

化学诱变剂和⁶⁰Co处理对大麦小孢子低氮胁迫培养的影响

陆瑞菊^{1,2,*}, 陈志伟^{1,2,*}, 何婷^{1,2}, 徐红卫^{1,2}, 杜志钊^{1,2}, 高润红^{1,2}, 王亦菲^{1,2}, 邹磊^{1,2}, 郭桂梅^{1,2}, 卜姝明³, 黄亦辰³, 刘成洪^{1,2,**}, 黄剑华^{1,2,**}

¹上海市农业科学院生物技术研究所, 上海201106; ²上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106; ³上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306

摘要: 以大麦品种‘花30’为材料, 用不同剂量化学诱变剂(EMS和PYM)处理大麦游离小孢子, 不同剂量⁶⁰Co辐照处理大麦离体穗和干种子, 比较其对在低氮胁迫下小孢子培养诱导愈伤组织产量和绿苗分化数量的影响。结果表明, EMS处理离体小孢子和⁶⁰Co辐照干种子明显比PYM处理小孢子和⁶⁰Co辐照离体穗的培养效果好。

关键词: 大麦; 小孢子培养; 诱变

Effects of Chemical Mutagen and ⁶⁰Co Treatments on Microspore Culture of Barley under Low-Nitrogen Stress

LU Rui-Ju^{1,2,*}, CHEN Zhi-Wei^{1,2,*}, HE Ting^{1,2}, XU Hong-Wei^{1,2}, DU Zhi-Zhao^{1,2}, GAO Run-Hong^{1,2}, WANG Yi-Fei^{1,2}, ZOU Lei^{1,2}, GUO Gui-Mei^{1,2}, BU Shu-Ming³, HUANG Yi-Chen³, LIU Cheng-Hong^{1,2,**}, HUANG Jian-Hua^{1,2,**}

¹Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; ²Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China; ³College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To investigate the effects of chemical mutagens and ⁶⁰Co on callus yield and green plantlet production through microspore culture under low-nitrogen stress, we used the barley (*Hordeum vulgare*) variety ‘Hua 30’ as the tested material, used two chemical mutagens, ethylmethylsulfone (EMS) and pingyangmycin (PYM), with different concentrations to treat the microspores, and used ⁶⁰Co with different doses to treat young spikes and seeds respectively. The results showed that EMS treatment of microspores or ⁶⁰Co treatment of seeds were much better than PYM treatment of microspores or ⁶⁰Co treatment of young spikes for callus induction and green plantlet differentiation.

Key words: *Hordeum vulgare*; microspore culture; mutation

氮素是植物生长所必需的大量元素之一, 也是植物需要最多的一种矿质元素。提高作物的氮素利用率可以减少施肥量, 既提高了作物产量, 又节约成本, 还能减少环境污染。对啤酒大麦而言, 减少施肥量是提高制啤质量的重要措施之一。因而作物耐低氮种质创新的相关研究受到了广泛的关注。

组织培养过程中会产生广泛的变异, 利用这一技术诱导并筛选变异体的优越性早已被论证并实现(Winicov和Dhundy 1997; Jain 2001; He等2009; Patade和Suprasanna 2008; Fatnassi等2011; Yamaguchi等2009), 通过细胞变异体获取耐逆材料的研究也有报道(Das等2000; Chen等2011; Predieri 2001; Patade和Suprasanna 2009; Luan等2007; 高玉

红和李云2004; 杨乾等2011)。随着花药培养技术的发展, 利用理化诱变与花药培养技术相结合定向筛选变异体的报道很多(Kasha等2001; Chen等2001; 孙月芳等2005, 2006; 宣朴等2000), 这一技术具有明显的优点, 即可以迅速固定并纯合发生变异的性状(Germana 2011; 刘录祥等2009)。利用小孢子培养技术来诱导并筛选变异体的报道不多,

收稿 2013-10-28 修定 2013-11-25

资助 大麦青稞产业技术体系(CARS-05)、上海市种业发展项目[沪农科种字(2012)第7号]、上海市科委基础重点项目(12JC1407800)。

* 并列第一作者。

** 共同通讯作者(E-mail: sw1@saas.sh.cn, chliu001@163.com; Tel: 021-62201032)。

仅有的一些报道集中在油菜上(Barro等2001, 2002; 石淑稳等2007; 和江明等2003), 大麦上仅有1例(陆瑞菊等2012)。小孢子是真正意义上的细胞培养系统, 且是单倍体单细胞培养系统; 利用小孢子培养系统, 给予适当的(逆、病、营养、生长)胁迫压, 可筛选出含相应抗性基因的存活小孢子, 抗性小孢子分化成苗后, 经过染色体加倍使所携带的基因一次性加倍, 得到的是完全纯合的植株(黄剑华2007), 而且小孢子比种子敏感, 有利于增加变异机率(顾宏辉等2003; 黄剑华2003, 2007)。将诱变技术与小孢子离体培养技术结合起来不仅可以避免嵌合体的发生, 而且可以使隐性性状得以较早表现, 加速纯合过程, 从而大大提高变异和筛选效率(Das等2000)。陆瑞菊等(2011)利用较为成熟的大麦小孢子培养技术, 证实了供试品种的耐低氮性在小孢子水平与植株水平上具有一致性, 揭示可以在小孢子水平进行耐低氮突变体的筛选。目前尚未见到大麦小孢子游离后离体诱变、低氮胁迫培养及筛选的报道。本研究以大麦品种‘花30’为供试材料, 分别利用辐照处理干种子和离体穗以及用化学诱变剂浸泡处理游离后的小孢子来研究不同诱变受体和不同诱变剂对小孢子培养诱导愈伤组织和绿苗分化的影响, 同时探索利用小孢子低氮胁迫培养来筛选耐低氮植株的可行性。

材料与方法

1 材料

由本实验室保存的大麦材料‘花30’(*Hordeum vulgare* L. cv. ‘花30’)种植于上海市农科院青浦试验场内。‘花30’干种子诱变于2010年11月进行, 2011年4月取麦穗进行小孢子培养; 离体穗和小孢子诱变于2011年4~5月进行, 诱变结束后进行小孢子培养。

2 小孢子培养方法

从大田选取中部小花小孢子发育处于单核早期和中期的穗子, 放入5℃冰箱冷藏15 d。接种时, 穗子用饱和的漂白粉溶液消毒15 min, 无菌水冲洗3~4次。每个试管接10个穗子, 倒入15 mL提取液, 用高速分散器超速旋切, 用150目筛网过滤, 滤液以100×g低速离心5 min, 重复3次, 收集小孢子。小孢子用预处理液于25℃下黑暗预处理2 d。培养前

将小孢子先用21%麦芽糖纯化, 再用培养基洗涤1次, 然后用培养基将小孢子密度调节至 1.0×10^5 个·mL⁻¹, 取1 mL小孢子悬浮液接种于培养皿(35 mm×15 mm), 用封口膜封口, 25℃下暗培养。每个实验设4个重复。

3 提取液、预处理液及培养基

以添加CaCl₂ 1.1 g·L⁻¹和MES 0.976 g·L⁻¹的6%甘露醇溶液为提取液和预处理液。诱导培养基以改良的N6为基本培养基, 附加KT 0.5 mg·L⁻¹、2,4-D 1.0 mg·L⁻¹、麦芽糖90 g·L⁻¹, 并添加不同浓度的谷氨酰胺(Gln)和水解干酪素(CH), 以Gln和CH各2000 mg·L⁻¹为正常含量。分化培养基以MS为基本培养基, 其中加有6-BA 0.5 mg·L⁻¹、KT 1.5 mg·L⁻¹、NAA 0.05 mg·L⁻¹和麦芽糖30 g·L⁻¹, 用6 g·L⁻¹琼脂固化。低氮胁迫的诱导和分化培养基中无机氮为正常量的1/10, Gln和CH含量均为400 mg·L⁻¹。提取液、预处理液及诱导培养基均采用过滤灭菌, 分化培养基在0.11 Mpa、121℃下高温高压灭菌15 min。

4 诱变处理

小孢子处理: 以甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)和平阳霉素(pingyangmycin, PYM)作为化学诱变剂, 剂量均为3和5 mg·L⁻¹。小孢子提取后用含有诱变剂的提取液于25℃、黑暗下浸泡48 h。

穗子处理: 5℃低温预处理15 d后用钴60(⁶⁰Co)进行辐照, 剂量率1 Gy·min⁻¹, 剂量分别为10和15 Gy。

种子处理: 播种前干种子用⁶⁰Co进行辐照, 剂量率1 Gy·min⁻¹, 剂量分别为400和500 Gy。

5 数据处理

愈伤组织产量: 25℃暗培养21 d时称取每个培养皿中愈伤组织的重量, 即 1.0×10^5 个小孢子形成的愈伤组织产量。绿苗数量: 单个培养皿愈伤组织分化出绿苗的株数, 即培养 1.0×10^5 个小孢子最后获得的绿苗数量。采用Microsoft Office Excel 2003软件对数据进行统计分析。

实验结果

1 EMS和PYM对愈伤组织产量和绿苗分化的影响

表1显示, 分别以3和5 mg·L⁻¹的EMS为诱变剂处理‘花30’离体小孢子后进行小孢子低氮培养, 所

获得的愈伤组织产量以 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EMS处理的略高,而绿苗分化数量则是 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EMS处理的较高,但差异不显著。另外,用 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PYM处理‘花30’离体小孢子所获得的愈伤组织产量和绿苗数都高于 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PYM处理的,差异也不显著。说明这两种浓度的EMS或PYM处理对愈伤组织产量和绿苗数量均没有明显差异。但比较两种化学诱变剂处理的结果可见,愈伤组织产量相差不大,而PYM处理所获得的绿苗数量要远远低于EMS处理的,表明PYM对于绿苗分化的伤害要大于EMS。

表1 EMS和PYM诱变后小孢子培养的愈伤组织产量和绿苗分化数量

Table 1 The yield of calli and production of green plantlets through microspore culture after EMS and PYM treatments

诱变剂		愈伤组织产量/mg	绿苗数量/株
种类	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		
EMS	3	78.0±5.3	108.3±4.2
	5	72.5±2.7	132.3±11.3
PYM	3	75.6±3.3	13.0±2.0
	5	57.0±7.7	9.5±2.4

2 ^{60}Co 辐照离体穗对愈伤组织产量和绿苗分化的影响

以两种剂量的 ^{60}Co 辐照大麦离体穗后进行小孢子低氮胁迫培养,结果显示,15 Gy剂量辐照所得到的愈伤组织产量明显高于10 Gy辐照的,而绿苗分化数则低于10 Gy辐照的(表2)。可见,高剂量辐照有利于愈伤组织产生,而低剂量辐照则有利于绿苗分化,表明虽然高剂量辐照得到了较高的愈伤组织产量,但可能其质量并不好,因而得到绿苗数量较少。

表2 离体穗经 ^{60}Co 辐照后小孢子培养的愈伤组织产量和绿苗分化数量

Table 2 The yield of calli and production of green plantlets through microspore culture after ^{60}Co treatment of young spikes

辐照剂量/Gy	愈伤组织产量/mg	绿苗数量/株
10	24.9±2.4	5.3±1.7
15	37.8±1.5*	0.3±0.3*

*在5%水平上差异显著。

3 ^{60}Co 辐照种子对愈伤组织产量和绿苗分化的影响

‘花30’干种子经400和500 Gy剂量的 ^{60}Co 辐照后进行小孢子低氮培养,所得到的愈伤组织产量相差不大,而绿苗数量则是后者显著低于前者(表3),说明辐照剂量的高低对绿苗分化的影响较大。另外,与幼穗的辐照剂量(10和15 Gy)相比,种子辐照所采用的剂量高很多,但培养后得到的愈伤组织产量和绿苗数均高于前者,可见辐照对幼穗的伤害要远远大于对种子的。

表3 干种子经 ^{60}Co 辐照后小孢子培养的愈伤组织产量和绿苗分化数量

Table 3 The yield of callus and production of green plantlets through microspore culture after ^{60}Co treatment of seeds

辐照剂量/Gy	愈伤组织产量/mg	绿苗数量/株
400	71.9±2.9	82.8±3.7
500	68.7±2.7	39.0±0.4*

*在5%水平上差异显著。

4 诱变处理对低氮胁迫下大麦小孢子培养的影响

从图1可以看出,‘花30’的离体小孢子经EMS或PYM浸泡48 h后,在低氮胁迫下, 1.0×10^5 个小孢子分别产生75.2和66.3 mg愈伤组织,并在胁迫分化培养基上分化出120.3和11.3株绿苗。由此可见,经EMS诱变后的小孢子培养效果优于PYM诱变的。

‘花30’离体穗或干种子经 ^{60}Co 辐照后小孢子在低氮胁迫下的愈伤组织产量分别为31.3和70.3 mg,在胁迫分化培养基上绿苗数量为2.8和60.9株,表明干种子经辐照诱变后小孢子在低氮胁迫下的培养效果优于离体穗诱变的(图1)。

讨 论

在长期的诱变育种实践中,辐照的试验材料大多是多细胞的种子、器官、组织和植株等,产生的突变体常出现嵌合现象,诱发的隐性基因突变在当代不能表达,虽也有直接对花粉进行辐照的,但授粉后产生的后代仍是杂合体,必须经过分离纯合,才能进行选择,从而降低了选择效率。采用游离小孢子培养结合辐射诱变的方法不仅可以克服以上不足之处,而且避免了花药培养过程中

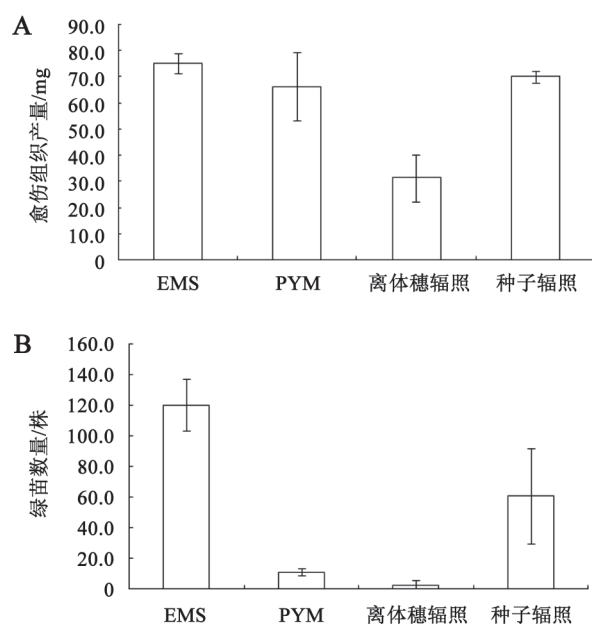


图1 化学诱变剂和⁶⁰Co处理对大麦小孢子培养的影响
Fig.1 Effects of chemical mutagen and ⁶⁰Co treatments on microspore culture of barley

二倍体花药壁细胞的干扰,使发生突变的单倍体在自然加倍后,即成为稳定的突变材料(Germana 2011)。此外,这一方法还能够提高变异效率,使变异既有来源于诱变和小孢子培养过程,也有二者的叠加效应,可能导致优良基因的重组和累加,从而创造出性状优良的突变体。

本研究表明,诱变处理影响供试材料小孢子低氮胁迫下的愈伤组织生成,⁶⁰Co γ -射线辐照离体穗明显比辐照种子的愈伤组织产量低。谢嘉华等(1995)也观察到大麦穗子经500 rad γ -射线辐照,不仅延缓了小孢子出愈时间,而且严重降低了小孢子分裂启动的比率。推测这可能与穗辐照后小孢子活力受到影响有关。PYM与EMS处理小孢子后愈伤组织产量差异不明显,但绿苗数量相差很大,可能的原因一是小孢子活力存在差异,二是诱变剂对小孢子有损伤。另外,选择合适的诱变剂和诱变方法(EMS诱变小孢子和⁶⁰Co γ -射线辐照干种子)处理后,确定适宜的胁迫筛选压对所获得的再生植株数量至关重要,本试验采用的低氮胁迫诱导培养基的胁迫压效果总体较好,但分化培养基中正常量1/10的氮含量可能还是太高,导致获得的绿苗数量较多,从而增加了植株鉴定的工作量。

从本研究的结果还可以看出,低氮胁迫下的小孢子培养效果与诱变剂的剂量没有呈现出有规律的负相关性,这或许是因为诱变剂处理后发生的变异是随机的、不定向的,导致不同批次间在低氮胁迫下的培养效果有所不同,也可能是经较大诱变剂量处理后存活小孢子的分化潜力提高,或是其形成的愈伤组织耐低氮胁迫能力有所增加。利用花药培养获得的植株中存在源于药壁细胞的二倍体再生植株(宣朴等2000),而小孢子培养的再生植株全部为单倍体或加倍单倍体,单倍体细胞水平诱变产生的耐低氮性发生变异的存活细胞,经过染色体加倍后,突变基因和其他基因一次性纯合,其所携性状的遗传稳定性较好。本研究为进一步优化大麦诱变结合小孢子低氮胁迫培养技术提供了有价值的实验数据,并且,这些研究结果可以为其他谷类作物小孢子水平诱变和胁迫筛选方法的建立提供参考。获得的再生植株正在用于耐低氮性评价。

参考文献

- 高玉红, 李云(2004). 植物离体培养筛选耐盐突变体的研究. 核农学报, 18 (6): 448~452
- 顾宏辉, 张冬, 张国庆, 周伟军(2003). 油菜离体小孢子诱变育种研究进展. 浙江农业学报, 15 (5): 318~322
- 和江明, 王敬乔, 陈薇, 李根泽, 董云松, 寸守铤(2003). 用EMS诱变和小孢子培养快速获得甘蓝型油菜高油酸种质材料的研究. 西南农业学报, 16 (2): 34~36
- 黄剑华(2003). 大麦细胞工程育种研究与展望. 见: 陆维忠, 郑企成编. 植物细胞工程与分子育种技术研究. 北京: 中国农业科学出版社, 74~87
- 黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. 作物研究, (3): 167~169
- 刘录祥, 郭会君, 赵林妹, 李军辉, 古佳玉, 赵世荣, 王晶(2009). 植物诱变突变技术育种研究现状与展望. 核农学报, 23 (6): 1001~1007
- 陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 王亦菲, 杜志钊, 高润红, 邹磊, 黄剑华, 陈佩度(2011). 大麦单倍体细胞水平与植株水平耐低氮性的关系. 麦类作物学报, 31 (2): 292~296
- 陆瑞菊, 徐红卫, 陈志伟, 何婷, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅, 卜姝明等(2012). 源于小孢子培养的大麦耐盐变异体获取. 植物生理学报, 48 (11): 1069~1078
- 石淑稳, 吴江生, 牛勤思(2007). 甘蓝型油菜小孢子离体诱变——紫外线对小孢子胚状体再生的影响. 核农学报, 21 (1): 17~19
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2005). 大麦花药离体诱变及铝胁迫下的培养反应. 核农学报, 19 (2): 95~98
- 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 周润梅, 黄剑华(2006). NaCl胁迫对不同基因型大麦花药离体培养的影响. 核农学报, 20 (1): 19~22
- 谢嘉华, 李胜康, 周建华, 高明尉(1995). 离体诱变对大麦游离小孢

- 子培养影响的初步研究. 核农学报, 10 (1): 57~60
- 宣朴, 徐利远, 瞿世洪, 余桂容, 尹春蓉, 岳春芳(2000). 小麦单倍体辐射诱变育种技术研究. 核农学报, 14 (1): 17~20
- 杨乾, 张峰, 王蒂, 张俊莲, 杨宏羽, 刘玉汇(2011). EMS诱变筛选马铃薯茎段离体耐盐变异体. 核农学报, 25 (4): 673~678
- Barro F, Fernández-Escobar J, De La Vega M, Martín A (2001). Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores. *Plant Breeding*, 120 (3): 262~264
- Barro F, Fernández-Escobar J, De La Vega M, Martín A (2002). Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica*, 129 (1): 1~6.
- Chen QF, Wang CL, Lu YM, Shen M, Afza R, Duren MV, Brunner H (2001). Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. *Euphytica*, 120 (3): 401~408
- Chen S, Chai ML, Jia YF, Gao ZS, Zhang L, Gu MX (2011). *In vitro* selection of salt tolerant variants following ^{60}Co gamma irradiation of long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 107 (3): 493~500
- Das A, Gosal SS, Sidhu JS, Dhaliwal HS (2000). Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Euphytica*, 114 (3): 205~209
- Fatnassi IC, Jebara SH, Jebara M (2011). Selection of symbiotic efficient and high salt-tolerant rhizobia strains by gamma irradiation. *Ann Microbiol*, 61: 291~297
- Germana MA (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30 (5): 839~857
- He SZ, Han YF, Wang YP, Zhai H, Liu Q (2009). *In vitro* selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 96: 69~74
- Jain SM (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118 (2): 153~166
- Kasha KJ, Simion E, Oro R, Yao QA, Hu TC, Carlson AR (2001). An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 120 (3): 379~385
- Luan YS, Zhang J, Gao XR, An LJ (2007). Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88: 77~81
- Patade VY, Suprasanna P (2008). Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane improvement. *Sugar Tech*, 10 (1): 14~19
- Patade VY, Suprasanna P (2009). An *in vitro* radiation induced mutagenesis-selection system for salinity tolerance in sugarcane. *Sugar Tech*, 11 (3): 246~251
- Predieri S (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 64: 185~210
- Winicov I, Dhundy RB (1997). Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiol Plant*, 19 (4): 435~449
- Yamaguchi H, Shimizu A, Hase Y, Degi K, Tanaka A, Morishita T (2009). Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica*, 165: 97~103