 后 DES<sub>1</sub> 降低为 302.26 U/g FW,这一数值比 CK<sub>1</sub> 的峰值 295.73 U/g FW 还高。以上分析说明,在整个低温胁迫过程中,抗性系整体表现出更强的 SOD 活性。

表 4 从一级伤害和对照小苗所诱导愈伤组织在各低温处理下的游离脯氨酸含量

Table 4 Proline content of the calluses induced from the plantlets of the 1<sup>st</sup> chilling injury and CK shoots under different low temperature stress

处理时间 Duration of treatment (d)	CK <sub>1</sub>	CK <sub>2</sub>	DES <sub>1</sub>	DES <sub>2</sub>	μg/g
0	42.64±3.67 B	21.56±2.44 C	53.99±2.75 A	51.46±3.66 A	
1	71.10±3.40 B	26.37±4.03 C	186.20±18.67 A	167.35±9.67 A	
3	210.47±12.38 B	222.80±25.50 B	388.17±11.35 A	359.80±36.98 A	
5	243.07±24.38 B	227.36±20.47 B	380.46±34.67 A	350.74±26.34 A	
7	150.63±11.39 D	187.16±10.51 C	278.81±15.31 B	300.34±12.67 A	

注:同行中不同字母表示数值之间的差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

Note: Different letters in the same row mean significant difference at 0.01 level. The same below.

表 5 从一级伤害和对照小苗所诱导愈伤组织在各低温处理下的 SOD 活性

Table 5 SOD activity in the calluses induced from the plantlets of the 1<sup>st</sup> chilling injury and CK shoots under different low temperature stress

处理时间 Duration of treatment (d)	CK <sub>1</sub>	CK <sub>2</sub>	DES <sub>1</sub>	DES <sub>2</sub>	U/g FW
0	164.19±2.34 A	159.93±11.42 A	179.42±36.78 A	179.87±22.34 A	
1	239.69±25.65 B	231.68±13.53 B	296.57±24.98 A	292.14±12.12 A	
3	283.43±55.04 AB	257.62±39.25 B	341.30±26.07 AB	345.18±34.78 A	
5	295.73±10.56 B	329.19±18.56 B	413.61±41.67 A	424.56±11.88 A	
7	162.11±34.47 C	172.88±41.51 BC	302.26±9.80 AB	243.50±5.75 B	

### 3 结论与讨论

在 DES 用来诱变植物愈伤组织的实验中,其处理时间一般不超过 2 h<sup>[10]</sup>,本实验的 DES 诱变处理时间都采用 2 h,而通过采用改变处理液的温度来改变其诱变效果。一般 DES 诱变实验的处理温度为室温(25℃),而本实验的研究结果表明,最佳处理为 0.4%DES 在 10℃下处理愈伤组织 2 h。这说明在使用半衰期较短的烷化剂进行化学诱变实验时,考虑到温度对其诱变效果和毒性都存在影响,应该严格设置不同温度梯度,寻找适合的处理温度。一概地使用室温(25℃),可能会错过更好诱变效果的处理,而根本不控制其处理时的温度,则更会导致在相同处理下其实验结果偏差较大。

确定了采用两步法筛选柱花草抗性愈伤组织,第 1 步和第 2 步筛选的 L-Hyp 浓度分别为 0.4 和 0.5 g/L,总计筛选得到一级伤害苗 14 株。测定愈伤组织的抗寒生理指标能够很好的反映出植株的抗寒能力。张栋梁等<sup>[11]</sup>通过测定茄子(*Solanum melongena*)抗性系愈伤组织及其再生苗的电导率、游离脯氨酸含量和丙二醛含量等抗寒生理指标发现,愈伤能够很好的体现其再生苗的抗寒水平。愈伤组织生理指标的检测结果表明,一级伤害和对照在多项生理指标上有明显区别,说明所得植株是变异体的可能性较大,但再生植株所表现的抗寒性是否属于基因水平上的变异,以及是否能够在有性繁殖世代中保持,仍需进一步研究。

### 参考文献:

[1] 庄南生,王英,唐燕琼,等.超声波处理柱花草种子的生物学效应研究[J].草业科学,2006,23(3):80-82.

- [2] 陈三有. 柱花草生产利用技术现状及展望[J]. 中国草地, 2000, (4): 64-67.
- [3] 刘进平, 李早霞, 吴发红, 等. 柱花草高频植株再生体系的建立[J]. 草业学报, 2005, 14(5): 66-68.
- [4] 蒋昌顺, 邹冬梅, 张义正. 柱花草的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 33.
- [5] 郭岩, 张耕耘, 陈少麟, 等. 抗羟脯氨酸水稻变异系的筛选及其特性的研究[J]. 实验生物学报, 1993, 26(2): 19-21.
- [6] 王韶唐. 植物生理学实验指导书[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986.
- [7] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [8] Bhagwat B, Duncan E J. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa*, spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense using chemical mutagens[J]. Scientia Horticulturae, 1998, 73: 11-22.
- [9] Dorffling K, Dorffling H, Lesselich E, et al. Heritable improvement to frost tolerance in winter wheat by in vitro selection of hydroxyproline resistant proline over producing mutants[J]. Euphytica, 1997, 93: 1-10.
- [10] 李波, 贾秀峰. 诱变苜蓿愈伤组织抗寒性研究[J]. 草地学报, 2004, (2): 95-97.
- [11] 张栋梁, 徐跃进, 陈建军. 离体筛选茄子抗羟脯氨酸突变体的初步研究[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(7): 804-809.

### Research on screening of *Stylosanthes* mutants with enhanced chilling resistance by a combination of DES mutagenesis and in vitro selection

WANG Xiao-hua, ZHUANG Nan-sheng, WANG Ying, GAO He-qiong, HAN Ping-yuan  
(College of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** Cut cotyledons of *Stylosanthes guianensis* cv. Reyan 2 seedling plants were used for explant production based on in vitro callus multiplication techniques. DES mutagenesis was applied under different temperatures in combination with in vitro selection on L-Hyp containing medium for induced callus production. The survivors from this 2 step in vitro selection of L-Hyp to plantlets, were subjected to 1°C—8 d low temperature selection, and the plantlets were then classified according to chilling injury into 4 grades. Randomly selected two plantlets with the lowest level of chilling injury (1<sup>st</sup> chilling injury), were taken at random and part of the stems were cut off for callus induction. These calluses were tested for physiological indices of cold resistance. The survival rate of calluses treated at the lowest temperatures was higher under the same concentrations of DES. Treatment with 0.4% DES (10°C, 2 h) for callus had the best survival rate (18.6%), which was significantly better than the 6.6% of the CK. Fourteen plantlets of the 1<sup>st</sup> chilling injury were obtained from those that survived the 2 step in vitro selection of L-Hyp after low temperature selection, while there were no surviving plantlets from the CK. The 1<sup>st</sup> chilling injury plantlets had a significantly better cold tolerance than those from the CK.

**Key words:** *Stylosanthes*; DES; L-hydroxyproline; low temperature selection; physiological indices of cold resistance