

文章编号: 1003-8701(2008)01-0023-03

高粱幼穗离体培养再生体系的建立

谭化, 王中伟, 周紫阳, 刘艳芝, 姜昱, 董英山*

(吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033)

摘要: 6个基因型的高粱幼穗接种于 YD₁₀、L₂、YLMSD 和 MS₁ 诱导培养基, 结果在 MS₁ 培养基上 6 个基因型的幼穗都诱导出愈伤组织, 05DL15A 诱导率最高为 96.0%, 四杂 40 诱导率最低为 27.5%。获得的淡黄色颗粒状愈伤组织分化出不定芽, 不定芽高 8 cm 左右转入生根培养基再生植株。

关键词: 高粱; 幼穗; 愈伤组织; 再生植株

中图分类号: S514; Q813.1²

文献标识码: B

Establishment of Regeneration System of Sorghum Spikes

TAN Hua, WANG Zhong-wei, ZHOU Zi-yang, LIU Yan-zhi, JIANG Yu, DONG Ying-shan*

(Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130124, China)

Abstract: Young spike of six genotype sorghum were inoculated on YD₁₀, L₂, YLMSD and MS₁ induction medium. Young spikes of six genotypes were all generated callus on MS₁ medium. The highest rate of 96.0% was obtained in '05DL/5A', whereas the lowest rate of 27.5% was obtained in 'Siza 40'. The yellow particulate callus differentiated adventitious buds. When the adventitious buds were 8cm long, they were switched to rooting media to regenerate plants.

Key Words: Sorghum; Young spike; Callus; Regenerated plant

高粱是我国主要杂粮作物之一, 是粮食、饲料和酿酒业原料的重要来源。虽然高粱遗传转化研究在上个世纪 60 年代就开始了, 然而, 高粱与其它植物相比, 通过组织培养获得再生植株相对更难一些。最早进行高粱组织培养研究的是 1968 年 Stroganov 利用高粱根和分蘖节诱导出愈伤组织, 开创了高粱组织培养研究的历史。1970 年 Masteller 等以芽原基为外植体, 诱导出愈伤组织并获得了再生植株, 此后, 高粱组织培养研究有了较多的报道, 所用的外植体主要有未成熟胚、成熟胚、幼穗、茎尖、种子、幼叶、花药和幼苗等, 但都存在着愈伤组织诱导率低、难分化成苗的问题。

高粱幼穗培养诱导率、分化率较高, 因此国内外开展的这项研究工作也较多。国外 Wen 等^[1]、Murty 等^[2]、Bhat 等^[3]相继报道了以幼穗为外植体进行诱导愈伤组织和再生的研究。国内, 韩福光等^[4]、

白志良等^[5]和石太渊等^[6]也进行了这方面的研究报道。都得到了类似的结论, 即幼穗愈伤组织诱导率高、生长快, 能获得再生植株。本研究以 6 个生产主栽品种或新品系为供试材料, 选用幼穗为外植体, 诱导产生了易于分化的愈伤组织类型, 愈伤组织分化出不定芽, 6 个基因型都获得了再生植株, 建立了较为完善的再生体系, 为今后高粱通过转基因直接选育新种质打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

四杂 40、05DL/5A、4190A/219K、Q24/辽 R-21、5933 和 2598, 由吉林省农业科学院作物所提供。

1.2 培养基

诱导培养基: MS₁(MS+2, 4- D 2mg/L+ 3% 蔗糖, pH 5.8); YD₁₀ (MS+ 2, 4- D 5 mg/L+ 3% 蔗糖, pH 5.8); L₂ (MS+ BA 0.5mg/L+ 6% 蔗糖, pH 5.8); YLMSD (MS+2, 4- D 2 mg/L+KT0.25 mg/L+ 3% 蔗糖, pH 5.8)。分化培养基 G₃ (MS+BA 2mg/L+NAA

收稿日期: 2007-05-14

作者简介: 谭化(1980-), 男, 技术员, 主要从事牧草及杂粮作物转基因研究。

通讯作者: 董英山, 研究员, ysdarg@cjaas.com

0.5 mg/L +IAA 0.5 mg/L+3%蔗糖, pH 5.8)。生根培养基 MS₀(MS基本培养基,不附加植物激素)。

1.3 愈伤组织诱导

取不同授粉时间的幼穗,用75%乙醇擦外层苞叶,然后在超净工作台上剥取幼穗,将每个幼穗的小穗切成8~10 cm段,接种于各诱导培养基中。每个培养皿接种20块外植体,每个基因型接种5个培养皿,置于培养室中暗培养,培养温度22~24℃。30 d时统计愈伤组织诱导率。

1.4 愈伤组织继代培养

幼穗切段接种3周后开始出现愈伤组织,接种5~6周大部分外植体都诱导出愈伤组织,将褐化严重的愈伤组织去掉,其余的愈伤组织转移到继代培养基中,每隔1周继代1次,并且进行光照培养(16 h/d, 1 500~2 000 lx)。

1.5 愈伤组织分化

在继代过程中,愈伤组织逐渐形成3种类型,根据各类型愈伤组织的生长状态,在不同时间内

将其转移到分化培养基中。2周后一部分愈伤组织上就有绿点出现,之后迅速分化出不定芽。10 cm长的不定芽转移到生根培养基中,1周就可以生出1~3条白色的根。

1.6 再生植株移栽

将炼苗7 d的再生植株洗去培养基,移栽入营养钵。注意保湿、保温。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对愈伤组织的诱导效果

幼穗切段接种到各种诱导培养基上,3周左右开始出现愈伤组织,30 d统计各基因型愈伤组织的出愈率(表1)。结果发现6个基因型在4种诱导培养基上都可以诱导出愈伤组织,MS₀培养基诱导愈伤组织的效果最好,其它3种培养基的诱导效果明显不如MS₀培养基,并且它们之间的诱导效果相差不多。

表1 4种诱导培养基对高粱6个基因型诱导愈伤组织效果比较

培养基	6个基因型的愈伤诱导率(%)						平均数
	四杂40	05DL/5A	4190A	Q24	5933	2598	
YD ₁₀	41.0	35	28.0	37	37.5	41.0	31.75
L ₂	27.5	38	37.0	32	30.0	37.5	32.00
YLMDS	32.0	40	32.5	39	32.5	41.0	37.00
MS ₀	75.0	96	87.0	91	82.0	87.0	88.50

MS₀培养基上诱导的愈伤组织呈淡黄色、松散颗粒状、生长较快,褐化现象较轻(图1);YD₁₀、L₂、YLMDS 3种培养基上诱导的愈伤组织呈黄白色、较硬颗粒状、生长缓慢、边缘褐化并逐渐扩大,通过继代培养时不断剔出褐化部分,保留黄色的生长速度较快的愈伤组织,进行继代增殖培养。从愈伤组织诱导率和形态两方面都表明,MS₀是较为适宜的诱导培养基,各基因型在MS₀培养基上的愈伤组织诱导率都很高,最好的05DL/5A诱导率达到96%。

2.2 不同基因型的分化效果

将6个基因型在MS₀培养基上诱导出的愈伤组织转入分化培养基G₃,2周即有愈伤组织出现绿点(图2),3周左右分化丛生芽(图3),统计分化率(表2)。每块愈伤组织的平均不定芽是2个,最多芽数为5个。诱导阶段培养基不同,对分化率的影响很大,MS₀培养基上6个基因型的平均诱导率为71.0%,其它3种培养基的平均诱导率仅为40%左右。分化率不同的基因型差别也很大,MS₀培养基上6个基因型中05DL/5A分化率最高为92%。

表2 不同诱导培养基对6个基因型分化率的影响比较

培养基	6个基因型的分化率(%)						平均数
	四杂40	05DL15A	4190A	Q24	5933	2598	
YD ₁₀	18	56	44	62	46	32	43.0
L ₂	26	68	36	28	42	38	46.7
YLMDS	42	58	46	36	46	28	44.0
MS ₀	56	92	64	74	72	68	71.0

2.3 愈伤组织的褐化现象

所有的高粱幼穗切段在接种7 d左右就出现褐化现象,最初是外植体边缘变褐,逐渐地整块外植体变褐直至死亡。不同基因型在同一培养基上褐化程度不同,同一基因型在不同培养基上褐化

程度也不同。缩短继代时间是解决褐化问题一个较好的方法。针对愈伤组织不同状态继代时间也不同,没有褐化或褐化程度轻的愈伤组织可1周继代一次,褐化较重的愈伤组织1 d继代一次,继代时不断剔出褐化部分,继代4~5次可得到黄绿

色又有分化能力的愈伤组织。外植体全部褐化的愈伤组织,通过缩短继代时间或培养基中附加活

性炭都无法减轻褐化现象。

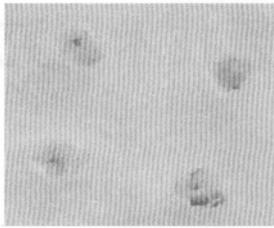


图 1 幼穗诱导愈伤组织

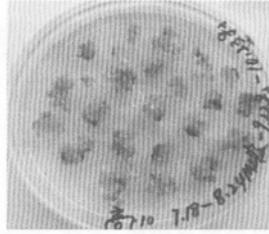


图 2 愈伤组织分化

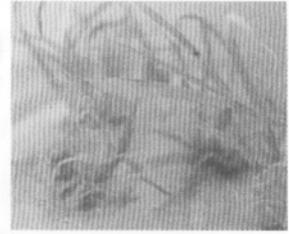


图 3 丛生不定芽

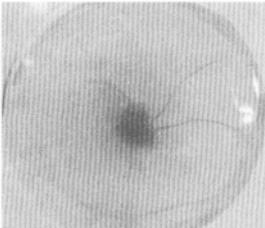


图 4 不定芽生根

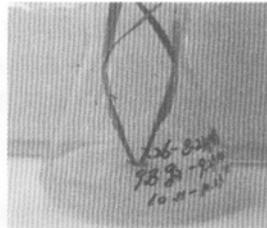


图 5 再生植株



图 6 移栽成活植株

2.4 不同基因型生根效果

丛生芽长至 10 cm 左右将其分开,转入生根培养基。1 周即有不定芽长出根,3 周时大部分不定芽长出 3~5 条根(图 4)。0.5DL/5A 的生根率最高为 60%,Q24/辽 R-21 的生根率最低为 10%。值得注意的是不定芽生根阶段,根部还会出现较重的褐化现象,但只要及时地将褐化部分切掉或者在培养基中添加活性炭就可以减轻褐化现象,不影响再生植株的生长(图 5),再生植株移栽成活(图 6)。

3 讨 论

高粱组织培养期间,外植体变褐是一个常见问题,甚至贯穿整个培养过程,因此是影响脱分化及再生芽的重大障碍。外植体变褐是由于组织中多酚氧化酶被激活,使细胞中的代谢发生变化,酚类物质被氧化后产生醌类物质,它们逐渐扩散到培养基中,抑制其它酶的活性,毒害整个外植体。高粱含丹宁比较多,丹宁是一种水溶性的酚类物质,因此组织培养过程中极易褐化,但是也发现不同的基因型褐化程度不同,这也与不同高粱品种中丹宁的含量不同相吻合。因此在高粱组织培养过程中需要对不同的基因型进行筛选,用褐化程度轻的基因型进行培养。

本研究选用的 6 个基因型高粱幼穗培养诱导率、分化率都较高,因此幼穗是高粱组织培养再生的适宜外植体,这与国内外这方面的研究结果相

一致。同时,大多研究者认为幼穗取材时期也是诱导愈伤组织的关键因素之一,一般认为 1~3 cm 长的幼穗是最适宜,过小或过长均难以诱导愈伤组织^[7]。在本实验中也是 2 cm 长的幼穗诱导愈伤组织效果最好;小于 2 cm 长的幼穗培养时更容易褐化,所以难获得理想的愈伤组织;长于 2 cm 的幼穗只要选用幼穗下端的小穗接种,也可以诱导出较为理想的愈伤组织。所以培养时外植体大小的选择范围可相对大一些,因为取材时不同的品种很难整齐一致。

参考文献:

- [1] Wen F.S. Callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of sorghum. *Euphyti*2ca, 1991, 52:177-181.
- [2] Murty U. R. Developing tissue culture system for sorghum. *Sorghum News letter*, 1987, 30:12-13.
- [3] Bhat S, Kuruvinashetti M.S. Plant regeneration from tissue cultures of cytoplasmic2genetic male2sterility maintainer lines of sorghum(*Sorghum bicolor*) [J]. *India Journal of Agricultural Sciences*, 1995, 65 (20):127-129.
- [4] 韩福光,赫 庞.高粱不同外植体愈伤组织诱导的研究[J]. *辽宁农业科学*, 1993(1):45-48.
- [5] 白志良,王良群,郑立萍,等.高粱不同外植体离体培养[J]. *华北农学报*, 1995, 10(1):60-63.
- [6] 石太渊,杨立国,王 颖.基因型和培养基对高粱幼穗离体培养的影响[J]. *国外农学-杂粮作物*, 1995, (2):27-29.
- [7] 石太渊.高粱组织培养研究进展 [J]. *杂粮作物*, 2003, 23(6):340-343.