

## 青稞的小孢子离体培养和植株再生

陆瑞菊<sup>1,\*</sup>, 高润红<sup>1,\*</sup>, 郭桂梅<sup>1</sup>, 何婷<sup>1</sup>, 陈志伟<sup>1</sup>, 徐红卫<sup>1</sup>, 李颖波<sup>1</sup>, 黄亦辰<sup>1,2</sup>, 杨沙沙<sup>1,2</sup>, 刘成洪<sup>1</sup>, 黄剑华<sup>1,\*\*</sup>

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

**摘要:** 以6份青稞品系为供试材料, 研究提取和预处理过程中在提取液中添加ABA和秋水仙碱对小孢子活力的影响, 以及诱导培养基中添加不同浓度亚精胺、2,4-D和麦芽糖对愈伤组织诱导和绿苗分化产量的影响。结果表明在提取和预处理过程中提取液中添加秋水仙碱均可以提高青稞小孢子活力, 诱导培养基中添加亚精胺可以提高愈伤组织诱导和绿苗分化产量, 愈伤组织诱导培养基中2,4-D 1.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>和麦芽糖60~90 g·L<sup>-1</sup>浓度比较适合青稞小孢子的培养。

**关键词:** 青稞; 小孢子培养; 愈伤组织产量; 绿苗产量

## Microspore Culture and Plantlet Regeneration of Highland Barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*)

LU Rui-Ju<sup>1,\*</sup>, GAO Run-Hong<sup>1,\*</sup>, GUO Gui-Mei<sup>1</sup>, HE Ting<sup>1</sup>, CHEN Zhi-Wei<sup>1</sup>, XU Hong-Wei<sup>1</sup>, LI Ying-Bo<sup>1</sup>, HUANG Yi-Chen<sup>1,2</sup>, YANG Sha-Sha<sup>1,2</sup>, LIU Cheng-Hong<sup>1</sup>, HUANG Jian-Hua<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Key Lab of Agricultural Genetics and Breeding, Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; <sup>2</sup>College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The six lines of highland barley was used to investigate the effect of abscisic acid (ABA) and colchicines in extraction buffer on the microspore viability in the process of extraction and pretreatment, and the effects of spermidine, 2,4-D and maltose concentration in induction medium on the yields of callus and green plantlets. The results showed that the microspore viability in the process of extraction and pretreatment could be improved by the addition of colchicines in extraction buffer, and the yields of callus and green plantlets could be increased by the supplement of spermidine in induction medium. The induction medium supplemented with 2,4-D 1.5–2.0 mg·L<sup>-1</sup> and maltose 60–90 g·L<sup>-1</sup> was suitable for highland barley microspore culture.

**Key words:** highland barley; microspore culture; callus yield; green plantlet yield

青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum*)又称裸大麦, 为禾本科大麦属作物, 原产我国, 是青藏高原的特色物种(栾运芳等2009), 更是藏区农牧民的主要粮食(苟安春2004)。小孢子培养技术可以为青稞的遗传改良提供加倍单倍体育种方法(黄剑华2003), 为青稞的分子生物学研究提供永久性作图群体。青稞的组织培养和花药培养已获成功(张金辉等2005; 王亦菲等2010), 与花药培养相比, 小孢子培养由于去除了药壁组织, 解除了小孢子个体之间的营养和空间竞争, 因而培养效率更高, 但技术也更为复杂, 由于没有了花药壁的保护, 完全暴露在提取液中的小孢子活力受到严重影响, 小孢子活力的下降又影响到愈伤组织的形成, 尚未见到青稞小孢子培养再生植株的研究报道。本实验室以大田种植的青稞为材料, 通过多年的研究, 获

得了游离小孢子培养再生植株的研究结果。本文报道了在提取液中添加ABA和秋水仙碱对小孢子活力的影响以及诱导培养基中添加不同浓度的亚精胺、2,4-D和麦芽糖对青稞小孢子培养形成的愈伤组织产量以及分化培养后绿苗产量的影响。

### 材料与方法

#### 1 材料

供试材料为大田种植的6个青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)品系Z-1026、

收稿 2014-10-15 修定 2014-12-04

资助 国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05)和上海市农业科学院学科领域建设专项(LY11)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: sw1@saas.sh.cn; Tel: 021-62201032)。

Z-0671、P8、喜马拉雅19号、P181和P183。

## 2 方法

### 2.1 小孢子提取和预处理

从大田选取中部小花中小孢子发育处于单核早期、中期的穗子, 放入冰箱冷藏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、5 min低速离心, 重复3次, 收集小孢子。小孢子在提取液中在25 °C下黑暗预处理2 d。

小孢子提取液以6%甘露醇溶液添加CaCl<sub>2</sub> 1.1 g·L<sup>-1</sup>和MES 0.976 g·L<sup>-1</sup>作为对照, 以添加ABA 1 mg·L<sup>-1</sup>或秋水仙碱125 mg·L<sup>-1</sup>作为处理。提取液采取过滤灭菌。

小孢子活力采用FDA (fluorescein diacetate)法测定。先将FDA母液配成1 mL丙酮溶液中含5 mg FDA, 置于4 °C冰箱中保存。测定时用0.3 mol·L<sup>-1</sup>的甘露醇溶液配成4 μg·mL<sup>-1</sup>的工作液, 取10 μL小孢子悬浮液于载玻片上, 加10 μL FDA工作液, 10 min后盖上盖玻片, 在倒置荧光显微镜下观察。

### 2.2 愈伤组织诱导

将预处理后的小孢子用诱导培养基洗涤1次, 然后用诱导培养基将小孢子密度调节至1.0×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>, 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 °C暗培养。培养21 d时吸干培养液后测定愈伤组织重量, 单位为mg·皿<sup>-1</sup>。

诱导培养基以改良的N<sub>6</sub>培养基为基本培养基, 添加KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、2,4-D 1.0 mg·L<sup>-1</sup>、麦芽糖90 g·L<sup>-1</sup>, 以此培养基作为对照, 另添加不同浓度的亚精胺、2,4-D或麦芽糖作为处理培养基。诱导培养基采取过滤灭菌,

### 2.3 愈伤组织分化与生根

将诱导培养基上培养21 d的愈伤组织, 转接到分化培养基上, 25 °C培养, 每天光照12 h, 10 d左右开始形成绿苗, 以每个培养皿中愈伤组织在45 d之内分化出的绿苗数量作为绿苗产量, 单位为株·皿<sup>-1</sup>。

待分化形成的绿苗长至1.5~2.0 cm高时, 及时转移至生根培养基上, 培养温度及光照同分化, 3 d后植株基部陆续发根, 30 d左右进行生根率的统计并炼苗移栽。

分化培养基以MS为基本培养基, 添加6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、KT 1.5 mg·L<sup>-1</sup>、NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>、麦芽糖30 g·L<sup>-1</sup>。生根培养基以1/2MS为基本培养基, 添加NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>、矮壮素3 mg·L<sup>-1</sup>、蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>, 分化和生根培养基用6 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉固化, 121 °C高温灭菌15 min。每个实验设3个重复。

## 实验结果

### 1 提取和预处理过程中在提取液中添加ABA和秋水仙碱对小孢子活力的影响

在大田栽培条件下, 青稞的小孢子活力较低, 2份供试材料(Z-1026和Z-0671)的小孢子活力均低于20%, 在提取液中添加ABA 1 mg·L<sup>-1</sup>后2份材料的小孢子活力明显下降, 与对照相比差异达到显著水平, 而且Z-0671的小孢子活力更低; 在提取液中添加秋水仙碱125 mg·L<sup>-1</sup>后2份供试材料的小孢子的活力与对照相比均显著提高(图1-A)。在相同的提取液中经过25 °C、2 d的预处理后, 小孢子活力明显下降, 特别是在添加了ABA的提取液中, 小孢子全部死亡; 在添加秋水仙碱的提取液中, 与预处理后的对照相比2份供试材料的小孢子活力显著提高, 材料Z-1026的小孢子活力提高幅度达到

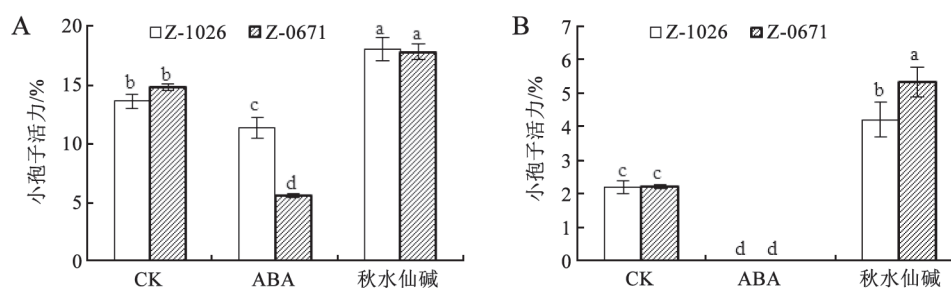


图1 提取液中添加ABA和秋水仙碱对小孢子活力的影响

Fig.1 Effect of abscisic acid and colchicines in extraction buffer on the microspore viability

A: 提取液中小孢子活力; B: 提取液中经25 °C、2 d预处理后小孢子活力。各图的柱形上不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下图同。

90%，材料Z-0671的小孢子活力的提高幅度达到139% (图1-B)。因此在提取和预处理过程中提取液中添加秋水仙碱都有利于提高青稞小孢子的活力。另外本研究中2 d的预处理虽然使小孢子的活力下降，但是活下来的小孢子更容易形成愈伤组织和分化成绿苗(陆瑞菊等2001)。

## 2 诱导培养基中添加亚精胺对青稞小孢子培养愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响

以P8和喜马拉雅19为供试材料，比较了诱导培养基中添加亚精胺 $21.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对愈伤组织产量诱导和绿苗产量分化的影响，从图2可以看出，

诱导培养基中添加亚精胺对青稞小孢子培养的愈伤组织形成和绿苗分化有很大的促进作用，尤其是绿苗产量分化。在不含亚精胺的对照培养基上尽管可以形成愈伤组织，但这些愈伤组织没有分化出绿苗，而在添加亚精胺的诱导培养基上不仅愈伤组织产量有了大幅度提高，在分化培养基上还分化出了绿苗。以P181为材料，进一步优化了诱导培养基中亚精胺浓度，结果表明在 $10.9\sim 32.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内，添加亚精胺的培养效果优于不添加的，最佳的亚精胺浓度为 $21.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

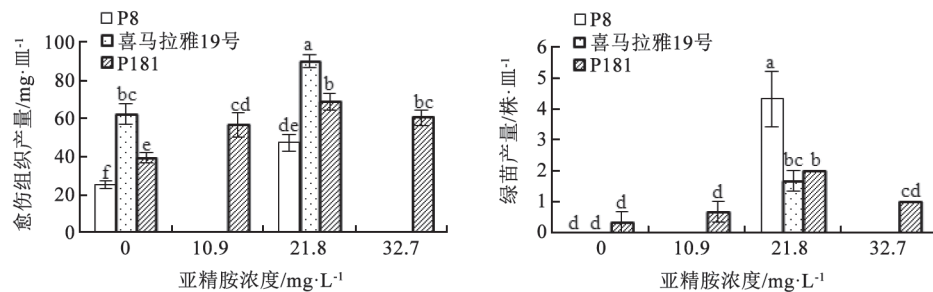


图2 诱导培养基中添加亚精胺对青稞小孢子培养愈伤组织和绿苗产量的影响

Fig.2 Effect of spermidine in induction medium on the yields of callus and green plantlets

## 3 诱导培养基中2,4-D浓度对青稞小孢子培养愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响

以P183为材料，比较了诱导培养基中2,4-D浓度对青稞小孢子培养愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响。从图3可以看出，愈伤组织诱导和绿苗产量分化总体上随着诱导培养基中2,4-D浓度的上升而增加，诱导培养基中2,4-D浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织产量最高，2,4-D浓度为 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织分化成绿苗的产量最高，因此诱导培养基中较高的2,4-D浓度( $1.5\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )有利于青稞的小孢子培养。

## 4 诱导培养基中麦芽糖浓度对青稞小孢子培养愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响

以P183为材料，比较了诱导培养基中麦芽糖浓度对青稞小孢子培养愈伤组织和绿苗产量的影响。从图4可以看出诱导培养基中麦芽糖浓度为 $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，愈伤组织产量诱导最高，绿苗产量分化也最高。从图4还可以看出，麦芽糖浓度在 $60\sim 90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，愈伤组织产量和绿苗产量的变化趋势虽有差异，但相差不大，当培养基中麦芽糖浓度上升至 $105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织和绿苗产量分化下降明显，因

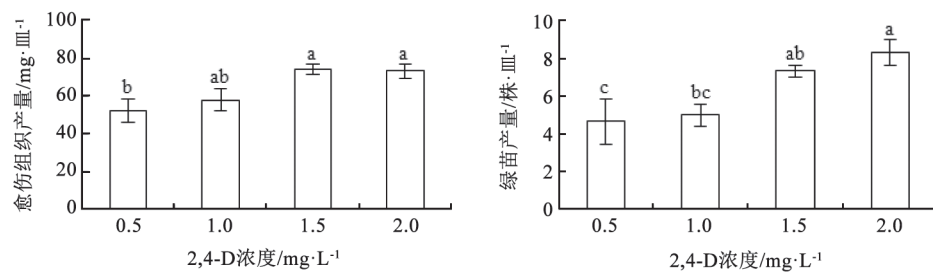


图3 诱导培养基中2,4-D浓度对愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响

Fig.3 Effect of 2,4-D concentration in induction medium on the yields of callus and green plantlets



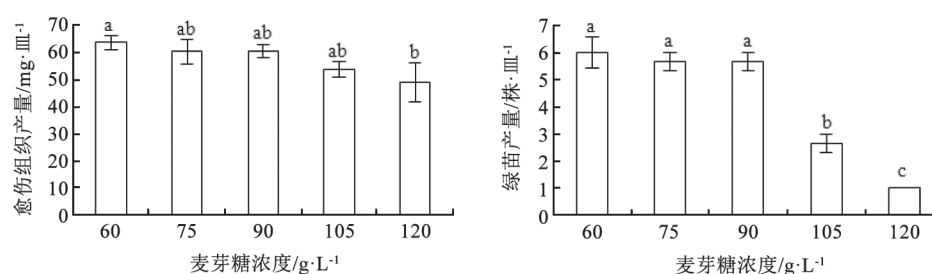


图4 诱导培养基中麦芽糖浓度对愈伤组织诱导和绿苗产量分化的影响

Fig.4 Effect of maltose concentration in induction medium on the yields of callus and green plantlets

此在所测试范围内适合青稞小孢子培养的诱导培养基中的麦芽糖浓度为60~90 g·L<sup>-1</sup>。

### 5 青稞小孢子再生植株的生根与移栽

青稞小孢子在诱导培养基上培养5~7 d时形成多细胞结构(图5-A), 培养14~18 d时形成肉眼可见的愈伤组织, 将培养21 d的愈伤组织(图5-B)转移至

分化培养基后10 d左右开始分化形成绿苗(图5-C), 长至1.5~2.0 cm高时, 及时转移至生根培养基上, 3 d后植株基部陆续发根, 30 d左右就能长成根系发达的再生植株(图5-D), 生根率可达80%, 这些根系发达的再生植株经过炼苗后移栽至盆钵, 成活率在95%以上。

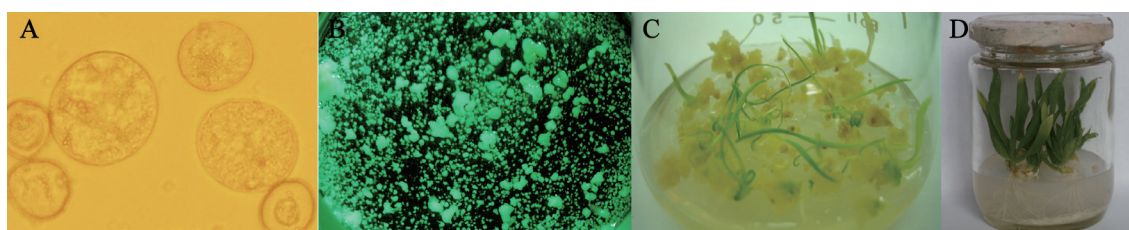


图5 青稞小孢子培养愈伤组织诱导及植株再生

Fig.5 Callus induction and plants regeneration of isolated microspore culture

A: 培养5 d时小孢子形成多细胞结构; B: 培养21 d的愈伤组织; C: 愈伤组织分化形成绿苗; D: 根系发达的再生植株。

## 讨 论

本文从影响小孢子培养的几个关键步骤着手, 进行了提高小孢子活力、愈伤组织诱导和绿苗分化的研究, 结果表明提取液中添加秋水仙碱有助于提高青稞小孢子的活力, 诱导培养基中添加亚精胺可以提高愈伤组织产量诱导和绿苗产量分化, 适合青稞小孢子培养的2,4-D浓度为1.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup>, 诱导培养基中适宜的麦芽糖浓度为60~90 g·L<sup>-1</sup>。秋水仙碱处理小孢子可以提高胚状体诱导产量和绿苗分化产量, 已在油菜(Zhao等1996)、水稻(Ale-manno和Guiderdoni 1994)、玉米(Saisingtong等1996)、小麦(Barnabás等1991)和大麦(陆瑞菊等2001)上证实, 青稞是裸大麦, 秋水仙碱在青稞小孢子培养中同样具有增益效应。亚精胺预处理可以减轻NaCl胁迫对青稞幼苗造成的伤害(段辉国等

2009), 本研究结果表明在青稞的小孢子培养中添加亚精胺可以提高愈伤组织诱导产量和绿苗分化产量, 或许亚精胺的添加有利于小孢子体内某些氨基酸的增加。诱导培养基中添加2,4-D有利于小孢子的脱分化启动, 麦芽糖不仅起碳源作用, 还对培养基的渗透压有调节作用, 因而2,4-D和麦芽糖浓度对小孢子培养的成功与否有着十分关键的作用。

### 参考文献

- 段辉国, 赵俊茗, 张轩波, 丁晓波, 杨汉波, 谭春华(2009). 亚精胺预处理对NaCl胁迫下青稞幼苗生理特性的影响, 西北植物学报, 29 (6): 1220~1225
- 苟安春(2004). 重新认识青稞生产的重要性. 大麦科学, (3): 6~9
- 黄剑华(2003). 大麦细胞工程育种研究与展望. 见: 陆维忠, 郑启成(主编). 植物细胞工程与分子育种技术研究. 北京: 中国农业科学技术出版社, 74~87

- 陆瑞菊, 黄剑华, 孙月芳, 王亦菲, 周润梅(2001). 秋水仙碱对大麦离体培养小孢子存活与成苗的影响. 植物生理学报, 27 (2): 135~140
- 栾运芳, 赵慧芬, 冯西博(2009). 西藏春青稞 $\beta$ -葡聚糖和食用纤维含量的基因型与环境及互作效应分析. 耕作与栽培, (3): 23~25
- 王亦菲, 陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 高润红, 杜志钊, 黄剑华(2010). 青稞花药的离体培养与植株再生. 植物生理学通讯, 46 (7): 745~746
- 张金辉, 唐亚伟, 陈荣军, 余懋群(2005). 青稞的组织培养与植株再生. 植物生理学通讯, 41 (2): 193
- Alemanno L, Guiderdoni E (1994). Increased doubled haploid plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media. Plant Cell Rep, 13 (8): 432~436
- Barnabás B, Pfahler PL, Kovács G (1991). Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet, 81 (5): 675~678
- Saisingtong S, Schmid JE, Stamp P, Büter B (1996). Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). Theor Appl Genet, 92 (8): 1017~1023
- Zhao JP, Simmonds DH, Newcomb W (1996). Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. Planta, 198 (3): 433~439