

不同高粱自交系幼胚组织培养 及植株再生

张美善^{1,2}, 赵娜², 阎鸿雁³, 林秀云^{2,3}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 东北师范大学遗传与细胞研究所分子表观遗传学实验室, 长春 130024; 3. 吉林省农业科学院作物研究所, 公主岭 136100)

摘要: 以7份高粱自交系幼胚为外植体, 研究了不同基因型对组织培养的反应和植株再生的差异。结果表明: 不同高粱基因型间愈伤组织诱导率没有明显差异, 但胚性愈伤组织百分率、不定芽分化率以及再生频率有明显差异。其中 YN336A、YN267R、YN510R 和 YN338A 的再生效果较好, 其不定芽发生率、不定根发生率及移栽成活率分别为 64.4%~72.8%, 76.2%~100.0% 和 36.3%~80.0%。对只生根不生芽的基因型, 加入 1~2 mg/L KT 有明显抑制生根、促进生芽的效应。

关键词: 高粱; 自交系; 幼胚; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 514.01

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2007)03-0256-03

Studies on Tissue Culture and Plant Regeneration of Immature Embryos of Sorghum Inbred Lines

ZHANG Mei-shan^{1,2}, ZHAO Na², YAN Hong-yan³, LIN Xiu-yun^{2,3}

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Laboratory of Plant Molecular Epigenetics, Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China; 3. Institute of Crops, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Explants of immature embryos of seven genotypes of sorghum inbred lines were examined for their response in tissue culture and plant regeneration. The results indicated that there were no significant differences of induction frequency among different genotypes, but the frequency of regenerable callus formation, shoot regeneration and plant regeneration was significantly different. YN336A, YN267R, YN510R and YN338A showed good performances under regeneration culture conditions, frequency of shoot formation, root formation and transplant survive was in the range of 64.4%~72.8%, 76.2%~100.0% and 36.3%~80.0%, respectively. For the genotypes that rooted rather than shot, 1~2 mg/L KT could effectively inhibit rooting and promote shooting.

Key words: sorghum; inbred line; immature embryo; tissue culture; plant regeneration

植物遗传转化需要高效率的细胞、组织培养和植株再生系统。高粱是全球仅次于小麦、水稻、玉米、大豆、马铃薯的第六大重要作物。然而,高

粱是目前公认的最难建立植物无性组织或器官再生体系的作物之一^[1]。各国学者以高粱未成熟胚、成熟胚、幼穗、茎尖、种子、幼叶、花药等不同器

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30430060)

作者简介: 张美善(1965-), 女, 在读博士, 副教授, 主要从事植物生理和分子遗传学研究。

收稿日期: 2006-05-30 修回日期: 2006-09-10

官或组织为外植体相继开展了组织培养研究工作并取得了较好的进展^[2-4],但高粱外植体培养最多、最成功、研究工作开展得较早的是未成熟胚培养。1977年, Gamborg 等^[5]首次以高粱的幼胚为外植体,诱导出愈伤组织,并获得了高粱再生植株。高粱的组织培养受基因型影响较大,而且仍存在着愈伤组织诱导频率不高、胚性愈伤组织在继代过程中出现褐化、水样化、胚性丧失等问题。本试验采用高粱优良自交系幼胚为外植体,研究愈伤组织的诱导、继代培养以及植株再生,其结果可为下一步遗传转化和分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为7个高粱自交系:YN336A, YN267R, YN510R, YN338A, YN507R, YN323A, YN213R。

1.2 试验方法

1.2.1 高粱幼胚的愈伤组织诱导及植株再生培养 授粉后15~18 d取高粱幼嫩种子用自来水冲洗,在超净工作台上用700 mL/L酒精表面消毒30 s,用无菌水冲洗2次,再用1 mL/L的HgCl₂浸泡3 min,并用无菌水冲洗4次。在超净工作台上用眼科镊子剥去种皮,取出幼胚,将幼胚盾片朝上接种于诱导培养基(MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6.8 g/L, pH值5.8)上。每个三角瓶中接种6~10个幼胚,在27℃光照培养箱中进行暗培养。20 d后将愈伤组织转移到继代培养基(MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6.8 g/L, pH值5.8),每14~20 d继代1次。继代培养6个月后将愈伤组织转移到分化培养基(MS+脯氨酸1.0 mg/L+PVP 1.0 g/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.2 g/L, pH值5.8),在光照培养箱内进行光培养,培养温度27℃,光照时间16 h/d。待再生苗长至约5 cm高时转移到生根培养基[1/2 MS(大量元素和微量元素减半)+PVP 1.0 g/L+蔗糖20 g/L+琼脂6.8 g/L, pH值5.8]中进行根的诱导。生根培养完成后进行炼苗移栽。为了防止移栽后根部被土壤微生物污染,栽苗前对土壤进行

高压灭菌。

1.2.2 细胞分裂素对胚诱导分化的影响试验 对在无激素分化培养基中只生根不生芽的YN507R进行了生芽诱导,在原无激素的分化培养基成分上分别添加0.5,1.0,2.0 mg/L的KT,观察其对胚诱导分化的影响。

2 结果与分析

2.1 不同基因型对高粱组织培养的影响

供试的7个高粱自交系幼胚在诱导培养基上均可以诱导出黄白色愈伤组织,愈伤组织诱导率均在95%以上(表1),说明本试验采用的诱导培养基广泛适用于不同高粱基因型幼胚愈伤组织的诱导。但继代培养6个月后,7个高粱自交系愈伤组织的性质有了明显差异,YN267R和YN336A形成了较多的结构致密的黄白色胚性愈伤组织,YN213R的胚性愈伤组织百分率不到50%,YN323A从诱导愈伤组织初期到继代培养后期始终未形成胚性愈伤组织,而是形成了结构松散的水样化的非胚性愈伤组织,最后全部死亡。在分化培养基上,YN213R和YN507R只生根不生芽,其余基因型的不定芽发生率为64.4%~72.8%(表1)。

将在分化培养基上形成不定芽的幼苗转移至生根培养基上诱导生根,结果不同基因型高粱幼苗都形成了较好的根系,但其移栽成活率却有较明显的差异,YN267R的移栽成活率最低,其次是YN336A和YN510R,YN338A的移栽成活率最高为80%(表1)。

在组织培养过程中,经常发生愈伤组织坏死并向培养基释放出深褐色或紫色色素的现象。从不同基因型的表现来看,自交系YN267R和YN323A的褐化较轻,YN507R和YN213R的褐化则比较严重(表1)。Takashi Hagio^[6]研究表明,向培养基中加入1.0 g/L的PVP可以较好地控制这种褐化现象。在本试验中,向继代、分化和生根培养基加入1.0 g/L的PVP,也取得了良好的效果,其中对生根培养基防止褐化效果最为明显(数据未列出)。

表1 不同基因型对高粱组织培养的影响
Table 1. Effects of genotypes on sorghum tissue culture

基因型 Genotype	幼胚数 No. of immature embryos	愈伤组织 诱导率/% Percentage of callus induction	胚性愈伤 组织百分率/% Percentage of embryonic callus	不定芽 发生率/% Percentage of shoot formation	不定根发生 率/% Percentage of root formation	移栽成活率/% Percentage of transplant survival	褐化程度 Degree of released brown pigments
YN336A	60	100.0	75.0	72.8	100	65.0	++
YN267R	60	100.0	69.2	70.5	76.2	36.3	+
YN510R	60	100.0	67.8	66.2	81.0	74.5	++
YN338A	60	95.0	64.1	64.4	100	80.0	++
YN507R	60	95.0	56.6	0	0	0	+++
YN323A	60	100.0	0	0	0	0	+
YN213R	60	96.7	43.4	0	0	0	+++

注：“+”轻度褐化；“++”中度褐化；“+++”严重褐化

Note: “+” indicates light degree of released brown pigments; “++” indicates medium degree of released brown pigments; “+++” indicates excessive degree of released brown pigments

2.2 KT对愈伤组织分化的影响

在本试验中,大部分高粱自交系在无激素培养基中能够生芽,如 YN336A、YN267R、YN510R 和 YN338A,但有些基因型在无激素培养基中只生根不生芽,如 YN507R。在原培养基成分的基础上分别加入 0.5, 1.0, 2.0 mg/L KT, 对 YN507R 进行培养, 结果发现愈伤组织在加入 0.5 mg/L KT 的分化培养基中仍然只生根不生芽, 而在加入 1.0, 2.0 mg/L KT 的分化培养基中愈伤组织很快转绿并生芽, 说明在不定芽诱导过程中 KT 起着关键的作用。将其转移到生根培养基进行生根诱导后移栽于土壤, 得到了再生植株(表 2)。

表2 KT对芽诱导的影响

Table 2. Effects of KT on shoot formation

$\rho(KT)/$ ($mg \cdot L^{-1}$) Concentration	不定芽 发生率/% Percentage of shoot formation	不定根 发生率/% Percentage of root formation	移栽成活率/% Percentage of transplant survive
0.5	0	0	0
1.0	74.5	87.0	58.5
2.0	77.3	89.3	69.0

3 讨论

本试验结果表明,不同基因型的高粱自交系形成胚性愈伤组织以及不定芽的能力有较大的差异。因此,进行高粱的遗传转化时应针对不同基因型的材料进行组织细胞培养能力筛选,找出最好

的基因型用于遗传转化。综合出愈率、胚性特点、分化能力、褐化程度和移栽成活能力等几方面的表现,可以认为 YN336A、YN510R 和 YN338A 的幼胚对组织培养的反应较好,可作为基因转化的理想受体材料。

不定根和芽分化的顺序对植株的再生有重要影响,如果愈伤组织先分化出不定根,则几乎不可能再分化出芽。反之,形成芽后愈伤组织却能在生根培养基上长出根来,形成完整的再生植株。因此,有效地诱导芽分化是提高植株再生率的重要环节。植物激素对于组织培养中器官或胚状体的分化有重要的调节作用,本试验结果表明 KT 在高粱不定芽诱导过程中起关键的作用。

参考文献:

- [1] 石太渊. 高粱组织培养研究进展[J]. 杂粮作物, 2003, 23 (6): 340-343.
- [2] 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.
- [3] 韩福光, 赵海岩, 林凤, 等. 高粱幼叶离体培养衍生系的耐盐筛选与性状分析[J]. 作物学报, 1997, 23 (4): 491-495.
- [4] KUMARAVEDIVEL N, RANGASAMY S R. Plant regeneration from sorghum anther cultures and field evaluation of progeny [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 286-290.
- [5] GAMBORG O L, SHYLUK J P, BRAR D S, et al. Morphogenesis and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum [J]. Plant Sci Lett, 1977, 10: 67-74.
- [6] TAKASHI H. Adventitious shoot regeneration from immature embryos of sorghum [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 68: 65-72.