

文章编号:1674-7054(2013)02-0129-04

青稞植株再生体系的建立

康明明¹, 潘燕林¹, 汪龙², 于静娟¹

(1. 中国农业大学 生物学院, 北京 100193; 2. 西藏农牧科学院 农业研究所, 西藏 拉萨 850000)

摘要: 选择青藏高原广泛推广的10个青稞品种的成熟胚作为外植体, 通过诱导愈伤组织和不定芽, 以及生根培养等, 建立了青稞植株的再生体系。结果表明, 在添加L-脯氨酸 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MS培养基上愈伤组织诱导率较高; 诱导不定芽效果较好的培养基为MS + L-脯氨酸 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 不定芽诱导率超过90%; 将不定芽转到1/2 MS培养基上进行生根培养, 1个月后可获得完整植株。

关键词: 青稞; β -葡聚糖; 植株再生

中图分类号: S 512.3

文献标志码: A

青稞 (*Hordeum vulgare* var. *nudum*, $2n = 14$), 又称为米大麦、米麦、裸麦、裸大麦、元麦, 是大麦的变种^[1], 在我国主要分布于西藏、青海、甘肃、四川阿坝和甘孜州。青稞是一种很重要的高原谷类作物, 耐瘠薄和高寒, 生长期短, 高产早熟, 适应性广。在海拔4 500 m以上的局部高寒地带, 青稞是唯一可以正常成熟的作物。青稞在多数国家和地区主要用作饲料, 而在我国青藏高原地区, 50%以上的藏族居民都以青稞为主食^[2-5]。我国青稞具有“三高两低”(高蛋白、高纤维、高维生素和低脂肪、低糖)的特点, 但是西藏的青稞品种仍然存在一些缺陷, 主要包括品种的株型普遍高大、叶片较大、抗倒伏性差等^[6], 因此, 需要对这些农艺性状进行改良。基因工程育种是在分子水平上定向重组遗传物质的育种方法, 利用此方法可以定向改造植物遗传性状而使其优良性状保持不变, 提高青稞的抗病能力和抗逆性, 还可以提高某些营养成分的含量, 获得具有特定优良性状的品种, 而且育种周期比常规育种周期短, 因此, 与常规育种相比具有明显优势。当然, 基因工程育种的生物安全性问题目前仍存在争议。要通过基因工程手段进行定向改良, 首先需要建立一个成熟的青稞组织培养再生体系。目前, 国内已有人利用青稞的成熟胚和花药作为外植体, 建立了青稞再生体系^[7-8], 但不同青稞品种(基因型)的愈伤组织诱导能力具有较大差异。因此, 笔者选用青藏地区广泛推广的10个青稞品种进行再生体系建立的研究, 旨在为青稞主栽品种的转基因改良提供条件。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 选用青藏高原上广泛推广的10个青稞品种的成熟胚作为外植体。它们是: 区试-07 (QK-07)、区试-08 (QK-08)、品比13 (PB13)、品比20 (PB20)、藏青25 (ZQ25)、航育藏青80 (HY80)、冬青8 (DQ8)、冬青11 (DQ11)、冬青15 (DQ15)和藏青955 (ZQ955)。以上品种均由西藏农牧科学院提供。

1.2 青稞成熟种子灭菌方法 取健康、饱满的青稞成熟种子用蒸馏水清洗3~5次, 除去表面杂质; 用

收稿日期: 2013-01-30

基金项目: 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室开放课题(2008SKLAB08-04)

作者简介: 康明明(1985-), 男, 辽宁本溪人, 中国农业大学生物学院2008级博士研究生。

通信作者: 于静娟, 教授, 博士生导师, 主要从事植物发育、基因表达调控、逆境应答的分子调控机理和作物品质改良研究。Tel: 010-62733462; E-mail: yujj@cau.edu.cn

$\varphi = 75\%$ 的乙醇振荡灭菌 1 min, 无菌水冲洗 3~5 次; 再用 $w = 0.1\%$ 的氯化汞浸泡灭菌 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次。

1.3 种子吸水膨胀处理 在灭菌后的青稞种子中加入适量无菌水, 室温下浸泡 12 h, 使其膨胀(膨胀处理有利于胚和胚乳的完全分离)。

1.4 愈伤组织的诱导 种子吸水膨胀后, 将种子胚面向上, 用镊子和解剖刀小心将成熟胚剥出, 盾面向上接种于愈伤诱导培养基($MS + L -$ 脯氨酸 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} +$ 水解酪蛋白 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4 - D$ $1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} +$ 植物凝胶 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} +$ 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.8) 上, 每培养皿接 30 个成熟胚, 每个品种 3 皿, 于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 黑暗培养, 重复 3 次。2 周后用新鲜的培养基继代培养 1 次, 4 周后统计愈伤组织的诱导率。

1.5 不定芽的诱导 将淡黄色、生长良好的愈伤组织转到分化培养基($MS + L -$ 脯氨酸 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} +$ 水解酪蛋白 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 6 - BA$ $0 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} +$ 植物凝胶 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} +$ 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.8), 每个培养皿约 20 块愈伤组织, 每 2 周继代培养 1 次。培养条件: 光照强度为 $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 每天光照 16 h, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。6~8 周后统计不定芽的诱导率。

1.6 生根培养 待不定芽生长到约 3 cm 的高度时, 用解剖刀小心将不定芽基部的不定根切除, 然后转接到生根培养基($1/2 MS +$ 植物凝胶 $3.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} +$ 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.8) 上进行生根培养(培养条件与分化培养相同)。培养 4 周后统计生根率。

1.7 炼苗与移栽 待再生苗的根长至 2~3 cm 时, 将装有生根苗的广口瓶转移至温室($25 \sim 27^\circ\text{C}$), 打开封口膜, 炼苗 2~3 d, 然后移栽到装有 $V_{\text{营养土}}:V_{\text{蛭石}} = 1:1$ 基质的小花盆中, 待幼苗长到约 20 cm 高时, 移栽至温室大田中, 使其自然生长至抽穗、结实。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 质量浓度对不同基因型成熟胚的愈伤组织诱导率的影响 在愈伤组织诱导培养基中分别添加 1, 2, 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 进行培养, 结果表明, 当 2,4-D 质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱导愈伤组织的效果最好, 80% 的品种的愈伤组织诱导率超过 50%。因此, 愈伤组织诱导率以 2,4-D $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的为标准进行统计分析。

从表 1 可知, 青稞成熟胚愈伤组织诱导率最高的品种为 DQ11 (87%), 最低的品种为 DQ15 (38%), 10 个品种愈伤组织诱导率的平均值为 64%。方差分析结果表明, 青稞品种间的愈伤组织诱导率的差异极显著 ($P < 0.01$), 即不同基因型的青稞成熟胚的愈伤诱导率具有极显著差异。

表 1 青稞各品种的愈伤诱导率统计

Tab. 1 Callus inducing rates of various breeds of highland barley

| 培养基编号 Code of medium | 品种 Breeds | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| | PB13 | PB20 | DQ8 | DQ11 | DQ15 | ZQ955 | ZQ25 | HY80 | QK07 | QK08 |
| 1 | 0.70 | 0.97 | 0.82 | 0.97 | 0.19 | 0.67 | 0.77 | 0.94 | 0.81 | 0.64 |
| 2 | 0.97 | 0.88 | 0.81 | 0.97 | 0.52 | 0.62 | 1.00 | 0.94 | 0.94 | 0.00 |
| 3 | 0.78 | 0.81 | 0.95 | 0.97 | 0.40 | 0.42 | 0.74 | 0.91 | 0.82 | 0.89 |
| 4 | 0.40 | 0.76 | 0.58 | 0.84 | 0.31 | 0.52 | 0.96 | 0.83 | 0.33 | 0.00 |
| 5 | 0.00 | 0.72 | 0.87 | 0.81 | 0.26 | 0.53 | 0.94 | 0.93 | 0.52 | 0.81 |
| 6 | 0.96 | 0.78 | 0.53 | 0.71 | 0.40 | 0.38 | 1.00 | 0.90 | 0.41 | 0.81 |
| 7 | 0.40 | 0.32 | 0.47 | 0.85 | 0.52 | 0.79 | 0.40 | 0.58 | 0.54 | 0.75 |
| 8 | 0.44 | 0.48 | 0.80 | 0.88 | 0.25 | 0.48 | 0.61 | 0.17 | 0.38 | 0.14 |
| 9 | 0.41 | 0.46 | 0.55 | 0.86 | 0.55 | 0.76 | 0.71 | 0.56 | 0.29 | 0.26 |
| 平均值 Mean | 0.56 | 0.69 | 0.71 | 0.87 | 0.38 | 0.57 | 0.79 | 0.75 | 0.56 | 0.48 |
| 标准差 Standard deviation | 0.32 | 0.22 | 0.18 | 0.09 | 0.13 | 0.15 | 0.20 | 0.27 | 0.24 | 0.37 |

2.2 6-BA 质量浓度对不定芽诱导率的影响 尽管 6-BA 的主要作用是促进芽的形成,但是在含有 6-BA 不同质量浓度 ($1, 2, 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的分化培养基中,所有青稞品种的愈伤组织均不能诱导出不定芽,而在没有添加任何激素的 MS 培养基中,经过 3~6 周的培养后,不定芽诱导率可超过 90%,这与张金辉等人^[7]的报道,在培养基中添加 6-BA 会显著降低青稞愈伤组织的发芽率的结果相似。

由于青稞种子中的 β -葡聚糖含量较高,在青稞种子发育过程中 β -葡聚糖可能发挥特殊的功能,而绝大多数 β -葡聚糖均位于成熟种子的胚乳中,因此,在诱导不定芽效果较好的培养基 (MS + L-脯氨酸 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 水解酪蛋白 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 中,添加不同质量浓度 ($10, 20, 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的葡聚糖,观察是否会促进分化。实验结果表明,葡聚糖虽然可以提高不定芽的诱导率,但与对照相比效果并不明显。这可能与添加的葡聚糖浓度有关,也可能由于葡聚糖在青稞不定芽形成过程中不是必须的。另外,诱导不定芽的时间较长,其生长十分缓慢,并且不同品种的愈伤组织在分化能力上具有显著差异。

2.3 生根培养及幼苗移栽 将不定芽转到生根培养基中,培养 30 d 后,全部不定芽均可生根。表明此生根培养基适用于笔者所试的 10 个青稞品种的生根培养。之后,通过移栽及常规田间管理即可获得青稞再生植株 (图 1)。

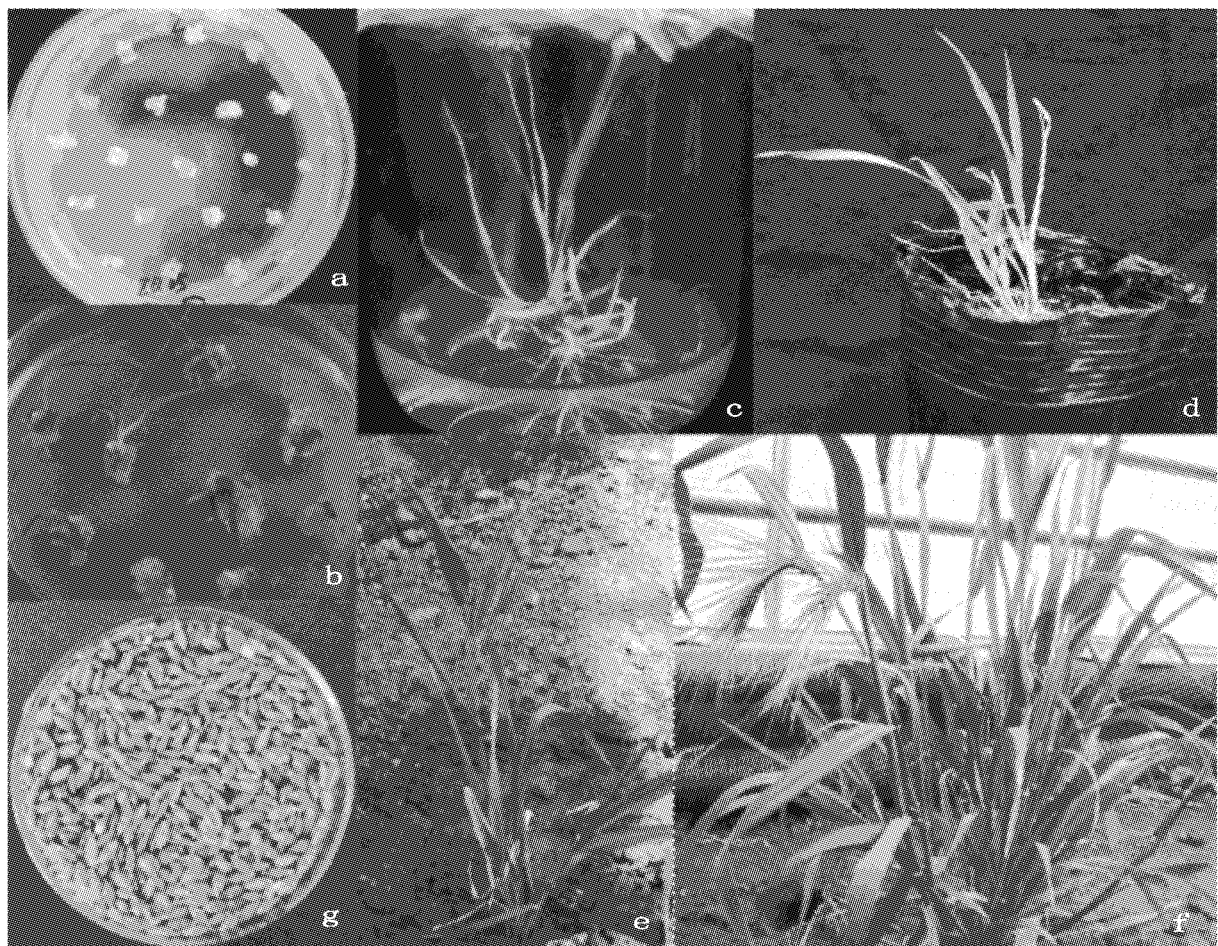


图1 青稞再生体系

a:愈伤组织诱导;b:不定芽形成;c:生根培养;d:幼苗. e:移栽至温室;f:成熟植株;g:青稞种子

Fig. 1 Schematic representation of plant regeneration of highland barley

a: Callus; b: Adventitious buds; c: Rooting culture; d: Seedling; e: Plantlet in green house; f: Mature plant; g: Seeds

3 讨论

青稞是重要的高原作物,通过基因工程方法培育优质、高产的青稞品种具有广阔的应用前景。但目前

前对青稞植株再生体系的建立的报道较少,笔者探索了以青稞成熟胚作为外植体建立高效的青稞植株再生体系的全过程,并最终获得了成熟的再生植株。实验结果表明,不同品种在愈伤和不定芽诱导率上具有显著差异。这可能与青稞的基因型有关,因为本实验所选品种包含春青稞和冬青稞。本文报道的青稞再生的培养条件与张金辉等^[7]报道的有相似之处,但愈伤诱导率存在差异,说明不同青稞品种在作为外植体的应用方面存在优劣性。蓝庆等^[9]用大麦成熟胚作为外植体筛选高再生率品种的研究中,不同品种的愈伤率和再生率都具有极显著差异,也有报道用青稞花药离体培养的方法获得再生植株^[8],本研究结果也表明,基因型对愈伤的分化率有很大影响。由此可见,对青稞品种的选择将极大地影响植株再生过程。另外,选用再生植株 ZQ25 的未成熟胚(授粉后 15~20 d)作为外植体,使用笔者的方法再次进行植株再生体系的建立,结果有 92% 的未成熟胚可被诱导形成愈伤组织(22/24),其中有 71% 的愈伤组织可以分化成苗(17/24),这进一步表明了本实验建立的青稞植株再生体系的方法可靠。青稞未成熟胚无论是愈伤形成率还是再生苗出苗率都比成熟胚的高,但是未成熟胚的获得受时间限制,而成熟胚则可以长期保存。因此,选用成熟胚建立青稞再生体系具有时间上的优势。因此,笔者建立的青稞再生体系对其他众多青稞品种的植株再生具有参考价值,也为今后通过基因工程方法进行青稞品种改良奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吕远平,熊莱君,贾利蓉,等. 青稞特性及在食品中的应用[J]. 食品科学,2005,26(7):267.
- [2] 孟凡磊,强小林,余奎军,等. 西藏主要农区青稞品种的遗传多样性分析[J]. 作物学报,2007,33(11):1910-1914.
- [3] 苟安春. 重新认识青稞生产的重要性[J]. 大麦科学,2004(3):6-9.
- [4] 赵慧芬,栾运芳,冯西博,等. 浅析西藏青稞品质及其改良途径[J]. 西藏科技,2008(3):18-20.
- [5] 冯继林,甲干,向明华,等. 藏区青稞考察与思考[J]. 大麦与谷类科学,2007(3):6-8.
- [6] 孟凡磊,赵亚斌,强小林,等. 不同地区大麦品种农艺性状比较与西藏青稞品种改良[J]. 麦类作物学报,2006,26(5):175-178.
- [7] 张金辉,唐亚伟,陈荣军,等. 青稞的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):193.
- [8] 王亦菲,陆瑞菊,陈志伟,等. 青稞花药的离体培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,2010,46(7):745-746.
- [9] 蓝庆,杨建明,华为. 大麦成熟胚培养高再生率品种的筛选[J]. 大麦与谷类科学,2012(2):1-6.

Establishment of Plant Regeneration System for Highland Barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*)

KANG Mingming¹, PAN Yanlin¹, WANG Long², YU Jingjuan¹

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Agricultural Research Institute, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850000, China)

Abstract: For highland barley plant regeneration, mature embryos selected from 10 popularized varieties of highland barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.) in Qinghai-Tibet Plateau were used as explants. A plant regeneration system was successfully established via regular tissue culture procedure. In the plant regeneration system the callus inducing rate for the embryos of the 10 barley varieties was higher when cultured in the MS medium at the presence of L-Proline ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + Casein hydrolyzate ($8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + 2,4-D ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), and adventitious bud inducing rate was higher in the MS medium supplemented with L-Proline ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) + Casein hydrolyzate ($8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). The plantlets were induced to root in the 1/2 MS rooting medium.

Key words: *Hordeum vulgare* var. *nudum*; β -glucan; plant regeneration