

# 高粱液体再生系统初步研究

王良群<sup>1,2</sup>, 刘勇<sup>1</sup>, 郝艳芳<sup>1,2</sup>, 张微<sup>1,2</sup>, 杨伟<sup>1</sup>, 白鸿雁<sup>1</sup>, 武攀<sup>1</sup>

(1. 山西省农业科学院高粱研究所, 山西晋中 030600; 2. 高粱遗传与种质创新山西省重点实验室, 山西晋中 030600)

**摘要** 选用幼穗为外植体并进行匀浆, 将匀浆物进行振荡培养, 获得颗粒状培养物。再把这些颗粒状培养物接入到液体分化培养基中, 振荡培养后有些颗粒会萌发出新芽, 然后把这些已长出芽的培养物接入到固体分化培养基中可获得完整的苗。研究还将幼穗固体培养模式获取的愈伤组织接入到液体分化培养基中进行振荡培养, 结果获取了相互分离能生根发芽的胚状体。该研究丰富了高粱再生培养技术手段。

**关键词** 高粱; 液体再生系统; 静止培养; 振荡培养

**中图分类号** S514 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)22-0034-02

## Preliminary Study on Sorghum Liquid Regeneration System

WANG Liang-qun<sup>1,2</sup>, LIU Yong<sup>1</sup>, HAO Yan-fang<sup>1,2</sup> et al (1. Sorghum Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong, Shanxi 030600; 2. Shanxi Key Laboratory of Sorghum Genetic and Germplasm Innovation, Jinzhong, Shanxi 030600)

**Abstract** The immature inflorescences was used as explant and homogenized. The homogenate was cultured with shaking. The granular callus-like culture was obtained and accessed into liquid differentiation edium. After further culturing, germination of sprouts will occur on some granules and then these geminated granules were added into solid regeneration culture medium. Lastly, complete seedlings can be obtained. In the study, the callus of the immature inflorescences was cultured in the liquid differentiation medium. As a result, the embryoid bodies isolated from each other were obtained. The sorghum liquid regeneration culture was explored to enrich the sorghum tissue culture technology.

**Key words** Sorghum; Liquid regeneration system; Static culture; Shaking culture

植物组培是一项重要的基础生物技术, 被广泛应用于工农业生产和科学技术研究等诸多行业领域。植物组培涵盖许多内容, 其中组培再生系统的建立是重要的研究内容之一。由于组培再生技术对作物转基因研究应用非常重要, 所以随着转基因技术快速发展, 建立有效的不同作物的组培再生系统显得越来越重要。

高粱是全球第五大农作物, 具有食用、饲用和酿造用等多种用途。但是与玉米等作物相比, 高粱生产水平和育种水平都相对落后。造成高粱生物技术育种落后的原因很多, 高粱组培再分化难从而限制高粱组培转基因研究应用是其重要原因之一<sup>[1-2]</sup>。高粱属于较早开展离体培养技术研究的作物之一, 早在 1968 年, 就有研究者利用高粱根和分蘖节在添加 2,4-D 和 KT 的 MS 培养基上诱导出高粱愈伤组织。1970 年, Masteller 等<sup>[3]</sup>、Brettell 等<sup>[4]</sup> 以高粱芽原基为外植体进行了愈伤组织培养, 并分化产生了再生苗。之后的多年里, 国内外研究者以幼穗、幼胚、茎尖等多种器官组织为外植体进行了广泛的研究。目前, 已能将幼穗、幼胚、茎尖、幼叶、成熟胚等多种外植体诱导培养出愈伤组织, 且诱导率较高, 在 70% 以上。至于再生苗分化培养, 不同外植体差异较大, 其中幼穗和幼胚分化率较高, 其他外植体愈伤则再生出苗困难, 分化率很低<sup>[5-7]</sup>。

高粱组培固体再生系统的基本流程是选取某一种外植体, 消毒后接种于固体培养基上, 28 d 左右诱导出愈伤组织, 然后转接到新固体培养基上进行 21~35 d 的继代培养, 最后转入固体培养基进行再生苗分化培养。目前高粱组培再生

普遍采用这种单一化的固体培养基再生培养模式。为了克服高粱分化难这一公认的难题, 丰富高粱再生培养技术手段, 近年来尝试采用高粱液体培养技术来研究高粱组培分化培养。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 试验材料为高粱恢复系忻七、3642、三尺三等。

**1.2 幼穗等外植体取材方法** 该研究所用的外植体为幼穗、茎尖、成熟胚和籽粒。幼穗取材时, 先从田间选取其幼穗长为 1~3 cm 的植株, 再分 3 次剥出。第 1 次剥离在一般条件下进行, 不露出幼穗, 仍保留多层叶片。第 2 次在无菌条件下剥离, 减少包埋叶片, 最后用刀具剥出幼穗; 制备茎尖时, 先将无菌种子进行发芽, 待芽长达 0.5 cm, 叶片展开前, 即可进行茎尖截取, 在无菌培养皿上把生长点或者分生区两端切去, 剩余的包括生长点在内 0.3~0.5 cm 长的切断可用作外植体进行接种。其中成熟胚是从消毒后浸泡 12 h 左右的籽粒中剥取的。从发育好、发芽率高的种子中挑选出饱满的种子, 灭菌后即可直接作为外植体。

**1.3 培养基选用** 基本培养基为 MS, 蔗糖为 3%, pH 为 5.8~6.0。愈伤常规诱导培养基附加的激素成分及用量主要为 2,4-D 3 mg/L、KT 0.5 mg/L, 继代培养基附加相同种类的激素, 但含量低, 一般 2,4-D 为 1~2 mg/L、KT 为 0.1~0.5 mg/L, 分化培养基去除 2,4-D, 仅用 0.5 mg/L 的 KT。当培养基为常规固体时, 加入 0.8% 的琼脂, 不加琼脂则为液体培养基。该研究选用的几种液体培养基为 Y<sub>1</sub>(2,4-D 1 mg、KT 0.5 mg)、Y<sub>2</sub>(2,4-D 3 mg、KT 0.5 mg)、Y<sub>3</sub>(KT 0.5 mg)。

**1.4 静止与振荡液培方法及光温条件** 液体培养分静止培养和振荡培养, 静止培养就是把已接种的液体培养瓶放置在培养室的固定培养架上; 振荡培养是把培养瓶置于摇床上, 转速为 100~150 r/min。该研究中, 静止培养仅用于与振荡

**基金项目** 山西省科技厅攻关项目“高粱组培育种技术在矮秆高产品种选育中的应用”(20150311003-2)。

**作者简介** 王良群(1959—), 男, 山西闻喜人, 研究员, 从事高粱新技术育种研究。

**收稿日期** 2017-05-24

培养的比较试验,其余培养均为振荡培养。培养主要在安装空调的培养室进行,温度在 22~25℃。高粱再生苗分化培养人工辅助光照强度为 2 000 lx,时间为 12 h,愈伤诱导和继代培养在自然光照条件下就可以。

**1.5 幼穗匀浆物液培方法** 匀浆培养法是把幼穗等外植体进行匀浆,匀浆时加入 2~3 mL 液体培养基,然后直接加入 Y<sub>2</sub> 液体培养基中进行振荡培养。培养 10 d 后,如果培养物直径达 3 mm,可直接将培养物接入液体分化培养基 Y<sub>3</sub> 中。如果培养物直径未达 3 mm,则需将培养物接入到 Y<sub>1</sub> 或 Y<sub>2</sub> 中继续培养,直到培养物直径达 3 mm 再接入到 Y<sub>3</sub> 中培养,当培养物在 Y<sub>3</sub> 中发芽后可转接到固体分化培养基中进行培养获取完整组培苗。

**1.6 幼穗愈伤组织常规诱导培养与液体分化培养** 愈伤组织常规培养方法是将选用的外植体接种到固体培养基上,经过 28 d 左右的培养,即可诱导生成愈伤组织。愈伤组织液体分化培养是把固体培养获取的愈伤组织接入到 Y<sub>3</sub> 液体培养基中进行振荡培养。

## 2 结果与分析

**2.1 幼穗、茎尖等外植体匀浆物液培** 该研究选用高粱幼穗和茎尖进行了匀浆物液培再生系统研究,结果表明茎尖相关研究无法达到预期的结果,而幼穗匀浆物液培结果超出预期。

幼穗匀浆液培研究分别选用恢复系忻七和 3642 进行试验。其中忻七幼穗匀浆物培养 10 d 后,培养物直径未达 3 mm,可能是由于匀浆力度过大导致匀浆物太细小,因而倒出上清液留下沉淀物,加入新鲜起始培养液继续培养,再培养 10 d 后仍发现培养物不够大,用同样的方法换培养液 Y<sub>1</sub> 进行继代培养,继续培养 10 d 后,培养物直径达 3 mm,这时把沉淀物接入到含有 25 mL 液体分化培养基 Y<sub>3</sub> 三角瓶中,在摇床上振荡培养,7 d 后发现有些颗粒已萌发出新芽,然后将这些已长出芽的培养物接入到固体分化培养基中置于固定不动的培养架上培养,15 d 后可获得完整的苗。

高粱恢复系 3642 培养 10 d 后培养物都比较大,直径在 3 mm 以上,不需要继代培养。培养 13 d 后,直接把粒状培养物接入到 25 mL 液体分化培养基中,在摇床上振荡培养,10 d 后发现有些颗粒已萌发出新芽,把这些已长出芽的培养物接入到固体分化培养基中置于培养架上培养,15 d 后可获得完整的苗。

**2.2 幼穗、茎尖等愈伤组织液培** 选用高粱恢复系三尺三的幼穗和茎尖进行愈伤常规培养,2 种外植体都容易诱导产生愈伤组织,但二者愈伤胚性相差很大。固体常规分化培养时,茎尖愈伤很难分化产生再生苗。将茎尖愈伤接入到液体分化培养基后,只能产生许多丝状体或根状体,很难观察到发芽现象,且愈伤组织会逐渐变黑。幼穗愈伤组织胚性很好,固体分化培养效果好,容易获得再生苗,将胚性状况好的幼穗愈伤组织接入到液体分化培养基中,经过 10 余天的培养,会形成许多相互分离的有芽有根的独立结构,这也就是萌发了的胚状体。把这些发了芽具有胚状体结构的培养物

接种到固体培养基中也可得到完整的组培苗。说明幼穗愈伤是通过胚状体途径产生再生苗的,这一现象在常规培养中是看不到的。

**2.3 茎尖、籽粒、成熟胚等外植体液体静止培养与振荡培养** 选用高粱恢复系三尺三的茎尖、成熟胚和籽粒 3 种外植体进行液体静止培养与振荡培养比较试验,结果表明培养 28 d 后,籽粒在静止培养条件下,萌发率为 8%,振荡培养条件下萌发率为 80%,这和种子实际发芽率基本一致,说明静止培养对籽粒萌发有很强的抑制作用。静止培养的籽粒芽长为 0.7 cm,而振荡培养的籽粒芽长为 4.0 cm。另外振荡培养的籽粒能生成愈伤组织,液体中能观察到大量细胞和细胞团,而静止培养细胞较少(表 1)。在对籽粒进行直接液体振荡培养时,还观察到 1 粒种子出 8 个苗的现象。

表 1 静止培养和振荡培养下籽粒萌发比较

Table 1 Comparison of seed germination under static culture and shaking culture

培养方式 Culture methods	萌发率 Germination rate//%	芽长 Bud length cm	游离细胞 Free cells
静止培养 Static culture	8	0.7	少
振荡培养 Shaking culture	80	4.0	多

静止培养的成熟胚萌发生成不超过 0.7 cm 长的芽,并生成乳白色愈伤,能观察到少量细胞,振荡培养的胚芽长为 1.5 cm,其愈伤为黑褐色(表 2),原因可能是振荡培养时,生长快,分泌色素多,培养物衰老快。静止培养的茎尖形成的茎叶长度为 4 cm 左右,茎基部可观察到愈伤,液体透明,可观察到数量很少的细胞,振荡培养的茎尖则褐化死亡。

表 2 静止培养和振荡培养下成熟胚比较

Table 2 Comparison of mature embryo under static culture and shaking culture

培养方式 Culture methods	芽长 Bud length cm	愈伤色泽 Color of callus	游离细胞 Free cells
静止培养 Static culture	0.7	乳白色	圆形、小
振荡培养 Shaking culture	1.5	黑褐色	不规则形、大

## 3 结论与讨论

在高粱几种常用外植体中,幼穗是最适宜用于匀浆液培的,其他几种外植体不太适合。该研究结果表明,当采用同一试材时,匀浆力度大小、匀浆物粗细对培养结果(继代培养次数和时间长短)有明显的影 响。与常规固体愈伤分化模式相比,外植体匀浆液培有 2 个优点:①培养周期明显缩短。当高粱材料 3642 匀浆物粗细合适时,只用 30 余天就得到了完整的组培苗,而常规固体愈伤再生系统一般需要 60 d 以上;②外植体匀浆液培系统是一种全新的再生模式,可以用于植物转基因研究中,为植物遗传转化提供一种新的试验系统,特别是在高粱被公认为分化难的情况下,多一种再生系统选择,对高粱转基因研究具有重要的意义。幼穗匀浆液

**2.3 呼吸商** 试验结果表明,幼虫期不同日龄的呼吸商差异显著(图3),2日龄最大为0.888 5,3日龄最小为0.822 6,其他日龄的大小依次为5日龄、1日龄、6日龄、4日龄。蛹期的呼吸商随着蛹期的增加逐渐减少。

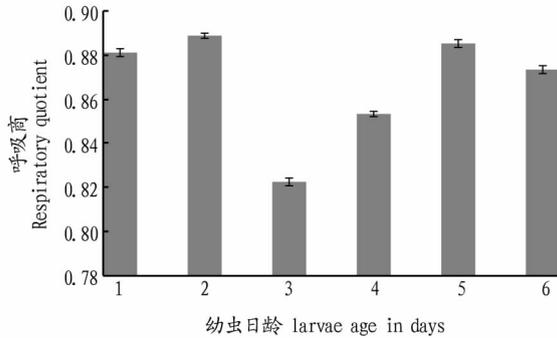


图3 桔小实蝇幼虫的呼吸商

Fig.3 Respiratory quotient of *Bactrocera dorsalis* larvae

### 3 结论与讨论

一切生命活动都要消耗能量,植食性昆虫生命活动所需的能量主要来源于寄主植物,不同龄期由于消耗的能量不同所摄取食物的量也有所差异,因此,在评价昆虫整个种群的能量消耗时,要考虑到不同龄期之间的差异。桔小实蝇的幼虫分3个龄期,1~2龄幼虫在果实内生活且不会弹跳,3龄老熟幼虫会从果实中弹跳到土表,寻找适当地点化蛹,其跳跃距离在15~25 cm,高度在10~15 cm,并可连续跳跃多次。由于不同龄期幼虫的生长量和活动性不同,这有可能影响到它的呼吸代谢。该研究发现各龄期间呼吸代谢差异与其生活特征和活动性存在对应关系。

呼吸商反映呼吸底物的利用情况,动物纯粹利用碳水化

合物或者脂肪作为底物时的呼吸商分别为1.0和0.7<sup>[5-6]</sup>。桔小实蝇幼虫的呼吸商平均为0.87,表明其利用的呼吸基质主要是碳水化合物,这同其他昆虫在植食性阶段的代谢规律是一致的<sup>[7-8]</sup>。

在较低的氧浓度条件下,密闭昆虫一段时间才对昆虫有致死作用,并随着密闭时间的延长,昆虫的死亡率增加,而昆虫的耐缺氧能力与其呼吸代谢水平有直接关系<sup>[9]</sup>。因此,该研究结果也可为实蝇的薰蒸和气调处理提供参考<sup>[10-11]</sup>。

### 参考文献

- [1] KEISTER M, BUCK J. Respiration; Some exogenous and endogenous effects on rate of respiration[J]. *The physiology of insecta*, 1964, 3: 617-658.
- [2] 祖元刚. 能量生态学引论[M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1990.
- [3] 林进添, 曾玲, 陆永跃, 等. 桔小实蝇的生物学特性及防治研究进展[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2004, 17(1): 60-67.
- [4] BRODY S. *Bioenergetics and Growth*[M]. New York: Reinhold Publishing Corp, 1945.
- [5] SOUTHWOOD T S. *Ecological methods with particular reference to the study of insect populations*[M]. Springer: Springer-Verlag, 1978.
- [6] 刘惠霞, 张克斌, 杨峰. 利用简易方法测定大型昆虫呼吸商的研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 1986, 14(2): 117-122.
- [7] 王冬梅, 李娟, 李爽, 等. 温度对意大利蝗呼吸代谢的影响[J]. *昆虫学报*, 2014, 57(3): 373-378.
- [8] 钱雪, 窦洁, 王冬梅, 等. 西伯利亚蝗气门结构及呼吸代谢对高温胁迫的响应[J]. *应用昆虫学报*, 2016, 53(4): 837-842.
- [9] DONAHAY E J, NAVARRO S, RINDNER M, et al. The combined influence of temperature and modified atmospheres on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. *Journal of stored products research*, 1996, 32(3): 225-232.
- [10] ARMSTRONG J W, WHITEHAND L C. Effects of methyl bromide concentration, fumigation time, and fumigation temperature on Mediterranean and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) egg and larval survival [J]. *Journal of economic entomology*, 2005, 98(4): 1116-1125.
- [11] KOYAMA J, KAKINOHANA H, MIYATAKE T. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan; Importance of behavior, ecology, genetics, and evolution [J]. *Annual reviews in entomology*, 2004, 49(1): 331-349.

(上接第35页)

培再生系统完全不同于传统固体愈伤培养模式,该研究只是初步的探索,需要对其影响因素进行更多的研究分析,建立更加完善的技术体系。

高粱常规愈伤再生系统研究结果表明,幼穗是分化培养最适宜的外植体,其愈伤组培的胚性最好,愈伤液培结果也证明了这一点,当把幼穗、茎尖等外植体的愈伤组织块进行液体分化培养时,只有幼穗愈伤会产生相互分离的胚状体结构。该结果说明高粱幼穗愈伤分化出苗主要是通过胚状体的途径,其意义在于这种愈伤液培方式可以用于转基因技术研究中。

由于液培时培养物完全浸没在培养基里,不像固体培养时培养物与培养基只是局部接触,所以会产生不同于常规固体培养时的效果,甚至出现意想不到的结果,可见液体培养是一种很有价值的离体培养手段。此外,通过静止与振荡液培比较试验,可以看出振荡对许多液培来说是非常必要的,

振荡可以加快培养物的生长。

### 参考文献

- [1] ZHU H, MUTHUKRISHNAN S, KRISHNAVENI S S, et al. Biolistic transformation of sorghum using a rice chitinase gene [J]. *J Genet Breed*, 1998, 52: 243-252.
- [2] 朱莉, 郎志宏, 李桂英, 等. 农杆菌介导甜高粱转 Bt *cry1Aa* 的研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(10): 1989-1996.
- [3] MASTELLER V J, HOLDEN D J. The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum [J]. *Plant Physiol*, 1970, 45(3): 362-364.
- [4] BRETTELL R I S, WERNICKE W, THOMAS E. Embryogenesis from cultured immature inflorescences of *Sorghum bicol* [J]. *Protoplast*, 1980, 104(1/2): 141-148.
- [5] JOGESWAR G, RANADHEER D, ANJALIAH V, et al. High frequency somatic embryogenesis and regeneration in different genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench from immature inflorescence explants [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2007, 43(2): 159-166.
- [6] 白志良, 王良群, 郑雨萍, 等. 高粱不同外植体离体培养 [J]. *华北农学报*, 1995, 10(1): 60-63.
- [7] 王良群, 白志良, 李爱军, 等. 影响高粱体细胞无性系发生几个因素分析 [J]. *山西农业科学*, 1995, 23(2): 34-37.