

野大麦幼根的愈伤组织诱导及植株再生

程肖蕊 张亚兰 杨松涛 李彦舫

(中国人民解放军农牧大学生物教研室, 长春 130062)

提 要 以野大麦(*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link)的幼根为外植体,采用 MS 培养基附加不同浓度的 2,4-D 诱导愈伤组织,结果以 2,4-D 4.0 mg/L 为最佳。以较低浓度 2,4-D 培养基进行愈伤组织的继代。在 MS 培养基附加 2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L,以极低的频率分化出芽,再在附加 IAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + Sucrose 20 g/L 上的 MS 培养基上生根,最终再生成完整植株。

关键词 野大麦;愈伤组织;植株再生

近年来,生物技术的应用和发展为禾本科植物的遗传开辟了广阔的前景,尤其禾谷类的组织培养技术作为基础性工作更是广泛应用于植物,特别是作物的遗传改良^[1],而目前对禾本科植物进行遗传操作中遇到的突出困难之一是外植体源受到极大的限制^[2],同时建立一个稳定的组织培养体系则是进行遗传操作的前提,禾本科作物的根组织培养再生植株十分困难,在大麦^[3]和水稻^[4]上曾有过报道。关于野大麦(*Hordeum brevisubulatum*)根的组织培养,国内外至今尚未见报道,本研究以野大麦的种子幼根为外植体,建立野大麦幼根组织培养的体系,为进一步进行野大麦的遗传改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织的诱导

将野大麦成熟种子剥去颖壳,用 70% 酒精浸泡 1 min,再用 0.1% 升汞浸泡 25 min,无菌水冲洗 5 次,接种于 0.7% agarose 的培养基上,待其幼根长至 2 cm 左右时,将其取出,切成 0.5 cm 左右的小段接种在基本培养基为 MS + 300 mg/L CH + 30 g/L sucrose + 0.7% agarose pH 5.8 附加 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、3.5 mg/L、4.0 mg/L、6.0 mg/L、8.0 mg/L 2,4-D 的培养基上,在 25℃ ± 1℃ 的黑暗条件下诱导愈伤组织。

1.2 愈伤组织的继代

将诱导出的愈伤组织,接到基本培养基为 MS + 300 mg/L CH + 30 g/L sucrose + 0.7% agarose pH 5.8 附加 0.5 mg/L、1.0 mg/L 2,4-D 的培养基上,在 25℃ ± 1℃、1 000 Lx 光照 10 h/d 的条件下培养,继代时挑选胚性愈伤组织,淘汰非胚性愈伤组织。

1.3 愈伤组织的分化

挑选胚性愈伤组织接种到基本培养基为 MS + 300 mg/L CH + 30g/L sucrose + 0.7% agarose pH 5.8 附加 IAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + ZT 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L 及 2,4-D 1.0mg/L + 6-BA 0.1 mg/L 上进行分化,待分化出芽后转至附加 IAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + sucrose 20 g/L 的培养基上进行生根培养。

1.4 再生植株的移栽

再生成完整植株后,取掉瓶塞,置温室中进行练苗1周后,用水冲洗掉根部琼脂,将其移植至土壤肥沃的花盆中,置温室中生长,温度不低于10℃、湿度不小于70%,待其缓过苗且有分蘖生成后,将其移植到大田。

2 结 果

将幼根切段接入诱导培养基培养10 d左右,切段两端长出白色松软的团状物即愈伤组织(照片2),以附加2,4-D 4.0 mg/L为最优,其出愈率(以出的愈伤组织块数占接种块数之比计算)达20%,2,4-D浓度过高或过低皆不利于诱导愈伤组织。2,4-D浓度在0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L、2.0mg/L、3.5mg/L、4.0mg/L、6.0mg/L、8.0mg/L时,平均出愈率分别为0、0.3%、8%、15%、20%、10%、2%。

将诱导出的愈伤组织接入继代培养基,起初在含2,4-D 0.5 mg/L的培养基上愈伤组织表面易长出大量白毛状根,同时长出大量绿点。在含2,4-D 1.0 mg/L的培养基上,也有少量根及绿点出现,同时有一些黄色颗粒状愈伤,即多为胚性愈伤,也有一些灰白色,表面无较平滑湿润的愈伤组织,即多为非胚性愈伤组织(照片3)失去分化能力,故在继代过程中淘汰这样的愈伤组织,以后几代则采用2,4-D 1.0 mg/L的培养基,经过5~6次继代,即可得到几乎全部为黄色颗粒状结构,较致密生长较快的愈伤组织(照片4)。

将上述胚性愈伤组织转至分化培养基上,在含有IAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + ZT 1.0 mg/L的培养基上,最终生出大量根及少量绿点,在含有NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L的培养基上最终生成大量绿点及根,而在含有2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L的培养基上出现一些绿点同时以极低频率为5%(分化出芽的数量占进行分化的愈伤块数之比)再生出丛生芽。将该芽转至含有IAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + sucrose 20 g/L的培养基上进行生根培养,待根长出5~6条后,将其移栽,其成活率达85%。

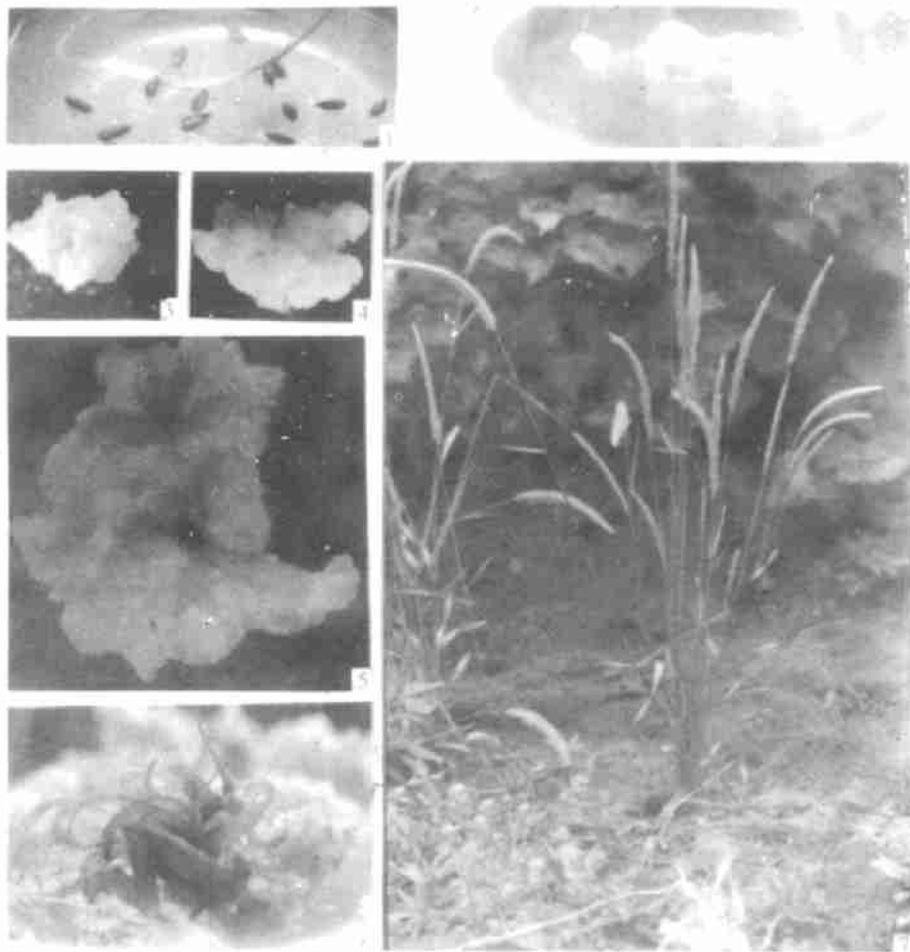
3 讨 论

在野大麦幼根组织培养过程中,时常出现带绿点的愈伤组织,将该绿点在实体解剖镜下观察(照片5),其外部形状象叶子,但经继续培养或转至其它多种培养基上培养,皆没有生成芽,在朱至清的簇毛麦^[1]实验中,其中部分绿斑经培养再生出植株,故带绿点的愈伤组织是否能够再生出植株,我们将在进一步的实验中研究。

用实体解剖镜观察的结果表明,在野大麦愈伤组织表面没有胚状体结构,估计是通过器官发生途径再生植株,对其发生的内部机理将在下一步工作中进行,正如邢登辉^[5]、王海波^[6,7]所述,总结细胞培养历史,忽视了具有共性意义的理论和探讨。尽管在生物技术发展迅猛的今天,对组织培养这种基础性工作的规律性探讨的缺乏,无疑成为其前进道路上的绊脚石。组织培养工作的继续深入研究仍具有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 朱至清等. 簇毛麦和挪威大麦草幼穗愈伤组织诱导植株再生. 植物学通报, 1984, 2(2-3): 69-71
- 2 李慧蓉. 禾本科植物叶培养及其意义. 植物生理学通讯, 1991, 27(6): 443-445
- 3 王君晖等. 大麦幼根的组织培养和植株再生. 植物生理学通讯, 1994, 30(1): 30-31
- 4 贾勇炯等. 从水稻根部悬浮培养细胞分离原生质体及植株再生. 生物工程学报, 1994, 10(2): 168-172
- 5 邢登辉等. 禾谷类作物细胞培养-体细胞胚性潜力的诱导与表达. 生物学通报, 1994, 29(7): 1-3
- 6 王海波. 组织培养中细胞状态的调控. 作物杂志, 1991, (3): 3-6
- 7 王海波等. 小麦愈伤组织状态调控与原生质体培养. 中国农业科学, 1996, 29(6): 8-14



- 照片 1. 用于诱导野大麦愈伤组织的外植体 - 幼根 2. 刚诱导出的野大麦愈伤组织
 3. 野大麦幼根的非胚性愈伤组织 4. 野大麦幼根的胚性愈伤组织
 5. 实体解剖镜下野大麦幼根愈伤组织上的绿点 6. 野大麦幼根愈伤组织的植株再生
 7. 移栽大田的野大麦植株成熟

Tissue Culture of Root and Plant Regenerated from *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link

CHENG Xiaonui, ZHANG Yalan, YANG Songtao and LI Yanfang

(University of PLA Agricultural and Animal Sciences, Department of Biology, Changchun 130062)

Abstract Using young root of *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link as explant, calli were induced on basal medium MS with different concentrations of 2,4-D. Results showed the best concentration was 4.0 mg/L. Calli were cultured on media with low concentration of 2,4-D. After the low shoot regenerated frequency appeared on MS with 2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L, those calli took roots on MS with IAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + sucrose 20 g/L, at last the whole plant regenerated.

Key words *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link, Calluse, Plant regenerated

(责任编辑:任 禾)