啤酒大麦幼胚愈伤组织诱导和植株高效再生

李静雯,张正英*,李淑洁,赵丽娟　(甘肃省农业科学院生物技术研究所,甘肃兰州 730070)

摘要　[目的]筛选出组织培养特性优良的大麦遗传转化受体。[方法]以7个大麦优良品种为实验材料,幼胚为外植体,研究基因型、培养基、激素等对大麦幼胚愈伤组织的诱导及植株再生的影响。[结果]在愈伤组织诱导过程中,甘啤4号等4个品种在三种诱导培养基上出愈率均较高,达100%;2,4-D与dicamba联用的MS2培养基上形成的愈伤组织质量优于MS1和MS3;品种间愈伤组织分化率差异显著,秀81-47分化率为88.9%,略低于模式品种Golden Promise;不同分化培养基的分化效率不同,在RN1培养基上的平均分化率较高。[结论]该试验筛选出愈伤组织诱导频率和绿苗分化率均较高,适合于遗传转化的受体材料,如秀81-47,甘啤4号。

关键词　大麦;幼胚;愈伤诱导;基因型;植株再生
中图分类号　S512.3+　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517－6611(2009)10－04375－03

Callus Induction and Efficient Plant Regeneration from Immature Embryos of Elite Barley Varieties

LI Jing-wen et al　(Biotechnology Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract　[Objective]To screen barley varieties suitable for genetic transformation that were excellent in tissue culture. [Method]Seven barley elite 1 ines and cultivars were studied to determine the influence of genotypes, media and plant hormones on the immature embryo derived callus induction and plant regeneration. [Result]The results indicated that the callus induction rate of four barley cultivars were very high on three different induction media. The quality of callus from MS2, which contained two plant hormones 2,4-D and Dicamba, were better than that from MS1 and MS3. Furthermore, differentiation frequencies among different varieties also varied significantly. Xiu 81-47 had a frequency of 88.9%, which was slightly less than Golden Promise. Two differentiation media had different effects on differentiation of barley varieties, and RN1 was better than RN2. genotypes. [Conclusion]Among the seven barley cultivars Xiu 81-47 and Ganpi 4 were identified with good performance in callus induction and plant regeneration.

Key words　Barley; Immature Embryo; Callus Induction; Genotype; Plant Regeneration

与进口大麦相比,国产啤酒大麦蛋白质含量一般高出2%[1],在质量上不能满足啤酒工业的需求。近年来,国内外有关提升麦芽品质的研究[2-4]为利用基因工程手段选育出低蛋白质、对氮肥不敏感的啤酒大麦品种提供了可能。尽管大麦遗传转化程序已经初步建立[5],但与基因转化受体系统的要求还有一定差距。目前多数研究获得的转基因大麦植株主要是基于模式品种Golden Promise(GP),但是基于该品种建立的组织培养体系[6]并不适合于其他具有重要经济价值的大麦品种。在大麦再生体系中仍存在着愈伤组织质量不高、基因型限制[7]、基因型的再生能力差、分化率低[8]等问题,从而降低了遗传转化效率,影响了啤酒大麦品质改良的基因工程研究。因此,建立啤酒大麦良好的组织培养条件和高效的植株再生体系仍具有重要意义。

该研究拟对影响大麦幼胚愈伤组织诱导及植株再生频率的因素进行分析,以期筛选出组织培养特性优良的大麦品种并建立高效的再生体系,为啤酒大麦遗传转化和品质改良等分子育种研究奠定基础,为大麦遗传转化技术在品种改良中的应用和大麦胚性细胞悬浮培养等相关研究提供有益借鉴。

1　材料和方法

1.1　大麦材料　供试材料甘啤4号、甘啤5号、秀麦1号、秀81-47、Schooner由甘肃省农科院啤酒原料研究所大麦育种组提供,花30由上海农科院提供,Golden promise由中国农科院品资所提供,共计7个大麦品种。大麦种子播种于大田后进行常规田间管理。

1.2　培养基　采用3种愈伤组织诱导培养基。基本培养基(Wan and Lemaux,1994)为MS培养基+1.25 mg/L $CuSO_4$+1 mg/L VB1+250 mg/L 肌醇+690 mg/L 脯氨酸+1 g/L 水解酪蛋白。诱导培养基MS1:基本培养基+2.5 mg/L dicamba;MS2:基本培养基+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L dicamba+187.5 mg/L 谷氨酰胺+25 mg/L 天门冬酰胺;MS3:基本培养基+3 mg/L 2,4-D。以上3种诱导培养基均添加0.5 mg/L ABA。继代培养基:基本培养基+0.5 mg/L dicamba。

分化培养基为RN1,RN2。RN1:MS+3 mg/LBAP+0.5 mg/L NAA;RN2:MS+2 mg/L BAP。生根培养基为1/2 MS+0.5 mg/L NAA。

所有培养基加入30 g/L麦芽糖和4.2 g/L琼脂粉,调pH至5.8,高压蒸汽灭菌,于121 ℃和0.1 MPa压力下灭菌20 min。

1.3　大麦愈伤组织的诱导　大麦开花后12~14 d(幼胚长约1.0~1.5 mm)剪下幼穗,剥出籽粒。70%的酒精表面消毒1 min,再用0.1%的升汞($HgCl_2$)消毒8 min,无菌水冲洗3~4次。在超净工作上用镊子剥取幼胚,去轴后盾片朝上接种于3种愈伤组织诱导培养基,于25 ℃暗培养。每个直径9 cm的培养皿放入40枚幼胚。诱导出的愈伤组织每2周继代1次,培养条件同上。

1.4　植株再生　将诱导出的愈伤组织转移到分化培养基RN1和RN2,于24 ℃,16 h光照/8 h黑暗条件下培养。当分化出的小苗长至2~3 cm时,将其转移到生根培养基上。待生成新根,长成一个完整的植株后(3叶1心),敞开瓶口,加入少许水,炼苗2~3 d,洗去根部的培养基,将苗移栽到营养钵中(蛙石:草炭:大田土=2:1:1)。待长出1片心叶后,带基质移栽至大田。

1.5　统计与分析　幼胚接种于愈伤组织诱导培养基3周后统计不同品种的愈伤组织诱导率,并观察愈伤组织质量,以愈伤组织的大小和表观(色泽,紧实度以及胚性区域比例)来

基金项目　甘肃省农牧厅生物技术专项"啤酒大麦籽粒蛋白质表达的遗传调控及种质创新"(GNSW-2006-05)。
作者简介　李静雯(1979－),女,甘肃榆中人,硕士,研究实习员,从事基因工程在作物育种中的应用研究。*通讯作者。
收稿日期　2009-01-16

判断。良好的愈伤组织应该是色泽光亮,淡黄,爽脆,质地紧密,表面有瘤状突起。其中 + + + 代表质量较佳愈伤组织,+ - - 代表质量较差愈伤组织。诱导的愈伤组织接种于分化培养基 4 周后,统计绿苗分化数。

出愈率(%)=诱导出愈伤的外植体数/接种的外植体数×100

绿苗率(%)=分化出绿苗的愈伤组织数/接种的愈伤组织数×100

对统计中的百分数经过反正弦(Arsin)转换,应用 SAS 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 基因型与激素对大麦愈伤组织诱导的影响 愈伤组织诱导率低是大麦植株再生困难的一个重要因素。该试验采用 3 种诱导培养基研究甘啤 4 号等 7 个品种的愈伤组织诱导率和愈伤质量,结果见表 1、表 2、图 1 C。

大麦幼胚在诱导培养基上培养 2 ~ 3 d 时,盾片开始膨大,4 ~ 5 d 后在大多数胚的周围形成愈伤组织团。7 个大麦品种在 3 种诱导培养基上均能形成愈伤,在激素种类和含量不同的 3 种诱导培养基上,花 30、秀 81 - 47、秀麦 1 号、Schnooer 4 个品种出愈率都很高,均为 100%,无显著差异。甘啤 4 号(67.1%)和甘啤 5 号(56%)出愈率则相对较低,说明基因型对大麦幼胚愈伤组织诱导频率的高低起重要作用。同一大麦品种在不同诱导培养基上形成的愈伤组织质量有显著差异(表 1)。花 30、秀 81 - 47、秀麦 1 号在诱导培养基 MS2 上形成的愈伤质量优于 MS1 和 MS3,而且颜色淡黄、质地紧密,颗粒状的胚性愈伤组织多形成于含 dicamba 的诱导培养基 MS2 和 MS1,并且生长速度也较快。

表 1 3 种不同诱导培养基对大麦幼胚愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of three different induction media on callus induction from immature embryo of different barley varieties

培养基 Medium	品种 Varieties	外植体数 No. of explants	出愈外植体数 No. of calli	出愈率//% Callus induction frequency	愈伤质量 Quality of calli
MS1	花 30	79	28	100	+ + -
	秀 81 - 47	92	92	100	+ - -
	秀麦 1 号	94	94	100	+ + -
	甘啤 4 号	189	131	67.3	+ + +
	甘啤 5 号	217	107	49.3	+ + +
	Schooner	61	61	100	+ + -
	G P	76	73	96.1	+ + +
MS2	花 30	136	136	100	+ + +
	秀 81 - 47	59	59	100	+ + +
	秀麦 1 号	106	106	100	+ + +
	甘啤 4 号	279	198	71	+ + +
	甘啤 5 号	66	57	88.4	+ + +
	Schooner	93	93	100	+ + -
	G P	49	48	98	+ + -
MS3	花 30	43	43	100	+ - -
	秀 81 47	65	65	100	+ + -
	秀麦 1 号	92	92	100	+ + -
	甘啤 4 号	146	89	61	+ + -
	甘啤 5 号	108	38	35.2	+ + +
	Schooner	71	71	100	+ - -

注:Golden Promise(GP) 因幼胚数量有限,在 MS3 培养基上未进行培养。

Note: Golden Promise (GP) isn't cultured on MS3 medium because the number of immature embryo is limited.

为获得较高愈伤组织诱导频率,在大麦幼胚愈伤组织诱导时选择激素种类和含量也很重要。从供试的 3 份大麦幼胚愈伤组织的诱导频率来看(表 2),2,4-D 和 dicamba 对不同品种的出愈率影响不同。dicamba 能明显提高甘啤 4 号的出愈率。2,4-D 和 dicamba 对 Schnooer 和甘啤 5 号出愈率的影响没有明显差异。

表 2 诱导培养基中激素处理对不同基因型出愈率的影响

Table 2 Effects of plant hormones in medium on callus induction rate of different genotypes

品种 Varieties	2,4-D	Dicamba	2,4-D + Dicamba
Schnooer	97.9	100	100
甘啤 4 号	32.7	82.6	61
甘啤 5 号	51.8	49.3	50

2.2 大麦基因型对幼胚愈伤组织分化的影响 将诱导产生的愈伤组织进行分化培养。未经继代而直接进行分化,为第 1 次分化,经过 1 次继代后的愈伤组织再分化,为第 2 次分化,依此类推,分化培养 2 周后,在一些淡黄色愈伤组织表面分化出绿点,其中一部分能继续分化形成绿苗,生长发育成植株(图 1 D ~ H);而另一些愈伤组织则只能分化出绿点和根,难以继续分化成苗。不同基因型大麦的分化再生率差异极显著($F = 21.075 > P_{0.01}$)。秀 81-47,甘啤 4 号,甘啤 5 号,秀麦 1 号,Schnooer,Goldern Promise 在 RN1 和 RN2 培养基上均能再生绿苗,其频率介于 7.1% ~ 92.9%,而花 30 在 RN2 培养基上无绿苗形成,表明大麦幼胚诱导的愈伤组织能否分化成苗具有较强的品种特异性。秀 81-47 分化培养 1 周后,就开始分化形成绿点和绿芽,继代培养后再生成苗。分化率低的品种,其愈伤组织转到分化培养基上,很难形成绿苗和绿点,有的甚至严重褐化死亡。

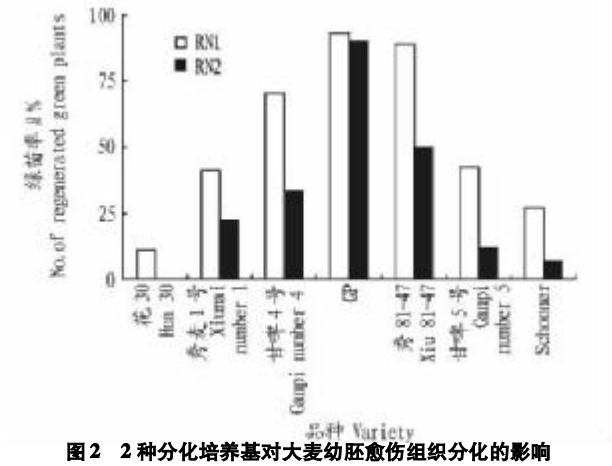


图 2 2 种分化培养基对大麦幼胚愈伤组织分化的影响

Fig. 2 Effects of two differentiation mdeia on callus differentiation from immature embryos of different barley varieties

RN1,RN2 分化培养基对 7 份供试大麦材料的植株再生产生不同影响(图 2)。在绿苗分化上甘啤 4 号,甘啤 5 号,秀 81-47,秀麦 1 号,Goldern Promise 在 RN1 和 RN2 分化培养基均有较高分化率,且 RN1 和 RN2 分化培养基表现出显著差异($F = 13.696 > P_{0.05}$)。RN1 分化培养基优于 RN2 分化培养基。除花 30 在 RN2 培养基上无绿苗出现外,其他 6 个供试品种在 RN1 分化培养基上分化率均高于 RN2 分化培养基。秀 81-47 在 RN1 上分化率达 88.9%,略低于大麦组培模式品种 Goldern Promise(92.9%),甘啤 4 号在 RN1 上分化率

也较高,达 70.4%。这说明除基因型对植株再生起重要作用外,分化培养基中添加不同激素也对植株再生产生重要影响。此外,甘啤 4 号、甘啤 5 号、秀麦 1 号及 Schnooer 等品种有一定数量白化苗产生。

3　讨论

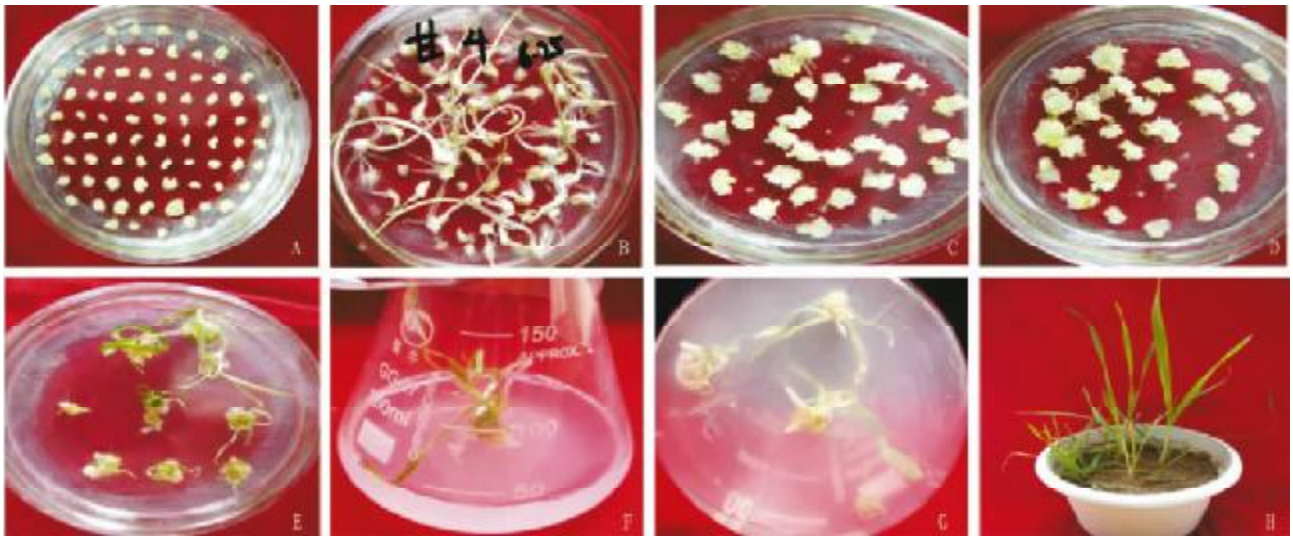
该研究表明大麦基因型对愈伤组织诱导和分化有很大影响。在 7 种基因型中,秀 81-47、秀麦 1 号、花 30、Schnooer 出愈率均较高,为 100%。甘啤 4 号和甘啤 5 号出愈率均在 50% 以上。因此,若以诱导愈伤组织进行悬浮培养为目的,这几个大麦品种都是良好的候选材料。

组培条件中,选择培养基对提高大麦幼胚愈伤组织的诱导是有效的,而且对愈伤组织的质量也有一定影响。该试验在幼胚诱导培养基中增加了 $CuSO_4$ 用量,添加了谷氨酰胺和天门冬酰胺,结果发现愈伤组织的诱导率明显较高,而且形成的胚性愈伤组织也较多。因为在胚性愈伤组织形成的早期对有机氮的要求较高,而无机氮则利于芽生长[9],而且较高浓度的 $CuSO_4$ 对提高大麦植株再生较重要[10-11]。

体细胞胚胎发生中 dicamba 是禾谷类作物愈伤组织诱导培养基中使用最广泛的一种激素。Castillo[12]等研究表明,对 2,4-D 而言,dicamba 利于胚性愈伤组织的诱导和维持以及提高愈伤组织分化潜能,但 dicamba 的使用也增加了体细胞变异。该研究中白化苗的形成可能与此有关。Tiidema 等[13]也认为对于白化苗的形成,添加有 dicamba 的愈伤诱导培养基的影响远大于分化培养基。有研究表明在愈伤组织形成后将其转入含有 2,4-D,BAP 和 Cu^{2+} 的诱导培养基培养 1 周,再接种到分化培养基可降低白化苗的产生[14]。下一步研究可进行此尝试来降低白苗率。

在大麦幼胚培养中,未成熟胚极易过早发芽。该试验表明,0.5 mg/L ABA 可有效地抑制胚芽的生长且有助于提高出愈率和植株的再生。该试验中还发现添加有 ABA 形成的愈伤组织较为致密(图 1 A、B)。此外,幼胚愈伤组织诱导和胚芽鞘发芽现象还与幼胚取材时期有关。该试验选取气温为 21 ℃时,大小为 1 ~ 1.5 mm 的幼胚进行诱导,愈伤组织诱导率和质量均较高,且只有极个别幼胚有发芽现象。

总之,秀 81-47 和甘啤 4 号分化率较高,可作为大麦遗传转化的理想受体。甘啤 5 号、秀麦 1 号、Schnooer 和花 30 均诱导率较高而分化率不高,可进一步研究各品种的最佳分化再生条件,以提高其分化成苗率。



注:A 添加 ABA 诱导的大麦愈伤组织;B 未添加 ABA 的培养基胚芽鞘生长;C 诱导 3 周大麦愈伤组织;D 愈伤组织绿原基的形成;E 愈伤组织的芽分化;F 愈伤组织再生成苗;G 生根培养;H 大麦再生植株。

Note: A. Calllus drived from media containing ABA; B. Coleoptile growth on media omitting ABA; C. Barley callus after three weeks induction; D. Formation of green nod of callus; E. Differentiation of buds of callus; F. Seeding from callus; G. Rooting culturing; H. Regeneration of barley plants.

图 1　图 版

Fig. 1　Chart

参考文献

[1] 王莉. 关于国产啤酒大麦与进口啤酒大麦品质比较的研究[C]//中国大麦文集(第五集). 北京: 中国农业科技出版社,2001:229 - 235.

[2] NUUTILA A M, RITALA A, KADSEN R W, et al. Expression of fungal thermotolerant endo-1,4-B-glucanase in transgenic barley seeds during germination [J]. Plant Mol Biol,1999,41:777 - 783.

[3] TULL D, PHILLIPSON B A, KRAMHOFT B, et al. Enhanced amylolytic activity in germinating barley through synthesis of a bacterial alpha - amylase[J]. Cereal Science,2003,37:71 - 80.

[4] 刘雷,尹钧,王振云. 利用基因枪法将 trxs 基因导入大麦的研究[J]. 麦类作物学报,2005,25 (4) :1 - 5.

[5] IYER L M, KUMPATLA S P, CHANDRASEKHARAN M B, et al. Transgene silencing in monocot [J]. Plant Mol Bio,2000,43:323 - 346.

[6] WAN Y, LEMAUX P G. Gemeration of large numbers of independently transformed fertile barley plants[J]. Plant Physiol,1994,104:37 - 48.

[7] GOLDSTEIN C S, KRONSTAD W E. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, Hordeum vulgare[J]. Theor Appl Genet,1986,71:631 - 636.

[8] HALAMKOVA E, VAGERA J, OHNOUTKOVA L. Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars[J]. Biologia Plantarum,2004,48(2):313 - 316.

[9] NUUTILA A M, HAMALAINEN J, MANNONEN L. Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant Sci, 2000,151:85 - 92.

[10] 李会勇,尹钧,刘雷,等. Cu^{2+} 浓度对啤酒大麦幼胚组织培养与植株再生的影响[J]. 麦类作物学报,2003,23(2) :27 - 29.

[11] BARTLETT J G, ALVES S C, SMEDLEY M, et al. High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation [J]. Plant Methods,2008, 4:22 - 33.

[12] CASTILLO A, EGANA B, SANZ J M, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain[J]. Plant Cell Rep,1998,17:902 - 906.

(下转第 4470 页)

比坝燕 4 号大;随碱浓度逐渐增加,两燕麦品种根系活力又呈显著下降趋势,且坝燕 1 号比坝燕 4 号下降幅度大。

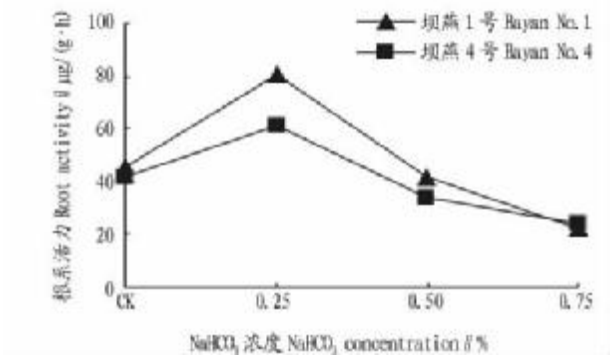


图 4 $NaHCO_3$ 胁迫对燕麦幼苗根系活力的影响

Fig. 4 The effect of $NaHCO_3$ stress on root activity of oats seedling

2.5 $NaHCO_3$ 胁迫对燕麦幼苗叶绿素含量的影响 叶绿素是光合作用过程中最重要的色素,在植物的光合作用中对光能的吸收、传递和转化起着极为重要的作用,其含量高低与光合作用密切相关。由图 5 可见,随 $NaHCO_3$ 浓度的增加,2 种燕麦幼苗叶绿素含量均下降,浓度 0.50% 和 0.75% $NaHCO_3$ 处理的燕麦自移栽后生长即受到严重抑制,30 d 后死亡。$NaHCO_3$ 浓度为 0.25% 时,坝燕 1 号叶绿素含量较对照降低了 19.38%,坝燕 4 号则降低了 11.03%。

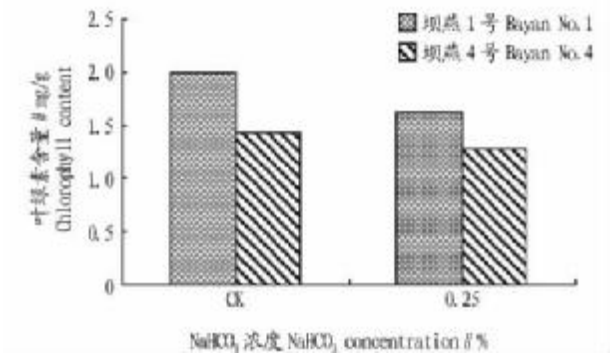


图 5 $NaHCO_3$ 胁迫对燕麦幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 5 The effect of $NaHCO_3$ stress on chlorophyll content of oats seedling

3 结论

(1)生物量是植物对碱胁迫响应的综合体现。该研究结果表明,$NaHCO_3$ 胁迫严重抑制了燕麦的生长,2 个供试品种的生物量和产量均迅速下降。在低浓度碱胁迫时,坝燕 1 号的生长量大于坝燕 4 号,而在高浓度时却低于坝燕 4 号。这表明在低碱胁迫条件下,坝燕 1 号比坝燕 4 号耐碱性强;在高碱胁迫条件下,坝燕 4 号有更强的碱环境适应性。

(2)碱胁迫下,燕麦叶片中叶绿素含量显著降低,说明碱胁迫加速了燕麦叶绿素的降解,使更多的叶绿素遭到破坏,影响了类囊体膜的结构稳定性,从而降低叶绿体对光能的吸收[16-17]。

(3)渗透调节是植物适应盐碱胁迫的基本特征之一。在逆境条件下,细胞内积累一些物质,如脯氨酸、可溶性糖等,以调节细胞内的渗透势,从而尽可能维持植株体内的水分平衡[18]。该试验结果表明,在碱胁迫条件下,燕麦组织中的脯氨酸含量增加,在低浓度碱胁迫时,坝燕 1 号的脯氨酸含量显著高于坝燕 4 号,而在高浓度时却低于坝燕 4 号。这一结果表明,在低浓度碱胁迫下,坝燕 1 号比坝燕 4 号的自我渗透调节能力强;而在高浓度碱胁迫下,坝燕 4 号的耐碱性更强。

(4)根系活力是体现根系功能的重要生理指标,直接影响植株对矿质营养和水分的吸收利用。该试验结果表明,在低浓度时,碱性环境促使燕麦植株根系活力增强;随碱浓度的升高,燕麦根系活力显著降低。

参考文献

[1] ZHU J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science,2001,6(2):66-71.
[2] 牛东玲,王启基. 盐碱地治理研究进展[J]. 土壤通报,2002,33(2):449-455.
[3] 李树华,许兴,惠红霞,等. 土壤盐碱胁迫对春小麦 K^+、Na^+ 选择性吸收的影响[J]. 西北植物学报, 2002,22(3):587-594.
[4] 盛彦敏,石德成,肖洪兴,等. 不同程度中碱性复合盐对向日葵生长的影响[J]. 东北师范大学学报:自然科学版, 1999(4):65-69.
[5] 谢得意,王惠萍,王付欣,等. 盐胁迫对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国棉花, 2000,27(9):12-13.
[6] 殷立娟,祝玲. 羊草苗对盐碱胁迫的反应和适应性[J]. 东北师范大学学报:自然科学版, 1989(4):87-95.
[7] 王萍,殷立娟,李建东. NaCl 胁迫下羊草幼苗的生理反应及外源 ABA 的缓解效应[J]. 应用生态学报, 1996, 7(2):155-158.
[8] 张福成. 胡麻耐盐度观测[J]. 内蒙古农业科技,1979(3):28-29.
[9] ERDEI L,TALEISNIK E. Changes in water relation parameters Under osmotic and salt stress in maize and sorghum[J]. Plant Physiol,1993,89:381-387.
[10] GORHAM J. Salt tolerance in triticeae:K/Na discrimination in some pereniialw heatgrassed and their amphloids[J]. J Exp Bot,1994,45:441-447.
[11] 王波,宋凤斌. 燕麦对盐碱胁迫的反应和适应性[J]. 生态环境,2006,15(3):625-629.
[12] MISHRA SHITOLE. Growth and yield of oat (*Avena sativa* L.) cv Kent under Na_2SO_4 doninated saline soil [J]. Geobios,1986,13:253-257.
[13] 邹琪. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
[14] 刘国花. 盐胁迫对豌豆幼苗生理指标的影响[J]. 湖北农业学报,2007,46(3):366-368.
[15] 颜宏,赵伟,尹尚军,等. 羊草对不同盐碱胁迫的生理响应[J]. 草业学报,2006,12(6):49-55.
[16] 石德成,赵可夫. NaCl、Na_2CO_3 胁迫下星星草根际 K^+,Na^+,Ca^{2+} 的生理行为[J]. 应用与环境生物学报,1997,3(2):112-118.
[17] 石德成. 东北碱化草地主要成分 Na_2CO_3 对羊草危害因素分析[J]. 草业学报,1993(1):1-5.
[18] 吴雪霞,朱为民,朱月林,等. NaCl 胁迫对不同品种番茄幼苗生长和叶绿素荧光特性的影响[J]. 西南农业学报, 2007,20(3): 379-382.

(上接第 4377 页)

[13] TIIDEMA A,TRUVE E. Effieient regeneration of fertile barley plants from callus cultures of several Nordic cultivars[J]. Hereditas,2004,140:171-176.
[14] JIANG W,CHO M J,LEMAUX P G. Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivals[J]. Plant Biotechnol,1998,15:63-69.