

组培条件下中国南瓜杂交种耐盐材料的筛选

周俊国^{1,2} 朱月林¹ 刘正鲁¹ 王建国¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 河南科技学院园艺系, 河南 新乡 453003)

摘要:在组培条件下以 69 份中国南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch.) 杂交种和 4 份商品种为试验材料, 研究中国南瓜杂交种的耐盐状况, 确定筛选耐盐材料的适当 NaCl 浓度。结果表明, 中国南瓜杂交种在不同 NaCl 浓度处理下存在明显的耐盐性差异, 69 份杂交种在 120mmol/L NaCl 浓度处理下的盐胁迫指数介于 29.94~100 之间, 呈正态分布, 有 6 份杂交种表现出较高的耐盐性, 其中 360-3 × 112-2 杂交种最耐盐。认为在组培条件下采用 120mmol/L NaCl 浓度处理中国南瓜幼苗是一种有效筛选耐盐材料的方法。

关键词:组培; 中国南瓜杂交种; 耐盐材料; 筛选

SELECTION OF SALT-TOLERANT MATERIALS OF PUMPKIN HYBRIDS *in vitro*

ZHOU Jun-guo^{1,2} ZHU Yue-lin¹ LIU Zheng-lu¹ WANG Jian-guo¹

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, 210095;

2. Horticultural Department of Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan, 453003)

Abstract: 69 hybrids and 4 commercial varieties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) were used for the study of salt-tolerance. NaCl concentration for selecting salt-tolerant material *in vitro* was determined. The results showed that there were significant differences in salt tolerance among 10 tested materials with 6 salinities (0, 40, 80, 120, 160, 200 mmol/L). The salt stress index (SSI) of seedlings of 69 pumpkin hybrids ranged from 29.94 to 100, and the frequency distribution was normal by normal test. 6 salt-tolerant hybrids were obtained, among the hybrid "360-3 × 112-2" showed the strongest salt tolerance. 120 mmol/L NaCl was determined as an effective concentration to select salt-tolerant materials from pumpkin hybrid seedlings.

Key words: *in vitro* culture; hybrid of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.); salt-tolerant material; selection

植物组织培养技术具有环境条件易控制、快速等优点, 在组培条件下进行耐盐突变体的筛选是近十几年来种质资源创新的主要方法, 已在葡萄^[1]、苹果^[2]、杨树^[3]、番茄^[4]等 40 多种作物^[5]上有所研究, 而利用种苗在含盐培养基筛选耐盐材料鲜有报道。中国南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch.) 是南瓜属中的一个主要栽培种, 在我国分布范围广, 资源丰富, 适应性强, 在瓜类栽培中常用作砧木^[6]。本试验采用组织培养技术, 以中国南瓜发芽种子为接种材料, 在培养基中添加不同浓度的 NaCl, 以探究中国南瓜杂交种的耐盐状况, 确定耐盐材料筛选的适当 NaCl 浓度, 为进一步从中国南瓜中选育出耐盐砧木奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

河南科技学院南瓜研究组于 2000 年开始在全国各地收集了 900 余份中国南瓜 (*Cucurbita moschata* Duch.) 农家品种资源, 经过 4 年的自交分离, 部分资源的性状已基本纯合。2005 年选取纯化程度高, 生长势较强的 40 个自交系配组杂交, 获得了 69 份杂交种。以这 69 份杂交种及从市场购买的 4 个中国南瓜品种 (蜜本、黄狼、无蔓 1 号和大地金钩) 为试验材料。

1.2 组织培养

收稿日期: 2006-10-18

基金项目: 江苏省科技厅资助项目 (BC2003306)

作者简介: 周俊国 (1967-), 男, 河南内乡人, 副教授, 博士研究生, 主要从事园艺植物育种和蔬菜栽培生理研究。E-mail: junguo1020@163.com

通讯作者: 朱月林 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为蔬菜栽培生理和生物技术。

种子精选后小心剥去种壳,在无菌工作台上用 75% 乙醇表面消毒 30s 后,用 0.1% HgCl_2 消毒 10min, 无菌水漂洗 5 次,接种于无菌的、内垫 2 层滤纸的 $\Phi 12\text{cm}$ 培养皿中,添加 3~5ml 无菌水,封口膜封口,在黑暗、恒温($27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$)条件下催芽,直至胚根长度为 5~10mm 时接种。培养容器为直径 6cm、高 9cm 的圆柱形玻璃瓶,内装约 40ml 不同浓度 NaCl 的 MS 培养基,接种后用专用聚乙烯塑料盖封口。室温为 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 下培养,光照时间 12h/d,光照度 $56\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.3 试验设计

1.3.1 NaCl 浓度胁迫试验 为了确定中国南瓜进行盐胁迫筛选的 NaCl 适宜浓度,随机选取 6 份杂交种 (360-3 $\times$ 112-2、360-3 $\times$ 42-1、112-2 $\times$ 42-1、112-2 $\times$ 360-3、42-1 $\times$ 360-3、42-1 $\times$ 112-2) 和市场购买的 4 份商品种做系列浓度的 NaCl 胁迫处理。将已发芽的种子分别接种在 NaCl 浓度为 0、40、80、120、160、200mmol/L 的 MS 培养基上,每份材料不同处理接种 36 粒发芽种子,每瓶 4 粒,共接种 9 瓶,在培养架上随机区组排列,3 次重复。接种 10d 后,调查幼苗的盐害状况。

1.3.2 单一 NaCl 浓度胁迫筛选试验 将 69 份中国南瓜杂交种的发芽种子分别接种在附加 NaCl 浓度为 120mmol/L 的 MS 培养基上,各接种 30 粒,接种 10d 后,调查幼苗的盐害状况,进而筛选出耐盐的杂交种材料。培养条件、培养容器、分组排列方法同上。

1.4 盐害调查、盐胁迫指数及半致死盐浓度的计算

NaCl 胁迫后 10d 按单株调查幼苗盐害级别。按单株幼苗受害程度和生成侧根数目的多少将幼苗的盐害

程度分成 0~4 级,分级标准参考张云起^[7]的方法并稍做修改。0 级:正常生长;1 级:幼苗生长稍受抑制,侧根数目在 6 条以上;2 级:幼苗生长受到抑制,侧根数目 3~6 条;3 级:幼苗生长严重受到抑制,侧根数目只有 1~2 条;4 级:幼苗没有表现出明显生长,无侧根。

根据所调查的盐害级别,分别计算各个重复不同 NaCl 浓度胁迫下幼苗的盐胁迫指数 (salt stress index, SSI)。

盐胁迫指数 (SSI) = $\Sigma(\text{代表级值} \times \text{株数}) / (\text{最高级值} \times \text{总株数}) \times 100$

以各材料的不同 NaCl 浓度作为自变量(x)、SSI 作为应变量(y),进行线性回归分析,建立回归方程 $Y = aX + b$,求出 SSI 为 50 时不同材料的 NaCl 浓度,以此值作为幼苗耐盐的临界值,即半致死盐浓度。

1.5 统计分析

采用 Microsoft Office Excel 2003 软件对数据做预处理,用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析,并对平均数作 Duncan's 新复极差法多重比较。

2 结果与分析

2.1 NaCl 浓度胁迫对不同中国南瓜幼苗盐胁迫指数的影响

由表 1 可知,同一盐浓度胁迫下,不同材料幼苗的 SSI 存在明显差异。随着 NaCl 浓度的增加,各个材料幼苗的 SSI 均呈升高趋势,NaCl 浓度与 SSI 均呈极显著正相关。

表 1 NaCl 浓度对不同中国南瓜幼苗盐胁迫指数 (SSI) 的影响

Table 1 Effects of NaCl concentration on the salt stress index (SSI) of pumpkin seedlings of different hybrids

材料 materials	NaCl 浓度 NaCl concentration (mmol/L)						回归方程 equation of linear regression	相关系数 coefficient of correlation	半致死盐浓度 lethal salt concentration (mmol·L ⁻¹)
	0	40	80	120	160	200			
360-3 $\times$ 112-2	0	4.17 d	26.39 d	29.94 e	69.54 e	80.56 c	$Y = 0.0043X - 0.0793$	0.9353**	134.72
360-3 $\times$ 42-1	0	0.00 d	27.78 d	55.56 c	93.06 b	100 a	$Y = 0.0058X - 0.1157$	0.9506**	106.16
112-2 $\times$ 42-1	0	29.17 bc	61.11 ab	86.11 a	97.22 a	100 a	$Y = 0.0052X + 0.1019$	0.9276**	76.56
112-2 $\times$ 360-3	0	26.39 c	30.56 d	45.83 d	83.33 c	97.22 a	$Y = 0.0048X - 0.0079$	0.9567**	105.81
42-1 $\times$ 360-3	0	27.78 c	30.56 d	40.28 d	78.33 d	94.44 b	$Y = 0.0045X - 0.0003$	0.9389**	111.18
42-1 $\times$ 112-2	2.08	33.30 b	53.13 b	73.96 b	100 a	100 a	$Y = 0.0051X + 0.0966$	0.9605**	79.10
蜜本 Miben	0	28.89 bc	45.40 c	75.17 b	94.08 b	100 a	$Y = 0.0052X + 0.0545$	0.9726**	85.67
黄狼 Huanglang	0	34.25 b	52.78 b	84.62 ab	100 a	100 a	$Y = 0.0052X + 0.0986$	0.9377**	77.19
无蔓 1 号 Wuman No. 1	0	42.56 a	68.77 a	89.35 a	100 a	100 a	$Y = 0.0062X + 0.1078$	0.9454**	63.26
大地金钩 Dadijingou	0	30.37 bc	51.56 b	85.70 a	95.36 ab	100 a	$Y = 0.0052X + 0.0842$	0.9424**	79.96

注:同列数值不同字母表示差异达 5% 显著水平。**指相关极显著。

Note: Different letters within the same column indicate significant difference at 5% level. **means significant at 1% level.

一方面,以 $SSI = 50$ 为界限,随着 $NaCl$ 浓度的提高,在不同 $NaCl$ 浓度下 SSI 超过 50 的材料个数在逐渐增加。当 $NaCl$ 浓度为 40mmol/L 时,各材料的生长不同程度受到了抑制,但 SSI 均未达到 50, $360-3 \times 112-2$ 和 $360-3 \times 42-1$ 的 SSI 最低,生长稍受抑制,与其他材料差异显著。当 $NaCl$ 浓度为 80mmol/L 时,有 5 份材料的 SSI 超过 50,另外 5 份材料的 SSI 未超过 50。当 $NaCl$ 浓度为 120mmol/L 时,有 7 份材料的 SSI 超过 50,只有 $360-3 \times 112-2$ 、 $42-1 \times 360-3$ 、 $112-2 \times 360-3$ 的 SSI 未超过 50,与其他材料差异显著, $360-3 \times 112-2$ 的 SSI 最低,与所有试验材料差异显著,表现出较强的耐盐性。当 $NaCl$ 浓度为 160mmol/L 时,10 份材料的 SSI 均超过 50,幼苗生长严重受到抑制,有 3 份材料的生长完全受到抑制。当 $NaCl$ 浓度为 200mmol/L 时,有 7 份材料的生长完全受到抑制,而杂交种 $360-3 \times 112-2$ 的 SSI 为 80.56,一些植株仍能生长,有侧根发生,表现出较强的耐盐性,与其他杂交种有显著区别。

另一方面,从 $NaCl$ 浓度与 SSI 值所建立的回归方程斜率大小可知,杂交种中 $360-3 \times 112-2$ 、 $42-1 \times 360-3$ 、 $112-2 \times 360-3$ 的斜率较小,说明 SSI 增加幅度小,表现出对 $NaCl$ 浓度变化的不敏感性,耐盐性较强。

另外,以各材料 $NaCl$ 浓度与 SSI 值建立的回归方程,进而求得的半致死盐浓度也能反映出 10 份材料的耐盐性差异。 $360-3 \times 112-2$ 的半致死盐浓度达 134.72mmol/L ,表现出极高的耐盐性,而无蔓 1 号南瓜的半致死盐浓度只有 63.26mmol/L ,耐盐性较低。

2.2 中国南瓜杂交种在单一 $NaCl$ 浓度胁迫下的盐胁迫指数

在不同 $NaCl$ 浓度处理下,浓度为 120mmol/L 时各材料间的 SSI 差异显著,10 份材料中有 3 份的 SSI 值没有超过 50,能区分材料间的耐盐性,而浓度为 80mmol/L 或 160mmol/L 时各材料的 SSI 过小或大,不易区分不同材料的耐盐性,因此,采用 120mmol/L 的 $NaCl$ 浓度进行中国南瓜杂交种幼苗耐盐性的筛选。

用 120mmol/L 的 $NaCl$ 浓度对 69 份中国南瓜杂交种进行耐盐性筛选,对它们的 SSI 值统计分析,结果表明,在 120mmol/L 的 $NaCl$ 浓度胁迫下有 2 份材料的幼苗完全停止了生长, SSI 值为 100,最小值是 $360-3 \times 112-2$,为 29.94,耐盐性最强,所有材料的 SSI 平均值为 63.66,标准差 18.41,说明中国南瓜杂交种幼苗的 SSI 差异较大。将 69 份材料的 SSI 值分成 7 组,组距 10.5,统计 SSI 各组的次数分布,经 χ^2 测验 ($\chi^2_{0.05} = 5.49$)符合正态分布(如图 1)。

选出 6 份 SSI 值最小的材料作为耐盐材料,分别

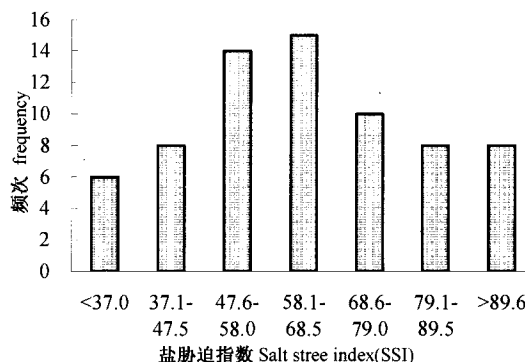


图 1 69 份中国南瓜幼苗在 $NaCl$ 胁迫下的 SSI 频次分布

Fig.1 Frequency distribution on SSI of 69 pumpkin seedlings under $NaCl$ stress

是 $360-3 \times 112-2$ ($SSI = 29.94$)、 $077-2 \times 112-2$ ($SSI = 30.87$)、 $360-3 \times 635-1$ ($SSI = 33.35$)、 $042-1 \times 041-1$ ($SSI = 34.75$)、 $042-1 \times 396$ ($SSI = 35.23$)、 $072-2 \times 112-2$ ($SSI = 36.34$),幼苗胁迫 10d 后每株能发生侧根 3~6 根,子叶完全展开,植株生长正常,表现出较强的耐盐性。

3 结论与讨论

本研究表明,中国南瓜杂交种幼苗在不同 $NaCl$ 浓度胁迫下的耐盐性存在明显差异,在中国南瓜资源中存在耐盐的材料,这与他人研究南瓜属中耐盐性的结果相一致^[8,9]。幼苗期是植物对盐胁迫较敏感的时期^[10-14],可以在很大程度上反映出该材料在其他时期的耐盐性,本试验通过对 10 份中国南瓜幼苗不同 $NaCl$ 浓度胁迫状况的比较,又经对 69 份中国南瓜在 120mmol/L $NaCl$ 浓度处理下的 SSI 值的统计分析,认为采用 120mmol/L $NaCl$ 的浓度处理中国南瓜幼苗可以筛选耐盐材料,通过本试验筛选出 $360-3 \times 112-2$ 、 $077-2 \times 112-2$ 、 $360-3 \times 635-1$ 等 6 份耐盐的杂交种,其中表现以 $360-3 \times 112-2$ 最耐盐,但有待进一步试验以便在生产上作为砧木使用。

植物的耐盐性是一个比较复杂的遗传体系,受到多个基因的控制^[15],在杂种后代可能出现显性效应和加性效应的遗传特征^[16]。本试验在培养基中以 120mmol/L $NaCl$ 浓度处理 69 份中国南瓜幼苗,调查所得的 SSI 值呈正态分布,也证实了中国南瓜的耐盐性在一个较大的群体中呈连续的数量性状特征,耐盐性受多个基因控制。

植物的耐盐性具有比较复杂的特征,受材料基因型、植株个体发育阶段以及环境条件等因素的影响,在

不同的试验技术条件下可能有不同的试验结果^[16]。关于瓜类材料的耐盐性筛选,前人多在幼苗期利用基质育苗添加不同浓度 NaCl 的方法进行^[7-9],其结果因采用不同的基质而出现不同的结果,且只能对数量有限的材料进行筛选,本研究在中国南瓜幼苗阶段采用组织培养技术,以克服环境因素对南瓜幼苗耐盐性的影响,为耐盐性结果的可靠性提供了保证。同时,组培条件下的耐盐性鉴定具有幼苗生长快,鉴定周期短,可同时准确进行大量资源材料耐盐性鉴定的优点。

参考文献:

- [1] 赵秀梅,张剑侠,王跃进.葡萄组培苗耐盐性研究.果树学报, 2005,22(3):202~206
- [2] 王海英,孙建设,马宝混,等.苹果砧木组培苗耐盐筛选技术研究.果树科学,2000,17(3):188~191
- [3] 张立钦,郑勇平,金佩英.用组织培养技术筛选杨树耐盐种质.浙江林学院学报,1996,13(4):397~404
- [4] Cano E A, Pérez-Alfocea F, Moreno V, et al. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998,53(1):19~26
- [5] 王仑山,王鸣刚,王亚薇.利用组织和细胞培养筛选作物耐盐突变体的研究.植物学通报,1996,13(2):7~12
- [6] 周宝利,林桂荣,李宁义.蔬菜嫁接栽培.北京:中国农业出版社, 1997
- [7] 张云起,刘世琦,杨凤娟,等.耐盐西瓜砧木筛选及其耐盐机理的研究.西北农业学报,2003,12(4):105~108
- [8] 李卫欣,陈贵林,赵利,等. NaCl 胁迫下不同南瓜幼苗耐盐性研究.植物遗传资源学报,2006,7(2):192~196
- [9] 朱进,别之龙,李娅娜.黄爪种子萌芽期及嫁接砧木幼苗期耐盐力评价.中国农业科学,2006,39(4):772~778
- [10] 方良俊,符小琴,等.诱抗剂对水稻幼苗耐盐性的诱导作用.核农学报,2006,20(4):273~276
- [11] 沈禹颖,王锁民,陈亚明.盐胁迫对牧草种子萌发及其恢复的影响.草业学报,1999,8(3):54~60
- [12] 孙月芳,陆瑞菊,等. NaCl 胁迫对不同基因型大麦花药离体培养的影响.核农学报,2006,20(1):19~22
- [13] 董晓霞,赵树慧,孔令安.苇状羊茅盐胁迫下生理效应的研究.草业学报,1998,15(5):10~13
- [14] 米海莉,许兴,马雅琴.小麦品种耐盐性的研究.干旱地区农业研究,2003,21(1):134~138
- [15] Mike Hasegawa, Ray Bressan. The dawn of plant salt tolerance genetics. Trends in Plant Science, 2000, 5(8):317~319
- [16] Flowers T J. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(396): 307~319

《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物研究所主办、科学出版社出版的核心期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及 NCBI、CABI 等 20 多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生,中学生物学教师等。

2005 年,《遗传学报》获得第三届国家期刊奖提名奖,2006~2007 年,连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自 2007 年起,《遗传学报》的外文刊名变更为 *Journal of Genetics and Genomics*。

《遗传学报》(ISSN 1673-8527, CN11-5450/R)为月刊,全年 12 期,国内邮发代号 2-819,国外发行代号: M63。2008 年定价 50 元,全年 600 元。期刊中文网址:遗传学报.cn

《遗传》(ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为月刊,全年 12 期。国内邮发代号 2-810,国外发行代号: M62。2008 年定价 40 元,全年 480 元。期刊中文网址:遗传.ca

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎发布广告!

联系地址:北京市安定门外大屯路:中国科学院遗传与发育生物研究所编辑室

主编:薛勇彪;编辑室主任:李绍武 E-mail:ycxb@genetics.ac.cn;yczz@genetics.ac.cn

邮政编码:100101;电话/传真:010-64889354,64807669

<http://www.Chinagene.cn> <http://jgenetgenomics.org>;中国遗传网.cn