

大麦单倍体的离体培养与快速繁殖

何婷^{1,2}, 陆瑞菊^{1,2}, 高润红^{1,2}, 郭桂梅^{1,2}, 黄亦辰^{1,2,3}, 杨沙沙^{1,2,3}, 陈志伟^{1,2}, 徐红卫^{1,2}, 李颖波^{1,2}, 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’小孢子培养来源单倍体植株作为起始材料, 分别对其丛生芽诱导、扩繁、生根以及再生植株水培等技术进行了研究。结果表明, 添加0.5 mg·L⁻¹ 噻苯隆(TDZ)的1/2MS培养基适宜丛生芽诱导; 添加1.0 mg·L⁻¹ TDZ的1/2MS培养基适宜丛生芽增殖; 分别添加400 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白(CH)、20 mg·L⁻¹ 亚精胺(Spd)和1.0 mg·L⁻¹ 多效唑(MET)可以促进丛生芽的健壮; 添加0.05 mg·L⁻¹ α -萘乙酸(NAA)和1.0 mg·L⁻¹ MET的1/2MS培养基适宜生根。水培7~10 d后, 90%以上的再生植株正常生长。

关键词: 大麦; 单倍体; 丛生芽; 快速繁殖

In Vitro Culture and Rapid Propagation of Barley Haploid

HE Ting^{1,2}, LU Rui-Ju^{1,2}, GAO Run-Hong^{1,2}, GUO Gui-Mei^{1,2}, HUANG Yi-Chen^{1,2,3}, YANG Sha-Sha^{1,2,3}, CHEN Zhi-Wei^{1,2}, XU Hong-Wei^{1,2}, LI Ying-Bo^{1,2}, 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 Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to establish a stable barley haploid population, the haploid plants derived from microspore culture of barley (*Hordeum vulgare*) cultivar ‘Hua-30’ were used as materials, and the induction and rapid propagation of multiple buds, rooting and hydroponics of regenerated plantlets were studied. The results showed that the supplement of 0.5 mg·L⁻¹ thidiazuron (TDZ) in 1/2MS basal medium was suitable for multiple buds induction; the supplement of 1.0 mg·L⁻¹ TDZ in 1/2MS basal medium was suitable for bud rapid propagation and the addition of 400 mg·L⁻¹ casein hydrolysate (CH), 20 mg·L⁻¹ spermidine (Spd) and 1.0 mg·L⁻¹ multi-effect triazole (MET) improved the state of buds growth. The supplement of 0.05 mg·L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 1.0 mg·L⁻¹ MET in 1/2MS basal medium were suitable for rooting of regenerated plantlets, and more than 90% plantlets survived after an acclimation of 7–10 days by hydroponics.

Key words: barley (*Hordeum vulgare*); haploid; bud; rapid propagation

细胞、组织培养系统的建立, 不仅使通过细胞无性系变异进行作物遗传改良成为可能, 同时也为植物的遗传转化提供了较为理想的受体材料(杜志钊等2010)。在大麦组织培养中, 幼胚是最常用的愈伤诱导外植体和遗传转化受体, 本实验室已建立了大麦品种‘花30’幼胚为外植体的高效再生体系(高润红等2012), 但在遗传转化中幼胚作为二倍体受体材料, 无法获得纯和的转基因植株。所以在小孢子来源单倍体再生植株的基础(高润红等2012)上, 本试验以单倍体植株为外植体, 研究了不同培养条件对单倍体丛生芽诱导的影响。

单倍体用于遗传改良的特殊作用, 有2个优点:

其一, 单倍体材料无同源染色体联会配对的影响, 单套基因易于插入外源基因, 转化效率可能会较高, 染色体加倍后外源基因成等位基因遗传稳定性会较好; 其二, 经转化后获得的植株不存在显隐性, 加倍后即可获得纯合的二倍体转化植株(陈彩艳2006)。单倍体群体构建的意义在于小孢

收稿 2014-10-15 修订 2014-12-02

资助 上海市科委基础研究重点项目(12JC1407800)、上海市种业发展项目(沪农科种字2011第1号)和国家大麦青稞产业技术体系(CARS-05)。

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

子及其愈伤的单倍体特征存在时间短, 并且需要的技术难度高, 构建单倍体群体后可以长时间利用, 是机理研究的好材料, 可以揭示倍性变化对重要性状的调控机制。双子叶植物中见到油菜单倍体丛生芽诱导的报道(刘成洪等2005), 谷类作物中已有二倍体丛生芽诱导的报道, 研究多集中在不同外源激素对离体培养和快速繁殖的影响方面, 除激素浓度外, 外源有机氮源、精胺类物质在离体培养中对外植体的增殖也有较大影响(张杰等2010; 余敏2011; 艾珊珊等2012)。至今未见谷类作物单倍体群体构建的研究报道。我们对大麦小孢子来源的单倍体植株的丛生芽诱导、扩繁、生根以及再生植株水培等技术进行了研究, 建立了比较稳定的技术程序。本研究的相关结果为下一步以单倍体茎尖为转化受体的转基因再生体系的研究打下了基础, 并为其它谷类作物的单倍体群体构建提供借鉴。

材料与方法

1 材料

供试材料为大麦品种(*Hordeum vulgare* L.) ‘花30’小孢子来源的再生单倍体植株, 培养方法参考陆瑞菊等(2001, 2002)方法, 选取分蘖期生长情况良好的单倍体苗。鉴定方法参考何婷等(2014)方法, 剥除外部叶片, 保留基部长度为8 cm左右的茎段待处理。

2 方法

2.1 外植体材料的处理

将收集的茎段用自来水快速冲洗5 min, 洗净表面灰尘, 再用75%酒精漂洗30 s, 无菌水冲洗3~4次, 对茎段表面进行杀菌, 沥干水分加入30% NaClO溶液边浸泡边振荡10~15 min, 用无菌水冲洗3~4次, 沥干。在超净台上用解剖刀剥去外部较大叶片和多余部分, 保留基部分蘖结部位1 cm左右, 接种到诱导培养基中启动丛生芽的萌发。

2.2 诱导培养

诱导培养基为附加0.5 mg·L⁻¹噻苯隆(thidiazuron, TDZ)的1/2MS培养基, 去除培养基中污染、褐化的丛生芽, 挑选萌发状况良好的丛生芽, 经过3~4次继代, 得到适宜的丛生芽。

2.3 增殖培养

将单倍体苗接种到附加0.5、1.0和2.0 mg·L⁻¹

TDZ的1/2MS培养基中进行增殖培养, 对照为不添加TDZ的1/2MS培养基, 每个处理接种5瓶, 每瓶5个茎节, 总共25个外植体。培养42 d后统计增殖倍数、株高及植株生长状况。

将单倍体苗分别接种到附加1.0 mg·L⁻¹ TDZ及不同浓度(400、800、1 200和1 600 mg·L⁻¹)水解酪蛋白(casein hydrolysate, CH)、不同浓度(10、20和30 mg·L⁻¹)亚精胺(spermidine, Spd)和不同浓度(1.0、2.0和3.0 mg·L⁻¹)多效唑(multi-effect triazole, MET)的1/2MS培养基中进行增殖培养的优化, 对照为附加1.0 mg·L⁻¹ TDZ的1/2MS培养基, 每个处理接种5瓶, 每瓶5个单芽, 总共25个外植体。培养42 d后统计丛生芽株高、增殖倍数、叶绿素含量及植株生长状况。

2.4 生根培养

将增殖培养基中生长42 d后的单倍体苗一部分直接接种到附加0.05 mg·L⁻¹ NAA和1.0 mg·L⁻¹ MET的1/2MS培养基中进行生根培养; 另一部分先在1/2MS培养基中预处理4周后, 再进行生根培养。42 d后统计生根率、生根数及根长数, 每个处理25个外植体。

2.5 水培及移栽

将生根的单倍体苗在清水中预处理3 d后, 用Hoagland营养液水培7~10 d, 再移栽至钵钵中。

上述培养基中均附加40 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂粉, pH 5.8左右, 培养温度(23±1) °C, 湿度65%左右, 光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期10 h·d⁻¹。

2.6 数据统计分析

采用Excel软件统计数据, 并用DPS 7.05软件进行数据处理和统计分析。

实验结果

1 大麦单倍体的诱导培养

诱导培养阶段, 丛生芽出现污染、褐化, 经过3~4次继代后获得生长状况良好的丛生芽(图1-A)。

2 大麦单倍体的增殖培养

2.1 不同TDZ浓度对大麦单倍体增殖的影响

由表1看出, 不同浓度TDZ对单倍体丛生芽增殖倍数的影响较大, 而对株高的影响较小。低浓度(0.5和1.0 mg·L⁻¹) TDZ可提高单倍体苗的株高, 而高浓度(2.0 mg·L⁻¹) TDZ则降低株高, 但是不同

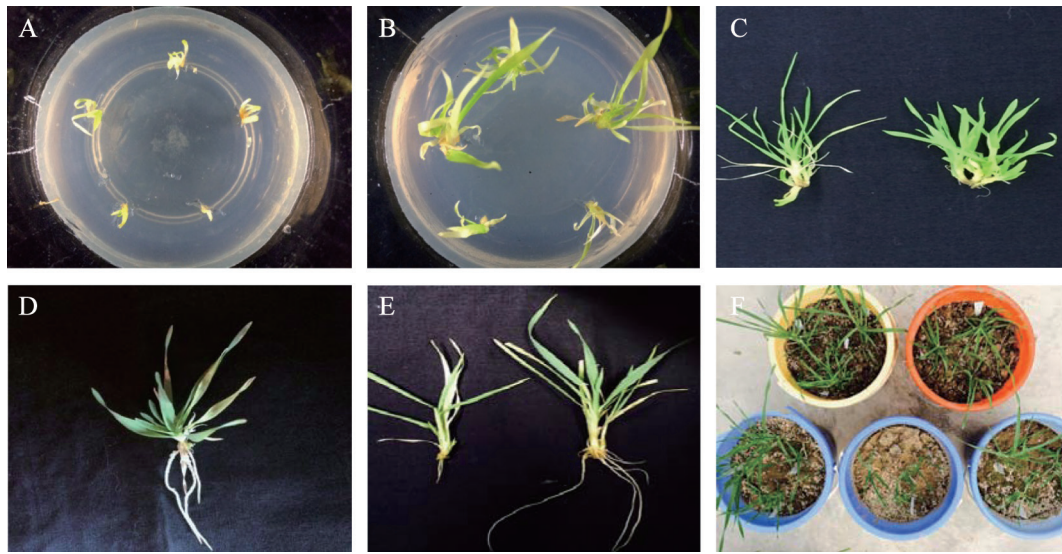


图1 大麦单倍体的组织培养与快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of barley haploid

A: 诱导培养; B: 增殖培养; C: 优化培养, 左边为优化前, 右边为优化后; D: 生根培养; E: 水培, 左边为水培前, 右边为水培后; F: 移栽成活。

表1 不同TDZ浓度对大麦单倍体增殖的影响

Table 1 Effects of different concentrations of TDZ on proliferation of barley haploid

TDZ浓度/mg·L	株高/cm	增殖倍数	生长状况
0 (对照)	6.01±0.40 ^A	1.82±0.44 ^D	丛生芽少, 叶片绿色
0.5	6.48±0.54 ^A	3.00±0.54 ^C	丛生芽细弱, 叶片失绿
1.0	6.30±0.73 ^A	4.60±0.69 ^B	丛生芽细弱, 叶片失绿
2.0	5.77±0.54 ^A	7.54±0.40 ^A	丛生芽簇状, 极细弱, 叶片失绿

不同大写字母表示0.01差异显著水平, 下表同此。

处理间差异并不显著。随着TDZ浓度升高, 增殖倍数显著提高, 当TDZ浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 增殖倍数达到最高值。但TDZ对植株的生长有较强的毒害性, 植株叶片明显失绿, TDZ浓度愈高, 叶片绿色越浅, 且植株整体瘦长细弱。所以为了同时获得较高的增殖倍数和较好的植株生长状况(图1-B), 选择浓度为1.0 mg·L⁻¹ TDZ为增殖培养基的基本浓度。

2.2 不同CH浓度对大麦单倍体增殖的影响

将单倍体苗接种到附加1.0 mg·L⁻¹ TDZ和不同CH浓度的1/2MS培养基中进行增殖培养的优化。由表2看出, 不同CH浓度对单倍体苗的株高影响较小, 随着CH浓度的升高, 株高先下降后上升再下降, 但与对照的无显著差异。不同CH浓度对增殖倍数和叶绿素含量有较大影响。在CH浓度为400 mg·L⁻¹, 丛生芽的增殖倍数达到最大值, 与对照差异显著, 之后随着CH浓度升高而下降, 这说明较低

浓度的CH对单倍体苗的增殖有很好的效果。在叶绿素方面, 添加CH可显著提高叶绿素含量, 但处理间无显著差异。综合比较, 400 mg·L⁻¹ CH既有利于增殖倍数的提高, 又改善了单倍体植株叶片在TDZ作用下的失绿状况。

2.3 不同Spd浓度对大麦单倍体增殖的影响

将单倍体苗接种到附加1.0 mg·L⁻¹ TDZ和不同Spd浓度的1/2MS培养基中进行增殖培养的优化。由表3看出, 不同浓度的Spd对单倍体苗的株高和增殖倍数无显著影响; 对叶绿素的影响比较大。20.0 mg·L⁻¹ Spd对增殖生长最有利, 株高和增殖倍数达到最大值, 且叶绿素也较高, 达到11.7。在此浓度下, 丛生芽的生长状况有所改善, 叶片和基部坚韧有力。

2.4 不同MET浓度对大麦单倍体增殖的影响

将单倍体苗接种到附加1.0 mg·L⁻¹ TDZ和不同

表2 不同CH浓度对大麦单倍体增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of CH on proliferation of barley haploid

CH浓度/mg·L	株高/cm	增殖倍数	叶绿素含量(SPAD值)	生长状况
0 (对照)	6.30±0.73 ^A	4.60±0.69 ^{BC}	9.94±0.52 ^B	丛生芽细弱, 叶片失绿
400	5.68±0.46 ^A	5.72±0.25 ^A	13.86±1.23 ^A	丛生芽较细, 叶片淡绿
800	6.08±1.02 ^A	5.36±0.27 ^{AB}	13.82±1.52 ^A	丛生芽较细, 叶片淡绿
1 200	6.04±0.43 ^A	4.22±0.59 ^C	14.72±1.64 ^A	丛生芽稍壮, 叶片淡绿
1 600	6.02±0.47 ^A	3.88±0.53 ^C	13.88±1.31 ^A	丛生芽稍壮, 叶片淡绿

表3 不同Spd浓度对大麦单倍体增殖的影响

Table 3 Effects of different concentrations of Spd on proliferation of barley haploid

Spd浓度/mg·L	株高/cm	增殖倍数	叶绿素含量(SPAD值)	生长状况
0 (对照)	6.30±0.73 ^A	4.60±0.69 ^A	9.94±0.52 ^B	丛生芽细弱, 叶片失绿
10	5.68±0.72 ^A	5.20±0.75 ^A	11.89±0.70 ^A	丛生芽细弱, 叶片失绿
20	6.12±0.43 ^A	5.44±0.53 ^A	11.70±0.83 ^A	丛生芽坚韧, 叶片淡绿
30	5.89±0.20 ^A	5.18±0.52 ^A	10.98±0.34 ^{AB}	丛生芽坚韧, 叶片淡绿

MET浓度的1/2MS培养基中进行增殖培养的优化。由表4看出, 随着MET浓度提高, 单倍体苗的株高及增殖倍数呈下降趋势, 而叶绿素呈上升趋势, 且差异显著。添加MET后, 植株的生长状况明显改善, 基部和叶片粗壮有力, 叶片失绿情况得到极大改善。但MET浓度越高, 增殖倍数就越低, 说明MET对丛生芽的萌发有抑制作用, 所以1.0 mg·L⁻¹ MET为最适宜的增殖培养基浓度(图1-C)。

3 大麦单倍体的生根培养

将增殖培养基中培养42 d的单倍体苗, 一部分接种到附加0.05 mg·L⁻¹ NAA和1.0 mg·L⁻¹ MET的1/2MS培养基中进行生根培养; 另一部分接种到

1/2MS培养基中预处理28 d后, 再进行生根培养。由表5可知, 经过预处理的单倍体植株生根率明显高于直接生根的; 两者生根数及根长均差异显著。说明经预处理后的生根状况好于直接生根, 这因为前期增殖培养阶段的TDZ对植株生根有一定的抑制作用, 预处理的单芽在1/2MS培养基中得到了缓解(图1-D)。

4 大麦单倍体的水培及移栽

将生根培养基中的单倍体苗取出, 在流水中洗净基部残余培养基, 用海绵条包裹植株基部后, 插入打孔的塑料泡沫板上。在周转箱内加入5 L左右清水, 将泡沫板浮于水面, 3 d后将清水换为

表4 不同MET浓度对大麦单倍体增殖的影响

Table 4 Effects of different concentrations of MET on proliferation of barley haploid

多效唑浓度/mg·L	株高/cm	增殖倍数	叶绿素含量(SPAD值)	生长状况
0 (对照)	6.30±0.73 ^A	4.60±0.69 ^A	9.94±0.52 ^D	丛生芽细弱, 叶片失绿
1.0	4.97±0.37 ^B	3.98±0.33 ^A	18.58±1.41 ^C	丛生芽健壮, 叶片绿色
2.0	4.72±0.40 ^B	3.68±0.51 ^A	21.68±0.90 ^B	丛生芽健壮, 叶片绿色
3.0	3.19±0.31 ^C	2.38±0.46 ^B	23.84±0.72 ^A	丛生芽少, 健壮, 有枯叶出现

表5 不同处理对大麦单倍体生根的影响

Table 5 Effects of different treatments on rooting of barley haploid

处理	生根率/%	生根数/条	根长/cm	根的生长状况
直接生根	76±0.17 ^A	1.56±0.43 ^B	1.32±0.38 ^B	细弱, 不发达
预处理后生根	92±0.11 ^A	3.36±0.26 ^A	3.38±0.62 ^A	稍壮, 比较发达

Hoagland营养液, 继续培养7~10 d后移栽进钵(图1-E和F)。单倍体植株的存活率极高, 达到90%以上, 生长情况良好, 叶片浓绿, 植株健壮。

讨 论

TDZ在植物组织培养中是一种有效的植物生长调节剂, 显示出细胞分裂素作用的功能特点(徐晓峰和黄学林2003)。利用TDZ进行禾本植物快繁与再生是非常有效的, 在小麦栽培品种(张杰等2010)、“华大麦7号”(余敏2011)、水稻地方品种(艾珊珊等2012)上都成功地建立丛生芽再生体系。本文中 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ为最佳浓度, 这与上述文章中的结果相一致, 说明麦类作物对TDZ的浓度要求不宜太高。在此基础上, 本文进一步探讨了TDZ与CH、Spd、MET对大麦小孢子来源单倍体植株丛生芽增殖的协同作用。结果表明, 单独使用TDZ虽然能保持单倍体植株的增殖倍数, 但TDZ本身对植株有很强的毒害作用, 通过添加 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CH可以提高丛生芽增殖倍数, 改善叶片失绿情况。

CH是一种有机氮源, 在组织培养中经常使用, 对愈伤组织和悬浮细胞培养有明显的促进(李忠光和龚明2006), 对芽的平均高度有显著的增加效应(谢志兵2003)。而本试验中以 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CH为最佳浓度, 株高随CH浓度升高呈下降趋势。

Spd是一种多胺成分, 在组织培养中有助于生物体的增殖和生长(毛碧增2003; 程云清等2008)。本试验中以 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Spd为最佳浓度, 增殖倍数及株高与对照相比并无显著差异, 但添加Spd的丛生芽基部与叶片坚韧有力, 生长状况得到改善。

在试验中发现TDZ对单倍体植株生根有较强抑制作用, 为了缓解不易生根的情况, 采取了1/2MS

培养基预处理和水培炼苗相结合的方法, 单倍体植株在移栽前生长情况良好, 根系发达, 大大提高了移栽存活率。

参考文献

- 艾珊珊, 李建容, 曾晓芳, 赵德刚(2012). 贵州地方稻种香禾糯组织培养再生体系建立. 分子植物育种, 10 (4): 469~475
- 陈彩艳, 肖晗, 张文利, 王爱菊, 夏志辉, 翟文学, 程祝宽, 朱立煌, 李晓(2006). 以花药愈伤组织为受体的水稻转化和RNA干扰研究术. 中国科学, 36 (4): 289~301
- 程云清, 刘剑锋, 陈智文(2008). 平榛组织培养与快速繁殖. 林业科学, 44 (12): 57~61
- 杜志钊, 陆瑞菊, 黄剑华(2010). 以单倍体材料为转化受体的植物转基因研究进展. 核农学报, 24 (2): 302~306
- 高润红, 杜志钊, 郭桂梅, 邹磊, 何婷, 陈志伟, 李梁, 陆瑞菊, 黄剑华(2012). 优良大麦品种花30幼胚遗传转化体系的优化. 植物遗传资源学报, 13 (5): 901~906
- 何婷, 郭桂梅, 陈志伟, 杜志钊, 高润红, 徐红卫, 邹磊, 卜姝明, 黄亦辰, 刘成洪(2014). 大麦小孢子再生植株气孔保卫细胞长度与倍性的相关性. 麦类作物学报, 34 (2): 175~180
- 李忠光, 龚明(2006). 水解酪蛋白对烟草愈伤组织和悬浮培养细胞生长的促进作用. 云南师范大学学报, 26 (4): 60~61
- 刘成洪, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅, 陆瑞菊(2005). 甘蓝型油菜单倍体植株群体的构建. 上海农业学报, 21 (4): 23~25
- 陆瑞菊, 黄剑华, 何南扬, 龚来庭, 王亦菲, 孙月芳, 周润梅(2002). 应用小孢子离体培养技术培育大麦新品系. 麦类作物学报, 22 (4): 88~90
- 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
- 毛碧增, 李凤玉, 王春, 李德葆(2003). 春石斛组织培养技术研究. 浙江大学学报(理学版), 30 (5): 580~583
- 徐晓峰, 黄学林(2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20 (2): 227~237
- 谢志兵(2003). 水解酪蛋白和不同碳源在称猴桃组织培养的作用. 农业与技术, 23 (4): 56~59
- 余敏(2011). 大麦再生体系的建立及矮秆基因Bnrga-ds的转化[学位论文]. 武汉: 华中农业大学
- 张杰, 李和平, 廖玉才, 瞿波(2010). 小麦茎尖丛生芽诱导及植株再生. 华中农业大学学报, 29 (4): 403~407