

徐红卫, 郭桂梅, 高润红, 等. 盐预处理对大麦种子萌发和小孢子愈伤形成的影响[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(2): 123-129.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.02.013

盐预处理对大麦种子萌发和小孢子愈伤形成的影响

徐红卫^{1,2}, 郭桂梅¹, 高润红^{1,2}, 何婷¹,
杜志钊³, 李静¹, 陈志伟¹, 陆瑞菊¹, 王亦菲¹, 刘成洪¹

1. 上海市农业科学院生物技术研究所/上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

2. 扬州大学农学院, 扬州 225009; 3. 上海市农业科技服务中心, 上海 200335

摘要 为探究盐预处理对大麦种子萌发和小孢子培养的影响, 以大麦耐盐品种花 11 和盐敏感品种花 30 为材料, 比较了它们在不同盐浓度预处理下, 种子萌发过程中的发芽率、主根长以及小孢子培养过程中的愈伤组织产量差异, 同时对 2 个品种在小孢子时期响应盐胁迫的 4 个关键基因的表达进行了研究。结果显示: 花 30 的种子和小孢子在无 NaCl 和低浓度 NaCl 预处理时, 对盐胁迫的耐受性均低于花 11, 但经高浓度 NaCl (萌发期为 15 g/L, 小孢子时期为 300 mg/L) 预处理后, 花 30 的种子和小孢子对高浓度盐胁迫的耐受性均显著增强, 且发芽率、主根长和愈伤产量均显著高于花 11; 通过对 2 个品种在盐预处理下的发芽率、主根长以及愈伤产量相对值的相关性分析发现, 2 个品种在种子萌发期和小孢子时期响应盐预处理的相对值呈显著正相关。同时, 在小孢子培养阶段, 经过 300 mg/L NaCl 预处理后, 花 30 中小热激蛋白基因 *HvsHSP1* 和翻译起始因子 1 基因 *HveIF1A* 的表达量在高浓度盐胁迫下较花 11 显著上调。因此, 供试品种间在种子萌发过程和小孢子培养过程对盐预处理的响应差异在某种程度上可能具有一致性, *HvsHSP1* 和 *HveIF1A* 基因可能与盐敏感品种在小孢子时期响应 NaCl 盐诱导存在关系。

关键词 大麦; 盐胁迫; 盐预处理; 先锋作物; 小孢子培养

中图分类号 S 512.303.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)02-0123-07

盐胁迫已经成为制约我国农作物生长与产量的重要因素之一^[1]。在作物发育的关键时期对种子、幼苗或者细胞进行化学物质预处理, 是改善作物耐盐性的有效措施^[2-3]。大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 在禾谷类作物中耐盐性较强, 是开拓盐荒的先锋作物^[4], 但是品种之间的耐盐性差异很大, 深入研究耐盐性差异的品种在关键生育期对盐预处理的响应机制, 对于品种的耐盐性评价有重要的指导意义^[5]。

种子萌发期为研究品种响应盐胁迫机制的关键时期, 该阶段对植株能否存活和进一步生长发育至关重要^[6]。已有研究报道, 一定浓度的 NaCl 预处理可提高盐敏感种子萌发阶段的耐盐性^[7-9], 发芽率和主根长为该时期区分不同品种耐盐性的重要指标^[10]。相比种子, 小孢子时期是植物胚胎发育过程中重要的阶段^[11], 可作为更加理想的胁迫对象。孙

月芳等^[12]利用 NaCl 溶液处理大麦小孢子, 发现小孢子对外界胁迫刺激极为敏感, 存活率明显受到影响。通过小孢子离体盐胁迫培养技术, 不仅提高了耐盐材料的筛选效率, 而且结合田间鉴定, 可快速筛选获得稳定遗传的耐盐纯合株系^[13]。Liu 等^[13]对大麦小孢子时期响应盐胁迫的关键基因也进行了研究, 发现在连续的盐胁迫下, 细胞防御系统为调控基础蛋白质合成产生了翻译抑制, *HveIF1A* (翻译起始因子 1) 和 *HvRPLP0* 基因 (核糖体蛋白) 等下调表达, 同时一系列热休克蛋白基因 *HvsHSP1* 和 E3 泛素连接酶基因 *HvSIAH1E3* 等被选择性地激活, 这些基因对小孢子诱导胚性愈伤组织缓解盐胁迫起着重要作用。前期研究者已证实大麦小孢子培养时期与植株生长发育时期对盐胁迫的响应具有相关性^[14], 但是关于盐预处理对大麦种子萌发和小孢子

收稿日期: 2020-08-19

基金项目: 上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-08-F01109); 现代农业产业技术体系 (CARS-05-01A-02); 上海市农业科学院助跑计划 (ZP19211); 上海市农业科学院卓越团队 [农科创 2017(B-01)]

徐红卫, E-mail: xuhongwei@saas.sh.cn

通信作者: 刘成洪, E-mail: liuchenghong@saas.sh.cn

愈伤形成的影响效应尚未明确。

本研究以耐盐性存在差异的2个大麦品种花11和花30为研究对象,探究盐预处理对品种间种子萌发过程的影响效应在小孢子培养过程中的表现,同时在小孢子时期对2个品种响应盐胁迫关键基因的表达进行研究,旨在为应用小孢子技术鉴定大麦种质资源的耐盐性提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大麦耐盐品种花11和盐敏感品种花30,均由上海市农业科学院植物细胞工程研究室、上海市农业遗传重点实验室提供。

1.2 种子萌发期耐盐性鉴定方法

首先将直径为9 cm的培养皿清水洗净后灭菌并烘干,放入2张滤纸待用。其次,选择饱满整齐的健康种子,利用3% H₂O₂消毒8 min后,蒸馏水连续冲洗3次,于30℃浸泡于0.5和15 g/L的NaCl溶液,保湿过夜,待种子露白后均匀排放于培养皿的滤纸上,再次加入0.5、10和15 g/L的NaCl溶液处理,并将所有种子置于25℃恒温光照培养箱中发芽。6 d后统计种子的发芽率和主根长度。每个处理共设置3次重复。

1.3 小孢子培养方法

小孢子的游离及培养方法主要参考文献[15]。选取发育处于单核早中期的大麦穗,先将其置于5℃冰箱中预处理17 d,再用饱和漂白粉溶液消毒大麦穗15 min。于每个试管中分别接种10个穗,加入15 mL无菌提取液(60 g/L的甘露醇中添加0.976 g/L的N-吗啡乙烷磺酸和1.1 g/L的

CaCl₂)。利用高速分散器超速旋切,106 μm筛网进行过滤,滤液以700 r/min低速离心5 min,共重复3次,最后收集小孢子。小孢子培养时先将其置于25℃黑暗的无菌盐预处理液中,NaCl溶液质量浓度分别为0、100和300 mg/L,2 d后,将小孢子用无菌提取液和培养基分别洗涤1次,将小孢子密度调节至1.1×10⁵/mL,然后取1 mL小孢子悬浮液于培养皿(20 mm×15 mm)中,Parafilm封口后,置于25℃培养箱暗培养。培养至28 d时,称取愈伤组织的质量并取材、液氮速冻,-80℃保存。其中,诱导培养基以改良的N6培养基为基本培养基,同时分别添加1.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT、90 g/L麦芽糖和0、100、200和300 mg/L的NaCl溶液。每个实验共设置4次重复。

1.4 荧光定量PCR检测

将样品愈伤组织的RNA通过Trizol Reagent (Invitrogen)提取后,再利用SuperScript™ III反转录酶(Invitrogen)获得样品的cDNA^[16]。引物序列由北京六合华大基因科技有限公司合成,其中,盐响应基因的引物序列参考文献[13],*HvActin*和*HvGAPDH*内参基因的引物序列参考文献[16],详见表1。采用7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem)对大麦小孢子时期响应盐胁迫的4个关键基因的相对表达量进行分析。定量PCR的总反应体系为20 μL,包括样品cDNA(约50 ng/μL)4 μL,正反向引物(10 μmol/L)各2 μL,2×power-up SYBR qPCR Mix (Toyobo) 10 μL和ddH₂O 2 μL,反应程序为:95℃预变性2 min,95℃变性15 s,60℃退火延伸1 min,40个循环^[16]。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>HvsHSP1</i>	CGAGCCTAAGAAGCCCAAGA	GAAACATCAAACCATCACCACC
<i>HvSIAH1</i>	GGGTGGAGATGCAGATGAGG	TAAACCAATGCGTCGGATGA
<i>HvRPLP0</i>	ACATCCCCACCAAGATCAACA	CACAGCAACAGCAAGCACATT
<i>HveIF1A</i>	TCAAGGTCCACGGCTTCTAAT	CCAAACAGCAAACCCGATACTA
<i>HvActin</i>	GCTGACCGTATGAGCAAGGA	GGAAAGTGCTGAGTGAGGCT
<i>HvGAPDH</i>	AGATGCCCTATGTTGTGG	GGTCTTCTGTGTGGCAGTGA

1.5 统计分析

发芽率、主根长和愈伤产量测定结果利用SPSS21.0软件的Duncan's新复极差法进行差异显著性分析;定量PCR的数据根据Chen等^[17]的方法计算其基因相对表达量,LinReg软件分析相关基因

引物的扩增效率。

2个品种间愈伤产量的相对比值=同一处理下花30的愈伤产量/花11的愈伤产量;

2个品种间发芽率的相对比值=同一处理下花30的发芽率/花11的发芽率;

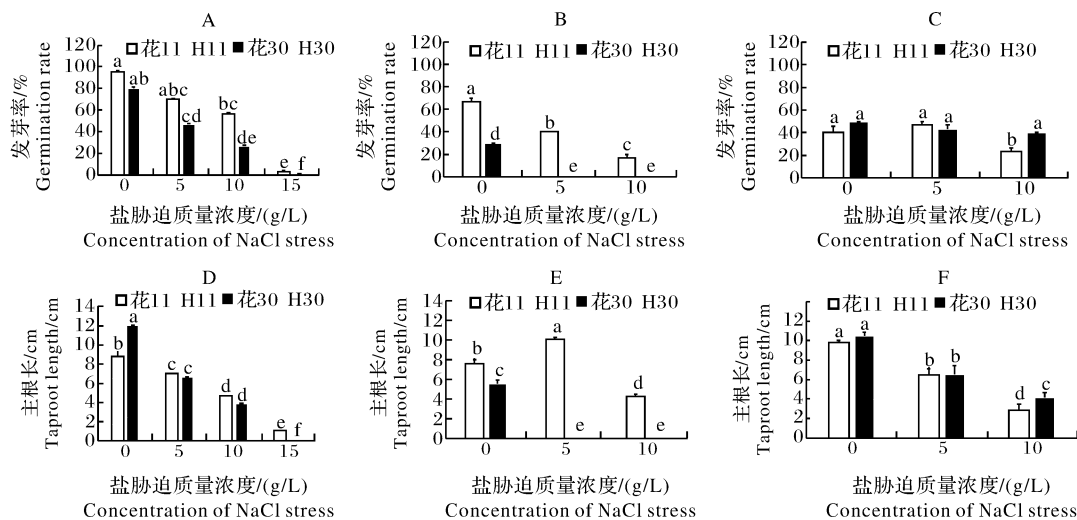
2 个品种间主根长的相对比值 = 同一处理下花 30 的主根长/花 11 的主根长。

2 结果与分析

2.1 2 个大麦品种在种子萌发期对盐预处理的响应

为了明确 2 个大麦品种在种子萌发期对盐预处理的响应差异,以发芽率和主根长作为鉴定指标。在没有用 NaCl 预处理种子的情况下,比较 2 个大麦品种对不同质量浓度盐胁迫的直接反应(图 1A、D),结果显示:在正常萌发条件下,2 个大麦品种都能正常发芽,且发芽率无显著差异,随着培养基中 NaCl 质量浓度的提高,花 30 的发芽率显著低于花 11(图 1A)。在正常萌发条件下,花 30 的主根长度显著大于花 11;但在盐胁迫条件下,花 30 的主根长度与花 11 无显著差异,表明花 30 主根长的抑制程度显著高于花 11(图 1D)。说明,花 30 在种子萌发期对盐胁迫的直接耐受性低于花 11。种子经过

5 g/L NaCl 预处理后,在 0 g/L 盐胁迫下,花 30 的发芽率只有 30%,而花 11 的发芽率为 66.67%,花 30 的发芽率相对于花 11 显著减少了 55%,在 5 g/L 和 10 g/L 盐胁迫下,花 11 分别具有 40%和 16.67%的发芽率,花 30 则完全不能萌发(图 1B);在 5 g/L NaCl 预处理后,花 30 的主根长度也显著小于花 11,在 0 g/L 盐胁迫下,花 30 的主根长相对于花 11 显著减少了 26.96% (图 1E);当种子经过 15 g/L NaCl 预处理时,花 30 在 0 和 5 g/L 盐胁迫下的萌发率分别为 50%和 43.33%,发芽率与花 11 无显著差异(图 1C),主根长度也是如此(图 1F);在 10 g/L 盐胁迫下,花 30 的发芽率和主根长显著优于花 11,分别提高了 41.75%和 32%(图 1C、F)。说明,花 30 经过低质量浓度 NaCl 预处理后,对盐胁迫的耐受性也低于花 11,但是经过高质量浓度(15 g/L)NaCl 预处理后,对 10 g/L 盐胁迫的耐受性增强,显著优于花 11。



A-C:不同质量浓度的 NaCl 预处理条件下,2 个品种在不同质量浓度 NaCl 胁迫下的发芽率。其中,A:0 g/L NaCl 预处理; B:5 g/L NaCl 预处理; C:15 g/L NaCl 预处理; D-F:不同质量浓度的 NaCl 预处理条件下,2 个品种在不同质量浓度 NaCl 胁迫下的主根长。其中,D:0 g/L NaCl 预处理; E:5 g/L NaCl 预处理; F:15 g/L NaCl 预处理。每一柱状图上不同字母代表同一性状在 2 个品种不同处理间的差异。A-C: The germination rate of the two materials cultured at different salt concentrations with 0 g/L (A), 5 g/L (B) and 15 g/L (C) NaCl pretreatment; D-F: The taproot length of the two materials cultured at different salt concentrations with 0 g/L (D), 5 g/L (E) and 15 g/L (F) NaCl pretreatment. Different letters on the histogram indicate the significant differences of a trait among different treatments between two cultivars.

图 1 2 个大麦品种在种子萌发期对盐胁迫的响应

Fig.1 Response of the two barley cultivars to salt stress during the seed germination stage

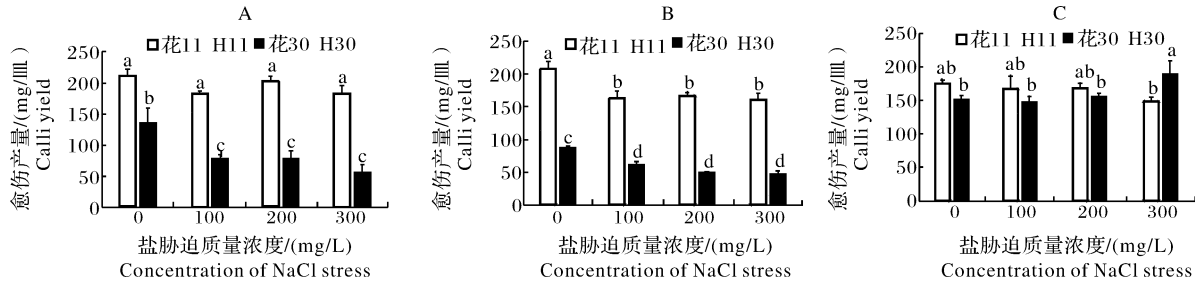
2.2 2 个大麦品种在小孢子培养时期对盐预处理的响应

为了探索 2 个大麦品种在小孢子时期对盐预处理的响应差异,我们对小孢子培养后的愈伤产量进行比较,以愈伤组织产量的高低作为耐盐性高低的

评判指标。在无 NaCl 预处理的条件下,花 30 的小孢子在不同质量浓度 NaCl 培养基上获得的愈伤产量均小于 130 mg/皿,而花 11 的愈伤产量均大于 180 mg/皿,花 30 的愈伤产量显著低于花 11,表明花 30 在小孢子时期对盐的直接耐受性低于花 11

(图 2A)。经过 100 mg/L NaCl 预处理后,花 30 的小孢子在 0、100、200 和 300 mg/L NaCl 培养下获得的愈伤产量均显著低于花 11,表明低质量浓度的 NaCl 预处理对花 30 的小孢子造成的损伤很大(图 2-B);经过 300 mg/L NaCl 预处理后,花 30 的小孢子在不同质量浓度 NaCl 处理下培养获得的愈伤产量明显高于低质量浓度(100 mg/L)NaCl 预处

理的小孢子,且 2 个品种的愈伤产量在 0、100 和 200 mg/L NaCl 的培养基上均无显著性差异,但在 300 mg/L NaCl 的培养基上,花 30 的愈伤产量显著超过花 11 的 21.64%(图 2C),表明,花 30 小孢子受高质量浓度的 NaCl(300 mg/L)预处理诱导后,对高质量浓度的盐胁迫耐受性增强。



A: 0 mg/L NaCl 预处理下, 2 个品种在不同质量浓度盐胁迫培养下的愈伤产量; B: 100 mg/L NaCl 预处理下, 2 个品种在不同质量浓度盐胁迫培养下的愈伤产量; C: 300 mg/L NaCl 预处理下, 2 个品种在不同质量浓度盐胁迫培养下的愈伤产量。A: Calli yield of the two materials under salt stress with 0 mg/L NaCl pretreatment; B: Calli yield of the two materials under salt stress with 100 mg/L NaCl pretreatment; C: Calli yield of the two materials under salt stress with 300 mg/L NaCl pretreatment.

图 2 预处理和培养液中 NaCl 质量浓度对花 11 和花 30 愈伤产量的影响

Fig.2 Effect of NaCl concentration in pretreatment and medium on calli yield of H11 and H30

2.3 2 个大麦品种在 2 个时期盐胁迫下生长指标的相关性分析

通过比较 2 个供试材料在种子萌发阶段与小孢子诱导愈伤阶段的发芽率、主根长和愈伤产量的相对比值发现,愈伤产量和发芽率、主根长之间显著正相关,相关系数分别是 0.600 和 0.648(表 2)。

表 2 2 个大麦品种种子萌发期和小孢子诱导愈伤期相对生长比值的 Pearson 相关性分析

Table 2 Correlation analysis of the relative differences values of germination rate, taproot length and calli yield between two cultivars

指标 Indicators	愈伤产量 Calli yield	发芽率 Germination rate	主根长 Taproot length
愈伤产量 Calli yield	1	0.600*	0.648*
	12	0.039	0.023
	12	12	12
发芽率 Germination rate	0.600*	1	0.642*
	0.039	0.039	0.025
	12	12	12
主根长 Taproot length	0.648*	0.642*	1
	0.023	0.025	0.025
	12	12	12

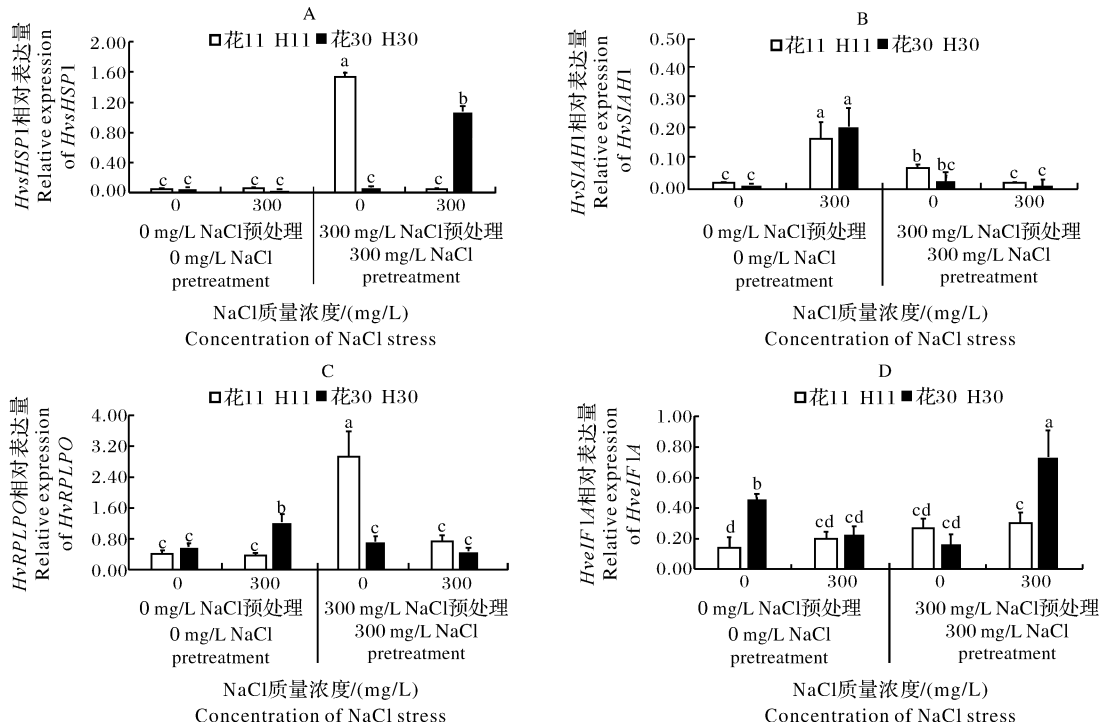
注: * 表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关。Note: * shows the correlation was significant at the 0.05 level (bilateral).

2.4 2 个大麦品种在小孢子时期响应盐胁迫的关键基因的表达模式

为进一步分析 2 个品种在小孢子时期响应盐预处理的分子机制,研究了小热激蛋白基因 *HvsHSP1*、E3 泛素连接酶基因 *HvSIAH1*,核糖体保护蛋白基因 *HvRPLPO* 和翻译起始因子 1 基因 *HveIF1A* 在 2 个品种中于 0 和 300 mg/L NaCl 溶液培养下的表达模式(图 3)。在无 NaCl 预处理时, 2 个品种在正常条件和盐胁迫处理下的 *HvsHSP1* 基因表达量均无显著性差异,但是经过 300 mg/L NaCl 预处理后,相比 0 mg/L 培养基,在 300 mg/L NaCl 培养基下,花 11 中该基因的表达量显著减少了 97.09%,花 30 中基因表达量却显著增加 93.95%(图 3A);在 0 mg/L 和 300 mg/L NaCl 预处理条件下, 2 个材料之间的 *HvSIAH1* 基因表达量在不同 NaCl 胁迫培养基上均无显著性差异(图 3B);*HvRPLPO* 基因在无预处理条件下,于 300 mg/L NaCl 培养时,花 30 中基因表达量较花 11 显著增加,经过 NaCl 预处理后,在 300 mg/L NaCl 培养条件下,该基因在花 30 的表达量与花 11 无显著性差异(图 3C);*HveIF1A* 基因在无 NaCl 预处理的条件下,相比 0 mg/L 培养条件,花 30 中基因表达量在 300 mg/L NaCl 胁迫时显著减少了 49.71%,但是在

300 mg/L NaCl 预处理的条件下,花 30 中基因表达量较 0 mg/L 培养条件显著增加了 77.11%,较花 11 在同样处理下显著增加了 59.15%(图 3D)。结果表

明,经过高质量浓度 NaCl 预处理后,*HvsHSP1* 和 *HveIF1A* 基因可能对于花 30 缓解高浓度的盐胁迫起着重要作用。



A: *HvsHSP1*; B: *HvsSIAH1*; C: *HvrPLPO*; D: *HveIF1A*.

图 3 2 个品种在小孢子时期响应盐胁迫的关键基因的表达模式

Fig.3 Expression of the key genes associated with salt tolerance at the microspore culture stage between the two cultivars

3 讨论

植物对逆境的适应与抵抗有多种形式,其中对关键发育时期的种子、幼苗或者细胞通过预处理的方式获得抗逆性是一种最普遍而有效的方式^[8]。有研究表明,作物在生长发育的关键时期对盐胁迫预处理的响应是作物应对盐胁迫的关键^[6,18]。种子萌发和幼苗建成是植株水平生长发育的关键时期,该阶段的耐盐性可以反映植株水平的耐盐性^[14],而小孢子是减数分裂后四分体释放出的单核细胞,小孢子时期是高等植物生活中雄配子体发育过程中重要的阶段。有研究表明,在大麦、番茄、苜蓿和大豆等植物中,细胞水平的耐盐性与植株水平耐盐性是一致的^[19]。本研究结果表明,大麦小孢子诱导愈伤阶段与种子萌发阶段 2 个发育时期对 NaCl 预处理的响应具有显著的正相关性,花 30 在直接盐胁迫或低质量浓度 NaCl 诱导处理后的耐盐性低于花 11,但是经过高质量浓度(萌发期为 15 g/L NaCl,小孢子时期为 300 mg/L)NaCl 预处理后,花 30 种子和小孢子的耐盐性显著增加,尤其在高质量浓度的盐

胁迫培养时,发芽率、主根长和愈伤产量均显著优于花 11。据此推测,作物品种内在的遗传基础决定了不同品种在小孢子诱导愈伤阶段或种子萌发阶段等关键发育时期对 NaCl 引发或预处理后的响应差异。因此,在小孢子离体培养早期或种子萌发阶段实施 NaCl 盐胁迫预处理,对于品种的耐盐性评价具有重要意义。

近年来随着对植物耐盐分子机制研究的不断深入,发现编码小热激蛋白的基因在植物逆境胁迫响应等过程中发挥重要功能^[20]。Zhao 等^[21]的研究表明 *LeHSP21.5* 基因在番茄中过量表达,转基因植株对盐的耐受性显著增强。Ruibal 等^[22]报道了在苔藓中过量表达 *PpHSP16.4* 基因能增强植株的耐盐性。本研究中,经过 300 mg/L NaCl 预处理后,在盐胁迫的培养基上,盐敏感品种中 *HvsHSP1* 基因的表达量也显著增强。该结果与 Liu 等^[13]的研究结果相似,说明,热休克蛋白作为分子伴侣,参与蛋白质折叠、装配、易位和退化,它的激活可能对于盐敏感品种缓解由于盐胁迫引起的内质网应激以及维持组织细胞的自稳和环境适应性方面起着重要作

用。植物的耐盐性状为数量性状,受多基因控制,涉及到多种耐盐生理生化机制和诸多基因的选择性差异表达,仅通过对单一的功能基因进行遗传改良来提高植物的耐盐性具有非常大的局限性。因此,对基因表达的调控研究十分重要。真核翻译起始因子1A(eIF1A)是植物中重要的蛋白合成调控因子之一,超表达该基因可明显增强植物的抗逆性,被认为是盐胁迫耐受的一个重要决定因素^[23]。Liu等^[13]也发现转录起始因子eIF1A在小孢子细胞应答盐胁迫中发挥作用。本研究中,*HveIF1A*基因在无NaCl预处理的条件下,花30中基因表达量在盐胁迫时显著减少,但是在300 mg/L预处理的条件下,花30中基因表达量在盐胁迫时显著增加,说明盐胁迫下,花30的翻译起始受到盐胁迫的抑制,但是经过NaCl预处理后,翻译起始能力增强。

本研究揭示不同大麦品种在小孢子盐胁迫培养过程中对前期盐预处理的响应能力存在差异,与种子萌发过程对盐预处理响应能力的差异在某种程度上存在一致性,且发现小孢子经过高质量浓度NaCl预处理后,后期诱导愈伤中*HveIF1A*和*HvsH-SP1*在受到盐胁迫时会诱导上调表达,可能与其耐盐性增强有关,可为进一步利用小孢子培养体系鉴定品种的耐盐性以及耐盐性状遗传改良提供参考。

参考文献 References

- [1] SHEN Q F, YU J H, FU L B, et al. Ionic, metabolomic and proteomic analyses reveal molecular mechanisms of root adaptation to salt stress in Tibetan wild barley[J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2018, 123: 319-330.
- [2] SIVRITEPE N, SIVRITEPE H O, ERIS A. The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions [J]. *Sci Hort*, 2003, 97: 229-237.
- [3] JAIN M S. Tissue culture-derived variation in crop improvement [J]. *Euphytica*, 2001, 118: 153-166.
- [4] ZHU J, FAN Y, SHABALA S, et al. Understanding mechanisms of salinity tolerance in barley by proteomic and biochemical analysis of near-isogenic lines[J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(4): 1516 [2020-18-19]. <https://doi.org/10.3390/ijms21041516>.
- [5] GAO R H, DUAN K, GUO G M, et al. Comparative transcriptional profiling of two contrasting barley genotypes under salinity stress during the seedling stage[J]. *International journal of genomics*, 2013, 139(2): 822-835.
- [6] 王亦菲, 杜志钊, 马运涛, 等. NaCl预处理对糯玉米发芽期耐盐性的影响[J]. *上海农业学报*, 2020, 36(3): 20-24. WANG Y F, DU Z Z, MA Y T, et al. Effects of seed pretreatments with different NaCl concentrations on salt tolerance in two waxy maize varieties under different salt stresses at germination stage [J]. *Acta agriculturae Shanghai*, 2020, 36(3): 20-24 (in Chinese with English abstract).
- [7] IBRAHIM E A. Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds[J]. *Journal of plant physiology*, 2016, 192: 38-46.
- [8] AMOOAGHAIE R, TABATABAIE F. Osmopriming-induced salt tolerance during seed germination of alfalfa most likely mediates through H₂O₂ signaling and upregulation of heme oxygenase[J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1791-1803.
- [9] MA L J, YU C M, LI X M, et al. Pretreatment with NaCl induces tolerance of rice seedlings to subsequent Cd or Cd⁺ NaCl stress[J]. *Biologia plantarum*, 2013, 57(3): 567-570.
- [10] 陆瑞菊, 徐红卫, 陈志伟, 等. 源于小孢子培养的大麦耐盐变异体获取[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(11): 1069-1078. LU R J, XU H W, CHEN Z W, et al. Screening of variants derived from barley (*Hordeum vulgare* L.) microspore culture for salt tolerance [J]. *Plant physiology journal*, 2012, 48(11): 1069-1078 (in Chinese with English abstract).
- [11] GAO R H, GUO G M, FANG C Y, et al. Rapid generation of barley mutant lines with high nitrogen uptake efficiency by microspore mutagenesis and field screening[J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 450 [2020-08-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00450>.
- [12] 孙月芳, 陆瑞菊, 王亦菲, 等. 不同基因型大麦离体培养的花药及小孢子对低温和NaCl预处理的反应[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(4): 46-48. SUN Y F, LU R J, WANG Y F, et al. Response of in vitro culture of anther and microspore from different genotypes of barley to cool and NaCl pretreatments[J]. *Chinese agricultural science bulletin*, 2007, 23(4): 46-48 (in Chinese with English abstract).
- [13] LIU C H, LU R J, GUO G M, et al. Transcriptome analysis reveals translational regulation in barley microspore derived embryogenic callus under salt stress[J]. *Plant cell reports*, 2016, 35(8): 1719-1728.
- [14] 陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 等. 两份大麦品种单倍体细胞与植株水平耐盐性的关系[J]. *核农学报*, 2011, 25(2): 226-230. LU R J, CHEN Z W, HE T, et al. Relationship of NaCl tolerance between haploid cell level and plant level in two barley cultivars [J]. *Journal of nuclear agricultural sciences*, 2011, 25(2): 226-230 (in Chinese with English abstract).
- [15] LU R J, WANG Y F, SUN Y F, et al. Improvement of isolated microspore culture of barley (*Hordeum vulgare* L.); the effect of floret co-culture[J]. *Plant cell, tissue and organ culture*, 2008, 93(1): 21-27.
- [16] 徐红卫, 王亦菲, 梁乔伟, 等. 胚乳对大麦苗期耐盐性的影响[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(10): 1489-1496. XU H W, WANG Y F, LIANG Q W, et al. Effect of endosperm on salt tolerance of barley at seedling stage[J]. *Plant physiology journal*, 2019, 55(10): 1489-1496 (in Chinese with English abstract).
- [17] CHEN Z W, LI Y B, LIU C H, et al. Reference gene selection for quantitative RT-PCR normalisation in barley under low-ni-

- trogen stress, based on RNAseq data[J]. *Journal of cereal science*, 2018, 82: 213-215.
- [18] GAO Y, LU Y, WU M Q, et al. Ability to remove Na⁺ and retain K⁺ correlates with salt tolerance in two maize inbred lines seedlings[J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1716 [2020-08-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01716>.
- [19] 王亦菲, 陆瑞菊, 黄剑华. 花药和小孢子培养技术应用于大麦育种的回顾和展望[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(12): 1753-1758. WANG Y F, LU R J, HUANG J H. Review and perspective on the application of anther and microspore culture in barley breeding[J]. *Plant physiology journal*, 2014, 50(12): 1753-1758 (in Chinese with English abstract).
- [20] URADE R. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants[J]. *The FEBS journal*, 2007, 274(5): 1152-1171.
- [21] ZHAO C M, SHONO M, SUN A Q, et al. Constitutive expression of an endoplasmic reticulum small heat shock protein alleviates endoplasmic reticulum stress in transgenic tomato[J]. *Journal of plant physiology*, 2007, 164(7): 835-841.
- [22] RUIBAL C, CASTRO A, CARBALLO V, et al. Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrel-la patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4[J/OL]. *BMC plant biology*, 2013, 13(1): 174 [2020-08-19]. <http://biomedcentral.com/1471-2229-13-174>. DOI: 10.1186/1471-2229-13-174.
- [23] YANG G, YU L, WANG Y, et al. The translation initiation factor 1A (*TheIF1A*) from *Tamarix hispida* is regulated by a Dof transcription factor and increased abiotic stress tolerance[J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2017, 8: 513 [2020-08-19]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00513>.

Effects of salt pretreatment on seed germination and microspore callus formation in barley

XU Hongwei^{1,2}, GUO Guimei¹, GAO Runhong^{1,2}, HE Ting¹, DU Zhizhao³, LI Jing¹,
CHEN Zhiwei¹, LU Ruiju¹, WANG Yifei¹, LIU Chenghong¹

1. *Institute of Biotech Research, Shanghai Academy of Agricultural Sciences/Shanghai Municipal Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China;*
2. *College of Agronomy, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;*
3. *Shanghai Municipal Service Centre for Agricultural Science and Technology, Shanghai 200335, China*

Abstract The salt tolerant cultivar H11 and salt sensitive cultivar H30 were used to study the effects of salt pretreatment on seed germination and microspore callus formation in barley. The germination rate, taproot length during the seed germination and the yield of callus in the microspore culture stage was compared under the salt pretreatments. The expression of four key genes at the microspore stage of the two cultivars was investigated under salt stress. The results showed that the seeds and microspores of H30 were less tolerant to salt than that of H11 under 0 g/L NaCl and low NaCl pretreatment. Under the high concentration of NaCl pretreatment (15 g/L NaCl in germination stage and 300 mg/L in microspore stage), the salt tolerance of H30 was significantly enhanced. The germination rate, taproot length and the yield of callus were significantly superior to that of H11 under high concentration of salt stress. The results of the correlation analysis of germination rate, taproot length and callus yield between the two cultivars showed that the relative values of the differences between the two cultivars at the stage of germination and microspore were significantly positively correlated. The gene *HvsHSP1* and *HveIF1A* of H30 were significantly up-regulated at the stage of microspore culture in comparison with that of H11 after 300 mg/L NaCl pretreatment. It is indicated that the differences in the response of tested barley cultivars to salt pretreatment at the stage of seed germination and microspore may be consistent. *HvsHSP1* and *HveIF1A* of salt sensitive cultivar may be related with the response of NaCl induction at the stage of microspore.

Keywords barley; salt stress; salt pretreatment; pioneer plants; microspore culture

(责任编辑:张志钰)