

文章编号: 1008-5394 (2008) 04-0048-04

## 高粱组织培养研究进展\*

王立艳<sup>1,2</sup>, 孙守钧<sup>2</sup>, 裴忠有<sup>2</sup>, 张树光<sup>1</sup>

(1. 天津市农业资源与环境研究所, 天津 300192; 2. 天津农学院 农学系, 天津 300384)

**摘要:** 随着植物基因工程的发展, 高粱的遗传转化已由理论研究转向应用研究, 而高粱组织培养是遗传转化中的一个基础而重要的环节。论述了近年来高粱组织培养及植株再生方面的研究进展。

**关键词:** 高粱; 组织培养; 再生

**中图分类号:** Q813.12

**文献标识码:** A

## Progress on Research of Sorghum Tissue Culture

WANG Li-yan<sup>1,2</sup>, SUN Shou-jun<sup>2</sup>, Communication Author, PEI Zhong-you<sup>2</sup>, ZHANG Shu-guang<sup>2</sup>

(1. Tianjin Agricultural Resource and Environment Institute, Tianjin 300192, China; 2. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** With the development of plant gene engineering, the genetic transformation of sorghum has converted from academic studies to applied studies. Sorghum tissue culture is viewed as a basic and important approach in sorghum genetic transformation. So, it is summarized the processes in recent years of the tissue culture and plant regeneration of sorghum.

**Key words:** sorghum; tissue culture; regeneration

组织培养是指在无菌条件下利用人工培养基对植物组织进行培养, 是生物工程研究的基础, 是进行遗传转化和植物改良研究的基本环节。对高粱组织进行培养及再生, 其目的在于让外植体能够高频率地诱导出愈伤组织, 建立高效的体细胞再生体系, 为高粱遗传转化和细胞工程研究创造有利条件。最早进行高粱组织培养研究的是 Strogonol B P<sup>[1]</sup>, 1968年, 他利用高粱根和分蘖节在培养基上附加1 mg/L 2, 4-D、1 mg/L KT、5 mg/L 泛酸钙和1 mg/L 抗坏血酸诱导出愈伤组织, 并与海蓬子、草木犀、甘蓝的愈伤组织进行了抗盐比较, 但是, 他并没有得到再生植株。Masteller等<sup>[2]</sup>以芽原基为外植体, 在附加2, 4-D 1~5 mg/L的MS培养基上诱导出愈伤组织, 并获得了再生植株, 这是通过组织培养获得高粱再生植株的最早报道。此后, 高粱组织培养工作不断进行。

### 1 胚培养

#### 1.1 未成熟胚的培养

高粱外植体的培养多以未成熟胚为材料进

行。国外, Gamborg等<sup>[3]</sup>、Thomas等<sup>[4]</sup>、Dunstan等<sup>[5]</sup>、Brettel等<sup>[6]</sup>、Ma等<sup>[7]</sup>、Lusardi和Lupotto<sup>[8]</sup>、Rao等<sup>[9]</sup>相继进行了以未成熟胚为外植体诱导出愈伤组织, 并分化获得再生植株的报道。Gamborg等选用一个杂交种, 在含有IAA的培养基上诱导出愈伤组织并获得了再生植株。Ma等采用20个高粱品种, 研究了各品种在形成愈伤及产生再生植株上的差异, 并分化出再生植株。Lusardi和Lupotto研究了不同品种在形成愈伤组织方面的差异。Rao等研究了不同浓度的天门冬酰胺(L-Asn)和脯氨酸(L-Pro)对胚性愈伤组织诱导、继代的影响。他们认为在MS培养基中(添加了2, 4-D)同时添加高浓度的L-Asn和L-Pro能促进愈伤组织的诱导和分化。Elkonin等<sup>[10]</sup>以未成熟胚为外植体, 在附加1~5 mg/L 2, 4-D的MS培养基上诱导出胚性愈伤组织; 在附加IAA 1 mg/L和KT 0.1 mg/L或NAA 0.1 mg/L和6-BAP 0.5 mg/L的培养基上分化、获得了再生植株; 并在N6培养基上附加高浓度的天门冬氨酸和脯氨酸, 也诱导形成了胚性愈伤组织。国内, 马鸿图等<sup>[11]</sup>对来自美国和

\* 收稿日期: 2006-05-22 修回日期: 2008-10-30

作者简介: 王立艳(1981-), 女, 黑龙江海伦人, 研究实习员, 硕士, 主要从事土壤改良和植物营养的检测与研究。E-mail: wangly2007@163.com.

通讯作者: 孙守钧(1961-), 男, 山东文登人, 教授, 博士, 主要从事植物生理、作物栽培及育种方面的教学与研究。E-mail: sunshoujun2001@yahoo.com.cn.

中国的20个基因型不同的高粱幼胚进行诱导培养, 结果用401-1品种的5个未成熟胚的小盾片愈伤组织分化获得了158株再生植株。郭建华等<sup>[12]</sup>以10个高粱品系和10个杂交种的未成熟胚小盾片为外植体进行愈伤组织的诱导、分化和再生, 并对其同工酶和品质进行了分析研究, 结果表明: 高粱未成熟胚的最适胚龄为授粉后的12~13 d, 长约1.0 mm; 再生植株后代中的蛋白质含量高于对照亲本, 单宁含量显著低于对照亲本。韩福光等<sup>[13]</sup><sup>[45]</sup>用25个品系和杂交种作为试材进行研究, 结果发现: 未成熟胚的诱愈率在无盐MS培养基中可达70.2%, 最适胚龄为授粉后的12~15 d; 同时认为2, 4-D的浓度是诱导愈伤组织的关键因素之一。白志良等<sup>[14]</sup><sup>[62]</sup>也对10个高粱品种不同外植体的愈伤组织进行了诱导培养和分化再生等方面的研究, 结果未成熟胚的出愈率为8%~74%, 分化率为26%~66%。实验结果还表明, 幼胚的出愈率主要受胚龄的影响, 一般胚龄小于1周的很难诱导成功, 胚龄大的则较易成功。

### 1.2 成熟胚培养

国内, 先后有韩福光等<sup>[13]</sup><sup>[44]</sup>、白志良等<sup>[14]</sup><sup>[61]</sup>、石太渊等<sup>[15]</sup><sup>[28]</sup>做过相关的研究。韩福光等报道了以高粱不同外植体在添加有不同浓度2, 4-D的MS培养基上所进行的愈伤组织的诱导培养, 并对8个不同基因型的高粱品种成熟胚的幼愈率进行了分析。白志良等也报道了对高粱不同外植体所进行的愈伤组织诱导和分化的研究, 结果表明, 成熟胚的诱愈率为59%~100%, 分化再生率最高为25%。相对于幼胚培养, 成熟胚取材比较方便, 但如消毒时间掌握不好, 污染会很严重。

国外对成熟胚培养的报道相对多一些。Bhaskaran<sup>[16]</sup>首次报道了高粱成熟胚愈伤组织的诱导培养。此外, 他还进行了耐盐和耐铝筛选培养的研究, 获得了再生植株, 并在1987年<sup>[17]</sup>报道了再生植株的体细胞克隆变异研究。此后Hagio等<sup>[18]</sup>、Murty等<sup>[19]</sup><sup>[127]</sup>也利用成熟胚小盾片产生的愈伤组织分化出了再生植株。Cai等<sup>[20]</sup>报道了以高粱成熟胚的芽端为外植体, 在添加L-Asn 150 mg/L、KT 5 mg/L和调整5种无机盐的MS培养基上诱导出愈伤组织, 并分化出再生植株的研究。Bhat等<sup>[21]</sup><sup>[127]</sup>报道了高粱不同外植体的诱导培养研究。其中, 成熟胚培养的诱愈率为41.6%。

## 2 幼叶培养

已报道的用于幼叶培养的培养基都是MS培养基。wernicke等<sup>[22]</sup>用生长10 d的幼苗幼叶为外植体, 在MS培养基上, 培养5周后得到愈伤组织, 并分化出再生植株。Sairam等<sup>[23]</sup>以8个基因型不同的高粱品种为材料, 将培养18 d后的无菌苗的第六片幼叶的叶肉细胞为外植体, 在附加2, 4-D和NAA的KM8培养基上进行液体培养, 形成了愈伤组织, 将其在MS固体培养基上进行分化试验, 其中仅296B和IS32266两个品种能分化到再生植株。韩福光等<sup>[13]</sup><sup>[47]</sup>报道了以幼叶(将近生长点0.1~1.0 cm的幼叶切成1~2 mm段)为外植体进行培养, 在附加1%NaCl的MS培养基上的诱愈率明显少于在未加NaCl的MS培养基上所获得的愈伤组织数。在含盐培养基上, 品种间诱愈率的差别也较大。

## 3 茎尖培养

在白志良等<sup>[14]</sup><sup>[63]</sup>的研究报道中, 以茎尖(长0.5 cm、包括生长点在内的切段)为外植体的诱导试验中, 其出愈率为11%~100%, 分化率为0~23%。白志良等还指出茎尖培养主要受无菌芽长的影响, 当芽长小于2 cm时, 所截取茎尖的培养效果最好。在Nahdi等<sup>[24]</sup>的报道中, 11个高粱品种的茎尖再生频率为0~91%, 不同基因型间的差别较大, 这说明基因型对高粱茎尖的再生有非常重要的影响。Seetharama等<sup>[25]</sup>以3个高粱品种的茎尖为外植体进行诱导培养, 获得了再生植株, 再生率均在14%以上, 其中296B和M35-1的再生率达(18.0±0.5)%。

## 4 幼穗培养

Brettel等<sup>[26]</sup>首次报道了这方面的研究工作。此后Murty<sup>[19]</sup><sup>[13]</sup>等、George等<sup>[27]</sup>、Cai等<sup>[28]</sup>、Bhat等<sup>[21]</sup><sup>[129]</sup>和Kaeppeler等<sup>[29]</sup>相继报道了以幼穗为外植体进行愈伤组织诱导和再生的研究工作, 也都得到了类似的结论。即: 幼穗愈伤组织的诱导率高、生长速度快, 都可获得再生植株。国内, 卫志明等<sup>[30]</sup>、韩福光等<sup>[13]</sup><sup>[48]</sup>、白志良等<sup>[14]</sup><sup>[63]</sup>、石太渊等<sup>[15]</sup><sup>[28]</sup>也做了这方面的研究, 得到了类似的结果。其中, 韩福光等对不同外植体进行了培养研究, 发现幼穗愈伤组织的诱导率平均值最高, 为88.0%, 其中8份试材的幼穗诱愈率为100.0%。白志良等在附加有2, 4-D和KT的MS培养基上诱导出愈伤组织, 其中, 幼穗的出愈率可达到100.0%。因此, 他认

为幼穗是最理想的外植体,幼穗的取材时期也是诱导愈伤组织的关键因素之一。

## 5 花药培养

Rose等<sup>[31]</sup>对高粱花药的培养条件、前处理温度等进行了研究,但最后只得到几株白化苗。Wen等<sup>[32]</sup>的花药培养获得了再生植株;当他对再生植株根尖细胞的染色体进行检查后发现,染色体分别为10、15、20、40和60,但只有 $2n=20$ 的再生植株能得到成熟种子。韩福光等<sup>[13]48</sup>报道了花药培养的研究结果。2份材料分别接种在MS和C17培养基上,另2份接在不同的MS培养基上。但只有89-6396在MS培养基上能得到愈伤组织,诱导率为0.63%,并获得8株绿苗,但未成株。其它3份试材无论是在MS或C17培养基上都未出现愈伤组织。可见基因型和培养基都能影响愈伤组织的诱导。

## 6 种子培养

Manjula等<sup>[33]</sup>用添加2,4-D的MS培养基进行培养,结果发现:M35-1和A-1的愈伤诱导率分别为90%和83.3%;当培养基中蔗糖含量达到60 g/L时,M35-1的分化效果和再生根的效果更好。刘明等<sup>[34]</sup>以突变高粱种子为材料,在添加不同浓度的2,4-D和KT的MS培养基上进行了愈伤组织的诱导,并得到了较高的诱导率。白志良等<sup>[15]29</sup>以不同外植体进行愈伤组织的诱导培养,结果表明,以种子为外植体的诱愈率为28%~93%,但他未能获得再生植株。

## 7 小结

高粱愈伤组织的诱导和再生受到许多因素的影响。不同基因型间、不同外植体间的诱导和再生存在着差异;高粱幼胚是理想的外植体,但幼胚的取材有季限制;培养基中添加的外源激素、氨基酸,以及适宜的培养条件也是影响高粱愈伤组织诱导与再生的重要因素。因此,高粱高效的组织培养再生系统还有待于进一步的研究。

### 参考文献:

[1] 韩福,张颖.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.  
 [2] Masteller V J, Holden D J. The growth and organ formation from callus tissue of sorghum[J]. *Plant Physiol*, 1970(45):362-364.  
 [3] Gamhorg O L, Shyluk J P, Brar D S, et al. Morphogenes

and plant regeneration from callus of immature embryos of sorghum[J]. *Plant Sci Lett*, 1977(10):67-74.  
 [4] Dunstan D I, Short K C, Thomas E. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*[J]. *Protoplasma*, 1978, 97: 251-260.  
 [5] Dunstan D I, Short K C, Dhaliwal H, et al. Further studies on plantlet production from cultured tissues of *Sorghum bicolor*[J]. *Protoplasma*, 1979, 101: 355-361.  
 [6] Brettell R I, Wernicke W, Thomas E. Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicolor*[J]. *Protoplasma*, 1980, 104: 141-148.  
 [7] Ma H, Gu M, Liang G H. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) [J]. *Moench Theor Appl Genet*, 1987, 73: 389-394.  
 [8] Lusardi M C, Lupotto E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum* species[J]. *Maydica*, 1990, 35: 59-66.  
 [9] Rao A M, Sree K P, Kishor P B K. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime[J]. *Plant Cell Rep*, 1995, 15: 72-75.  
 [10] Elkonin L A, Lopushanskaya R F, Pakhomova N V. Initiation and maintenance of friable, embryogenic callus of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by amino acids[J]. *Maydica*, 1995, 40: 153-157.  
 [11] 马鸿图.高粱幼胚培养及再生植株变异的研究[J].遗传学报,1985,12(5):350-357.  
 [12] 郭建华.高粱幼胚小盾片愈伤组织的诱导及其再生植株性状的变异分析[J].辽宁农业科学,1989(3):7-14.  
 [13] 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.  
 [14] 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.  
 [15] 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.  
 [16] Bhaskaran S, Schertz K, Smith R H. Control of morphogenesis in sorghum by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and cytokinins[J]. *Plant Physiology*, 1983, 72 (Supplement): 142-143.  
 [17] Bhaskaran S, Smith R H, Paliwal S, et al. Somaclonal variation from *Sorghum bicolor* (L.) Moench cell culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987(9):189-196.  
 [18] Hagio T. Varietal difference of plant regeneration from callus of sorghum mature seed[J]. *Sorghum Newsletter*, 1987, 30: 92-97.

- [19] Murty U R. Developing tissue culture system for sorghum[J]. *Sorghum Newsletter*, 1987, 30: 12—13.
- [20] Cai Tishu, Barbara Daly, Larry Butler. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghum[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987 (9): 245—252.
- [21] Bhat S, Kuruvinashetti M S. Plant regeneration from tissue cultures of cytoplasmic genetic male-sterility maintainer lines of sorghum (*Sorghum bicolor*) [J]. *India Journal of Agricultural Sciences*, 1995, 65(20): 27—129.
- [22] Wernicke W, Potrykus I, Thomas E. Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*-The morphogenetic pathways[J]. *Protoplasma*, 1982, 111: 53—62.
- [23] Sairam RV, Seetharama N, Devi P S A, et al. Culture and regeneration of mesophyll-derived protoplasts of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench][J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 972—977.
- [24] Nahdi S, Wet J M J. In vitro regeneration of *Sorghum bicolor* Lines from shoot apices[J]. *Int Sorghum & Millets Newsletter*, 1995, 36: 88—90.
- [25] Seetharama R V, Sairam, Rani T S. Regeneration of sorghum from shoot tip cultures and field performance of the progeny[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 61: 169—173.
- [26] Brettell R L S, Emcke W, Thomas E. Embryogenesis from cultured immatures inflorescences of *Sorghum bicolor*[J]. *Protoplasma*, 1980 (104): 141—148.
- [27] George L, Eapen S. Plant regeneration by somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of *Sorghum almum*[J]. *Ann Bot*, 1988, 61: 589—561.
- [28] Cai T, Butler. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums[J]. *Plant Cell Tiss, Org Cult*, 1990, 20: 101—110.
- [29] Kaeppeler H F, Pedersen J F. Evaluation of 41 elite and exotic inbred sorghum genotypes for high quality callus production[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 48: 71—75.
- [30] 卫志明, 许智宏. 高粱原生质体培养再生植株[J]. *植物生理学通报*, 1989 (6): 45—46.
- [31] Rose J B. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescence of several high-tannin sorghum[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1986 (6): 16—22.
- [32] Wen F S. Callus induction and plant regeneration from another and inflorescence culture of Sorghum[J]. *Euphytica*, 1991, 52: 177—181.
- [33] Manjula S, Maralappanavar M S, Kuruvinashetti, et al. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. *Euphytica*, 2000, 115: 173—180.
- [34] 刘明, 赵琦. 诱导突变高粱愈伤组织初探[J]. *生物技术通报*, 2004, 4: 47—52.

(上接第47页)

- stimulates carbon dioxide formulation in isolated rat hepatocytes[J]. *J Lipid Res*, 1987, 28 (2): 152—161.
- [4] Oseno Y, Hirose N, Nakajima K, et al. The effect of pantethine on fatty liver and fat distribution[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2000, 7 (1): 55—58.
- [5] Arsenio L, Boddria P, Mngnati G, et al. Effectiveness of long-term treatment with pantethine in patients with dyslipidemia [J]. *Clin Ther*, 1986, 8 (5): 537—545.
- [6] Prisco D, Rogasi P G, Matucci M, et al. Effect of oral treatment with pantethine on platelet and plasma phospholipid in IIA hyperlipoproteinemia[J]. *Angiology*, 1987, 38 (3): 241—247.
- [7] Eto M, Watanabe K, Chonan N, et al. Lowering effect of pantethine on plasma beta-thromboglobulin and lipids in diabetes mellitus[J]. *Artery*, 1987, 15 (1): 1—12.
- [8] Coronel F, Tomero F, Tormnte J, et al. Treatment of hyperlipimia in diabetic patients on dialysis with a physiological substance[J]. *Am Nephrol*, 1991, 11 (1): 32—36.
- [9] Murai A, Miyallara T, Tanaka T, et al. The effect of pantethine on lipid and lipoprotein abnormalities in survivors of cerebral infarction[J]. *Artery*, 1985, 12(4): 234—243.
- [10] Binaghi P, Cellina G, Locicero G, et al. Evaluation of the cholesterol-lowering effectiveness of pantethine in women in perimenopausal age[J]. *Minerva Med*, 1990, 81 (6): 475—479.
- [11] 丁兆坤, 许友卿, 黄溢明. 采用产氨短杆菌合成辅酶A的研究[J]. *微生物学报*, 1993, 33 (1): 32—39.