



笃斯越桔耐弱碱突变体的离体筛选与鉴定

宋春艳, 宗长玲, 郑美香, 谭智文, 宗成文*

(延边大学 农学院, 吉林延吉 133002)

摘要:以笃斯越桔组培苗为试验材料,建立了 EMS 诱变体系,采用 EMS 诱变与 NaHCO_3 共同胁迫处理的方法,筛选耐弱碱候选突变体,并进行了相关生理指标的鉴定,以明确其突变体株系的耐弱碱能力。结果显示:(1)0.4% EMS 浸泡笃斯越桔茎段 4 h 为较适宜的诱变剂量,存活率达 46.7%;在含 0.1% EMS 的培养基中处理 3 d,存活率达 50.0%;EMS 浸泡处理后, NaHCO_3 适宜剂量为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,经 3 次交替培养后,筛选出 2 株候选耐弱碱突变体。(2)相关生理指标鉴定表明,2 株候选突变体的 SOD 和 POD 活性及游离脯氨酸含量显著高于对照,MDA 含量显著低于对照。研究表明,该研究获得的笃斯越桔候选突变体具有一定的耐弱碱能力。

关键词:笃斯越桔;EMS 处理;耐弱碱突变体;鉴定

中图分类号:Q319⁺5;Q344⁺12 **文献标志码:**A

in vitro Screening and Identification of Mutants with Weak Alkali-tolerance of *Vaccinium uliginosum* Linn.

SONG Chunyan, ZONG Changling, ZHENG Meixiang, TAN Zhiwen, ZONG Chengwen*

(Agriculture College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

Abstract: In this study, the tissue culture seedlings of *Vaccinium uliginosum* Linn. were used as material, the EMS mutation system has been established, the alkali-resistance mutants were screened by using EMS and NaHCO_3 combinative stress method, and identified with some physiological indexes. The results showed that: (1) 0.4% EMS immersion the stem 4 h was the suitable mutation concentration, survival rate could reach 46.7%; when 0.1% EMS was applied into the medium 3 days, survival rate could reach 50%; the suitable concentration of NaHCO_3 was $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, after three times alternating culture, two candidate mutants have been screened; (2) Identification of physiological index showed the activities of SOD, POD and proline content which significantly higher than those in control, the content of MDA which significantly lower than those in control. The study showed the mutants have some ability in weak alkali-tolerance.

Key words: *Vaccinium uliginosum* Linn.; EMS treatment; alkali-resistance mutant; identification

笃斯越桔 (*Vaccinium uliginosum* Linn.) 属杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 植物, 在中国主要分布于黑龙江、吉林、内蒙古、辽宁等地区^[1]。其果可生食, 酸甜可口, 汁液丰富, 为果酒、果醋、果

酱、果汁及提取天然食用色素的原料, 内含有大量对人体有益的有机酸, 人体必需的游离氨基酸, 各种维生素。富含花色苷、类黄酮等化合物, 具有防治冠心病、抑制癌细胞、防止衰老、减缓视疲劳等功效^[2-4]。

收稿日期: 2013-12-17; 修改稿收到日期: 2014-03-11

基金项目: 吉林省科技支撑计划重点项目 (20120251)

作者简介: 宋春艳 (1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: 905320524@qq.com

* 通信作者: 宗成文, 博士, 副教授, 主要从事果树遗传育种研究。E-mail: zongchengwen@aliyun.com

笃斯越桔原生地土壤多为沼泽土,其次是泥炭沼泽土、草甸沼泽土,在草甸暗棕壤上也有分布但数量极少。土壤适宜 pH 为 4.7~5.5^[5-6]。其大多为喜酸性植物,但经栽培发现与蓝莓比较其在弱酸性土壤中也有少数分布^[7],通过诱变处理诱导出耐弱碱的候选突变体株系,使其后代经组培快繁及鉴定后,成功筛选耐弱碱突变体,这样就能创造出适宜弱盐碱环境的新种质资源,为以后种质资源的创新和利用、优良新品种的培育奠定了一定的基础。

突变体的筛选常用化学试剂进行诱变诱导并结合组培快繁技术,如把材料接种到培养基诱变剂中和直接浸泡于诱变剂中共同培养在效果上有很大不同^[7]。突变体的鉴定一般分为常规的鉴定和分子鉴定。常规的鉴定可以通过形态差异与生理生化指标的测定进行初步鉴定。分子水平一般利用 DNA 分子标记技术对耐盐突变体进行筛选和鉴定^[8-9]。目前已被广泛应用到与盐胁迫有关的遗传和生理研究过程^[10]。

本研究拟通过建立适宜的 EMS 诱变体系,并结合 NaHCO₃ 共同胁迫笃斯越桔组培苗,在组培快繁的基础上,筛选耐弱碱候选突变体株系,并通过相关生理指标的鉴定,证明其突变体株系具有一定的耐弱碱能力。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以采自吉林省长白山区的笃斯越桔 (*Vaccinium uliginosum* Linn.) 优株,采用宗长玲^[1]的方法获得的组培苗为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 EMS 浸泡处理对笃斯越桔组培苗成活率和增殖生长的影响 将装蒸馏水的三角瓶高压灭菌后冷却至室温,然后在无菌条件下用一次性注射器吸取甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS),经微过滤器注射到以上蒸馏水三角瓶中,温度为室温(EMS 在 30 °C 时的半衰期为 25.9 h),使其体积浓度百分比分别为 0.3%、0.4%、0.5%,之后把预培养的长势良好的笃斯越桔茎段剪取 1~2 cm 浸泡在以上三角瓶溶液中(不加 EMS 的三角瓶为对照),在振荡培养箱培养。每隔 3、4、5、6 和 7 h 取出部分茎段,之后用无菌蒸馏水冲洗 3~5 次,洗去残留的 EMS,将继代培养试管苗剪成 1~2 cm,接种于经预备实验优选出继代培养基(改良 MS+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ 蔗糖

+6.5 g·L⁻¹ 琼脂)中,pH 5.2,每个处理培养基接种 5 瓶,每瓶接种 4 丛,每丛接种 3 株,每个处理重复 3 次。30 d 后统计茎段的存活率和增殖倍数。培养条件:培养温度(25±2) °C,光照度 1 500~2 000 lx,光照时间 14 h/d(下同)。

1.2.2 EMS 施入处理对于笃斯越桔茎段成活率和增殖生长的影响 在无菌的条件下通过过滤灭菌向培养基中加入 0.05%、0.1% 和 0.2% EMS,每个处理培养基接种 5 瓶,每瓶接种 4 丛,每丛接种 3 株,每个处理重复 3 次。将组培苗的茎段剪成 1~2 cm,接种于上述配好的不同浓度的 EMS 培养基中(以不加 EMS 的培养基为对照),之后 3、5 和 7 d 转接没经处理的继代培养基,培养 30 d 后统计茎段的存活率和增殖倍数。

1.2.3 NaHCO₃ 胁迫对笃斯越桔组培苗生长的影响及耐弱碱突变体筛选 在无菌的条件下通过过滤灭菌向培养基(改良 MS+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.2 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+6.5 g·L⁻¹ 琼脂,pH 5.2)中加入不同剂量(0、4、6、8、10 和 12 mmol/L)的 NaHCO₃,将长势良好的组培苗茎段接种于含不同浓度 NaHCO₃ 的培养基中,每个处理接种 30 株。接种 30 d 后按照盐害分级标准调查盐害指数和盐害率,0 级:无盐害症状;1 级:轻度盐害;2 级:中度盐害;3 级:重度盐害;4 级:极重度盐害;5 级:植株叶全部枯死^[1]。

$$\text{盐害率}(\%) = \text{受害株数} / \text{总株数} \times 100\%$$

$$\text{盐害指数} = [\sum(\text{代表级值} \times \text{株数})] \times 100 / (\text{最高级值} \times \text{总株数})$$

将长势良好的组培苗茎段经 0.4% EMS 渗泡处理 4 h 后,接种于上述实验筛选出的含适宜剂量 NaHCO₃ (8 mmol/L) 的培养基中培养 30 d 后,转接至上述不含 NaHCO₃ 的培养基中培养 30 d,如此交替 3 次培养筛选候选耐弱碱突变体,然后将筛选出的候选突变体植株进行相关生理指标的鉴定。

1.2.4 候选耐弱碱突变体的鉴定 SOD 活性参照张志良^[11] 的 NBT(氯化硝基四氮唑蓝)法测定,POD 活性参照张志良^[11] 的愈创木酚法测定,丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法(TBA)^[12] 测定,游离脯氨酸含量采用茚三酮比色法^[12] 进行测定。分别比较候选耐弱碱突变体株系与对照植株之间各个生理指标的含量的差异是否达到显著水平($P < 0.05$),以鉴定经上述筛选出的候选突变体株系是否具有了一定的耐弱碱能力。

1.3 统计方法

采用 SPSS 11.5 与 Excel 统计软件包对实验结果进行方差分析和显著性测验。

2 结果与分析

2.1 笃斯越桔 EMS 化学诱变体系的建立

2.1.1 EMS 浸泡处理对笃斯越桔组培苗成活率和增殖生长的影响 如表 1 所示,不同 EMS 浓度及相应处理时间对笃斯越桔茎段存活状况有很大影响,EMS 浓度与处理时间呈负相关。其中,0.3% EMS 处理笃斯越桔茎段时间为 3~5 h 时,增殖倍数与对照相比差异不显著;处理时间为 6~7 h 时,笃斯越桔茎段与对照相比增值倍数较高且长势好,颜色为深绿色(图版 I, A),这说明 0.3% EMS 对笃斯越桔茎段的生长有一定的促进作用。在 0.4% EMS 浸泡茎段 4 h 时,存活率为 46.7%,约达半致死剂量,增殖倍数显著高于其它处理,同时组培苗长得更高,叶片变得更大(图版 I, B),为诱变处理的适宜剂量;随着处理时间的进一步延长,这种促进作用转变为抑制作用,即植株有变矮和叶片有变小的趋势,叶片也逐渐变得狭窄(图版 I, C~E)。当浓度增大至 0.5% 时,组培苗全部死亡。

2.1.2 EMS 施入处理对笃斯越桔茎段成活率和增殖生长的影响 如表 2 所示,在培养基中加入不同

浓度 EMS 对笃斯越桔茎段存活状况有很大影响,其中,0.05% EMS 对笃斯越桔茎段诱变 5 和 7 d 转接正常培养基,达到略微褐变死亡,但未达到半致死剂量,植株叶片浅绿色且茎细弱(图版 I, G)。随着 EMS 浓度继续提高,组培苗存活率开始明显下降。0.1% EMS 诱变 3 d 转接正常培养基,存活率为 50%,已经达到半致死剂量,植株叶片浓绿色且茎粗壮(图版 I, H)。而 0.2% EMS 处理笃斯越桔植株叶片淡黄且枯萎(图版 I, I)。另外,对于转接天数的观察发现,同一浓度转接 3 d 的组培苗的存活率及增殖倍数与转接 5 和 7 d 相比有显著差异,而转接 5 和 7 d 无显著差异。

2.2 NaHCO₃ 胁迫对笃斯越桔组培苗生长的影响及耐弱碱突变体筛选

由表 3 可以看出,笃斯越桔幼苗盐害率随着盐摩尔浓度的增加而增加,当 NaHCO₃ 摩尔浓度达 6 mmol · L⁻¹ 时,植株全部受害,低级盐害株比例较高。而当 NaHCO₃ 的摩尔浓度提高到 8~10 mmol · L⁻¹ 时,几乎所有植株都不能正常生长,8 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ 处理达到 7 d 时处理植株的生长情况见图版 I, J, 说明 8 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ 处理已完全抑制了植株的生长。而筛选真正的耐盐突变体,选择压力必须达到足以抑制绝大多数个体的正常生长,因此根据宗长玲^[1]实验结果确定笃斯越桔组

表 1 不同 EMS 浓度及浸泡时间下笃斯越桔的存活率和增殖生长情况

Table 1 Effect of various EMS concentrations and treatment time on the survival rate and multiplication of the shoot tip of *V. uliginosum*

EMS 浓度 Concentration of EMS/%	处理时间 Treatment duration/h	平均苗高 Average shoot height/cm	存活率 Survival rate/%	平均增殖倍数 Average multiplication rate
0.3	3	5.5 e	100.0 a	3.2 c
	4	5.8 d	100.0 a	3.3 c
	5	5.9 d	100.0 a	3.3 c
	6	6.0 c	100.0 a	3.5 b
	7	6.2 c	100.0 a	3.5 b
0.4	3	6.5 b	80.0 b	3.5 b
	4	6.8 a	46.7 c	3.6 a
	5	2.5 f	40.0 d	2.5 d
	6	2.5 f	36.0 d	1.5 e
	7	2.5 f	13.3 e	0.6 f
0.5	3	0.0 g	0.0 f	0.0 g
	4	0.0 g	0.0 f	0.0 g
	5	0.0 g	0.0 f	0.0 g
	6	0.0 g	0.0 f	0.0 g
	7	0.0 g	0.0 f	0.0 g
CK	—	5.8 d	100.0 a	3.2 c

注:不同字母表示不同浓度、时间梯度胁迫之间在 0.05 水平存在显著性差异;下同。

Note: Different letters indicate significant difference between stress levels and treatment time at 0.05 level; The same as below.

表 2 培养基中加入 EMS 对于笃斯越桔茎段存活率和增殖生长的影响

Table 2 Effects of EMS in medium on the survival rate of the shoot tip and multiplication of *V. uliginosum*

EMS 浓度 Concentration of EMS/%	处理时间 Treatment duration/h	平均苗高 Average shoot height/cm	存活率/% Survival rate/%	平均增殖倍数 Average multiplication rate
0.05	3	4.5 a	100.0 a	1.3 b
	5	4.5a	90.0 b	1.3 b
	7	4.4a	88.9 b	1.1 a
0.1	3	4.3 b	50.0 c	1.8 a
	5	4.0 d	43.0 d	0.2c
	7	4.0 d	38.0 d	0.3 c
0.2	3	2.0 e	6.0 e	0.1 d
	5	0.0 f	0.0 f	0.0 e
	7	0.0 f	0.0 f	0.0 e
CK	—	4.2 c	100.0 a	1.2 b

表 3 NaHCO₃ 胁迫对笃斯越桔继代苗的生长影响Table 3 Injury case of subculture *Vaccinium uliginosum* under NaHCO₃ stress

NaHCO ₃ 浓度 Concentration of NaHCO ₃ (mmol · L ⁻¹)	盐害最高级别 Highest degree of salt injury		盐害最低级别 Lowest degree of salt injury		盐害指数 Salt injury index	盐害率 Salt injury ratio/%
	级值 Value	株数 No.	级值 Value	株数 No.		
0	0	0	0	30	0.00 f	0 c
4	2	7	0	10	0.18 e	67 b
6	3	6	1	8	0.39 d	100 a
8	4	4	1	3	0.53 c	100 a
10	5	4	3	5	0.79 b	100 a
12	5	10	3	1	0.86 a	100 a

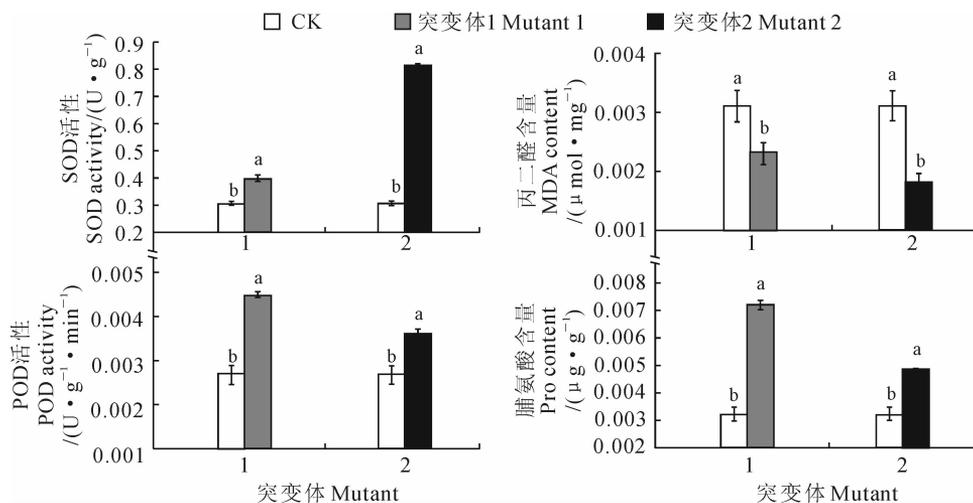


图 1 候选耐弱碱突变体 SOD、POD 活性及丙二醛、脯氨酸含量差异比较

Fig. 1 The difference of the activities of SOD, POD and the contents of MDA, proline between the mutants

育苗耐 NaHCO₃ 变异体的适宜剂量为 8 mmol · L⁻¹, 最后选出的耐弱碱突变体 2 株, 即突变体 1 和突变体 2(图版 I, K, L)。

2.3 耐弱碱突变体的鉴定

将 2 种候选耐弱碱植株和对照植株进行 SOD、POD 活性以及丙二醛(MDA)、游离脯氨酸含量测

定, 通过 SPSS 软件进行单因素方差分析, 分别对两种突变体与对照植株进行邓肯差异性检验比较($P < 0.05$), 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 2 个经诱变处理的突变体植株 SOD、POD 活性显著高于对照, MDA 含量显著低于对照, 游离脯氨酸含量显著高于对照, 这说明诱变处理以及弱碱 NaHCO₃ 胁迫

对笃斯越桔的组培苗产生了一定的影响。在弱碱胁迫下突变体植株细胞内可以启动保护酶防御系统,抑制膜质的过氧化作用,产生了清除MDA的能力或者使MDA的生成减少,并积累更多的脯氨酸,以增强对弱碱环境引起的渗透胁迫的抵抗能力,对通过诱变获得的候选耐弱碱突变体株系鉴定提供了可靠的依据。

3 讨论

张兰^[13]采用0.1%~0.2% EMS浸泡和0.01% EMS加入培养基中诱变与NaCl共同胁迫苹果砧木组培苗,成功获得了耐盐植株。高胡静等^[14]使用EMS诱导百合愈伤组织时发现随着EMS浓度的增加其存活率降低,且低浓度的EMS促进植株分化以及再生。本实验研究EMS浸泡法以及施入法时也得到低浓度(体积浓度百分比)的0.4% EMS浸泡越桔茎段和0.1% EMS施入培养基中对组培苗的生长有促进作用,但随着EMS浓度的增加其存活率降低,这可能与低浓度的EMS对细胞呼吸强度及细胞色素氧化酶活性有刺激作用,而较高浓度EMS则表现抑制效应有关。另外,本研究中发现除了浓度外,其处理时间的影响也很大。本实验采用两种处理方式与NaHCO₃共同作用,其中EMS浸

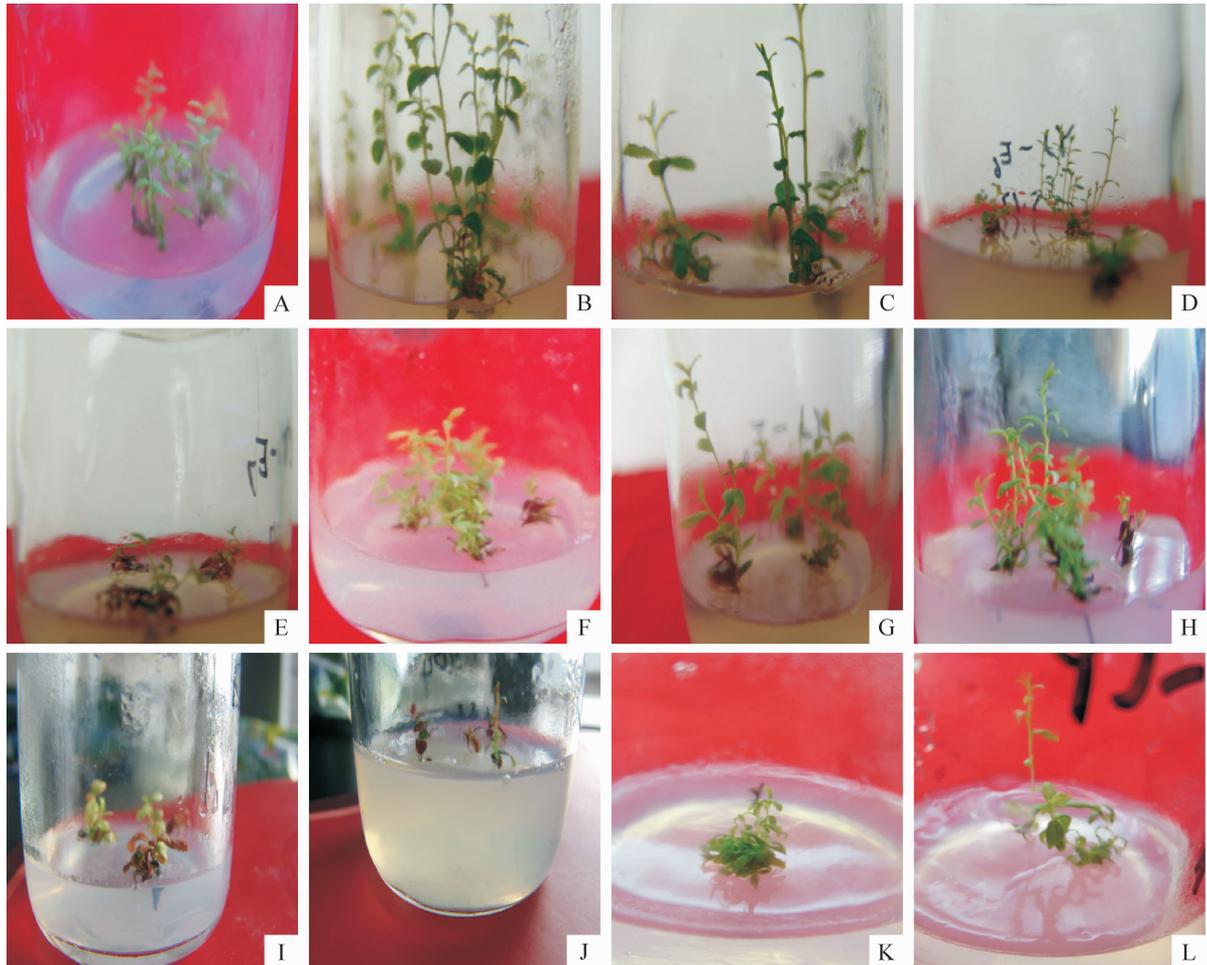
泡的效果,植株长势更好,这与刘艳萌^[15]研究结果相一致。Rodrigo等^[16]在离体条件下也采用EMS处理花梗获得菊花突变材料。因此本实验选择EMS与弱碱共同胁迫处理,筛选耐弱碱突变体。

孙振元等^[17]利用NaHCO₃对毛白杜鹃进行离体耐弱碱突变体的筛选和鉴定,得到了8 mmol/L剂量的NaHCO₃对其组培苗达到了半致死效应,在本实验中适宜笃斯越桔组培苗半致死剂量的NaHCO₃浓度(摩尔浓度)也为8 mmol/L。利用EMS与NaHCO₃共同胁迫植株筛选耐弱碱突变体报道较少,筛选笃斯越桔耐弱碱突变体更加罕见,因此本实验利用较低的选择压力EMS与NaHCO₃共同胁迫,成功筛选出2株突变体,对于笃斯越桔植株耐碱方面的研究具有一定的创新意义。为了进一步确定其突变体的可能性,本实验也通过常规方法鉴定了其生理指标SOD、POD、MDA以及游离脯氨酸的水平,得到的结论与刘艳萌^[15]对草莓离体诱变耐盐突变体生理指标的鉴定相一致,但是本研究仅得到较少的笃斯越桔候选突变体株系及其初步的生理鉴定,今后应深入开展相关笃斯越桔耐盐碱分子水平方面的研究,随着SRAP、RAPD、RFLP及AFLP技术的不断成熟,其在耐盐碱的离体诱变和突变体的筛选上有十分广阔应用前景。

参考文献:

- [1] 宗长玲. 笃斯越桔组培快繁、植株再生及耐弱碱突变体的筛选[D]. 吉林延吉: 延边大学, 2011.
- [2] LIU C(刘翠), CHEN S H(陈素华), CHEN SH Y(陈少云), et al. Preliminary separation and analysis of anthocyanidins in blueberries of *Vaccinium uliginosum* of China[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 2009, **25**(1): 57-64(in Chinese).
- [3] GE C L(葛翠莲), HUANG CH H(黄春辉), XU X B(徐小彪). Research on anthocyanins biosynthesis in fruit[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2012, **39**(9): 1 655-1 664(in Chinese).
- [4] LI X, SUN H, PEI J, et al. De novo sequencing and comparative analysis of the blueberry transcriptome to discover putative genes related to antioxidants[J]. *Gene*, 2012, **511**(1): 54-61.
- [5] YIN D J(尹德洁), SU SH CH(苏淑钗), HOU ZH X(侯智霞), et al. Germplasm resources investigation of wild blueberry in Da Hinggan Mountains[J]. *Nonwood Forest Research*(经济林研究), 2011, **29**(2): 114-118(in Chinese).
- [6] LI X(李学), WANG E J(王恩久), LIU CH Q(刘春起), et al. Study on suitable growing habitat of wild *Vaccinium uliginosum* Linn[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*(安徽农业科学), 2010, **38**(33): 18 714-18 716(in Chinese).
- [7] LUO J(罗静), ZHOU H CH(周厚成), WANG Y Q(王永清). Development of chemical induction and selection of mutation research in horticulture plant[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2005, **21**(8): 302-305(in Chinese).
- [8] BEN-ARI G, LAVI U. 11-marker-assisted selection in plant breeding[M]//ALTMAN A, HASEGAWA P M. *Plant Biotechnology and Agriculture*. San Diego: Academic Press, 2012: 163-184.
- [9] SUO G L(索广立), HUANG ZH J(黄占景), HE C F(何聪芬), et al. Identification of the molecular markers linked to the salt-resistance locus in the wheat using RAPD_BSA technique[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2001, **43**(6): 598-602(in Chinese).
- [10] LI N N(李娜娜), KONG W G(孔维国), ZHANG Y(张煜), et al. Progress of salt tolerance study in wild soybean[J]. *Acta Bot. Bore-al. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2012, **32**(5): 1 067-1 072(in Chinese).

- [11] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987: 155—156.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 260—261.
- [13] 张 兰. 苹果砧木组培苗耐盐诱变及筛选技术研究[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2002.
- [14] 高胡静. 百合离体条件下的耐盐性评价和 EMS 诱变育种初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [15] 刘艳萌. 草莓离体诱变及耐盐突变体的筛选[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2006.
- [16] RODRIGO R L, AUGUSTO T N. *In vitro* mutation of chrysanthemum(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate(EMS) in immature floral pedicels[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 77: 103—106.
- [17] SUN ZH Y(孙振元), XU W ZH(徐文忠), LIU SH L(刘淑兰), et al. *In vitro* screening and identification of mutants with alkali-tolerance of *Rhododendron mucronatum*[J]. *Journal of Central South Forestry University*(中南林学院学报), 2003, 23(5): 53—55(in Chinese).



图版 I A~F. EMS 浸泡处理中不同浓度及时间下继代培养 30 d 后的生长状况, EMS 浓度及时间: A. 0.3%, 6 h; B~E. 0.4%, 4~7 h; F. CK; F~I. EMS 施入法处理中不同浓度及时间下转接正常继代培养 30 d 后的生长状况, EMS 浓度及时间: F. CK; G. 0.05%, 7 d; H. 0.1%, 3 d; I. 0.2%, 3 d; F, J~L. EMS 和 NaHCO_3 胁迫下笃斯越桔组培苗生长情况: F. CK, 未加入 EMS 和 NaHCO_3 的正常培养基; J. $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理 7 d; K. 0.4% EMS 和 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 胁迫共同作用最后一次培养 30 d; L. 组培苗最后一次在 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 培养基中继代培养 30 d.

Plate I Fig. A~F. The shoot tip of *V. uliginosum* growth status of subculture for 30 d in the different concentrations and time of EMS treatment. Treatment concentration and time; A. 0.3%, 6 h; B~E. 0.4%, 4~7 h; F. CK; Fig. F~I. The shoot tip of *V. uliginosum* growth status of subculture for 30d with different concentrations and time of EMS in medium. Treatment concentrations and time; F. CK; G. 0.05%, 7 d; H. 0.1%, 3 d; I. 0.2%, 3 d; Fig. F, J~L. Growth condition of *V. uliginosum* plantlet growing under EMS and NaHCO_3 stress; F. CK, normal plantlet without EMS and NaHCO_3 in the medium; J. $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 treatment for 7 days; K. 0.4% EMS and NaHCO_3 stress joint action for the last 30 days; L. Subculture for the last 30 d with the $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 .