

高粱体细胞无性系变异的筛选与利用

王良群, 王呈祥, 白志良, 杨伟, 刘勇, 武秀兰, 侯丽萍

(山西农科院高粱研究所, 晋中 030600)

摘要: 选用幼穗、幼胚、茎尖等五种外植体进行组培, 结果表明, 幼穗和幼胚的分化率最高, 最适宜选用进行高粱体细胞克隆变异利用研究。对9个高粱品系的166个R₂代株系进行了观察分析, 除两个品系外, 其余7个均有变异株系出现, 其中晋梁5号的变异频率高达26%, 9个品系的平均变异频率为11.24%。筛选到多个高粱骨干恢复系的无性系变异材料, 并且以优良变异系R111为父本育成了优良杂交种一个, 已通过审定, 定名为晋杂18号。

关键词: 高粱; 组培; 体细胞无性系变异; 杂交种

中图分类号: S514.035 **文献标识码:** A

Studies on Screening and Utilization of Somaclonal Variants in Sorghum

Wang Liangqun, Wang Chengxiang, Bai Zhiliang, Yang wei, Liu Yong, Wu xiulan, Hou Liping

(Sorghum Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong 030600)

Abstract: Five types of explants including young embryo, young inflorescence, shoot tips, kernel and mature embryo were cultured. But regenerating ability varies greatly with the different explants types, among which calli from young inflorescence and young embryo has the best regenerating ability. Somaclonal variations were investigated in 166 R₂ lines derived from nine genotypes. The results revealed that all the genotypes except two showed somaclonal variations. Among all, the variation frequency of Jinliang No 5 was as high as 26%. The average frequency of all the investigated lines was 11.24%. Many somaclonal variants with special characters were obtained through variation screening method and one excellent hybrid named Jinza No 18 was developed and released.

Key words: Sorghum, Tissue culture, Somaclonal variants, Hybrid

研究表明, 植物组织培养产生的再生苗及其后代广泛地存在着可遗传的变异, 即体细胞无性系变异。这些变异源的存在无疑给物种的改良工作奠定了新的物质基础, 也理所当然地引起了人们广泛的兴趣。

高粱组织培养研究最早报道于20世纪60年代, 其后也出现了不少有关单个外植体培养成功的报道, 但总体上讲以分化出苗为实用目的组培研究深度不够、系统性不强^[1-4]。为了充分开发利用逐渐成熟的高粱组培技术, 使之日常化, 定型化地应用于高粱品种改良工作, 提高高粱育种的整体水平, 多年来, 笔者于1992—2005年在山西省农科院高粱研究所张村试验基地坚持开展了高粱体细胞克隆变异在育种上的应用

研究工作, 并在体细胞无性系建立, 田间选育技术创立, 优良高粱变异材料筛选和新杂交种选育方面取得了突破性进展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

笔者先后选用了25个高粱品系进行研究, 均为综合性状较好的常用育种材料, 其中包括骨干恢复系晋梁5号、三尺三、忻七、245、1383、HM65等。

1.2 组培试验方法

外植体为幼穗、幼胚、成熟胚、茎尖和子粒, 其中幼穗长度为0.2~5cm, 幼胚胚龄为6~20d, 茎尖是从0.5~12cm的无菌苗上截取的包括最上节在内的部分,

基金项目: 国家科委地方重大科技攻关(971003)和山西省留学归国项目(200115-62)资助。

第一作者简介: 王良群, 1959年出生, 男, 山西闻喜人, 副研究员, 主要从事新技术育种研究, 发表论文30余篇。通信地址: 030600 山西省晋中市榆次区柳东北巷15号山西农科院高粱研究所。Tel: 0354-3963982, E-mail: wanglx298@126.com。

收稿日期: 2006-02-15, **修回日期:** 2006-03-08。

成熟胚剥自浸泡 12h 左右、具有发芽能力的子粒。

基本培养基为 MS 或 LS, 蔗糖浓度为 30~40g/L。pH 值为 5.8~6, 激素有 2,4-D、IAA、NAA、KT、6BA、ZT。培养在室温或光温控制条件下进行^[9]。

1.3 田间选育方法

1.3.1 R_1 代再生植株种植观察 再生苗可进行盆栽或直接栽植在温室地里直到成熟收获, 盆栽的植株, 第二年 5 月中旬移栽到大田, 大田成活植株抽穗后套袋自交, 收获时分株收获。

1.3.2 R_2 代种植及选育 R_1 代(单株)下一季种植后形成了 R_2 代株系, 一般按 5 行区或 10 行区种植即可(行长 3~4m), 种植时设置对照。

R_2 代选择时, 先淘汰掉和对照完全一致无变异的株系, 对出现变异株系按两种情况分别对待。如属无分离变异株系, 变异性状有利或符合既定的育种目标, 可选 3~5 个单株分别收获, 下一季分别种植形成 R_3 姊妹系, 以便下一季观察性状稳定性。如属有分离变异株系, 则选择符合育种目标的优良变异单株。

因体细胞无性系后代稳定快, 所以 R_2 代中出现的有利变异单株或无分离变异株系即可进行测交, 以便下一季鉴定其配合力, 对已测交的单株要挂牌标记, 以便收获时辨认。

1.3.3 R_3 代及以后各世代的种植观察与鉴定 R_3 代株系田间种植时要设对照亲本, 在 R_3 代要注意观察各株系的稳定性, 一般大多数株系已趋于稳定, 可混收混脱, 但对仍有分离的少部分株系, 则要继续进行单株选择, 在下一代即 R_4 代继续进行鉴定。

如果育种目标是提高抗病性或其它抗逆性, 则可在 R_3 及以后的世代进行。比如, 要进行抗病性鉴定, 则取一小部分所选 R_2 单株的种子, 播种于病圃, 进行人工接种, 收获时根据其抗性水平再决定 R_3 株系选择或淘汰。

R_3 株系另一个选择的依据是配合力, 即根据上一季测交所得测交种的产量水平或丰产性来决定不同株系的取舍^[9]。

2 结果与分析

2.1 高粱体细胞无性系的建立及其影响因素分析

2.1.1 外植体的选用及其影响 基于取材周期性和打破时空局限性的考虑, 笔者选用了子粒、成熟胚、茎尖、幼穗和幼胚等五种外植体进行了组培研究。表 1 是多次试验的综合结果, 表 2 是利用晋梁 5 号品种取得的一个具体试验结果。表 1 所出现的变异幅度是除培养基以外的其它因素所致, 显而易见, 五种外植体除幼胚较低外, 其余几种都得到较高的出愈率(表 1), 但是, 由

表 1 不同外植体的培养效果比较

外植体类型	子粒	成熟胚	茎尖	幼胚	幼穗
出愈率(%)	28~93	59~100	11~100	8~74	18~100
分化率(%)	0	0~15	0~23	26~66	27~100

表 2 晋梁 5 号不同外植体的分化率

外植体	子粒	成熟胚	茎尖	幼胚	幼穗
分化率(%)	0	13	14	38.1	72.2

于不同外植体愈伤组织的胚性差异很大, 其再生植株分化率差异也非常显著, 其中高粱幼穗愈伤组织胚性好, 分化率高, 幼胚愈伤组织的分化率虽不如幼穗, 但明显优于其它外植体。所以笔者认为, 外植体来源是影响高粱体细胞无性系发生的一个非常重要的因素。这表明, 在建立高粱不同基因型的体细胞无性系时, 注意外植体的选用, 能取得事半功倍之效, 显然, 幼穗和幼胚是适宜采用的外植体。虽然茎尖和成熟胚分化出苗困难, 但在非生长季节即幼穗取材发生困难时, 仍可作为替代使用的外植体。

多年的试验结果表明, 不同外植体的分化培养效果受本身的发育状况影响。茎尖的长度是影响愈伤组织分化培养效果的重要因素, 1cm 以下无菌芽的茎尖愈伤组织容易分化出苗。20d 以下胚令的幼胚的愈伤组织易分化培养出苗, 超过 20d 的则难分化出苗。0.5~3cm 长的幼穗的愈伤组织容易分化出苗, 过大或

过小的幼穗都不适宜采用。

2.1.2 基因型试材的选用及影响 多年来, 笔者选用了二十个高粱品种进行了组培研究, 其中包括晋梁 5 号、三尺三等多个骨干恢复系。结果表明, 不同基因型对愈伤组织诱导培养的影响表现在产生色素种类、生长快慢、外观形态和胚性保持力等方面有差别, 但对出愈率影响不大, 不管采取什么基因型品系, 一般均能成功诱导愈伤组织且出愈率高。对分化的影响表现在, 当采用茎尖、成熟胚为外植体时, 其分化率很低, 有的很难获得再生苗。但当以幼穗和幼胚为外植体时, 不同基因型均可分化出苗, 其差别只不过是分化率高低和平均得苗率不等。所以, 在以品种改良为主要目的的组培研究中, 当采用幼穗和幼胚外植体时, 可忽略基因型对分化培养的影响, 选材主要根据育种目标和品种的综合性状来进行。

2.1.3 培养基选用 笔者选用的基本培养基主要为 MS, 其次为 LS, 实践证明, 采用 MS 可取良好的培养效果。诱导培养基附加的激素成分主要有 2~3mg/L 2,4-D 和 0.5~1mg/L KT, 继代培养基也附加

有相同种类的激素,但含量低,2,4-D和KT分别为1~2mg/L和0.1~1mg/L。再生苗分化培养基为MS+1~3mg/L IAA+0.5~1mg/L KT。进行幼穗愈伤组织分化培养,也可用只附加0.5~1 mg/L KT、ZT和6BA的培养基,就可取得良好的效果,并且使用KT和ZT分化产生的再生苗具有良好的根系,不需要进行生根培养,但使用6BA时,虽然能取得同样好的分化效果,因无根,需要一次生根培养。

2.4 培养条件的控制

高粱愈伤组织培养的适宜温度范围是20~25℃。据观察,温度高时,虽然生长旺盛,但并不利于胚性愈伤组织的形成,而是形成大量疏松、无结构的非胚性愈伤组织,使植株再生率降低。因此,在高温季节,以空调调节室温为佳。

光照是保证体细胞无性系发生的一个必不可少的条件,在进行分化培养时,要进行人工辅助照明,使光强达到2000Lx,光照时数10~12h。

2.2 无性系后代变异特点及遗传稳定性

R₁代变异最早出现于再生苗试管分化培养阶段,比如能明显观察到白化苗和畸形苗等异常现象。但是,由于再生苗当代植株历经试管培养、盆栽,田间移植等多个不同生长环境,所以很难保持生长条件一致,不同的再生植株间差异非常大,很难确定是可遗传的变异,还是环境条件造成的不可遗传的变异。

由于有许多变异并不会在R₁代中表现出来,所以R₂代是观察和分析变异的一个重要世代。表3是对9

个基因型品系的166个R₂株系出现变异情况调查统计结果,除B₁₃₅和fB外,其它品系均有程度不同的变异株系出现,其中晋梁5号和三尺三的变异频率最高分别为26%和25%。9个品系的166个株系的总变异频率为11.24%。R₂代出现变异的情况有两种,一是无变异分离,即变异性状已趋于稳定无分离现象,另一种是有分离变异,即变异性状出现分离现象,整个株系表现不一致。在出现变异的R₂代株系中,有时只观察到一个性状出现变异,其它性状和亲本相同,但在有些变异株系中,可观察到同时出现多个性状变异。连续多代的观察结果表明,高粱体细胞无性系变异类型丰富,许多形态学及生物学性状可发生变异,如株高、生育期、株型、穗形、叶形、粒形、粒色、抗逆性,千粒重及赖氨酸含量等,其中株高,生育期等性状最易发生变异,一般地,株高发生变异时,有高秆易于矮化,矮秆趋于变高的特点,如在三尺三中出现了许多高秆变异系,当生育期出现变异时,一般则有早熟易出现晚熟、晚熟材料易出现早熟变异系的倾向。

表3 不同基因型的R₂变异频率

基因型	R ₂ 株系数	变异株系	变异率(%)
晋梁5号	23	6	26.0
654	57	5	8.8
忻七	36	2	5.6
8738-2	15	2	13.3
B135	8	0	0
245	6	1	16.7
fB	2	0	0
1383	11	1	9.1
三尺三	8	2	25.0
合计	166	19	11.6

表4 高代稳定无性变异系性状表现

名称或编号	抽穗期(月-日)	株高(cm)	穗长(cm)	穗宽(cm)	穗型	穗形	千粒重
晋梁五 R111	07-25	145	24	8	紧	纺形	31.8
晋梁五 R231	07-19	109	22	7	中紧	长纺形	32.0
晋梁五 R232	07-22	117	27	10	中	纺形	28.0
晋梁五 R234	07-30	147	25	8	中紧	长纺形	28.4
晋梁五 R235	07-23	111	22	7	中紧	纺形	33.0
晋梁五 R242	07-27	137	24	7	中紧	纺形	38.0
晋梁五 R246	07-23	117	22	6	中紧	棒形	24.4
晋梁五 R247	07-26	107	28	9	中紧	纺形	27.6
晋梁五 R248	07-24	117	22	8	中紧	纺形	29.2
晋梁5号(CK)	07-25	168	26	10	中	纺形	32.0
忻七 R346	07-26	150	23	8	中紧	纺形	26.0
忻七(CK)	07-23	136	26	7	中	纺形	22.6
三尺三 R256	07-23	128	24	5	中	纺形	26.0
三尺三 R257	07-19	141	23	5	中	纺形	20.8
三尺三 R258	07-22	143	26	8	中	长纺	30.0
三尺三 R259	07-23	129	25	9	中紧	长纺	26.8
三尺三 R262	07-21	148	26	6	中紧	棒形	31.2
三尺三(CK)	07-19	149	23	9	中散	塔形	27.0
245R237	07-27	181	20	7	中紧	纺形	33.6
245R348	07-29	152	23	9	中紧	纺形	28.0
245R350	07-25	170	25	8	中紧	长纺形	31.0
245R351	07-24	162	21	7	紧	纺形	30.8
245(CK)	07-29	123	24	8	中紧	长纺形	34.0

多年观察还表明,R₂代出现了变异一般可在R₃中能遗传下来,并且多数变异性状在R₃代均表现一

致,不再分离,对部分变异株系的高代跟踪观察表明R₃代稳定的株系在R₄及更高的世代R_n代中不再分

离。

2.3 优异高粱无性系后代变异材料的筛选

晋梁5号、三尺三、忻七是一些重要的高粱恢复系,在杂交种选育中发挥过重要作用,但同时也存在一些明显的缺点,如不抗丝黑穗病。采用体细胞克隆育种方法对这些材料进行了改良,筛选到了许多优异变异材料。

表4列举了已稳定的体细胞无性变异系与各自对照的性状特点,不难看出,这些无性系均与对照在一个或数个主要性状间的差异非常大。最早抽穗的晋梁五 R₂₃₁ 与最晚抽穗的晋梁五 R₂₃₄ 相差 11d,株高最低的晋梁五 R₂₄₇ 与对照相差 61cm,千粒重最低的晋梁五 R₂₄₆ 与最高的晋梁五 R₂₄₂ 相差 13.6 g。

2.4 优良杂交种晋杂 18 号的选育

晋梁五号是高粱育种上的一个骨干恢复系,曾配制出晋杂 4 号和晋中 405 等优良杂交种,其配合力高,综合性状好,但不抗丝黑穗病,且穗略散茎秆高。鉴于此,采用体细胞克隆变异育种方法对其进行了改良,筛选到了一个优良变异系晋梁五 R₁₁₁(表 4)。该品系具有配合力高、恢复性好、秆硬、叶色深绿、高抗丝黑穗病等特点。以其为父本与 7501A 配制了一个杂交种。该杂交种丰产性好、千粒重高、株高适中、抗倒伏、高抗丝黑穗病,在 1996—1997 年的山西省区试和生产试验中表现优异,通过了省品审会的审定,被命名为晋杂 18 号。2001—2002 年该品种参加了全国区试,因表现良好于 2004 年通过了国家高粱品种鉴定委员会的鉴定。

3 讨论

高粱组培是体细胞无性系研究利用的基础环节,高粱组培技术的不断完善研究对体细胞无性系变异在品种改良中的应用是非常重要的。正如笔者的研究工作所表明的,外植体是影响高粱体细胞无性系发生一个非常重要的因素,各种外植体中,幼穗和幼胚是最适宜采用的两种外植体,但是取材受季节限制。茎尖、成胚熟等虽然分化率低,但取材容易不受时空限制,因此继续研究探索不同外植体高效低耗的再生苗分化培养的方法,仍然有重要的意义。此外,随着体细胞离体培养技术的不断完善,还可通过操纵离体培养条件,逐步实现定向诱导和筛选无性变异系的目的,形成更多的

技术优势,解决一些用常规方法难以解决的问题。

高粱体细胞无性系变异在育种上的应用研究是一个新兴的研究领域,过去,不少人对高粱体细胞无性系变异的利用持不同的看法,怀疑通过体细胞克隆是否能够产生足够多的变异加以利用,变异是否有益,是否能稳定遗传。试验结果表明,高粱体细胞克隆,确实能产生足够的无性系变异用于选育新的育种材料。几年来,笔者通过多品种、多代数、大群体的再生苗及其后代的观察比较和鉴定分析,对其变异和遗传进行了研究,创立了一套适合再生苗及后代的田间选育方法。但是为了更有效地发挥这一技术的作用,笔者认为应该更加深入地开展变异发生机理和遗传规律的研究^①。

高粱体细胞无性变异育种技术具有育种周期短、材料稳定快等特点。由于这些变异产生的遗传基础不是建立在不同品种大规模遗传物质交换重组、分离基础上,而是由于体细胞克隆过程的诱因使本身遗传基础个别方面发生了突变仍保留原有的大部分特点,因此易于稳定。该方法特别适合综合性状好,但存在个别缺点的材料的改良。

参考文献

- 1 马鸿图, Liang G A. 高粱幼胚培养及再生植株变异研究. 遗传学报, 1985(5):350~357
- 2 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
- 3 Masteller V J, Holden D J. The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum[J]. Plant Physiol, 1970,(45):362~364
- 4 Brettell RIS, Wernicke W, Thomas E. Embryogenesis from cultured immature inflorescences of sorghum bicolor [J]. Protoplasm, 1980 (104):141~148
- 5 白志良,王良群,等.高粱不同外植体离体培养[J].华北农学报,1995 (1):60~63
- 6 王呈祥,王良群,等.高粱组培无性变异系 R111 的选育[J].华北农学报,1997,(2):49~53
- 7 Waskom R M, Miller D R, Hanning E, et al. Field evaluation of tissue culture derived sorghum for increased tolerance to acid soils and drought stress[J]. Can J Plant Sci, 1990,70:997~1004

(责任编辑:秦守亮)