

引文格式: 周洪斌, 王卫斌, 王梦玥, 等. 不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对大麦成熟胚组培特性的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 9–17. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202210010](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202210010)

不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对大麦成熟胚组培特性的影响*

周洪斌[#], 王卫斌[#], 王梦玥, 熊静蕾, 陈升位, 毛孝强^{**}

(云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 【目的】探究不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对大麦成熟胚组培特性的影响。【方法】以 Bowman、北青 7 号和光头大麦的成熟胚为材料, 研究不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对大麦成熟胚愈伤诱导率、长根率、长芽率、褐化率、绿点率、再分化率和愈伤湿质量的影响。【结果】Bowman、北青 7 号和光头大麦成熟胚的 7 种组培特性间存在不同程度差异。与对照相比, 0.75 mg/L Cu^{2+} 可减少 10.43% 的成熟胚长根、7.48% 的成熟胚长芽、8.24% 的愈伤组织褐化、20.74 mg 的愈伤湿质量; 4.00 mg/L Ag^+ 可提高 6.47% 的愈伤组织诱导率, 可减少 9.08% 的成熟胚长根、7.96% 的成熟胚长芽和 9.67% 的愈伤褐化; 0.75 mg/L Cu^{2+} 和 4.00 mg/L Ag^+ 对愈伤细胞转绿、愈伤增殖和再分化均无抑制。【结论】适宜质量浓度的 Cu^{2+} 和 Ag^+ 可有效抑制大麦成熟胚长根、长芽和愈伤组织褐化, Ag^+ 还可有效提高愈伤诱导率; 在基于 MS 培养基的大麦成熟胚愈伤组织诱导和再分化培养中, Cu^{2+} 和 Ag^+ 的适宜质量浓度分别为 0.75 和 4.00 mg/L。研究结果可为构建大麦成熟胚的愈伤诱导及其再分化技术体系提供理论支持。

关键词: 大麦; 成熟胚; 组培特性; Cu^{2+} 质量浓度; Ag^+ 质量浓度

中图分类号: S512.301

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2024) 01-0009-09

Effects of Different Mass Concentrations of Cu^{2+} and Ag^+ on the Tissue Culture Characteristics of Barley Mature Embryos

ZHOU Hongbin, WANG Weibin, WANG Mengyue, XIONG Jinglei,

CHEN Shengwei, MAO Xiaoqiang

(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of different mass concentrations of Cu^{2+} and Ag^+ on the tissue culture characteristics of barley mature embryos. [Methods] Three barley genotypes, including Guangtoudamai, Beiqing No.7 and Bowman, were used to evaluated the effects of different mass concentrations of Cu^{2+} and Ag^+ on the callus induction rate, rooting rate, shooting rate, browning rate, green-dot rate, redifferentiation rate and wet weight of callus of the barley mature embryos.

[Results] The seven tissue culture characteristics were different among the mature embryos of

收稿日期: 2022-10-07

修回日期: 2024-02-08

网络首发日期: 2024-03-14

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060457); 云南省科技厅基础研究重点项目 (202201AS070066)。

作者简介: [#]对本文贡献等同, 为并列第一作者。周洪斌 (1998—), 男, 云南弥渡人, 在读硕士研究生, 主要从事麦类作物分子遗传研究。E-mail: yndl_zhb@126.com; 王卫斌 (1995—), 男, 云南曲靖人, 在读博士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学、基因挖掘与利用研究。E-mail: little_bit@163.com

^{**}通信作者 Corresponding author: 毛孝强 (1969—), 男, 云南威信人, 硕士, 副教授, 主要从事麦类作物遗传与育种研究。E-mail: ynmxq@163.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240313.1702.001>



Bowman, Beiqing No.7 and Guangtoudamai. Compared with the control, the rooting rate was reduced with 10.43%, shooting rate was reduced with 7.48%, browning rate was reduced with 8.24%, and wet weight of callus reduced with 20.74 mg, under 0.75 mg/L Cu^{2+} . Under 4.00 mg/L Ag^+ , the callus induction rate was increased with 6.47%, rooting rate was reduced with 9.08%, shooting rate was reduced with 7.96%, and browning rate was reduced with 9.67%. The 0.75 mg/L Cu^{2+} and 4.00 mg/L Ag^+ treatment did not showed any inhibition for the green-dot rate, redifferentiation rate and wet weight of per unit callus. [**Conclusion**] Cu^{2+} and Ag^+ with appropriate mass concentration can effectively inhibit the rooting, shooting of barley mature embryo and callus browning, and Ag^+ can also effectively improve the callus induction rate; the appropriate mass concentrations of Cu^{2+} and Ag^+ in MS medium used to induce barley mature embryo callus and redifferentiate the calluses are 0.75 and 4.00 mg/L, respectively. The results can provide theoretical support for the construction of a callus induction and redifferentiation technology system for barley mature embryo.

Keywords: barley; mature embryo; tissue culture characteristic; Cu^{2+} mass concentration; Ag^+ mass concentration

基于愈伤组织的农杆菌浸染技术是大麦遗传转化的主要方法^[1]。目前,用于农杆菌浸染的大麦愈伤组织大多来源于幼胚^[2],虽然幼胚愈伤诱导率和再分化效率相对较高,但易受大麦基因型和生长季节的限制。以大麦成熟胚为外植体诱导愈伤组织虽不受生长季节限制,但在培养过程中成熟胚易长根、长芽,诱导的愈伤易褐化、质量相对较差,愈伤诱导率和再分化率也较低。为解决上述问题,不同学者探讨了基因型^[3]、2,4-D 浓度^[4]、成熟胚切割方式^[5]等因素对大麦成熟胚愈伤质量和诱导率的影响,发现采用 2~6 mg/L 2,4-D,结合成熟胚纵向或横向切割处理可有效抑制培养进程中成熟胚长根和长芽,进而改善大麦成熟胚愈伤组织质量,提高其诱导率。尽管如此,但鲜有大麦成熟胚愈伤组织易褐化、再分化率偏低、绿化愈伤细胞再分化流产(细胞转绿后不能再分化)的报道。

作为植物生长的必要微量元素,适宜浓度 Cu^{2+} 可有效抑制大麦胚芽鞘生长,进而提高愈伤组织的再分化率^[6]。不同学者以 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为 Cu^{2+} 源,报道了啤酒大麦^[6]、水稻^[7]、小麦^[8]等植物未成熟胚愈伤诱导及其再分化培养中 Cu^{2+} 的有效浓度,但 Cu^{2+} 效应及其有效浓度具有基因型依赖性。 AgNO_3 可有效提高精氨酸脱羧酶活性,促进细胞中多胺的合成,进而提高细胞中多胺浓度,减缓植物组织褐化,提高愈伤组织的诱导率和再分化率^[9-10]。在大麦幼胚愈伤组织诱导培养中常以 AgNO_3 作为 Ag^+ 源,但不同大麦基因型所需

AgNO_3 有效浓度也存在较大差异^[11]。

前人虽证实 Cu^{2+} 和 Ag^+ 可有效提高大麦未成熟胚愈伤组织的诱导率或再分化率,但 2 种离子协同对大麦成熟胚长根、长芽、愈伤褐化等组培特性的影响仍不清楚。本研究以北青 7 号、Bowman 和光头大麦的成熟胚为材料,分析 MS 培养基中不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Ag^+ 对大麦成熟胚长根、长芽、愈伤组织褐化等 7 种组培特性的影响,期为优化大麦、特别是国内主要大麦品种成熟胚愈伤组织诱导及其再分化技术体系提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 Bowman、北青 7 号和光头大麦为材料。其中, Bowman 为二棱皮大麦,国外育成品种;北青 7 号为六棱裸大麦,育成品种;光头大麦为六棱裸大麦,地方品种。Bowman 和光头大麦由浙江省农业科学院国家大麦改良中心提供,北青 7 号由迪庆州农业科学研究所提供。所有材料均由课题组繁育、保存。

1.2 试验方法

1.2.1 材料种植

试验材料均种植于云南农业大学教学试验农场。于 2019 年 11 月 10 日播种,株行距为 5 cm×20 cm。其他田间管理措施与大田常规生产基本一致。在完熟期收取不同材料种子置于牛皮袋,自然风干,室温保存,备用。

1.2.2 培养基配制

在 MS 培养基中添加蔗糖 30.0 g、酪蛋白 1.0 g、 VB_1 1.0 mg、肌醇 350.0 mg、脯氨酸 690.0 mg 和麦草畏 2.5 mg, 然后添加适量 AgNO_3 , 定容至 1 000 mL, 构建 0、2.00、4.00、6.00 和 8.00 mg/L Ag^+ 处理培养基; 添加 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1 000 mL, 构建 0、0.75、1.25、1.75 和 2.25 mg/L Cu^{2+} 处理培养基。

在 MS 培养基中添加蔗糖 20.00 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 132.00 mg、谷氨酰胺 750.00 mg、 VB_1 0.40 mg、肌醇 100.00 mg、2,4-D 2.50 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.25 mg 和 BAP 0.10 mg, 定容至 1 000 mL, 构建再分化培养基。

愈伤组织诱导和再分化培养基的琼脂质量浓度均为 7 g/L, pH 值均为 5.8。除酪蛋白、 VB_1 、肌醇、脯氨酸、头孢霉素、谷氨酰胺和草铵膦采用过滤除菌外, 其余成分均采用高温灭菌。

1.2.3 愈伤诱导培养

采用陈升位等^[12]报道的大麦成熟胚愈伤组织诱导培养方法, 消毒、切割、接种并培养大麦成熟胚。接种 14 d 后继代培养愈伤组织, 统计出愈胚、长根胚和长芽胚的数量, 并从每个处理的愈伤组织中随机取 5 个称量, 测定愈伤组织湿质量。每个处理接种 70 个以上成熟胚, 重复 3 次。

1.2.4 愈伤再分化培养

暗培养 28 d 后再分化培养愈伤组织, 分化培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照时间 12 h/d。再分化培养 7 d 后调查褐化和绿化的愈伤组织, 21 d 后调查再分化愈伤。

1.2.5 数据统计与分析

按照公式计算 7 个指标: 愈伤湿质量=愈伤

总质量/称量愈伤数; 长根率=长根胚数/接种胚数 $\times 100\%$; 长芽率=长芽胚数/接种胚数 $\times 100\%$; 愈伤诱导率=出愈胚数/接种胚数 $\times 100\%$; 褐化率=褐化愈伤数/继代愈伤数 $\times 100\%$; 绿化率=变绿愈伤数/分化愈伤数 $\times 100\%$; 愈伤再分化率=出苗愈伤数/分化愈伤数 $\times 100\%$ 。采用 SPSS 20.0 的方差和多重比较模块分析数据。

2 结果与分析

2.1 成熟胚的培养特性

通过 14 d、25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养, 成熟胚平均愈伤诱导率可达 94.39%, 平均长根率和长芽率分别为 2.31% 和 3.35% (图 1)。再分化培养 7 d 后未出现新的褐化愈伤组织, 14.02% 的愈伤组织开始出现绿化细胞。再分化培养 14 d 后可见再分化的根和芽 (图 2), 28 d 后愈伤组织基本停止再分化。

3 个大麦材料 (基因型) 成熟胚的 7 种组培特性差异 (F 值) 均达到显著或极显著水平 (表 1), 表型均值也存在不同程度的差异 (表 2)。光头大麦、北青 7 号和 Bowman 愈伤诱导率均较高, 分别为 $(94.41 \pm 1.15)\%$ 、 $(96.91 \pm 0.52)\%$ 和 $(91.85 \pm 1.30)\%$ 。北青 7 号成熟胚愈伤诱导率极显著高于 Bowman, 但光头大麦与北青 7 号、Bowman 间均无显著差异。Bowman 成熟胚愈伤的再分化率极显著高于北青 7 号和光头大麦, 北青 7 号的成熟胚再分化率极显著高于光头大麦, 但 3 个材料的成熟胚再分化率均较低。Bowman 成熟胚长根率和愈伤褐化率均极显著高于北青 7 号和光头大麦; 成熟胚长根率和愈伤褐化率在北青 7 号与光头大麦间无显著差异。Bowman、北青 7 号和光头大麦成熟胚的长芽率无显著差异。Bowman 与北青 7 号的

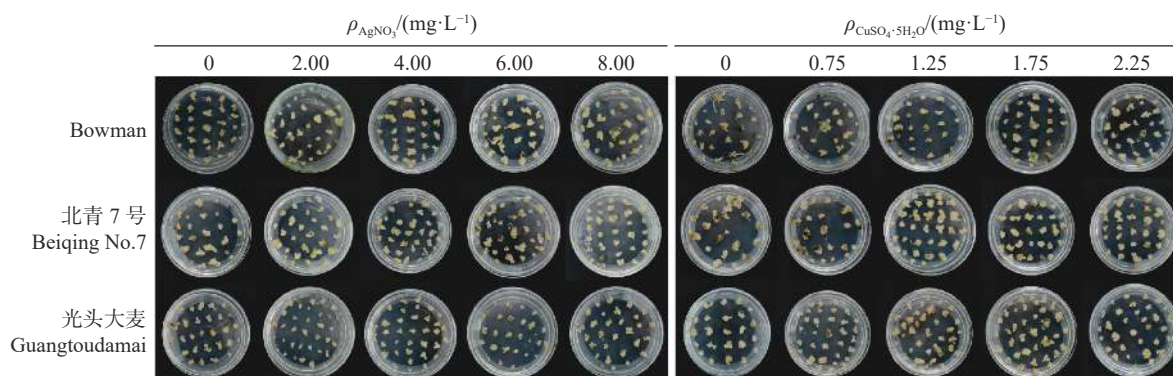
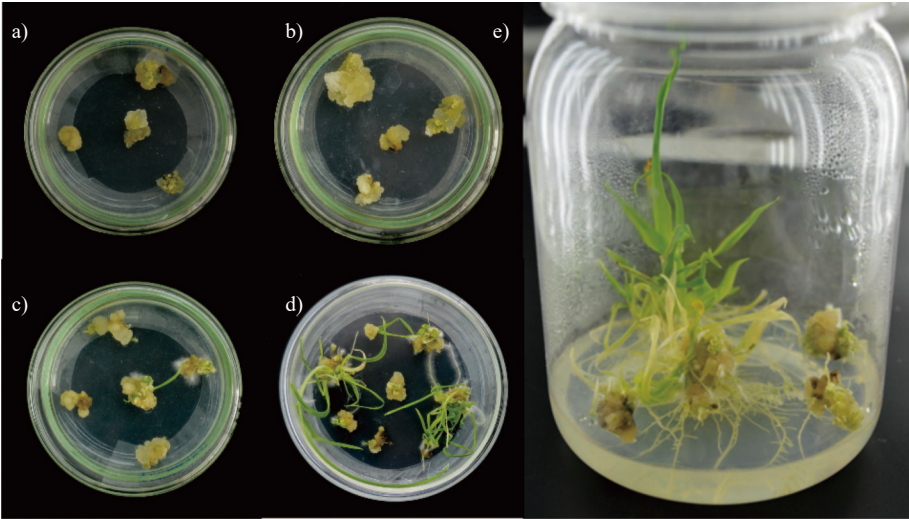


图 1 不同 Cu^{2+} 和 Ag^+ 处理下不同大麦品种的成熟胚生长差异

Fig. 1 Differences in the growth of mature embryos of different barley varieties under different Cu^{2+} and Ag^+ treatments



注: a) 和 b) 绿化的愈伤组织; c) 和 d) 再分化幼苗; e) 继代培养的幼苗。
Note: a) and b) greening calluses; c) and d) redifferentiation seedlings; e) subculture plantlets.

图 2 再分化进程中的成熟胚愈伤组织及其再分化幼苗

Fig. 2 Mature embryos calluses and their seedlings from the process of redifferentiation

表 1 3 个大麦材料成熟胚培养特性的方差分析

Tab. 1 Variance analysis of mature embryo culture characteristics of three barley materials

因变量 dependent variable	变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F 值 F-value
愈伤诱导率/% induction rate	组间 between groups	0.035	2	0.017	5.831**
	组内 within groups	0.231	78	0.003	
	总计 total	0.266	80		
愈伤再分化率/% redifferentiation rate	组间 between groups	0.360	2	0.018	38.965**
	组内 within groups	0.360	78	0.000	
	总计 total	0.710	80		
长根率/% rooting rate	组间 between groups	0.015	2	0.007	5.693**
	组内 within groups	0.101	78	0.001	
	总计 total	0.116	80		
长芽率/% shooting rate	组间 between groups	0.007	2	0.003	3.351*
	组内 within groups	0.080	78	0.001	
	总计 total	0.087	80		
褐化率/% browning rate	组间 between groups	0.033	2	0.017	6.023**
	组内 within groups	0.217	78	0.003	
	总计 total	0.250	80		
绿化率/% green-dot rate	组间 between groups	0.298	2	0.149	25.379**
	组内 within groups	0.458	78	0.006	
	总计 total	0.757	80		
愈伤湿质量/mg wet weight of callus	组间 between groups	0.007	2	0.003	6.150**
	组内 within groups	0.043	78	0.001	
	总计 total	0.049	80		

注: “*”表示在0.05水平上差异显著, “**”表示在0.01水平上差异极显著; 下同。
Note: “*” indicates significant differences at 0.05 level, “**” indicates extremely significant differences at 0.01 level; the same as below.

表 2 3 个大麦材料成熟胚培养特性的表型均值及其差异

材料 materials	愈伤诱导率/% induction rate	愈伤再分化率/% redifferentiation rate	长根率/% rooting rate	长芽率/% shooting rate	褐化率/% browning rate	绿化率/% green-dot rate	愈伤湿质量/mg wet weight of callus
光头大麦 Guangtoudamai	94.41±1.15 ABab	0.09±0.07 Cc	1.50±0.38 Bb	2.06±0.45 Aa	0.24±0.10 Bb	5.76±0.67 Bb	75.06±4.48 Bb
北青 7 号 Beiqing No.7	96.91±0.52 Aa	2.10±0.34 Bb	1.22±0.52 Bb	3.83±0.85 Aa	0.49±0.27 Bb	16.14±1.48 Aa	97.26±4.89 Aa
Bowman	91.85±1.30 Bb	5.19±0.62 Aa	4.21±1.01 Aa	4.16±0.47 Aa	4.67±1.73 Aa	20.16±1.98 Aa	88.27±4.11 ABab

注: 同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著, 不同大写字母表示在0.01水平上差异极显著; 下同。
Note: In the same column, different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level, different uppercase letters indicate extremely significant differences at 0.01 level; the same as below.

绿化率无显著差异, 但二者均极显著高于光头大麦。北青 7 号的愈伤湿质量极显著高于光头大麦, 但其他材料的愈伤湿质量间无显著差异。

2.2 Cu²⁺对大麦成熟胚培养特性的影响

不同质量浓度 Cu²⁺处理下, 愈伤诱导率和再分化率的差异未达到显著水平, 但长根率、长芽率、愈伤湿质量等 5 种组培特性的差异均达到显著或极显著水平 (表 3)。多重比较结果 (表 4) 表明: 不同 Cu²⁺质量浓度处理间的长根率无显著差

异, 但均极显著低于对照。0.75 mg/L Cu²⁺处理的长芽率均极显著低于其他处理, 对照的长芽率极显著高于 1.25 和 1.75 mg/L Cu²⁺处理, 其余处理的长芽率无显著差异。对照的褐化率与 1.75 mg/L Cu²⁺处理的褐化率无显著差异, 但极显著高于其他 Cu²⁺处理; 4 种 Cu²⁺处理的褐化率也无显著差异。2.25 mg/L Cu²⁺处理的绿化率极显著低于其他处理, 其余处理间的绿化率无显著差异。对照的愈伤湿质量极显著高于 2.25 mg/L Cu²⁺处理,

表 3 不同质量浓度 Cu²⁺ 处理下大麦成熟胚培养特性的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of the culture characteristics of barley mature embryos under different mass concentrations of Cu²⁺ treatments

因变量 dependent variable	变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F 值 F-value
愈伤诱导率/% induction rate	组间 between groups	0.029	4	0.007	2.043
	组内 within groups	0.141	40	0.004	
	总计 total	0.170	44		
愈伤再分化率/% redifferentiation rate	组间 between groups	0.005	4	0.001	1.839
	组内 within groups	0.026	40	0.001	
	总计 total	0.031	44		
长根率/% rooting rate	组间 between groups	0.070	4	0.017	22.937**
	组内 within groups	0.030	40	0.001	
	总计 total	0.100	44		
长芽率/% shooting rate	组间 between groups	0.025	4	0.006	8.189**
	组内 within groups	0.031	40	0.001	
	总计 total	0.057	44		
褐化率/% browning rate	组间 between groups	0.057	4	0.014	3.230*
	组内 within groups	0.176	40	0.004	
	总计 total	0.233	44		
绿化率/% green-dot rate	组间 between groups	0.086	4	0.022	2.915*
	组内 within groups	0.295	40	0.007	
	总计 total	0.381	44		
愈伤湿质量/mg wet weight of callus	组间 between groups	0.006	4	0.001	3.295*
	组内 within groups	0.017	40	0.000	
	总计 total	0.023	44		

表 4 不同 Cu²⁺质量浓度处理下大麦成熟胚培养特性的表型均值及其差异

Tab. 4 Phenotype mean and difference of the culture characteristics of barley mature embryos under different mass concentrations of Cu²⁺ treatments

$\rho_{\text{CuSO}_4}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	长根率/% rooting rate	长芽率/% shooting rate	褐化率/% browning rate	绿化率/% green-dot rate	愈伤湿质量/mg wet weight of callus
0	10.73±1.93 Aa	8.50±1.70 Aa	9.95±4.81 Aa	20.25±3.62 Aa	106.87±12.03 ABab
0.75	0.30±0.20 Bb	1.02±0.28 Cc	1.71±0.86 Bb	20.28±2.59 Aa	86.13±5.40 BCbc
1.25	0.32±0.21 Bb	4.71±0.76 Bb	0.96±0.53 Bb	19.95±3.16 Aa	110.57±2.43 Aa
1.75	2.15±0.48 Bb	4.50±0.39 Bb	2.63±0.58 ABab	19.53±3.05 Aa	97.19±7.65 ABCabc
2.25	1.43±0.40 Bb	5.34±0.80 ABab	0.00±0.00 Bb	9.09±1.37 Bb	81.59±1.72 Cc

1.25 mg/L Cu²⁺处理的愈伤湿质量极显著高于 0.75 和 2.25 mg/L 处理，但其他处理的愈伤湿质量无显著差异。与对照相比，0.75 mg/L Cu²⁺可减少 10.43% 的大麦成熟胚长根、7.48% 的大麦成熟胚长芽、8.24% 的愈伤组织褐化、20.74 mg 的愈伤湿质量，且不会有效抑制愈伤组织转绿、增殖和再分化。

2.3 Ag⁺对大麦成熟胚培养特性的影响

不同 Ag⁺处理下，再分化率的 *F* 值未达到显

著水平，其余 6 种培养特性的 *F* 值均达到极显著水平 (表 5)。多重比较结果 (表 6) 表明：不同 Ag⁺处理的愈伤诱导率、长根率、长芽率等 6 种培养特性存在不同程度差异。4.00 mg/L Ag⁺处理的愈伤诱导率极显著高于对照、6.00 和 8.00 mg/L Ag⁺处理，但与 2.00 mg/L Ag⁺处理无显著差异。虽然 2.00 mg/L Ag⁺处理的愈伤诱导率与对照也无显著差异，但极显著高于 6.00 和 8.00 mg/L Ag⁺处理。对照的长根率、长芽率和褐化率均极显著高

表 5 不同 Ag⁺质量浓度处理下大麦成熟胚培养特性的方差分析

Tab. 5 Variance analysis of the culture characteristics of barley mature embryos under different mass concentrations of Ag⁺ treatments

因变量 dependent variable	变异来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value
愈伤诱导率/% induction rate	组间 between groups	0.052	4	0.013	4.473**
	组内 within groups	0.116	40	0.003	
	总计 total	0.168	44		
愈伤再分化率/% redifferentiation rate	组间 between groups	0.008	4	0.002	2.006
	组内 within groups	0.038	40	0.001	
	总计 total	0.046	44		
长根率/% rooting rate	组间 between groups	0.062	4	0.016	16.884**
	组内 within groups	0.037	40	0.001	
	总计 total	0.099	44		
长芽率/% shooting rate	组间 between groups	0.037	4	0.009	13.244**
	组内 within groups	0.028	40	0.001	
	总计 total	0.064	44		
褐化率/% browning rate	组间 between groups	0.068	4	0.017	4.068**
	组内 within groups	0.168	40	0.004	
	总计 total	0.236	44		
绿化率/% green-dot rate	组间 between groups	0.165	4	0.041	6.744**
	组内 within groups	0.245	40	0.006	
	总计 total	0.411	44		
愈伤湿质量/mg wet weight of callus	组间 between groups	0.021	4	0.005	14.966**
	组内 within groups	0.014	40	0.000	
	总计 total	0.035	44		

表 6 不同 Ag⁺质量浓度处理的大麦成熟胚培养特性的表型均值及其差异
Tab. 6 Phenotype mean and difference of the culture characteristics of barley mature embryos under different mass concentrations of Ag⁺ treatments

$\rho_{\text{AgNO}_3}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	愈伤诱导率/% induction rate	长根率/% rooting rate	长芽率/% shooting rate	褐化率/% browning rate	绿化率/% green-dot rate	愈伤湿质量/mg wet weight of callus
0	91.15±3.15 BCbc	10.73±1.93 Aa	8.50±1.70 Aa	9.95±4.81 Aa	20.25±3.62 Aa	106.87±12.03 Aa
2.00	96.82±0.99 ABab	1.36±0.68 Bb	2.27±0.72 Bb	0.67±0.35 Bb	8.92±1.15 BCbc	91.06±1.57 Aa
4.00	97.62±0.44 Aa	1.65±0.58 Bb	0.54±0.21 Bb	0.28±0.18 Bb	16.28±3.97 ABab	97.06±2.58 Aa
6.00	90.54±1.80 Cc	0.90±0.23 Bb	1.37±0.40 Bb	0.00±0.00 Bb	8.72±1.88 BCbc	56.88±4.95 Bb
8.00	89.49±1.35 Cc	1.92±0.73 Bb	1.91±0.47 Bb	0.00±0.00 Bb	3.14±0.54 Cc	54.40±3.91 Bb

于其他处理,且其他处理间无显著差异。对照的绿化率与 4.00 mg/L Ag⁺处理的绿化率无显著差异,但极显著高于其他处理;4.00 mg/L Ag⁺处理的绿化率也极显著高于 8.00 mg/L Ag⁺处理;其余处理的绿化率无显著差异。对照、2.00 和 4.00 mg/L 处理间的愈伤湿质量无显著差异,但均极显著高于 6.00 和 8.00 mg/L Ag⁺处理,6.00 和 8.00 mg/L Ag⁺处理的愈伤湿质量无显著差异。与对照相比,4.00 mg/L Ag⁺可有效提高 6.47% 的愈伤诱导率,降低 9.08% 的成熟胚长根率、7.96% 的长芽率和 9.67% 的愈伤组织褐化,且不会有效抑制愈伤组织转绿、再分化和愈伤湿质量。

3 讨论

3.1 3 个大麦品种成熟胚组培特性的基因型差异

虽然 3 个大麦品种的棱型、皮裸性、生态型等基本特性存在差异,但在成熟胚培养进程中均出现成熟胚长根、长芽、愈伤组织褐化等共有特性。3 个大麦品种的成熟胚组织培特性存在不同程度差异,其中北青 7 号成熟胚的愈伤诱导率极显著高于 Bowman; Bowman 成熟胚的长根率和愈伤褐化率均极显著高于北青 7 号和光头大麦。由于成熟胚的生理状态、切割方法、培养条件等外部条件基本一致,因此基因型差异可能是导致试验材料成熟胚组培特性存在差异的主要原因。

3.2 Cu²⁺对组培特性的影响

作为生命活动的必需元素, Cu²⁺可参与多种代谢反应调控,进而调节植物生长、发育和器官发生。研究发现: 0.5~10.0 μmol/L Cu²⁺可显著提高小麦^[13-14]、大麦^[15]和高粱^[16]愈伤组织的再分化率,促进愈伤组织长根和长芽。在植物细胞中,多酚和络氨酸均可被多酚氧化酶催化,产生醌类物质,而醌类物质积累及其与蛋白和氨基酸的聚

合均可导致愈伤组织褐化^[17]。已有研究表明: 浓度小于 3.0 mmol/L 的 Cu²⁺可有效抑制马铃薯、苹果、甘薯和西红柿的多酚氧化酶活性^[18-19]。因此,在植物组织培养过程中,大麦成熟胚愈伤的褐化率降低可能是多酚氧化酶活性被 Cu²⁺有效抑制后细胞中醌类物质减少所致。另外, Cu²⁺是电子传递、蛋白质和碳水化合物生物合成等代谢途径中许多重要酶的组分或激活剂,这些酶(如酯酶和谷氨酸脱氢酶^[20-21])可能在愈伤组织再分化过程中起重要作用。

本研究表明: 添加 0.75~1.25 mg/L Cu²⁺能显著降低大麦成熟胚愈伤组织诱导和再生过程中褐化率并改善愈伤组织生长状态。在未添加 Cu²⁺的对照中,培养出的愈伤组织长根率、长芽率和褐化率较高,愈伤组织柔软、泛白,愈伤组织的再分化率较低。因此,对大麦成熟胚愈伤组织进行诱导时,宜添加 Cu²⁺进行优化,可以提高遗传转化过程中的再生效率。

3.3 Ag⁺对组培特性的影响

在植物组织培养中, Ag⁺具有多种功能,如促进体细胞胚发生以及防止愈伤组织褐化与玻璃化,过量 Ag⁺也会导致细胞机能损坏,破坏蛋白质结构和功能^[22-23]。AgNO₃ 作为一种乙烯抑制剂,能有效抑制乙烯合成、缓解植物愈伤组织褐变并促使愈伤组织转化为胚状体^[22, 24]。有研究证明乙烯会抑制植物器官的发生,而多胺的作用刚好与之相反。培养基中添加 Ag⁺可有效阻止乙烯干扰多胺的合成,从而提高精氨酸脱羧酶的活性,间接促进多胺的合成积累,提高植物愈伤组织的分化率^[9-10]。已有研究表明: 1.5~4.0 mg/L AgNO₃ 可提高玉米^[25]、大麦^[11]、甘蓝^[26]和大白菜^[27-28]愈伤组织的再分化率,但 10 μmol/L AgNO₃ 会抑制啤酒花愈伤组织根的分化^[29]。低浓度 AgNO₃ 能促

进白菜^[28]、非洲菊^[30]和花生^[31]愈伤组织形成不定芽,但 AgNO_3 浓度过高时则会发生抑制作用,这可能与 Ag^+ 毒性有关。

本研究表明:添加 2.00~4.00 mg/L AgNO_3 后愈伤组织的褐化率较低,色泽偏淡黄、质地紧密,适合作为遗传转化材料;但当 Ag^+ 质量浓度大于 4.00 mg/L 时,愈伤湿质量显著下降,愈伤生长缓慢,愈伤组织较小。因此,在大麦成熟胚培养中宜采用质量浓度相对较低的 AgNO_3 ,以缓解愈伤褐化,提高其再分化率。

4 结论

0.75 mg/L Cu^{2+} 虽不能有效促进愈伤增殖、提高愈伤诱导率和愈伤组织转绿,但可有效抑制大麦成熟胚长根、长芽和愈伤褐化;与 0.75 mg/L Cu^{2+} 处理相比,2.25 mg/L Cu^{2+} 可更有效地抑制愈伤褐化,但对成熟胚长根和长芽的抑制效果相对较差,且会有效降低愈伤绿化率;1.25 mg/L Cu^{2+} 可有效促进愈伤增殖,但对成熟胚长芽的抑制效果相对较差。2.00 和 4.00 mg/L Ag^+ 可有效促进愈伤诱导率,抑制成熟胚长根、长芽和愈伤组织褐化,但 2.00 mg/L Ag^+ 会显著降低愈伤组织的绿化率。由于 Ag^+ 和 Cu^{2+} 质量浓度过高对植物具有毒害,因此,在大麦成熟胚的愈伤诱导和再分化培养过程中,添加 0.75 mg/L Cu^{2+} 和 4.00 mg/L Ag^+ 较为适宜。

[参考文献]

- [1] 刘叶飞,赵海霞,姜希萍,等.野大麦高效组培快繁及农杆菌介导的愈伤侵染体系建立[J].植物学报,2023,58(3): 440. DOI: 10.11983/CBB22221.
- [2] TAKÁČ T, KŘENEK P, KOMIS G, et al. TALEN-based *HvMPK3* knock-out attenuates proteome and root hair phenotypic responses to *flg22* in barley[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 666229. DOI: 10.3389/fpls.2021.666229.
- [3] 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. DOI: 10.14069/j.cnki.32-1769/s.2012.02.004.
- [4] 李奔,陈小强,谢晓东,等.不同种类及不同配比的激素和碳源对大麦幼胚愈伤组织诱导及分化的影响[J].种子,2018,37(6): 10. DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2018.06.010.
- [5] 李晨,谢晓东,王景太,等.大麦成熟胚愈伤组织诱导、继代及分化研究[J].天津农学院学报,2019,26(2): 8. DOI: 10.19640/j.cnki.jtau.2019.02.002.
- [6] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1009-1041.2003.02.008.
- [7] 罗天宽,张小玲,李道品,等.铜元素对水稻花药愈伤组织绿苗分化率的影响[J].江苏农业学报,2002,18(4): 249. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4440.2002.04.013.
- [8] 陈耀锋,王丽敏,丁云姣,等. Cu^{2+} 对小麦幼胚脱分化和高频再生特性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(10): 1. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2004.10.001.
- [9] 马生健,谢卫英,凌亮亮,等.乙烯抑制剂对卡特兰组织培养的影响及解剖学观察[J].中南林业科技大学学报,2010,30(7): 85. DOI: 10.3969/j.issn.1673-923X.2010.07.016.
- [10] ROUSTAN J P, LANCHE A, FALLOT J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel[J]. Plant Cell Reports, 1989, 8(3): 182. DOI: 10.1007/bf00716836.
- [11] HAQUE M, SIDDIQUE A B, ISLAM S M S. Effect of silver nitrate and amino acids on high frequency plants regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2015, 25(1): 37. DOI: 10.3329/ptcb.v25i1.24124.
- [12] 陈升位,胡扬帆,王楠,等.切割处理和2,4-D对多棱裸大麦离体成熟胚出愈率的影响[J].麦类作物学报,2014,34(12): 1645. DOI: 10.7606/j.issn.1009-1041.2014.12.08.
- [13] PURNHAUSER L, GYULAI G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 35(2): 131. DOI: 10.1007/bf00032962.
- [14] TAHILIANI S, KOTHARI S L. Increased copper content of the medium improves plant regeneration from immature embryo derived callus of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2004, 13(1): 85. DOI: 10.1007/bf03263199.
- [15] DAHLEEN L S. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43(3): 267. DOI: 10.1007/bf00039954.
- [16] NIRWAN R S, KOTHARI S L. High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2003, 39(2): 161. DOI: 10.1079/ivp.2002385.
- [17] 高洁,张萍,薛璟祺,等.酚类物质及其对木本植物组织培养褐变影响的研究进展[J].园艺学报,2019,46(9): 1645. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2018-0698.
- [18] 廖春丽,王衡,李亚平,等. L-半胱氨酸及金属离子对马铃薯、苹果、甘薯多酚氧化酶活性的影响[J].江苏农业科学,2015,43(11): 375. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.118.
- [19] SOMMER A, NE'EMAN E, STEFFENS J C, et al. Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase[J]. Plant Physiology, 1994, 105(4): 1301. DOI: 10.1104/pp.105.4.1301.
- [20] EVERETT N P, WACH M J, ASHWORTH D J. Bio-

- chemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73[J]. *Plant Science*, 1985, 41(2): 133. DOI: [10.1016/0168-9452\(85\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90115-3).
- [21] COPPENS L, DEWITTE D. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis[J]. *Plant Science*, 1990, 67(1): 97. DOI: [10.1016/0168-9452\(90\)90055-S](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90055-S).
- [22] 淡明, 黄海波, 郭安平, 等. 黄灯笼辣椒组织培养中防褐变的研究[J]. *福建热作科技*, 2006, 31(2): 1. DOI: [10.3969/j.issn.1006-2327.2006.02.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-2327.2006.02.001).
- [23] 刘娟, 汤浩茹, 王小蓉, 等. 硝酸银在植物离体培养中的应用之研究进展[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(10): 400. DOI: [10.3969/j.issn.1000-6850.2007.10.083](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-6850.2007.10.083).
- [24] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 生菜遗传转化过程中克服玻璃苗的研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(2): 62. DOI: [10.13327/j.jjlau.2000.02.013](https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2000.02.013).
- [25] SONGSTAD D D, DUNCAN D R, WIDHOLM J M. Effect of I-aminocyclopropane-I-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures[J]. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(4): 262. DOI: [10.1007/bf00272538](https://doi.org/10.1007/bf00272538).
- [26] WILLIAMS J, PINK D A C, BIDDINGTON N L. Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 21(1): 61. DOI: [10.1007/bf00034493](https://doi.org/10.1007/bf00034493).
- [27] CHI G L, PUA E C, GOH C J. Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledonary explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson *in vitro*[J]. *Plant Physiology*, 1991, 96(1): 178. DOI: [10.1104/pp.96.1.178](https://doi.org/10.1104/pp.96.1.178).
- [28] 杜虹, 庄东红, 黄文华. AgNO_3 对大白菜子叶芽再生的促进作用[J]. *热带亚热带植物学报*, 2000, 8(2): 109. DOI: [10.3969/j.issn.1005-3395.2000.02.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-3395.2000.02.004).
- [29] CASTILLO A M, EGANA B, SANZ J M, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(11): 902. DOI: [10.1007/s002990050506](https://doi.org/10.1007/s002990050506).
- [30] 祝红艺, 张显, 崔维红. 提高非洲菊试管苗叶片再生频率的研究[J]. *西北农业学报*, 2006, 15(5): 233. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1389.2006.05.056](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-1389.2006.05.056).
- [31] OZUDOGRU E A, OZDEN-TOKATLI Y, AKCIN A. Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2005, 41(2): 151. DOI: [10.1079/ivp2004591](https://doi.org/10.1079/ivp2004591).

责任编辑: 何承刚