

危文波,蒋礼玲,吴昆仑,等. 青稞品种肚里黄成熟胚愈伤组织诱导与植株再生[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.012

青稞品种肚里黄成熟胚愈伤组织诱导与植株再生

危文波, 蒋礼玲, 吴昆仑, 迟德钊

(青海省农林科学院/青海省高原作物种质资源创新与利用国家重点实验室培育基地/
青海省青稞遗传育种重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:以青稞品种“肚里黄”成熟胚为外植体,设置不同成熟胚切割方式、不同基础培养基、不同激素及配比、不同碳源,研究对成熟胚愈伤组织诱导及绿苗分化的影响,以期为进一步实现青稞的遗传转化奠定基础。结果表明,将刮碎的成熟胚接种在以麦芽糖为碳源,附加 6 mg/L 的 2,4-D 的 MS 培养基上最为合适,愈伤质量最好;添加 1.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L KT 对愈伤组织的分化效果最佳,绿苗率达 44.5%。研究结果表明,通过愈伤诱导和分化的优化,肚里黄的愈伤组织诱导率和分化率均可以达到较高水平,适合于作为遗传转化的受体材料。

关键词:青稞;成熟胚;出愈率;愈伤诱导;植株再生

中图分类号: S512.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0044-03

随着生物技术的不断发展,以幼胚、花药、分生组织等为外植体,通过细胞和基因工程技术定向改良大麦品种的研究,已经取得了良好进展^[1-5]。但这些培养方法都受到大麦生长季节的限制,一年中取材时间有限,易受环境影响等不足。利用大麦种子的成熟胚为外植体,则具有取材方便、不受生长季节限制、能够长年大量供应等优点,近年来,受到了越来越多的研究者青睐^[6-8]。青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.),属禾本科大麦属,在植物学上属于栽培大麦的变种,因其籽粒内外稃与颖果分离,籽粒裸露,故称裸大麦,是青藏高原藏族人民的主粮,然而,青稞在其分子育种基础性工作的青稞成熟胚研究报道较少。

本试验选取青海省种植面积最大的青稞品种肚里黄为材料,以成熟胚为外植体,研究成熟胚不同处理方式以及不同培

养条件对其愈伤组织诱导及其植株再生的影响,从而建立高效的青稞成熟胚再生体系,为青稞的遗传转化和品质改良等分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种

供试品种为肚里黄,是 20 世纪 60 年代从甘肃省甘南州引进的青稞农家品种。目前,肚里黄在青海省青稞种植区均有大面积种植。肚里黄种子由青海省农林科学院作物所青稞研究室提供。

1.2 培养基

愈伤组织诱导分别以 MS、N6 及 B5 大量 + MS 微量的 3 种培养基添加 2 mg/L 2,4-D,分别添加不同浓度的 2,4-D (2、4、6、8、10 mg/L),并设置不同的碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖)。继代培养基以 MS 培养基,不添加 2,4-D。分化培养基以 MS 培养基为基础培养基,添加 KT 和 6-BA 的不同组合。所有培养基均添加 6 g/L 植物凝胶,121 ℃下高温灭菌 20 min 后使用。

1.3 种子处理及组织培养方法

1.3.1 种子处理和灭菌 选取当年收获、籽粒饱满、大小一致的青稞种子,置 75% 乙醇中浸泡 2~3 min;无菌水冲洗 3~4 次;再浸于 5% 次氯酸钠中 15 min;无菌水冲洗 3~4 次;无

收稿日期:2015-04-09

基金项目:国家大麦青稞产业技术体系(编号:CARS-05);青海省自然科学基金(编号:2012-Z-916Q);青海省农林科学院创新基金(编号:2012-NKY-01);青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室开放课题(编号:2012-01)。

作者简介:危文波(1990—),男,硕士研究生,从事作物遗传育种。
E-mail:645334022@qq.com。

通信作者:蒋礼玲,博士,副研究员,从事青稞分子育种。E-mail:lilingjiang1015@126.com。

[15] Nonneman D, Rohrer G A. Linkage mapping of porcine *DGAT1* to a region of chromosome 4 that contains QTL for growth and fatness [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33(6): 472-473.

[16] 马海明,施启顺,柳小春. DGAT 相关基因研究进展[J]. *遗传学报*, 2005, 32(12): 1327-1332.

[17] 杨海玲,曾勇庆,魏述东,等. 莱芜猪脂肪代谢酶活性的发育性变化及其对肌肉脂肪沉积的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(11): 1150-1154.

[18] Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, et al. Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver *DGAT1* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280

(22): 21506-21514.

[19] Horton J D, Goldstein J L, Brown M S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(9): 1125-1131.

[20] Nakamura M T, Cheon Y, Li Y E, et al. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids [J]. *Lipids*, 2004, 39(11): 1077-1083.

[21] 王国富,吴慧光,孙国权,等. 中国西门塔尔牛 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因组织表达谱及其在脂肪组织中的表达与背膘厚的关联分析[J]. *华北农学报*, 2012, 27(5): 60-64.

菌水浸泡 12 ~ 18 h; 接种前用 5% 次氯酸钠浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3 ~ 4 次后备用。

1.3.2 成熟胚的处理及初始愈伤组织的诱导 在超净工作台上将已灭菌的种子放在无菌滤纸上吸水后分别按照王兴珍等采用的 3 种方式^[6]处理: (1) 沿胚轴完全切开(纵全切), 接种半胚; (2) 垂直胚轴完全横切开(横切), 只接种有胚芽的 50%; (3) 将胚完全刮碎(刮碎), 悬浮于愈伤培养基上。于培养箱中(25 ± 1) °C, 黑暗条件下诱导愈伤组织。

1.3.3 愈伤组织的继代和分化培养 将初始愈伤组织转到继代培养基上, 25 °C、光强 450 lx 下培养, 每隔 7 d 继代 1 次, 诱导胚性愈伤组织; 再将胚性愈伤组织转移到分化培养基上, 25 °C、光强 450 lx 下分化出植株。

1.4 统计与分析

接种 1 周后统计不同处理下的出愈率, 待胚性愈伤组织转入分化培养基上 2 周后, 统计分化的绿点数和绿苗数。所有试验结果采用 Excel 数据处理系统进行统计分析、差异显著性比较。

出愈率 = 诱导出愈伤组织的胚数/接种胚数 × 100%;

绿点数 = 分化出绿点的愈伤数/接种的愈伤数 × 100%;

再生苗数 = 分化出绿苗的愈伤数/接种的愈伤数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同成熟胚切割方式对成熟胚愈伤组织诱导的影响

以肚里黄种子为材料, 研究 3 种不同的成熟胚切割方式对愈伤组织诱导率的影响。结果表明, 不同种子处理方式对愈伤组织的诱导率有极显著影响。从图 1 可以看出, 胚刮碎处理的出愈率显著高于其他 2 种处理。胚刮碎处理后的愈伤组织胚萌发较少, 而且脱分化效果最佳, 形成的愈伤组织呈淡黄色, 质地紧密, 表明玻璃化不明显。胚纵轴切和横切时, 会出现大量萌发的胚芽, 且愈伤组织玻璃化严重。因此, 本试验均以刮碎的成熟胚进行接种诱导愈伤组织。

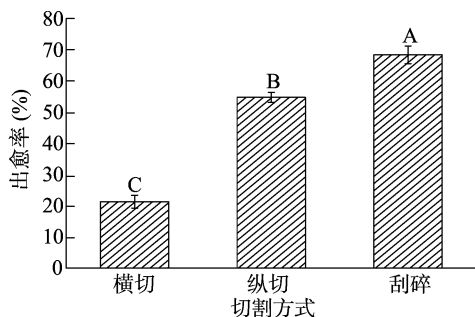


图1 不同切割方式对出愈率的影响

2.2 诱导愈伤培养基的优化

2.2.1 不同基础培养基对成熟胚诱导愈伤组织的影响 不同基础培养基 (MS、B₅、N₆) 对成熟胚诱导愈伤组织的影响见图 2。从图 2 可以看出, 不同培养基对肚里黄成熟胚出愈率的影响达到极显著水平。其中以 MS 为基础培养基时, 肚里黄的出愈率最高, 达 71.1%; 在 N₆ 基础培养基上的出愈率可达 62.1%; 而在 B₅ 基础培养基上的出愈率只有 46.4%。研究结果表明, 与其他 2 种培养基相比, MS 培养基更适合作为青稞品种肚里黄成熟胚诱导愈伤组织的基础培养基。

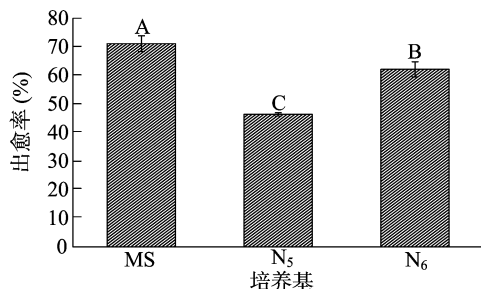


图2 不同基础培养基对出愈率的影响

2.2.2 不同碳源对愈伤组织诱导的影响 在 MS 基础培养基的基础上, 比较 3 种不同的碳源 (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖) 对肚里黄愈伤组织诱导的影响。从图 3 可以看出, 3 种不同的碳源对肚里黄出愈率的影响达到显著水平, 其中以麦芽糖为碳源时, 出愈率最高, 为 82.3%, 其次是以蔗糖为碳源; 而以葡萄糖为碳源时, 出愈率最低, 为 70.0%。表明以 MS 为基础培养基, 麦芽糖为碳源时, 青稞品种肚里黄出愈率得到大幅提高, 因此, 麦芽糖可代替葡萄糖作为青稞成熟胚愈伤组织诱导的碳源。

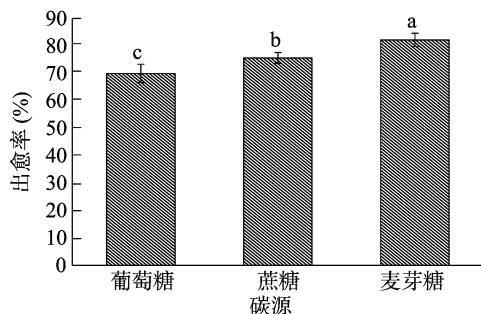


图3 不同碳源对出愈率的影响

2.2.3 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响 通过添加不同浓度的 2,4-D 研究肚里黄成熟胚愈伤诱导的情况。从表 1 可以看出, 在 2,4-D 浓度 2 ~ 8 mg/L 浓度范围内, 随着 2,4-D 浓度的升高, 肚里黄的出愈率随之升高。在 2,4-D 浓度为 8 mg/L 时, 出愈率达到最高, 为 96.7%, 随着 2,4-D 浓度的进一步升高, 即 10 mg/L 时, 反而抑制了愈伤组织的诱导。培养基中 2,4-D 的升高显著降低了成熟胚的直接萌发出芽率, 且愈伤组织质量明显优于低浓度的愈伤组织, 表明一定浓度 2,4-D 的添加对愈伤组织诱导存在促进作用, 也可显著抑制胚胎的直接发生并有效改善愈伤质量。

表 1 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 (mg/L)	出愈率 (%)	出芽率 (%)
2	82.2d	39.3a
4	86.4c	15.5b
6	90.0b	5.3c
8	96.7a	4.6c
10	92.5b	4.3c

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

综上所述, 青稞品种肚里黄, 诱导愈伤的最佳培养基为 MS, 麦芽糖为碳源, 添加 6 mg/L 2,4-D 最为合适。

2.3 不同分化培养基对成熟胚诱导愈伤组织的影响

挑选质地紧密的胚性愈伤组织, 以 MS 为基本培养基, 添

加不同种类及浓度的激素,研究对成熟胚愈伤组织分化的影响。从表 2 可以看出,不同激素对比对肚里黄愈伤组织的分化有明显影响。在培养基中添加 1.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L KT 时,绿苗分化率最高,达到 44.5%。在 0~1.5 mg/L 6-BA 的培养基上,绿苗分化率是随着 6-BA 浓度的升高而提高,而当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,分化率反而降低;当 6-BA 浓度在同一水平时,随着 KT 浓度的升高,其出愈率随之提高,表明激素在一定范围内可以促进绿苗的分化,较高激素浓度会抑制肚里黄成熟胚愈伤组织的分化。

表 2 不同激素对比对愈伤组织分化的影响

编号	KT 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	分化率 (%)
1	0.5	0	1.9
2	1.0	0	6.1
3	1.5	0	9.3
4	0.5	0.5	6.3
5	1.0	0.5	6.6
6	1.5	0.5	9.7
7	0.5	1.0	10.5
8	1.0	1.0	13.3
9	1.5	1.0	24.8
10	0.5	1.5	20.3
11	1.0	1.5	30.3
12	1.5	1.5	44.5
13	0.5	2.0	14.3
14	1.0	2.0	19.7
15	1.5	2.0	24.8

注:不同激素配比组合接种数均为 75 个。

3 讨论与结论

青稞愈伤组织的诱导与植株再生是建立青稞遗传转化体系的前提。而以成熟胚为外植体,取材方便、不受生长季节限制,可以常年大量供应。研究结果表明,成熟胚作为外植体诱导愈伤组织时,诱导愈伤的同时,伴随有胚发芽现象^[6,8-9]。因此,通过成熟胚的不同处理方式及诱导条件的优化,成熟胚也可以得到较好的愈伤组织。本研究与前人研究结果一致,认为刮碎的成熟胚可以抑制胚发芽现象,并可以形成良好的愈伤组织。此外,添加外源激素可以促进愈伤组织诱导和分化再生^[10-12]。尤其是 2,4-D 不仅能够提高成熟胚的出愈率,而且可以抑制胚发芽现象,改善愈伤组织的质量,因此,被认为是影响成熟胚培养的主要因素之一^[11,13-14]。在大麦成熟胚愈伤组织诱导培养中,王卉等的研究结果表明,在 1~8 mg/L 的范围内,2,4-D 浓度对大麦成熟胚愈伤组织的出愈率影响较小,浓度间差异不明显^[15]。而潘向群等对不同基因型和 2,4-D 浓度的互作研究发现,不同基因型的大麦成熟胚高频率诱导愈伤所需 2,4-D 浓度是不同的。本研究结果表明,青稞品种肚里黄,1~8 mg/L 的 2,4-D 浓度范围内,肚里黄成熟胚的出愈率随着 2,4-D 浓度升高而逐渐升高,而且显著降低了成熟胚的直接萌发出芽率。此外,外源激素对愈伤组织的分化有明显的影响,众多研究表明,6-BA 和 KT 的添加有利于芽的分化^[16-18],本研究结果与之一致,随着 6-BA 和 KT 浓度的升高,其愈伤组织分化率随之提高,在 1.5 mg/L 6-BA 和 1.5 mg/L KT 时,肚里黄绿苗率最高,达

44.5%。

本研究结果表明,成熟胚的处理方式、基础培养基、碳源和激素的种类和对比对青稞成熟胚愈伤组织的诱导及分化具有一定的影响。本试验在刮碎的成熟胚接种以麦芽糖代替葡萄糖作为碳源 MS 基础培养基上,并添加 6 mg/L 的 2,4-D,不仅明显抑制了胚芽的萌发,而且提高了肚里黄成熟胚的出愈率。通过肚里黄成熟胚愈伤组织诱导及分化过程中的各项参数条件进行优化,使得其愈伤组织诱导率及绿苗分化率分别达到 96.7%、44.5%,结果表明,肚里黄成熟胚可以作为较好的遗传转化受体材料。

参考文献:

[1] Wojnarowicz G, Jacquard C, Devaux P, et al. Influence of Copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant Science, 2002, 162(5): 843-847.

[2] 高润红, 杜志钊, 郭桂梅, 等. 优良大麦品种花 30 幼胚遗传转化体系的优化[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 901-906.

[3] 华 为, 尚 毅, 贾巧君, 等. 大麦花药快速培养法及不同基因型对花药培养的影响[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(3): 425-430.

[4] Dale P J, Deambrogio E. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare* [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1979, 94(1): 65-77.

[5] Jähne A, Lazzeri P A, Lörz H. Regeneration of fertile plants from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10(1): 1-6.

[6] 王兴珍, 林国梁, 赖 勇, 等. 西北地区特色大麦品种成熟胚离体培养的初步研究[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(2): 286-289.

[7] Han Y, Jin X L, Wu F B, et al. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Journal of Zhejiang University - Science B, 2011, 12(5): 399-407.

[8] 李和平, 王 韬, 黄 涛, 等. 不同大麦品种成熟胚愈伤诱导与分化研究[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 599-602.

[9] 李静雯, 张正英, 李淑洁, 等. 啤酒大麦幼胚愈伤组织诱导和植株高效再生[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(10): 4375-4377, 4470.

[10] 李文泽, 胡 含. 培养基成份对大麦花粉植株高频率再生的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1991, 8(3): 175-180.

[11] 陈升位, 陈疏影, 赵志萍, 等. 品种基因型和 2,4-D 浓度对青稞成熟胚出愈率的影响[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2012(6): 777-782.

[12] 郭晓琳, 张红伟, 刘欣洁, 等. 大麦成熟胚愈伤组织的诱导和植株再生的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 418-422.

[13] 付凤玲, 冯质雷, 渠柏艳, 等. 玉米未成熟胚胚性愈伤组织诱导率与内源激素含量的关系[J]. 核农学报, 2006, 20(1): 10-14.

[14] 张智奇. 蔗糖浓度、激素配比及不同培养方式对水稻胚性愈伤组织的诱导效应[J]. 上海农业学报, 1991, 7(3): 16-22.

[15] 王 卉, 阮义理. 大麦成熟胚培养及其影响因素[J]. 大麦科学, 1993(2): 17-19.

[16] 晨 卉. 王艳芳, 等. 五种菊花近缘植物组织培养研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 30-35.

[17] 雷加容, 余金龙, 余 敖. 甘薯的组织培养[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(1): 113-115.

[18] 翁 浩, 赖钟雄. 不同因素对金花茶体胚成熟的影响研究[J]. 园艺与种苗, 2013(7): 29-34.