

大麦成熟胚胚性愈伤组织的高频诱导 和植株再生^{*}

严华军 王君晖 黄纯农^{**}

(杭州大学生物科学与技术系, 浙江杭州, 310012)

提 要 大麦成熟胚的初代愈伤组织是水质、柔软的非胚性愈伤组织, 在继代培养中能以一定频率出现胚性愈伤组织。本文研究了基因型、有机添加物和胚切割等因素对大麦胚性愈伤组织诱导频率的影响。结果表明: 供试的10个大麦品种在胚性愈伤组织诱导率和植株再生率上有显著差异; 培养基中添加水解酪蛋白、L-脯氨酸以及提高维生素B₁和肌醇的浓度可以促进胚性愈伤组织的形成; 胚芽段比全胚或胚根段更易形成胚性愈伤组织。胚性愈伤组织转入无2, 4-D的分化培养基后能产生发育良好的体细胞胚, 再经萌发可得到正常的绿色植株。胚性愈伤组织经精心选择和继代培养, 能在一年或更长的时间内保持再生能力。

关键词 大麦; 成熟胚; 胚性愈伤组织; 植株再生

体细胞胚胎发生是禾谷类作物植株再生的主要途径^[13], 高效诱导胚性愈伤组织在禾谷类作物组织培养中具有特别重要的意义。幼嫩外植体是大麦胚性愈伤组织的良好来源, 但取材受到季节和发育阶段的严格限制。大麦成熟胚则不受时间和数量的限制, 但从成熟胚诱导胚性愈伤组织和再生植株较为困难。在已报道的研究中, 多数情况下只能产生无形态发生能力的或只能形成根的愈伤组织^[3,5,12,14]。Lupotto (1984)报道从大麦成熟胚诱导出一种具有植株再生能力的致密愈伤组织, 但没有检测到体细胞胚结构^[7]。Rengel (1987)首次报道从大麦成熟胚诱导产生了胚性愈伤组织, 但不能继代培养^[10]。我们从大麦成熟胚高频率地诱导出能长期继代培养的并且适合于建立胚性悬浮细胞系的愈伤组织。现予报道。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为大麦(*Hordeum vulgare* L.)早熟3号、舟麦2号、沪麦4号、秀79-2、浙农大3号、浙原87-12、浙原87-82、浙原86-166等10个品种当年收获的种子。

1.2 培养基

诱导培养基用MS^[8]和CC^[9]两种基本培养基的无机盐成份, 以有机添加物的不同, 设置了6种培养基(表1)。培养基用0.8%的纯化琼脂固化, pH5.8, 高压灭菌。继代培养基与诱导培养基相同。分化培养基为:(1)BM₀培养基减去2, 4-D;(2)BM₀培养基减去2, 4-D, 另加NAA 0.5 mg/L和KT 0.5 mg/L。

* 国家自然科学基金、浙江省自然科学基金资助项目。

** 通讯联系者。

收稿日期: 1993-09-28, 终审完毕日期: 1994-09-26

表1 愈伤组织诱导及继代培养基
Table 1 Media for callus induction and subculture (mg·L)

培养基成分 Components	培养基 Media					
	BM ₁	BM ₂	BM ₃	BM ₄	BM ₅	BM ₆
无机成分 Inorganic components	as MS	as MS	as MS	as MS	as MS	as CC
甘氨酸 Glycine	2	2	2	2	2	2
维生素 B ₁ VB ₁	0.4	0.4	0.4	5	5	5
维生素 B ₆ VB ₆	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
烟 酸 Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
肌 醇 Myo-inositol	100	100	100	250	250	250
水解酪蛋白 Casein hydrolysate	0	1000	0	0	1000	1000
L-脯氨酸 L-Proline	0	0	1000	0	1000	1000
2, 4-D	2	2	2	2	2	2
蔗 糖 Sucrose	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000	30,000

1.3 愈伤组织的诱导、种类划分和继代培养

将大麦干种子用 50% H₂SO₄ 在 25℃ 下处理 3 小时, 振荡去壳, 然后流水冲洗 30 分钟。用解剖刀从盾片处剥取成熟胚, 在 0.1% 升汞中表面消毒 8 分钟, 无菌水清洗 5 次后接种在诱导培养基上。置于 25℃ 下黑暗培养。

在表现特征上可以区分胚性愈伤组织(Embryogenic Callus, EC)和非胚性愈伤组织(Non-Embryogenic Callus, NEC)。色泽暗淡、多水、柔软的愈伤组织记为 NEC; 色泽新鲜、黄色或白色、质地致密, 表面上具有不同程度皱褶或颗粒感的愈伤组织被记为 EC。继代培养后每两周统计一次胚性愈伤组织的形成情况。

NEC 每个月继代一次。待胚性愈伤组织产生并长至 2~3mm 大小时, 及时选取并继代培养。继代培养在 25℃, 弱光照(500 lx)下进行。

1.4 再生植株根尖的染色体分析

取再生植株的生长旺盛的根尖, 在冰箱中预处理 24 小时(4℃), 卡诺氏液固定 4 小时, 用 1:1 比例配制的浓盐酸: 乙醇解离液处理 5 分钟, 用改良的苯酚品红染色、压片。Olympus BH-2 型显微镜镜检。

2 结果

2.1 胚性愈伤组织的高频诱导

大麦成熟胚在诱导培养基上培养一周后, 即可见愈伤组织的形成。其色泽暗淡、多水、柔软, 是非胚性愈伤组织。非胚性愈伤组织经继代培养, 2~3 个月后可以以一定频率陆续产生黄色或白色, 结构致密的胚性愈伤组织(图版-1)。

2.1.1 培养基成份对胚性愈伤组织诱导率的影响

以舟麦 2 号为材料研究了培养基对出愈率及 EC 形成率的影响(图 1)。在 6 种培养基上, 舟麦 2 号成熟胚的出愈率都相当高, 除 BM₃ 低一些(81%), 其余都在 90% 以上, 不同培养基之间, 初代愈伤组织的诱导率无明显差异。但是, 在继代培养中, 初代愈伤组织形成胚性愈伤组织的频率却差异显著。与不添加有机附加物的 BM₁ 相对照, 在培养基中添加水解酪蛋白(BM₂)、L-脯氨酸(BM₃)、提高维生素 B₁ 和肌醇的含量(BM₄)或同时添加水解酪蛋白、L-脯氨酸、提高维生素 B₁ 和肌醇含量(BM₅), 对胚性愈伤组织的形成均有明显的促进作用, 胚性

愈伤组织的诱导率在 20% 左右。而 BM_1 的胚性愈伤组织的形成率只有 8.5%。经显著性检验, BM_2 、 BM_3 和 BM_5 与 BM_1 比较, 胚性愈伤组织形成率差异显著 ($P < 0.05$)。 BM_5 和 BM_6 , 即 MS 和 CC 基本培养基在诱导胚性愈伤组织方面无明显差别。

2.1.2 全胚、胚芽段和胚根段的比较

以 86-166 和早熟 3 号品种为材料进行成熟胚切割培养试验。将剥离的成熟胚沿胚轴的中部切成胚芽段和胚根段。胚芽段包括胚芽、胚芽鞘、部分胚轴和部分盾片; 胚根段包括胚根、胚根鞘、部分胚轴和部分盾片。然后将全胚、胚芽段和胚根段分别接种于 BM_6 培养基上, 统计出愈率和胚性愈伤组织形成率, 结果见表 2。全胚的初代愈伤组织诱导率较高, 胚芽段和胚根段的有所下降。但是在胚性愈伤组织诱导率上, 胚芽段明显高于全胚, 两个品种相似。86-166 全胚的胚性愈伤组织诱导率为 23.3%, 其胚芽段则为 40%; 早熟 3 号全胚的胚性愈伤组织诱导率为 21.9%, 其胚芽段则高达 52.4%。同时, 胚根段几乎不能形成胚性愈伤组织, 其原因待查。

2.1.3 供试品种在胚性愈伤组织形成率上的差异 以胚芽段为外植体, 在 BM_6 培养基上对 10 个大麦品种的成熟胚培养进行了比较, 结果见表 3。每个品种都能诱导产生初代愈伤组织, 出愈率在 46.5%~80% 之间, 经独立性检验(卡平方测验), 初代愈伤组织诱导率的基因型效应达显著水平 ($P < 0.05$), 除 87-82 外, 其余 9 个基因型均能诱导出胚性愈伤组织, 形成率在 6.7%~60.5% 之间。经独立性检验, 胚性愈伤组织形成率的基因型效应极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 体细胞胚胎发生和植株再生

将胚性愈伤组织转入无 2, 4-D 的分化培养基, 两周后即可观察到发育成熟的体细胞胚, 其中少数具有典型的合子胚结构, 包括盾片、胚芽鞘和胚根鞘等部分。大多数体细胞胚的盾片呈叶状结构, 同时也可观察到其它形态的盾片。在分化培养基上, 体细胞胚能萌发成具根和芽的再生植株。与无激素分化培养基相比, 含 0.5mg/L KT 和 0.5mg/L NAA 的分化培养基更有利于植株再生。不同基因型间, 胚性愈伤组织的植株再生率有明显的差异(卡平方测验, $P < 0.05$, 表 3), 能形成胚性愈伤组织的基因型, 均能分化出再生植株, 植株再生率在 30%~86.7% 之间。其中, 87-12 的胚性愈伤组织每块都能再生植株。

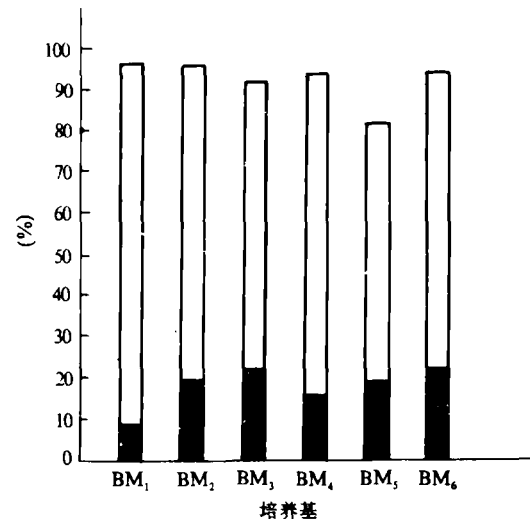


图 1 培养基对大麦成熟胚 EC 形成的影响*

Fig. 1 Influence of media on EC formation from barley mature embryo

* 1) 接种 1 个月后统计出愈率, 3 个月后统计 EC 形成率; The data for callus induction and EC formation frequencies were collected at 1 and 3 months after inoculation, respectively.

2) □ 出愈率 Callus induction rate; ■ EC 形成率 EC formation frequency.

表2 全胚、胚芽段和胚根段胚性愈伤组织形成率比较
Table 2 Comparison of efficiency of EC formation of complete embryo, coleoptile part and coleorhiza part

品种 Variety	外植体 Explants	接种个数(个) No. of explants inoculated	出愈率(%) Callus induction rate (%)	NEC 经继代的外植体数(个) No. of explants with NEC subcultured	形成 EC 的外植体数(个) No. of explants producing EC	EC 形成率* EC formation frequency (%)
86-166	全胚 Complete embryo	90	97.5	60	14	23.3
	胚芽段 Coleoptile part	105	64.8	80	32	40
	胚根段 Coleorhiza part	93	59.1	45	0	0
早熟3号 Zaoshu 3	全胚 Complete embryo	47	100	32	7	21.9
	胚芽段 Coleoptile part	89	60.7	42	22	52.4
	胚根段 Coleorhiza part	83	87.8	45	0	0

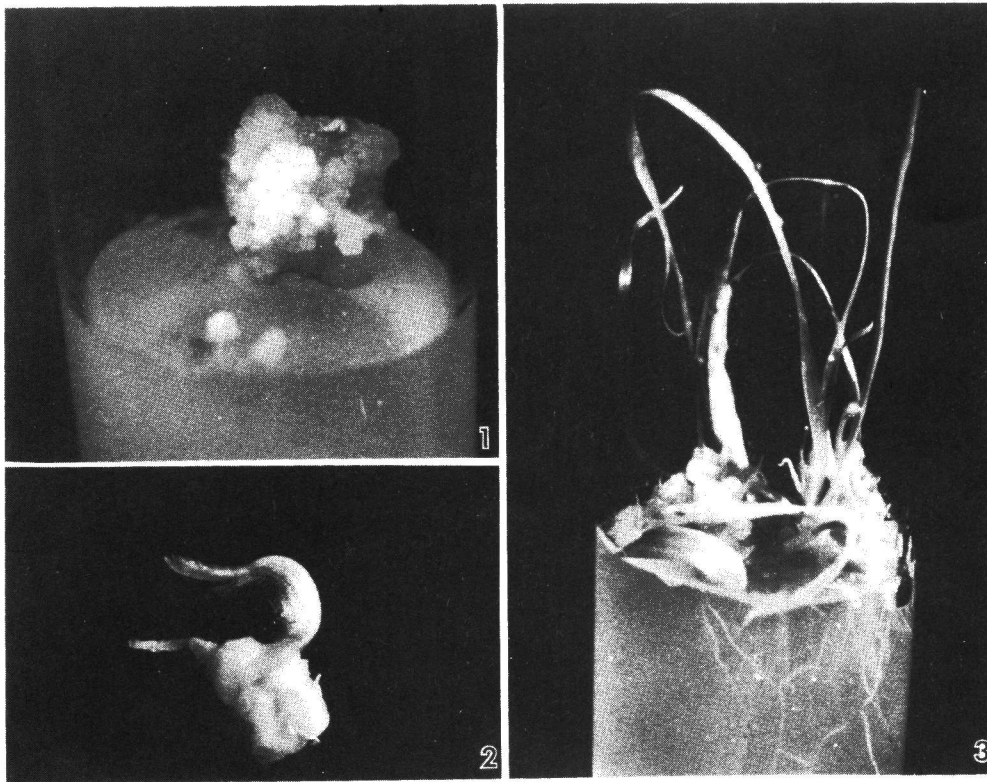
* 同图1。 The same as Fig. 1.

随着继代次数的增加,致密型的胚性愈伤组织常常由于强烈的形态发生或植株分化而失去愈伤组织状态,或者由于胚性愈伤组织的疏松化而丧失植株再生能力。但是,如果每次继代培养时都精心选择色泽鲜嫩、呈致密颗粒状的愈伤组织,则可以在一年或更长的时间内保持胚性愈伤组织的再生能力。从舟麦2号筛选到一个快速生长的鲜黄色由致密小颗粒组成的愈伤组织类型,经一年多的继代培养,仍保持植株再生能力。但较长时间继代培养后,再生植株会出现一定数量的白化苗。图版I-2、3显示植株再生的过程。

表3 不同基因型对成熟胚胚性愈伤组织形成率及植株分化率的影响
Table 3 Influence of different genotypes on EC formation and plant regeneration

品种 Variety	接种数(个) No. of explants inoculated	出愈率* Callus induction rate (%)	NEC 经继代的外植体数(个) No. of explants with NEC subcultured	形成 EC 的外植体数(个) No. of explants producing EC	EC 形成率* EC formation frequency (%)	植株再生率 Plant regeneration frequency (%)
浙原 87-82 Zheyuan 87-12	61	47.5	18	0	0	0
戈贝纳 Gebaina	75	48.7	30	2	6.7	50
秀 79-2 Xiu 79-2	143	55.2	69	10	14.5	33.3
农大 87-36 Nongda 87-36	119	71.4	63	13	20.6	76.9
87-12	127	46.5	63	14	22.2	100
86-166	129	53.5	42	15	35.7	30
浙农大 3 号 Zhenongda 3	125	80	66	25	37.9	56
沪麦 4 号 Humai 4	157	65	57	22	38.6	72.7
舟麦 2 号 Zhoumai 2	127	68	60	26	45	79.1
早熟 3 号 Zaoshu 3	169	71.6	81	49	60.5	86.7

* 同图1。 The same as Fig. 1.



图版说明

1. 从非胚性愈伤组织上面形成胚性愈伤组织; 2. 正在萌发的体细胞胚; 3. 再生的绿色小植株.

Explanation of Plates

1. Embryogenic callus formed from non-embryogenic callus; 2. The germinating somatic embryo; 3. The regenerated green plantlets.

通过对 10 株再生植株根尖细胞染色体数目的检查, 再生植株均为正常二倍体, $2n=14$ 。

3 讨论

大麦成熟胚的胚性愈伤组织在表观特征上, 与大麦幼穗、幼胚等来源的胚性愈伤组织及其它禾本科植物的胚性愈伤组织相似。不同的是, 本实验中大麦成熟胚胚性愈伤组织只能在形成松软的非胚性愈伤组织之后, 再经 2~3 个月的继代培养才能产生致密的胚性愈伤组织。为了减少失去胚性愈伤组织的机会, 在继代培养中, 注意观察和精心选择胚性愈伤组织将是试验成功的关键之一。

对大麦成熟胚的切割培养试验表明, 胚芽段的胚性愈伤组织诱导率显著高于全胚, 胚根段不能形成胚性愈伤组织。这说明胚根段可能以某种方式抑制了成熟胚全胚胚性愈伤组织的形成。Botti 等报道在大黍成熟胚培养中也有类似的现象^[4]。但 Rengel 把大麦成熟胚切成带叶状原基的茎尖、胚芽鞘、胚轴和盾片等部分, 并与全胚培养比较, 发现只有完整的胚才能形成胚性愈伤组织^[10]。与本文相比, 他可能把胚芽段切得太细, 故不能得出类似结果。陆瑞菊等对大麦成熟胚作了纵切和横切试验, 发现都能提高愈伤组织的诱导率, 但未报道对胚性愈伤组

织形成率的影响^[2]。我们认为,就大麦成熟胚培养而言,仅仅考虑出愈率的高低并无多大意义,必须将重点放在胚性愈伤组织形成率的提高上,因为具有植株再生能力的胚性愈伤组织在育种上才有意义。以成熟胚胚芽段为外植体,将可以大大提高大麦成熟胚的胚性愈伤组织形成率。

外植体的生理状态是影响离体培养反应的重要因素。大麦成熟胚培养中,通常是将种子吸胀16~24小时后剥胚接种。本研究表明,以未经吸胀的干胚为外植体可以得到良好的培养效果。干胚的生命活动基本上处于静止状态,在表面消毒时能减轻消毒剂对胚的损伤,这可能有利于提高组织培养的效率。

本研究供试的10个二棱大麦品种在出愈率及胚性愈伤组织形成率上都有显著差异,但基本上都能形成胚性愈伤组织。这说明成熟胚培养中基因型的效应主要表现在量的差异,而非质的差异。这与Rengel的结果相似^[10]。Taniguchi等^[11]、Ukai等^[12]、和王卉等均报道大麦成熟胚培养中存在明显的基因型效应。

本研究建立的大麦成熟胚培养系统的基本特点是:选择适当的基因型,用干种子的胚芽段为外植体,在改良的MS或CC培养基中添加有机附加物,在继代时精心选择胚性愈伤组织,从而能从大麦成熟胚高效诱导胚性愈伤组织和植株再生。本实验所获得的胚性愈伤组织可以长期继代保存,它既是一个良好的大麦体细胞无性系和植株再生系统,又能够和大麦悬浮细胞培养和原生质体研究接轨。我们已证明这种胚性愈伤组织可以成功地建立高度分散、均一、具有植株再生能力的胚性悬浮细胞系^[6]。该系统对于应用植物组织培养技术和基因工程进行大麦遗传育种具有一定的意义。

参 考 文 献

- 1 王卉、阮义理, 1993, 大麦科学, 2, 17~19.
- 2 陆瑞菊、黄剑华, 1990, 上海农业学报, 6(3), 20~22.
- 3 Bayliss, M. W. & S. D. M. Dun, 1979, Plant Sci. Lett., 14, 311~316.
- 4 Botti, C. & I. K. Vasil, 1983, Z. Pflanzenphysiol., 111, 319~325.
- 5 Dale, J. & E. Deambrogia, 1979, Z. Pflanzenphysiol., 94, 65~77.
- 6 Huang, C. N., H. J. Yan, Q. F. Yan, et al., 1993, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32, 19~25.
- 7 Lupitto, E., 1984, Annals of Botany, 61, 523~529.
- 8 Murashige, T., T. Skoog, 1962, Physiol. Plant., 15, 473~497.
- 9 Potrykus, L., C. T. Harms, H. Lorz, 1987, Theo. Appl. Genet., 4, 209~214.
- 10 Rengel, Z., 1987, Plant Physiol. Biochem., 25, 43~48.
- 11 Taniguchi, M., S. Enomoto, T. Komatsude, 1991, Japan J. Breed., 41, 571~579.
- 12 Ukai, Y., & S. Nishimura, 1987, Japan J. Breed., 37, 405~411.
- 13 Vasil, I. K., 1987, J. Plant Physiol., 128, 193~218.
- 14 Vostrakova-Nemcova, B., S. Rakousky, M. Onderej, 1983, Biologia Plantarum, 25, 288~292.

Efficient Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration from Barley Mature Embryos

Yan Huajun Wang Junhui Huang Chunnong

(Department of Biological Science and Biotechnology, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Abstract The primary callus induced from barley mature embryos is soft, watery and nonembryogenic, but after subculture it can produce compact embryogenic callus with a certain frequency. In this paper, the influence of different genotypes, organic nutrients and different parts of the embryo on the induction frequency embryogenic callus was investigated. The results are as follows: (1) The ten barley varieties studied showed significant difference in the frequency of embryogenic callus induction and plant regeneration; (2) The addition of casein hydrolysate and L-proline in the media and increased concentrations of vitamine B1 and inositol could enhance embryogenic callus formation; (3) The induction frequency of coleoptile part was higher than that of intact embryos, and the coleorhiza could not be induced to embryogenic callus. After transferred to 2, 4-D free medium, embryogenic callus could produce well-developed somatic embryos, which readily germinated into normal plants. When embryogenic callus was carefully selected and subcultured, it could retain plant regeneration capacity for one year or more.

Key words Barley (*Hordeum vulgare* L.); Mature embryo; Embryogenic callus; Plant regeneration