

文章编号: 1001-411X(2001)03-0050-03

胡萝卜抗 HgCl_2 变异细胞系的筛选

傅雪琳¹, 何平², 朱庆麟³

(1 华南农业大学农学系, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州 510642;

3 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 利用胡萝卜下胚轴愈伤组织, 以 HgCl_2 为选择剂, 通过多步正筛选法, 获得了抗性变异细胞系. 抗性鉴定结果表明, 在不同 HgCl_2 浓度的培养基上, 抗性系的愈伤组织存活率和鲜质量增殖率均明显高过亲本系, 抗性系的细胞膜透性也发生了变化. 对抗性系和亲本系愈伤组织进行再分化的结果表明, 在连续 3~4 代的分化培养之后, 愈伤组织都能再生绿苗. 提出了该项研究在预防和治理重金属污染方面的重要意义.

关键词: 胡萝卜; 抗性变异细胞系; 重金属污染

中图分类号: Q319.33

文献标识码: A

环境污染是世界环境恶化的重大问题之一, 随着现代工业的迅猛发展而愈加严重. 其中工业“三废”中的重金属污染所致农田污灌、土壤污染、农作物产品重金属污染, 已严重威胁到人类及家禽家畜的健康. 因此, 对土壤、农田灌溉水的重金属污染与农作物之间关系及防护技术的研究越来越受重视^[1]. 利用植物细胞工程技术, 在离体条件下筛选抗重金属的突变体, 可以为抗逆性育种创造新的种质资源, 同时也可环境的生物监测提供可能的依据. 众所周知, 胡萝卜是用于组织培养的经典植物, 其愈伤组织的诱导与植株再生技术已经成熟, 以胡萝卜愈伤组织为材料, 以 HgCl_2 为选择剂进行抗汞突变体的筛选及抗性体的特性研究, 在理论研究和实际应用上都有着积极意义.

1 材料与方法

所用胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 材料为 Burpee darwas halflong.

愈伤组织的诱导: 将胡萝卜种子在超净工作台上用 1 g/L 升汞浸泡 4~5 min, 用无菌水冲洗 4 次, 接种到发芽培养基. 待子叶充分展开, 取幼苗于无菌培养皿中, 切取下胚轴成 l 为 2~4 mm 的切断, 接种到愈伤组织诱导培养基上.

HgCl_2 抗性变异细胞系的筛选: 选择经 4 次继代、生长稳定、均匀一致的愈伤组织作筛选的材料. 多步正筛选按 $c(\text{HgCl}_2)$ 不断增高的程序逐代进行. 每代选留存活或生长相对旺盛的愈伤组织进入下代筛选过程, 所经过的筛选代数及 $c(\text{HgCl}_2)/$

$(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: $S_1 0.2 \rightarrow S_2 0.5 \rightarrow S_3 0.8 \times 10^{-3} \rightarrow S_4 1.1 \times 10^{-3} \rightarrow S_5 0.8 \rightarrow S_6 1.2 \rightarrow S_7 1.6$. 一步正筛选的 $c(\text{HgCl}_2)$ 开始即为 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 经过的选择程序为: $0 \rightarrow 2.0 \rightarrow 0$. 以同步继代的无 HgCl_2 的正常条件下的愈伤组织作为亲本系.

抗性变异细胞系的抗性鉴定与分化: 将多步正筛选法在最高代存活的愈伤组织在无 HgCl_2 的正常继代培养基上继代繁殖 3 代后, 部分用于抗性鉴定, 部分转入分化培养基进行绿苗再生. 抗性鉴定的 $c(\text{HgCl}_2)/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 梯度为: 0、0.5、0.7、0.8、1.0、1.2、1.4、2.0. 培养 30 d 后统计存活率和鲜质量增量变化, 以同步继代的亲本系作对照.

细胞膜透性测定: 采用紫外分光光度计法, 以抗性系和亲本系在含不同 $c(\text{HgCl}_2)$ 培养基上的存活愈伤组织进行测定. 重复 3 次.

培养基的使用: 诱导愈伤组织的培养基为 $\text{MS} + 2, 4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 筛选培养基为 $\text{MS} + 2, 4\text{-D } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{HgCl}_2$. 绿苗分化培养基为: MS (大量元素减半) + $\text{KT } 1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.25 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2 结果与分析

2.1 抗性变异细胞系的筛选

在采用多步正筛选法进行的筛选中, 随选择压 $c(\text{HgCl}_2)$ 增高, 愈伤的存活率下降 (表 1), 增殖速度减慢, 受毒害程度加剧, 愈伤组织由鲜绿色变为暗绿

收稿日期: 2001-03-12

作者简介: 傅雪琳 (1967-), 女, 讲师, 硕士.

表 1 胡萝卜 HgCl₂ 抗性变异细胞系的多步正筛选

Tab. 1 The multi-step selection of carrot HgCl ₂ resistant variant cell line			
选择代数 selection generation	接种愈伤数 no. of callus inoculated	愈伤存活数 no. of callus survival	存活率 ratio of callus survival / %
S ₁	400	400	100.0
S ₂	400	98	24.5
S ₃	220	201	91.4
S ₄	275	245	89.1
S ₅	465	356	76.6
S ₆	350	133	38.0
S ₇	245	41	16.7
CK	150	150	100.0

色或灰白色或褐色,死亡愈伤组织结构稀软、离散,在从低代到高代的选择进程中,存活的愈伤组织的外观表现与生长势逐渐变弱,均不如正常继代的亲本系(亲本系愈伤组织呈颗粒状、鲜绿色、致密,增殖快,生长旺盛).将在最高选择代存活并增殖的愈伤组织暂作为抗性变异细胞系.在采用一步正筛选法时,接种的第3 d 愈伤组织开始变为灰白色,以后部分变褐死亡,将灰白色的部分愈伤组织转接在无 Hg-Cl₂ 的正常培养基上,培养数天后,愈伤组织仍未见生长,说明 2.0 mmol·L⁻¹ 的 HgCl₂ 浓度已经对胡萝卜愈伤组织完全致死.

2.2 抗性变异细胞系的 HgCl₂ 抗性鉴定

抗性系抗性鉴定的结果(图 1, 图 2)表明,在不同 c(HgCl₂) 培养基上,抗性系与亲本系的愈伤存活率及平均每块愈伤鲜质量增殖率有相似的变化趋势,但在同一浓度上,抗性系与亲本系差异显著(在 2.0 mmol/L 浓度上均死亡).

2.3 抗性系细胞膜透性变化

将抗性系与亲本系在 HgCl₂ 浓度梯度培养基上

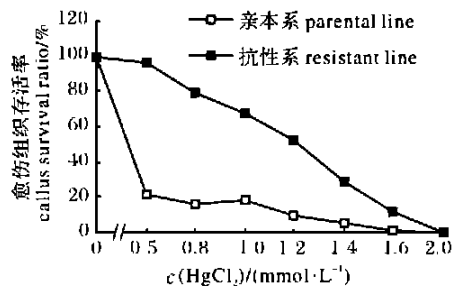


图 1 抗性系的愈伤组织存活率变化
Fig. 1 The change of resistant line' callus survival ratio

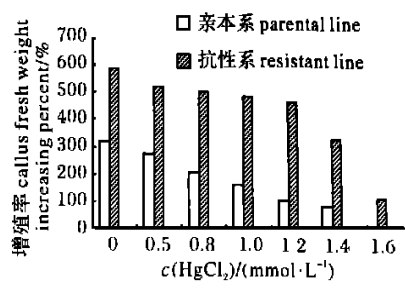


图 2 抗性系愈伤组织鲜质量增殖率变化
Fig. 2 The resistant line' s callus fresh weight increasing percent

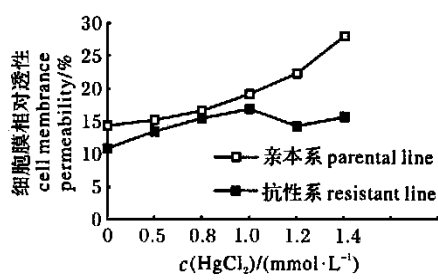


图 3 抗性系细胞膜相对透性变化
Fig. 3 The change of resistant line' s cell membrane permeability

生长 15 d 后的愈伤组织进行细胞膜相对透性测定的结果(图 3)表明,随着培养基中 HgCl₂ 浓度提高,抗性系与亲本系的细胞膜相对透性均增大,相比之下,抗性系的膜透性始终低于亲本系,且变化较平缓,尤其在高浓度培养基上.说明亲本系愈伤组织受到的毒害大于抗性系,即抗性系有较强的对汞毒的忍耐性.

2.4 抗性系愈伤组织的再分化

在无激素培养基和加有不同激素配比的分化培养基上交替进行愈伤组织的培养,以诱导绿苗再生.结果(图 4)表明,无论是亲本系还是抗性系,均能产生胚状体,进而再生绿苗,且两者都有较高的绿苗再生率.在胚状体发生时,绿色愈伤组织先长出白色小



图 4 抗性系愈伤组织绿苗分化情况
Fig. 4 The green shoot regeneration of the resistant line

颗粒, 其外观干硬, 随时间推移, 白色小颗粒长大成胚样结构, 最后长出绿芽, 并长大成苗. 此项研究历时近 2 a, 胡萝卜愈伤组织仍保持了较高的再生能力. 同时, 在分化培养基上愈伤组织也具有一定的增殖能力.

3 讨论

3.1 已有的研究表明, 在植物抗病、抗盐^[2]、抗除草剂^[3]等突变体的离体筛选中, 通过在培养基中添加一定的物质、作为选择压力所进行的研究具有可行性和有效性. 本研究以 HgCl₂ 为选择压进行胡萝卜抗汞变异细胞系的筛选, 获得了具有一定抗性的变异细胞系, 并能分化成苗, 有必要在愈伤水平和植株水平对抗性系的汞含量做进一步的测定分析研究, 以探明其抗汞机理及种子后代的抗性稳定性.

3.2 在对农作物尤其是蔬菜的重金属污染处理方面, 人们认为开展抗各种重金属污染的蔬菜品种的筛选, 有针对性地种植对重金属有较强抗性的品种是一条重要的途径^[4]. 由于不同植物的不同组织器官对不同的重金属有不同的吸收和富集能力, 选择在不同重金属污染的地区种植不同植物, 或以之作为生物监测的指示植物^[5,6], 或利用有“超级富集”作用的植物来清除被污染的土壤及水域中的重金属^[7]. 因此, 通过不同途径筛选和培育对重金属具有抗性或“超级富集”作用的植物品种显得更为重要,

本研究是一个有益的尝试.

参考文献:

[1] 任安芝, 高玉葆, 刘 爽, 铬、铅胁迫对青菜叶片几种生理生化指标的影响[J]. 应用与环境生物学报. 2000, 6(2): 112—116.

[2] 周荣仁, 杨燮荣, 季玉鸣, 等. 烟草耐盐愈伤组织变异体的筛选与再生植株后代的耐盐性[A]. 陈 英. 植物体细胞无性系变异与育种[C]. 江苏: 江苏科学技术出版社. 1991. 302—312.

[3] 叶 斌, 陆维忠, 黄裕泉, 等. 小麦抗(耐)除草剂细胞突变体筛选及植株再生[J]. 陈 英. 植物体细胞无性系变异与育种[C]. 江苏: 江苏科学技术出版社. 1991. 335—340.

[4] 许炼烽, 郝兴仁, 冯显湘. 城市蔬菜的重金属污染及其对策[J]. 生态科学. 2000, 19(1): 80—85.

[5] DUDKA S, PIOTROWSKA M, TERELAK H. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: A field study [J]. 1994, (2): 181—188.

[6] MARTIN H W, YOUNG T R, KAPLAN D L, et al. Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium[J]. Plant & Soil. 1996, 182(2): 199—207.

[7] FELIX H. Fields trials for in situ decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metalaccumulating plants [J]. Zeitschrift fuer Pflanzenemaehung und Bodenkunde. 1997, 160(5): 525—529.

Selection of the Carrot Variant Cell Line Resistant to HgCl₂

FU Xue-lin¹, HE Ping², ZHU Qing-lin³

(1 Dept. of Agronomy, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;

2 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;

3 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100 China)

Abstract: The carrot variant cell line resistant to HgCl₂ was selected through multi-step selection from even and stably-growing calli of carrot hypocotyl. The result of resistance identification showed that when adding different concentration of HgCl₂ to the culture medium, the calli survival ratio and fresh weight increasing percentt of the resistant line were significantly higher than those of the parental line, and the cell membrane permeability of the resistant line changed too. The callus differentiation result showed both the parental line and the resistant line regenerated green shoots from the long-term subcultured calli through 3—4 generations differentiation. And the important of this study to prevent and control environmental contaminations was put forward.

Key words: carrot; resistant variant cell line; heavy metal contamination

【责任编辑 周志红】