

高粱蔗体细胞无性系的建立及再生植株的后代表现*

母秋华 田惠香 张殿荣

(吉林市农业科学研究所)

粮糖兼用高粱是一种经济价值很高的作物。它不仅具有制糖、制酒、制醋、青饲、造纸等综合利用的价值,而且是一种具有极大潜在能源的作物。因此,引起了各国科学工作者的重视。1973年我国科技工作者以高粱为母本,以甘蔗为父本杂交育成了新型粮糖兼用作物—高粱蔗。它具有甜高粱的优点。通过很多地区试种表明,高粱蔗适应性广,抗逆性强,具有杂交优势,但后代不易稳定。如果将高粱蔗的杂种后代通过体细胞培养,建立起无性繁殖系,再通过体细胞的变异,从大量再生绿苗里快速筛选出稳定的新品系,这是所有遗传育种工作者的共同愿望。但迄今未见成功的报道。

我们从1980年,开始从事高粱蔗茎尖培养工作,当年获得较多的愈伤组织和再生绿苗〔2〕。1981年建立起一个可多次继代繁殖、能大量再生绿苗的无性繁殖系。几年来对无性系的培养技术及后代表现做了系统的研究。

材 料 和 方 法

一、材料来源

高粱蔗是1973年广东甘蔗糖业研究所海南甘蔗育种场的科技工作者以高粱(遗杂10号)和甘蔗(粤糖55/89)做亲本,通过有性杂交选育而成的。1980年春由本所高粱组间接提供的高粱蔗—甜研一号的种子。

二、试验方法

(一)取材及消毒:1980年春将高粱蔗的种子播种在温室苗床上,待长出7~8片叶时,将高粱蔗幼苗连根拔苗,用自来水冲洗,并去掉叶片与根际,表面用75%酒精消毒。然后削去外部叶片。取5厘米长的带有茎尖的基段,放到0.1%升汞溶液中灭菌15分钟,再用无菌水冲洗3~4次,在无菌条件下取其茎尖接种在固体培养基上。待愈伤组织形成以后,每隔4周转移一次,诱导无性系的发生。

(二)培养基:(1)诱导愈伤组织的培养基为“正12”等〔2〕。附加物质有2,4—

* 本文曾蒙马国辅研究员(吉林市科所)、郑万珍副研究员(中国科学院遗传所)校阅;刘志东协助摄影,于树清协助统计;周雅言(东北师大)、母文玉(省情报所)、肖永湖(吉林省农科院)、隋文彬副教授(吉林农大)、陆振祥(中国农科院)、本室及高粱组全体同志协助工作,一并致谢。

D 2 毫克/毫升(单位下同), 6BA1, KT1, 水解乳蛋白(HL)500, 蔗糖(Su) 6%。

(2) 诱导无性系形成的继代培养基为8114(KNO_3 1800, NH_4NO_3 1500, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 350, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150, KH_2PO_4 450, 甘氨酸2, 微量元素及有机酸同B₅)。附加物有2,4-D 0.2, 6BA1.5, NAA 0.5, 水解酪蛋白(GH)500。

(三) 分化培养基8112(KNO_3 1500, NH_4NO_3 1500, MgSO_4 400)其他成份除去掉2,4-D外, 完全与8114相同。

三、田间试验

试验设计为顺序排列, 1~3次重复。小区行长5米, 1~2行区, 行株距为60×20厘米。田间管理同一般大田。按物候期观察记载生育状况, 收获后对主要经济性状进行考查与测产, 用折光仪测定其含糖量。所得数据进行整理和分析。

试验结果与分析

一、高粱蔗茎尖体细胞无性系的建立

高粱蔗的茎尖, 接种在诱导培养基上以后, 在28℃的条件下, 2周后一部分茎尖可以直接长出叶片与根系。另一部分培养6周后开始形成愈伤组织。这些愈伤组织经继代培养虽然大都可分化出绿苗, 但不能继代培养, 且在愈伤组织及绿苗根际产生了一种红色的(多元酚类)有毒物质。为了解决这一问题, 我们将愈伤组织进行了多次转移, 并进行了培养与附加物质的筛选。结果这些愈伤组织转移三次以后, 发现其中的一块愈伤组织生长旺盛, 增殖很快, 表面布满绿色的芽状突起。为扩大繁殖, 将这一愈伤组织切割成数块, 然后分别转移到N6、MS、正12等几种不同的培养基上继代培养。经三周后, 在正12培养基上产生了大量能增殖的细胞群, 从而实现了继代繁殖。一年半后, 建立起一个来源于高粱蔗茎尖的并可大量再生绿苗的无性繁殖系〔图版2、5〕。

二、继代培养基与分化培养基的筛选

据观察, 高粱蔗茎尖无性系是由愈伤化的芽原基组成的细胞团(简称愈伤组织), 对培养基成分及激素的种类、活性碳等的反应十分敏感。为此, 我们在对该无性系的继代培养及分化的试验过程中研究了20种培养基, 60多种配方。并且对三种大量无机盐(KNO_3 、 NH_4NO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)进行了三种因素二个水平($L_4 2^3$)的正交试验。通过20多次的反复试验证明: ①这三种大量无机盐的用量及合理搭配对愈伤组织的分化与增殖有一定影响。在 NH_4NO_3 相同的条件下(1500mg/l), 提高 KNO_3 的含量(1800mg/l)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 稍低(350mg/l)有利于愈伤组织增殖。如8114培养基, 在28℃条件下, 五周转移一次, 每次可以增殖8倍〔图版1—1〕, 一年的增殖倍数可达 8^{10} ; 降低 KNO_3 的含量(1500mg/l), 提高 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的含量(400mg/l), 有利于绿苗的分化。如8112培养基, 对愈伤组织的分化效果很好, 愈伤组织转移到该培养基上均可大量再生绿苗〔图版1—2〕。据统计, 平均每瓶(50ml)可分化绿苗50~70株; ②在上述培养基中添加6BA2、NAA0.2, 可促进芽体的快速生长及发育; 添加2,4-D, 可以抑制芽的分化, 有利于愈伤组织的增殖。③活性碳可以吸附愈伤组织的有毒分泌物, 同时, 有利于幼苗的生长与发育。详见表1。

表 1 不同培养基及附加物质对高粱蔗无性系增殖与分化的影响

培 养 基	愈伤组织	再生绿苗数	绿苗平均高度	根系发育情况
	增殖倍数	苗/瓶	(厘米)	
8114+2.4-D2+6 BAI+NAA0.5	8	绿芽少量	0.2以下	无 根
8112+6 BA 2+NAA0.2+C0.5%	3	80	4.0	大量而粗壮
MS+6 BA 2+NAA0.2+C0.5	2	40	4.0	大量而粗壮

注：每个处理10瓶，培养温度28℃，培养5周后统计。

三、高粱蔗无性系继代培养次数对绿苗再生率的影响

国内外许多研究者指明〔3、6〕，一些植物的愈伤组织随着继代培养次数的增加而逐渐丧失分化能力。为了研究高粱蔗体细胞无性系不同世代绿苗分化率的异同，三年来，对各世代的无性系的分化能力做了详细观察，并对无性繁殖3、9、27三个世代愈伤组织分化率及绿苗移栽成活率进行了比较。结果证明：①继代培养3、9、27次的愈伤组织，继代培养三周后，均可增殖6倍以上。②不同培养世代的愈伤组织绿苗再生率没有因继代培养次数的增加而降低。如表2所示。

表 2 继代培养次数对无性系的增殖、分化、绿苗成活率的影响

继代培养次数	增殖倍数	绿苗分化及生长情况		绿 苗 移 栽 成 活 率		
		苗数株/瓶	平均苗高(厘米)	移栽苗数	成活株数	成活率(成活株/移栽株)
3	6	41	5.0	20	14	70
9	6.2	60	4.7	240	190	79.2
27	6	71	4.6	45	37	82.2
小 计				305	241	

四、不同无性繁殖世代的后代生活力和遗传稳定性

为了观察比较无性系不同繁殖世代后代生活力，及特性特征的遗传稳定性，我们于1981~1983年，将3、7、14次无性繁殖世代的愈伤组织的再生植株的(D₁、D₂、D₃)20

表 3 高粱蔗无性系不同继代培养次数(3、14代)的再生植株高度的分布*

愈伤组织继代培养次数	后代植株高度			总 数
	230~249	250~269	270~283	
3	1 (X ₁₁)	3 (X ₁₂)	2 (X ₁₃)	6
14	1 (X ₁₂)	3 (X ₂₂)	2 (X ₂₃)	7
总数	2 (t ₀₁)	6 (t ₀₂)	5 (t ₀₃)	13 (T)*

注：①继续培养，3与14次无性系再生植株分别调查6~7个株系，每一株系调查10~20株。

②植株高度为每一处理的平均值；单位为厘米。

X²值的计算结果为：X²=0.164。

显著标准：当P=0.01时=9.21；P=0.05时=5.59。

0.164<0.21

个株系种于田间。以原品种“高粱蔗”为对照。生育期间对其主要特性特征进行了系统的调查，并对无性繁殖3、14世代的再生植株高度与无性繁殖代数的关系进行了X²测验。

上述结果表明，高粱蔗茎尖体细胞无性系不同的继代培养次数与后代植株高度不存在相关性。继代培养3次与14次的无性繁殖植株的后代平均高度差异不显著；从而证明无性系继代培养次数的增加，对再生植株高度等田间长势影响不大。此外，我们还对不同培养世代愈伤组织的再生植株(D₁、D₂、D₃)做了大量的观察与记

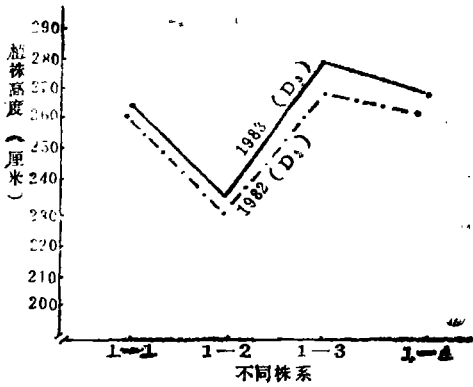


图 1 1号细胞株 4 个株系植株平均高度的变化

载。三年来的调查结果表明：大量再生植株苗期 (D₁) 株形、叶形、叶色、茎色十分相似；后期的不同株系之间，在某些特性特征方面出现了大同小异〔图版 3~8〕，但在群体之间仍不丧失高粱蔗原品种的典型性。如无性系经二年 14 次继代培养的再生植株，在株形、叶形、叶色、茎色、节数、叶片数、粒形，都与高粱蔗相似 (图版 10、11)。从而进一步说明，该无性系经多次继代培养以后，仍能保持再生植株后代的生长势及主要特性特征的相对遗传稳定性。

五、高粱蔗无性系再生植株某些性状的变异及优良株系的筛选

一些研究者指出：禾本科植物 (水稻、玉米) 再生植株后代之间存在着变异 [3、4]。

我们的工作又进一步证明，粮糖兼用作物——高粱蔗无性系的再生植株的后代之间的某些性状存在一定差异。通过三年来对 14 个细胞株、大量再生绿苗当代 (D₁) 和 20 个穗系的 D₁、D₂、D₃ 的连续调查表明：

(1) 由于受培养条件影响，再生植株的当代 (D₁) 的生长速度、分蘖力、株高、穗形有明显差异 (图版 6)。但这种表现型不完全遗传。(2) 不同株系之间存在着差异；同一株系之内整齐一致。(3) 来自同一细胞株的再生株系之间从第二代 (D₂) 起在株高、叶长、籽粒产量、蔗液垂度等性状存在着变异。如对 1 号细胞株无性繁殖的三个株系 (1-1、1-2、1-3) 的二代与三代 (D₂、D₃)，1982、1983 两年植株高度调查分析表明：来源于同一细胞株的后代的植株高度差异显著性达到了极显著标准，如表 4 所示。

为了研究不同株系之间的株高变异是否能遗传，于 1982、1983 年，调查分析了来源于 1 号细胞株 (1-1、1-2、1-3、1-4) 不同年份株高变化规律。图 1 的结果进一步说明：来源于同一

表 4 同一细胞株三个再生株系之间株高的变异分析

变异原因	平方和	自由度	变量	F
品种变异	3252.6	2	1626.3	13.5**
机 误	15624.2	27	120.47	
总变异	18876.8	29		

F=13.5, 当 F 为 0.05 时=3.5, F_{0.01} 时=5.5, 所测得 F 值 13.5 > 3.5 和 5.5。

表 5 体细胞无性系再生植株优良株系与对照种主要性状比较

项目	植株高度		中部叶长		穗 长		单株粒重		茎秆青重		蔗液浓度%	
	厘米	比对照土	厘米	比对照土	厘米	比对照土	克	比对照增/减%	克	比对照增/减%	%	比对照增/减%
高粱蔗 (CK)	264.5	0	78.8	0	18.4	0	27.0	0	872.5	0	14	0
10-1	256.9	-7.6	80.0	+1.2	21.7	+3.3	28.0	+3.7	957.5	+9.7	17.3	+23.6
13-1	246.9	-17.6	80.3	+1.5	20.8	+2.4	32.3	+19.6	863.5	-1.1	17.7	+26.4
14-1	266.8	+2.3	81.8	+3.0	20.0	+1.6	30.8	+14.1	875.0	+0.3	17.0	+21.4

注：上述数值为调查 20 株平均数。

细胞株的4个再生植株的后代，其植株高度存在着明显变异，1—2号植株平均高度仅为232~234厘米，比“1—3”矮45.9厘米。且两年在不同的气象条件下，株高之间的差异有一致的趋势。从而说明了体细胞再生植株某些性状的变异是可以遗传的。

此外，我们还对来自14个细胞株20个株系的主要性状进行了田间考察与小区测产。

通过二年多大量调查结果表明，来自同一无性系再生植株的后代，虽然大体上表现出高粱蔗的典型性，但是，一些主要特性特征如株高、叶的长宽、穗的大小、籽实产量、茎秆产量、含糖量上存在着明显差异。通过二年的田间考察与考种分析，初步筛选出10—1、13—1、14—1三个综合性状超过对照种的株系（详见表5）。由此可见，从高粱蔗茎尖体细胞无性系再生的大量绿苗中，如能经过大量的后代田间选拔、鉴定与繁殖，可望在不远的将来会选出早熟、抗逆性强、适应性广、粮糖兼丰、具有多种用途的高粱蔗新品种。

结 论 与 讨 论

据报道，在过去的二十年中大约有100个植物种建立了离体无性系〔1〕。但在重要的粮食作物上尚有一定的困难，本试验以高粱×甘蔗杂交后代的茎尖外植株体为材料，经过大量试验，终于建立起已继代培养三年，可大量再生绿苗的无性系并筛选出三个较优良株系。

试验结果指出：（1）无性系的形成及绿苗的再生和基本培养基的组成、细胞分裂素、生长素、活性碳的用量关系很大。SKOOG、miller发现培养基中生长素（A）和细胞分裂素（C）的比例是器官分化的决定因素。除此之外，我们还进一步发现，适当调节培养基中大量无机盐的含量，N、P、Mg的配比，及添加活性碳等也是值得注意的问题。

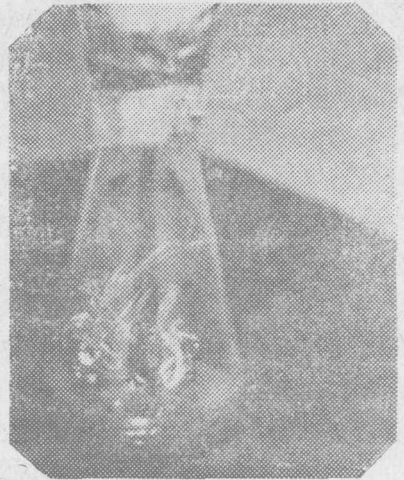
（2）通过三年多来，我们培养的玉米胚性细胞系〔3〕、高粱蔗体细胞无性系〔2〕及二年来对烟草、大叶兰无性系的绿苗再生能力大量观察表明，它不仅和植物种类、遗传背景有关，同时和供体材料的取材部位、原始细胞的基因组成有关。实验证明，来源于茎尖的高粱蔗体细胞无性系，始终保持着茎尖分生组织形成绿苗能力的遗传势。继代培养27次以后仍然保持良好的细胞全能性，没有发现分化能力的丧失。高粱蔗体细胞无性系的细胞，具有增殖速度快、繁殖周期短的特点，所以在它们大量的自我复制过程中，由于受多种理化因素的影响，有可能产生染色体的变异、基因的突变或重组，因此在它们再生植株的后代中形成了大同小异的新个体，从而可进一步筛选出多个优于原品种、遗传性较为稳定的新株系。这不仅为高粱蔗的育种开辟了一条新途径，同时对于高等植物利用遗传工程技术在细胞水平上进行品种改良及生物能源的开发与利用都是有用的。

参 考 文 献

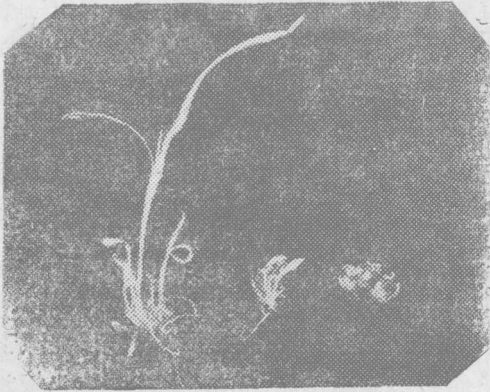
- 〔1〕 罗士卫：植物细胞和组织培养的应用与展望。1983年，植物生理学通讯（2）：1—6。
- 〔2〕 母秋华等：高粱蔗茎尖培养获得成功。1982年，科学通报27（7）：448。
- 〔3〕 母秋华等：玉米花粉胚状体无性系的建立及其在育种中的应用。1983年，实验生物学报，16（2）：223~229。
- 〔4〕 赵成章等：水稻再生植株及后代性状表现。1983年，遗传学报 9（4）：320~324。
- 〔5〕 曹文伯：国外开发利用新能源的一个重要途径—发展甜高粱生产。1983年，世界农业（8）：48~50。
- 〔6〕 D.amato, P. 1975: The Problem of genotic stability in plant tissue and all cultures. In crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge Univ. press. Cambridge England, P334~348。



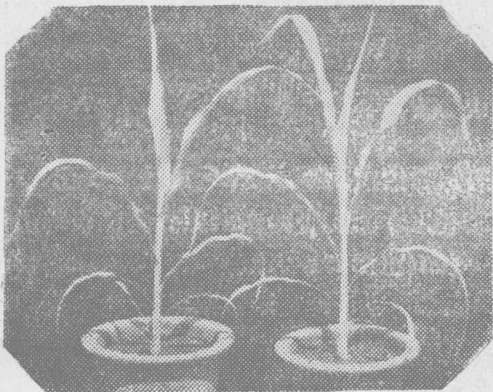
(1) 8114培养基继代培养中的高粱蔗体细胞无性系的愈伤组织。



(1—2) 8112分化培养基诱导的再生绿苗。



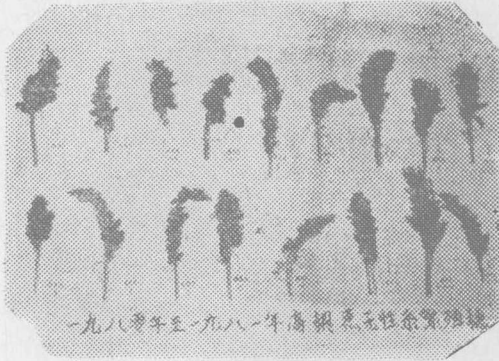
(2) 高粱蔗体细胞无性系的形态发生(从愈伤组织到绿苗)。(3) 移栽前的高粱蔗无性繁殖的试管苗。



(4) 移栽成活后的高粱蔗再生植株。



(5) 经27次继代培养的愈伤组织的可大量再生绿苗。



(6) 无性系再生植株 [D₁] 当代穗形间的差异。



(7) 无性系再生植株正常结实。



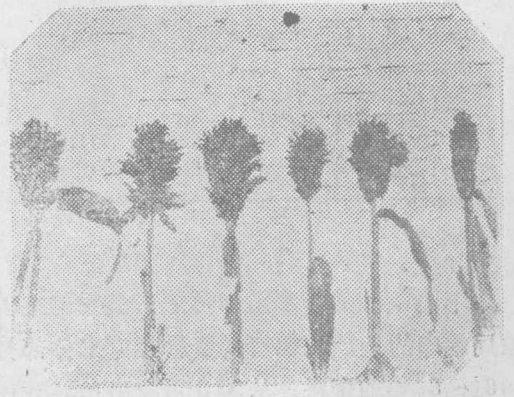
(8) 无性系再生植株粗壮茎秆。



(9) 无性系再生植株 [D₃] 田间生育状况。



(10) 左起 2~3 行, 比对照 (高粱蔗) 优良的无性繁殖新品系。



(11) 从再生植株中分离出来的变异穗 (左 1 为 CK, 2~6 为变异穗)。