

大麦组织离体培养的研究进展

危文波,刘仁建*

(省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室/西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏 拉萨 850032)

摘要:大麦是世界上种植面积总产量排名第4的禾谷类作物。近年来,大麦组织的离体培养研究飞速发展。本文对国内外大麦组织培养过程中主要影响其离体再生频率的因素进行了总结。

关键词:组织培养;基因型;外植体;培养条件

中图分类号:S512.1

文献标识码:A

Progress of Barley Tissue Culture in Vitro

WEI Wen-bo¹, LIU Ren-jian^{*}

(State Key Laboratory of Hulless Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement/Tibet Agriculture Research Institute of TAAAS, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract: The planting area of barley is the fourth largest cereal crops in the world. In recent years, the barley tissue culture research has made great progress. Barley tissue culture at home and abroad was reviewed in this paper, and the main factors affecting the regeneration frequency in vitro are summarized.

Key words: Barley tissue culture; Genotype; Explants; Culture conditions

大麦(*Hordeum vulgare* L.)属于禾本科小麦族大麦属,具有麸皮的为皮大麦,没有的是裸大麦。广适性、生育期短、抗逆性强等优点使大麦成为世界范围内种植小麦、玉米和水稻面积之后的第4大粮食作物^[1]。饲料、食品和制造麦芽是大麦主要用途,而丰富药用价值和的营养是医药公司和保健产品研发的公司重点关注大麦的原因之一^[2]。培育优质、高产、抗逆性好的大麦品种是大麦育种研究的主要目标。然而,传统的育种技术是选择和利用自然突变产生的优良基因和重组,存在时间长,有利变异少、见效慢的缺点^[3]。随着分子生物学的快速发展,转基因方法可以在短时间内定向培育出高产、品优、且抗病耐逆性强的作物品种^[4],伴随着大麦不同外植体的离体培养技术愈发完善,如何有效的将转基因技术运用到改良大麦品种中成为育种工作者

新的研究方向。而大麦的离体再生频率主要受到品种、受体材料和培养条件3种因素的影响。

1 基因型

不同大麦品种本身基因型就会影响大麦组织离体培养的效果,其愈伤组织诱导频率、分化频率和再生频率均有差异。很多可作为转基因的受体基因型被筛选出来,如 Golden promise^[5], Conlon^[6], Schooner^[7]等,并成功用于遗传转化。然而,大麦的基因型效应很大程度的影响了其离体培养的效果,愈伤组织的诱导和再生方法并非广泛适用^[8],而且大多基因型分化率较低^[9]。很多大麦成熟胚离体培养研究表明,不同大麦品种的愈伤组织诱导率和再生能力有显著性差异^[10]。不同的培养基适合不同品种,在组织离体培养过程中,可以通过改变和优化培养基的成分和激素水平来达到降低基因型效应的影响^[11-12]。根据文献报道,在诱导外植体形成胚性愈伤组织过程中,2,4-D 浓度是十分重要的,但并不呈线性关系^[13]。因此,不同的基因型材料需制定最佳的2,4-D 浓度培养计划。

收稿日期:2019-03-28

作者简介:危文波(1990-),男,助理研究员,主要从事青稞新品种选育和示范推广工作,E-mail:1104899913@qq.com,*为通讯作者;刘仁建(1980-),男,副研究员,主要从事青稞新品种选育和示范推广工作,E-mail:liurj_1999@126.com。

2 外植体

2.1 幼胚

大麦的组织培养再生体系包含有各种外植体,例如成熟胚^[14],幼胚^[15],幼叶^[16],分生组织^[11]等,其中最常用的外植体是幼胚。高效大麦再生体系的建立是根据幼胚中的盾片具有较强的再生能力,使其最容易产生愈伤组织来确定幼胚作为外植体^[17]。

2.2 成熟胚

虽然普遍认为大麦的最佳组织培养材料是幼胚,但季节和取材限制了其作为外植体供多数组织培养工作者使用^[17]。大麦成熟胚相比幼胚而言,具有取材不受季节限制、方便等优点。尽管大麦成熟胚离体培养的优点突出,且植株再生的研究也取得了不菲的成果,但其诱导的愈伤组织多数只能产生无形态发生能力的或只能形成根,且质量相对较差,可见成熟胚本身比幼胚培养困难得多。

2.3 花药

大麦花药成功离体培养获得再生植株最早是在 1973 年^[18],花药培养其实质是单倍体育种,通过秋水仙素处理可快速得到纯合的个体,这可以简化育种的程序,减少育种的年限也是大麦进行转基因的基础。单倍体选择育种对数量、质量性状的选择更加准确,相比常规育种产生纯系需要的时间,花药培养会少 3~5 代^[19-20]。1973 年 Clapham^[21]通过大麦花药离体培养成功获得愈伤组织并再生出单倍体植株。但是,大田种植的品种不良的生理状态限制了小孢子培养技术应用到大麦的遗传改良。

2.4 原生质体

外植体、愈伤组织和悬浮细胞的原生质体培养共同组成了原生质体培养。原生质体培养自颜秋生等在 1990 年首次通过对幼胚胚性愈伤组织细胞悬浮系的原生质体进行培养,成功获得再生绿色植株后,研究进展迅猛。1995 年张玉华等^[22]通过培养大麦花药诱导的愈伤组织中的游离原生质体,再生了绿色植株。离体培养初代愈伤组织不仅省略了细胞的悬浮培养过程,缩短了组培周期,还避免了体细胞发生变异的情况。

3 培养条件

3.1 培养基、激素

外植体离体培养的主要影响因素包括品种类型、外植体的选取、基础培养基、外源激素、有机附加物和培养环境条件等。在所报道的文献资料中,主要的基本培养基包括:MS^[23]、BS^[24]、N₆、B₅^[25]、

CC^[26]和以改良这五种基础培养基获得的各种培养基,其中 MS 培养基在幼胚组织培养最为常用。许多研究表明,在诱导大麦愈伤组织过程中,2,4-D 浓度的变化会很大程度的影响愈伤组织的诱导和再分化^[27]。为更好的诱导胚性愈伤组织的发生和频率,可适当增加 MS 培养基中 VB₁、肌醇和水解络蛋白的使用量^[17]。

3.2 胚龄

胚的成熟度即胚龄,不同胚龄的胚会在不同的部位形成质地不一的愈伤组织,诱导成熟度适中的幼胚,其形成胚性愈伤组织的质量更好。但环境条件的不一导致幼胚的发育程度不一致,因此,很难通过肉眼来获取不同条件下生长程度一致的幼胚。另外,大麦幼胚离体培养与温度也有很大关系,诱导愈伤组织和再生植株在较低温度(15℃)更易发生,在较高温度(25℃)下会困难一些^[17]。因此,在胚龄适宜的条件下,可尽量避免取生长在较高温度下的幼胚作为外植体。

3.3 其他

外植体离体培养的重要影响因素还有其本身的生理状态。在大麦成熟胚离体培养过程中,通常剥胚接种的种子是吸胀 18~24 h。1996 年严华军等^[28]的研究结果表明,离体培养效果较好的外植体是未经吸胀的干胚,且胚性愈组织的形成可以通过诱导大麦成熟胚胚芽来实现。除了激素以外,碳源^[29]、Cu²⁺^[30]以及其他添加物也会影响组织的离体培养效果。愈伤组织的再分化培养基,一般是以诱导培养基为基础培养基,去除其生长素可得到再生植株,而且在其中加入一定量的 KT、ZT,可提高绿苗的再生频率^[31]。

参考文献:

- [1] 张仲博. 大麦转基因技术研究进展及其应用[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(3): 560-568.
- [2] 谢志新, 丁守仁. 大麦品质育种研究与进展[J]. 大麦科学, 1996(2): 4-8.
- [3] 朱睦元. 大麦育种与生物工程[M]. 上海: 科学技术出版社, 1999.
- [4] 戎均康. 大麦组织培养研究进展(综述)[J]. 大麦科学, 1992(1): 6-9.
- [5] Dahleen L S, P. Bregitzer. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars[J]. Crop Science, 2002, 42(3): 934-938.
- [6] Manoharan M, Expression of 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and effects on deoxynivalenol [J]. Plant science, 2006, 171(6): 699-706.
- [7] Wang, M. B., D. C. Abbott, P. M. Waterhouse, A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to

- barley yellow dwarf virus[J]. Molecular Plant Pathology, 2000, 1(6): 347-356.
- [8] Gürel F. Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley(*Hordeum vulgare* L.)[J]. Acta Biologica Hungarica, 2009, 60(3): 309-319.
- [9] Chang Y. High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivar (*Hordeum vulgare* L. cv. Morex) [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(8): 733-738.
- [10] TANIGUCHI M. Varietal differences in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Ikushugaku Zasshi, 1991, 41(4): 571-579.
- [11] 郭晓琳. 大麦成熟胚高效再生体系的建立和改良直链淀粉的转基因研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [12] 潘向群, 梁海曼. 大麦成熟胚培养的培养基研究[J]. 作物学报, 1991, 17(4): 267-272.
- [13] Granatek C A. Cockerline, Callus formation versus differentiation of cultured barley embryos: Hormonal and osmotic interactions[J]. In vitro, 1978, 14(2): 212-217.
- [14] Sidor L P. Orlov. Regeneration potential of different wheat, rye and barley species in leaf explant culture [J]. TSitologiya i genetika, 2004, 39(5): 28-34.
- [15] Sharma V K. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos[J]. Plant Cell Reports, 2004, 23(1-2): 9-16.
- [16] 卢良恕. 中国大麦学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [17] 余敏. 大麦再生体系的建立及矮秆基因 BNRGA-DS 的转化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [18] Clapham D. Haploid Hordeum plants from anthers in vitro[J]. Zpflanzenzuchtg, 1973, 69: 142-155.
- [19] Castillo A M, Valles M P, Cistue L. Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium[J]. Euphytica, 2000, 113: 1-8.
- [20] Asakaviut R, Pasakinskien I. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley cultivars[J]. Biologija, 2006(4): 37-40.
- [21] Clapham D. Haploid Hordeum plants from anther in vitro[J]. Zpflanzenzuchtg, 1973, 69: 142-155.
- [22] 张玉华, 黄剑华, 陆瑞菊, 等. 大麦愈伤组织原生质体培养再生绿苗[J]. 上海农业学报, 1995, 11: 13-17.
- [23] Murashige T F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.
- [24] Gamborg O T. LaRue. Ethylene produced by plant cells in suspension cultures, 1968.
- [25] Gamborg O L c, R. A. Miller K. Ojima. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research, 1968, 50(1): 151-158.
- [26] Potrykus I. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.) [J]. Molecular and General Genetics, 1977, 156(3): 347-350.
- [27] 任江萍. 大麦幼胚离体培养条件的建立[J]. 麦类作物学报, 2006, 25(6): 25-28.
- [28] 严华军, 王君晖, 黄纯农. 大麦成熟胚胚性愈伤组织的高频诱导和植株再生[J]. 作物学报, 1996(1): 59-65.
- [29] Purnhauser L. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat *Triticum-aestivum* callus-cultures by copper [J]. Cereal Research Communications, 1991, 19(4): 419-423.
- [30] Lührs R H. Lörz. Plant regeneration in vitro from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1987, 75(1): 16-25.
- [31] 蓝庆. 大麦成熟胚高再生性基因型筛选和农杆菌介导法转化 *TaZnF* 基因的研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2012.