

· 技术方法 ·

# 芝麻愈伤组织诱导与植株再生体系的建立

苗红梅, 琚铭, 魏利斌, 马琴, 张海洋\*

河南省农业科学院河南省芝麻研究中心, 郑州 450002

**摘要** 以芝麻栽培种(*Sesamum indicum*,  $2n=26$ )、野生种(*S. radiatum*,  $2n=64$ ; *S. schinzianum*,  $2n=64$ )及其远源杂交后代(*S. schinzianum* × *S. indicum*)为材料, 研究了不同基因型、外植体类型、激素种类及其浓度对芝麻愈伤组织诱导及植株再生的影响, 建立了芝麻愈伤组织诱导及高频植株再生的技术体系。结果表明, 6-BA/NAA激素组合有利于绿色紧密型愈伤组织的形成及分化; 最佳愈伤组织诱导及分化培养基为MS+  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA +  $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。在该培养条件下, 野生种下胚轴愈伤组织的诱导率最高为97.50%, 分化率为94.02%; 栽培种下胚轴愈伤组织的诱导率最高为40.60%, 分化率为8.16%; 远缘杂交后代幼胚外植体愈伤组织的诱导率最高为46.67%, 分化率为89.29%。该研究结果为芝麻转基因技术体系的建立及新种质创制奠定了基础。

**关键词** 愈伤组织, 基因型, 诱导, 再生, 芝麻

苗红梅, 琚铭, 魏利斌, 马琴, 张海洋 (2012). 芝麻愈伤组织诱导与植株再生体系的建立. 植物学报 47, 162–170.

芝麻隶属胡麻科胡麻属, 是世界上最古老的油料作物之一。我国芝麻的种植面积约为 $8.0\times 10^5\text{ hm}^2$ , 年总产量约 $7.5\times 10^5\text{ t}$ , 位居世界第1, 在国际油料贸易中具重要地位。芝麻种子含油量一般介于35%–63%之间, 油酸/亚油酸的比例约为1:1, 是人类最理想的食用油脂。此外, 芝麻种子中还含有芝麻酚、芝麻素和VE等天然抗氧化类物质及其次生代谢物, 在降血脂、抗菌防癌和延缓人体衰老等医疗保健方面具有重要的功效(Ram et al., 1990)。目前, 芝麻生产中存在的主要问题为品种抗病抗逆能力差、产量低且不稳定。因此, 通过现代生物技术手段创制芝麻抗病抗逆新种质并提高其产量一直是芝麻遗传育种研究的重要任务之一。

自20世纪80年代以来, 国内外学者对芝麻愈伤组织诱导及植株再生技术体系开展了大量研究(刘瑞, 1986; 刘淑兰等, 1994; 瞿祯等, 1994; 李明军等, 1996; Xu et al., 1997; Mary and Jayabalan, 1997; 鄧玉宝等, 1998; Baskaran and Jayabalan, 2006; 卫双玲等, 2007; Chakraborti and Ghosh, 2009; 崔彦慧等, 2010), 并有关于通过芝麻愈伤组织诱导出胚状体或再生出植株的报道(李宝平等, 1990; 易永华

等, 1997), 但实验结果重复性差, 愈伤组织植株再生频率极低。另外, 生长调节剂的组合及浓度配比等方面各研究报道差异较大, 芝麻再生技术体系仍处于探索阶段(孙建和张秀荣, 2009), 尚不能用于转基因研究。鉴于此, 本研究以芝麻栽培种(*Sesamum indicum*,  $2n=26$ )、野生种(*S. radiatum*,  $2n=64$ ; *S. schinzianum*,  $2n=64$ )和远源杂交后代(*S. schinzianum* × *S. indicum*)等10个基因型的不同外植体为材料, 设计了不同的激素组合, 筛选出适宜芝麻愈伤组织诱导及再生的基因型、外植体类型、培养基类型及激素组合配方, 建立了芝麻愈伤组织诱导及植株再生技术体系, 为芝麻转基因技术体系建立及新种质创制奠定了基础。

## 1 植物材料

本研究所有实验材料均由河南省芝麻研究中心提供。所用的芝麻不同基因型及外植体来源如表1所示。

## 2 培养基成分和培养条件

### 2.1 外植体的获得

子叶和下胚轴: 选取籽粒饱满且无病害的芝麻种子。

收稿日期: 2011-09-29; 接受日期: 2012-01-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(No.2011CB109304)和国家芝麻产业技术体系建设项目(No.CARS-15)

\* 通讯作者。E-mail: zhy@hnagri.org.cn

表1 实验材料的基因型及外植体类型

Table 1 Genotypes and explant types of sesame

Material No.	Genotype	Species	Chromosome number	Explant type
M1	Yuzhi 11	<i>Sesamum indicum</i>	2n=26	Hypocotyl, cotyledon and immature embryo
M2	Sichuan Rongxian black sesame	<i>S. indicum</i>	2n=26	Hypocotyl, cotyledon and immature embryo
M3	Zhongyou1134	<i>S. indicum</i>	2n=26	Hypocotyl, cotyledon and immature embryo
M4	Wild sesame No.1	<i>S. radiatum</i>	2n=64	Hypocotyl, cotyledon and immature embryo
M5	Gangguo wild sesame	<i>S. schinzianum</i>	2n=64	Hypocotyl, cotyledon and immature embryo
M6	Hybrid progeny C01	<i>S. radiatum</i> × ZZM1102	Unknown	Immature embryo
M7	Hybrid progeny C02	<i>S. radiatum</i> × ZZM2296	Unknown	Immature embryo
M8	Hybrid progeny C03	<i>S. radiatum</i> × ZZM1224	Unknown	Immature embryo
M9	Hybrid progeny C04	<i>S. radiatum</i> × ZZM0570	Unknown	Immature embryo
M10	Hybrid progeny C05	<i>S. radiatum</i> × ZZM0209	Unknown	Immature embryo

表中材料(ZZM1102(颖上芝麻二号)、ZZM2296(老八棱)、ZZM1224(独苔)、ZZM0570(杨树黄和尚头)和ZZM0209(大八杈))编号来源于我国芝麻资源数据库编号。

ID of ZZM1102 (Yingshang Zhima No. 2), ZZM2296 (Lao Baleng), ZZM1224 (Dutai), ZZM0570 (Yangshu Huang Heshangtou) and ZZM0209 (Da Bacha) in this table come from the national sesame resources library of China.

在超净工作台上,先用70%乙醇消毒30秒,再用3%次氯酸钠灭菌8–10分钟,无菌水冲洗3–5次后放入无菌水中浸泡18–24小时。待种子露白后,在无菌条件下,取一部分种子,将子叶横向分切后,取远轴端子叶作为外植体(图1A);其余种子接种在MS固体培养基上。暗培养3天后再进行光照培养3天,获得无菌苗。在超净工作台上用手术刀切取幼苗下胚轴,切割成0.5 cm左右的小段(图1B)。

幼胚:取授粉后12天的幼蒴(瞿祯等,1994),用自来水冲洗干净。在超净工作台上先用70%乙醇处理30秒,再用3%次氯酸钠处理15分钟。用无菌水冲洗3–5次后在显微镜下剥取芝麻幼胚作为外植体(图1C)。

2.2 愈伤组织诱导、分化的激素类型及组合

初步筛选用的愈伤组织诱导培养基是以MS+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖为基本培养基,并分别附加不同浓度配比的细胞分裂素和生长素组合。细胞分裂素为6-BA(1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>)和KT(1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>);生长素为2,4-D(0.1、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>)和NAA(0.1、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>),共设置24个激素组合。经大量筛选实验后,确定选用0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA+2.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA和0.5 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>KT两种激素配方组合;分化培养基与愈伤组织诱导培养基成分相同。所有固体培养基均附加

8 g·L<sup>-1</sup>琼脂,灭菌后pH值为5.8。

2.3 愈伤组织的诱导、分化及再生植株培养

将上述准备好的外植体接种于不同愈伤组织诱导培养基上,所有外植体每皿接种20个,每个处理共接种200个。在(25±2)°C,光照强度为3 000–5 000 lux,16小时光照/8小时黑暗条件下培养。待愈伤组织分化出芽点并形成小苗后,切取幼苗放于MS基本培养基+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖培养基上继续培养(图1N);2周后,选取2–3 cm高的幼苗转入生根培养基(MS基本培养基+0.2 mg·L<sup>-1</sup>NAA)中诱导生根(图1O);待根长至2–3 cm后,移栽驯化培养(图1P)。

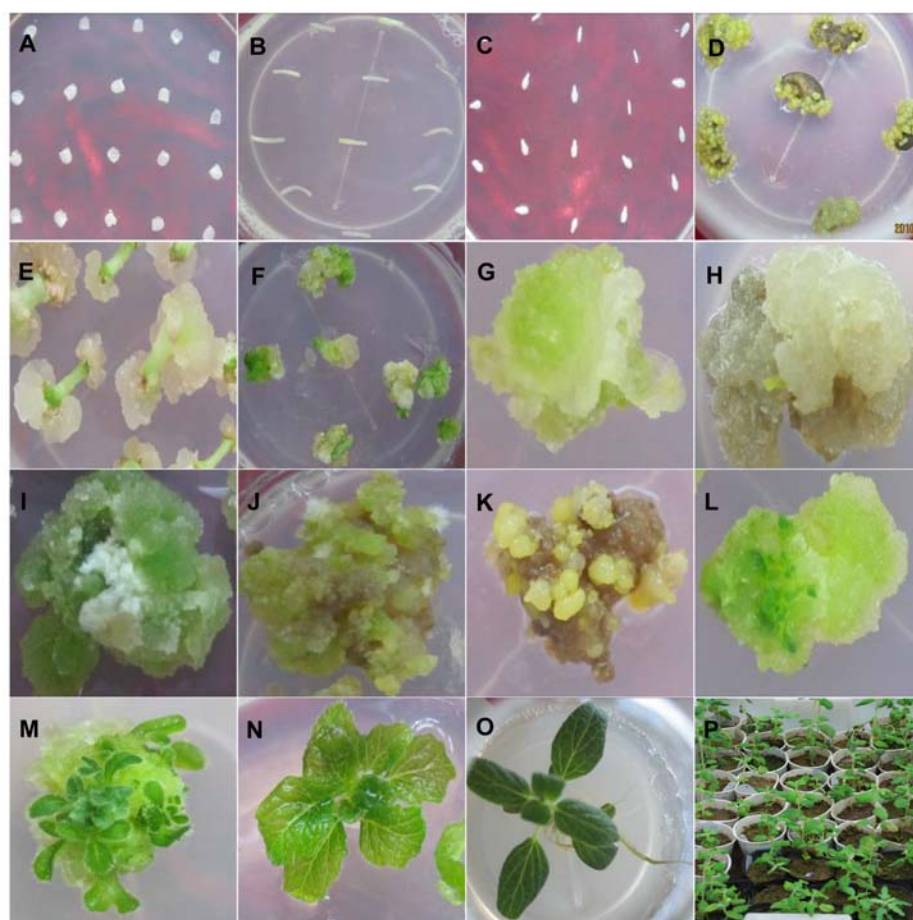
2.4 数据统计分析

将外植体接种于不同愈伤组织诱导培养基上进行培养。每周观察1次,记录外植体的出愈率和愈伤组织的质量。

愈伤组织诱导率=(出愈外植体数/接种外植体总数)×100%

愈伤组织分化率=(分化出再生芽的愈伤组织块数/愈伤组织块总数)×100%

植株再生系数=再生芽数/形成再生芽的愈伤组织块数



**图1** 芝麻不同外植体的愈伤组织诱导及植株再生

(A) 子叶外植体; (B) 下胚轴外植体; (C) 幼胚外植体; (D) 子叶愈伤组织诱导; (E) 下胚轴愈伤组织诱导; (F) 幼胚愈伤组织诱导; (G) 淡黄绿色松软型愈伤组织; (H) 灰白色稀软型愈伤组织; (I) 绿色结构紧密型愈伤组织; (J)–(L) 愈伤组织的分化; (M) 丛生芽; (N) 再生苗; (O) 再生植株生根; (P) 再生植株移栽

**Figure 1** Callus induction and shoot regeneration from different explants of sesame

(A) Cotyledon explants; (B) Hypocotyl explants; (C) Immature embryo explants; (D) Callus induced from cotyledon; (E) Callus induced from hypocotyl; (F) Callus induced from immature embryo; (G) Yellowish green soft callus type; (H) Gray white soft callus type; (I) Compact green callus type; (J)–(L) Callus differentiation; (M) Axillary shoot; (N) Regenerated plantlet; (O) Rooting of regenerated plant; (P) Regenerated plantlets culture

使用SPSS13.0软件统计数据并进行差异显著性分析。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 愈伤组织的诱导及再生体系的建立

在初步筛选24种不同激素组合的培养基的基础上, 选用3个栽培种、2个野生种及5个栽培种与野生种的

远缘杂交后代, 以芝麻下胚轴、子叶或幼胚为外植体 (图1A–C), 在 $MS+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖中附加 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA和 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA作为最佳愈伤组织诱导及分化培养基, 以MS基本培养基+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA为生根培养基, 成功建立了以芝麻栽培种、野生种及远缘杂交后代为材料的愈伤组织诱导、分化及植株再生技术体系。采用该技术体系, 子叶外植体接种1周后开始膨大变绿, 部分变褐, 并在切口处出现少量的愈伤组

组织;随着进一步的培养,愈伤组织会覆盖外植体(图1D)。而下胚轴切口则在接种3天后启动愈伤组织的发生;2周后,外植体两端的愈伤组织增殖明显(图1E)。幼胚外植体接种时因具有不成熟的胚性状态,其启动愈伤组织诱导的时间要比子叶及下胚轴长;一般表现为先出现小而嫩绿的2片子叶,而后在胚根处长出愈伤组织(图1F)。当外植体未能诱导愈伤组织发生时,常表现为子叶增大,边缘变黑且杂乱无章;下胚轴变粗并出根;幼胚长出实生苗或褐化死亡。继代培养后,部分愈伤组织表现为具有分化能力的绿色致密型愈伤组织(图1I),该愈伤组织颜色鲜艳且质地较紧密。在继代培养下,部分愈伤组织的表面开始变硬变绿,并出现很多的小芽点(图1L);1个月后,芽点增殖变大出现植株形态,主要分布于愈伤组织的表面(图1M);40天后发育形成大量的丛生苗,此时将小苗剥离(图1N),经生根培养,可获得完整的再生植株,用于温室移栽(图1O, P)。

### 3.2 不同基因型和外植体类型对愈伤组织诱导的影响

根据不同激素组合条件下的愈伤组织诱导初步实验结果(具体内容见2.2节),确定选用 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ 两种激素配方组合的诱导培养基,进行愈伤组织诱导的基因型及外植体类型筛选实验。10个基因型和3种不

同外植体的愈伤组织诱导率见表2。从表2可以看出,10个基因型的所有外植体类型均能诱导出愈伤组织,但不同基因型间的诱导率有差异。其中,2个野生种(M4, M5)的愈伤组织发生频率最高,可达90%以上;栽培种(M1–M3)下胚轴的诱导率最高,为17.36%–60.00%,与野生种相比差异显著;栽培种内不同品种间也表现出明显差异,黑芝麻(M2)较白芝麻(M1, M3)诱导率高。以子叶为外植体时,野生种与栽培种间的诱导率差异也达显著水平,诱导率最高达98.33%,但不同激素组合下同一基因型的愈伤组织诱导率变化较大。以幼胚为外植体时,远缘杂交后代(M6–M10)的愈伤组织诱导率均比野生种(M4, M5)和栽培种(M1–M3)的高,两种组合中的最高诱导率分别为54.17%和46.67%(M6),栽培种的诱导率最低,介于16.67%–33.33%之间;野生种的诱导率与栽培种较接近,但低于远缘杂交材料。说明基因型对愈伤组织的发生率起着关键决定作用。

此外,从表2还可看出,在 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ 激素配方组合下,除M2外,其它栽培种与野生种下胚轴的愈伤组织发生率均比子叶和幼胚的高。在 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 激素配方组合下,野生种下胚轴及子叶的愈伤组织发生率均较幼胚的高;而白芝麻栽培种(M1, M3)下胚轴与幼胚的愈伤组织发生率较为接近,且与子叶相比更易形成愈伤组织。综上所述,以芝麻野生种和栽培种的下胚轴及幼

表2 芝麻不同基因型及外植体类型的愈伤组织诱导率

Table 2 Callus induction rates from different genotypes and explants of sesame

Genotype	Callus induction rate on medium with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}$ and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}$ (%)			Callus induction rate on medium with $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ (%)		
	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo
M1	50.83 d	13.33 e	19.17 i	25.00 d	5.00 d	29.17 i
M2	60.00 c	81.67 a	20.83 h	40.60 c	40.00 c	33.33 f
M3	48.33 e	18.33 d	16.67 j	17.36 e	3.33 e	27.50 h
M4	92.50 a	58.33 b	31.67 f	97.50 a	98.33 a	33.33 f
M5	90.83 b	55.00 c	29.17 g	95.83 b	96.67 b	32.50 g
M6	—	—	54.17 a	—	—	46.67 a
M7	—	—	38.33 d	—	—	45.83 b
M8	—	—	40.00 c	—	—	35.83 e
M9	—	—	32.50 e	—	—	40.00 c
M10	—	—	48.33 b	—	—	38.33 d

不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。—表示未开展实验。

Different small letters represent significant difference at 0.05 level. — indicates untested.

胚为外植体,均可高频诱导出愈伤组织。对于远缘杂交种F<sub>1</sub>材料,因其亲本染色体数目差别较大,F<sub>1</sub>后代多为败育,无法正常结实,因而只能选用其幼胚作为外植体接种以获得愈伤组织。

3.3 不同基因型和外植体类型对愈伤组织类型及分化的影响

对获得的愈伤组织进行分离、继代及分化处理,可主要产生以下3种类型的愈伤组织(图1)。(1) 淡黄绿色松软型愈伤组织(I型)(图1G):其质地较好,但接种到分化培养基上20天后,愈伤组织的表面常出现白色根毛状物质,之后愈伤组织底部褐化(图1J),最终失去活力。(2) 灰白色稀软型愈伤组织(II型)(图1H):该类愈伤组织在分化培养基上能够长出很多类似胚状体的黄色颗粒(图1K)。将黄色的颗粒挑选出来进行继代培养,可分化形成大量的根状物,但不能分化出芽。(3) 绿色结构紧密型愈伤组织(III型)(图1I):表现为颜色鲜艳且质地紧密。经继代与分化培养可形成芽点和幼苗(图1L)。对上述激素组合培养条件下的各基因型及外植体类型诱导产生的愈伤组织类型进行统计,结果见表3。

在0.5 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+1 mg·L<sup>-1</sup>KT激素组合下,产生的愈伤组织类型多为I型(淡黄绿色松软型),少量为

II型,但均未能形成再生植株。在0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA+2 mg·L<sup>-1</sup>6-BA激素组合下,以下胚轴为外植体,各种基因型均可获得III型(可分化出苗的)愈伤组织,但不同基因型形成的愈伤组织类型差异较大。表4为愈伤组织分化率和再生植株的统计结果(表中以III型愈伤组织百分率代表愈伤组织分化率)。

从表4可以看出,各基因型间愈伤组织分化率及植株再生系数的变化幅度不同。野生种愈伤组织的分化率最高达94.02%,植株再生系数为15.26。栽培种III型愈伤组织的分化率最高为8.16%(M2),植株再生系数最高为5.00(M1),与野生种的分化率相比差异显著;栽培种不同品种间的下胚轴愈伤组织分化率和植株再生系数均具明显差异。而远缘杂交后代(M6–M10)以幼胚为外植体形成的愈伤组织分化率为65.22%–89.29%,植株再生系数为6.35–8.03,均介于栽培种与野生种之间;因亲本差异,各远缘杂交后代的愈伤组织分化率和植株再生系数也有一定的差异。此外,外植体类型对愈伤组织分化和再生的影响也较大。以下胚轴为外植体野生种和栽培种均可获得再生植株;以幼胚为外植体,栽培种(M1–M3)不能获得III型愈伤组织及再生植株;野生种(M4, M5)幼胚的愈伤组织分化率和植株再生系数均明显低于下胚轴及子叶;以子叶为外植体时,野生种的分化率及植株

表3 芝麻不同基因型、外植体类型及不同激素组合下诱导出的愈伤组织类型

Table 3 Callus types induced from different genotypes and explants of sesame with different hormones combination

Genotype	Callus types on medium with 0.5 mg·L <sup>-1</sup> 2,4-D and 1 mg·L <sup>-1</sup> KT			Callus types on medium with 0.1 mg·L <sup>-1</sup> NAA and 2 mg·L <sup>-1</sup> 6-BA		
	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo
M1	I, II	II	II	II, III	II	II
M2	I, II	I	I	I, II, III	I, II, III	I, II
M3	I, II	II	II	II, III	II	II
M4	I	I	I	I, II, III	I, II, III	III
M5	I	I	I	I, II, III	I, II, III	III
M6	—	—	I, II	—	—	III
M7	—	—	I, II	—	—	III
M8	—	—	I, II	—	—	III
M9	—	—	I, II	—	—	III
M10	—	—	I, II	—	—	III

I: 淡黄绿色松软型愈伤组织(图1G); II: 灰白色稀软型愈伤组织(图1H); III: 绿色结构紧密型愈伤组织(图1I)。—表示未开展实验。

I: Yellowish green soft callus type (Figure 1G); II: Gray white soft callus type (Figure 1H); III: Compact green callus type (Figure 1I). — indicates untested.

表4 芝麻不同基因型及不同外植体类型的愈伤组织分化率和再生系数

Table 4 Callus differentiation rate and regeneration coefficient from different genotypes and explant types of sesame

Genotype	Callus differentiation rate (%)			Regeneration coefficient		
	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo	Hypocotyl	Cotyledon	Immature embryo
M1	6.00 d	0.00 d	0.00 h	5.00 c	0.00 d	0.00 f
M2	8.16 c	2.08 c	0.00 h	3.75 d	2.00 c	0.00 f
M3	4.76 e	0.00 d	0.00 h	3.00 e	0.00 d	0.00 f
M4	94.02 a	87.29 a	5.00 f	15.26 a	13.90 a	2.50 e
M5	92.17 b	86.21 b	2.56 g	14.56 b	13.56 b	3.00 d
M6	—	—	89.29 a	—	—	7.34 b
M7	—	—	79.63 b	—	—	6.35 c
M8	—	—	74.42 c	—	—	8.00 a
M9	—	—	68.75 d	—	—	7.21 b
M10	—	—	65.22 e	—	—	8.03 a

不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。—表示未开展实验。

Different small letters represent significant difference at 0.05 level. — indicates untested.

再生系数稍低于下胚轴;栽培种变化较大,在白芝麻(M1, M3)子叶上不能获得再生植株,虽可从黑芝麻(M2)子叶上获得再生植株,但其分化率仅为2.08%。

综上所述,芝麻基因型和外植体类型对愈伤组织诱导类型、分化及植株再生起着关键作用。野生种分化率显著高于栽培种,远缘杂交后代因具有野生种基因也能够获得高频再生植株;栽培种及野生种以下胚轴为外植体均可成功获得再生植株,远缘杂交后代以幼胚为外植体也可成功获得再生植株。

### 3.4 激素类型对愈伤组织诱导及分化的影响

实验中发现,与野生种相比,栽培种的愈伤组织诱导及分化较为困难。为成功获得较高频率的栽培种愈伤组织及再生苗,本实验初期以M1(豫芝11号)的下胚轴为外植体,选用2,4-D、NAA、KT和6-BA四种激素进行了不同激素组合的初步筛选实验,结果见表5。从表5可以看出,除NAA和KT组合(T19-T24)外,其余组合均能获得较高的愈伤组织诱导率,在2,4-D和KT组合中最高诱导率为51.00%(T8);其次是NAA和6-BA组合,最高诱导率为25.00%(T16)。通过对获得的愈伤组织进行分类及分化统计发现,仅在NAA和6-BA组合培养基上可形成能分化的愈伤组织。不同浓度NAA和6-BA组合下(T13-T18),下胚轴的愈伤组织诱导率介于10.00%—25.00%之间,且愈伤组织均有再生苗形成,最高分化率为6.00%(T16, 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA)。

上述结果表明,激素类型对愈伤组织的诱导及分化起着关键作用,2,4-D和KT具有促进愈伤组织形成的作用,但多产生I型(淡黄绿色松软型)和II型(灰白色稀软型)愈伤组织,分化后往往形成根毛状组织或衰老死亡;NAA和6-BA组合可以形成III型(绿色致密型)愈伤组织并分化成苗。不同浓度的NAA和6-BA组合决定着愈伤组织的形成及分化方向。本实验选用0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA激素组合,成功获得了愈伤组织并分化成苗。

### 3.5 讨论

芝麻是离体培养再生较困难的作物(Were et al., 2006; Raja and Jayabalan, 2011)。目前,芝麻组织培养及植株再生技术研究主要包括两方面:(1)通过种子、茎尖、茎节或子叶节等外植体直接诱导丛生芽发生,进行扩繁;(2)通过诱导外植体产生愈伤组织,然后诱导愈伤组织形成丛生芽或产生体细胞胚以获得再生植株。迄今,多数研究集中于外植体直接诱导丛生芽的发生方面(George et al., 1987; 陈占宽等, 1994; 鄧玉宝等, 1998; Saravanan and Nadarajan, 2005; Seo et al., 2007; 崔彦慧等, 2010; Chattopadhyaya et al., 2010)。当前通过子叶等外植体直接诱导不定芽并再生植株的技术方法已获得成功并趋于成熟(魏利斌等, 2011);且已有该方法被用于基因枪法芝麻遗传转化研究的报道(陈占宽等, 1998)。印度学者Yadav等(2010)利用此体系并借助农杆菌侵染方

**表5** 不同激素组合对芝麻豫芝11号下胚轴外植体愈伤组织诱导及分化的影响

**Table 5** Frequency of callus induction and differentiation from hypocotyl explants of Yuzhi11 cultivar on media with different hormone combinations

Hormone treatment	2,4-D (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	KT (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	Hypocotyl number	Callus induction rate (%)	Callus differentiation rate (%)
T1	0.10	0.00	0.00	1.00	200.00	16.00 f	0.00 c
T2	0.50	0.00	0.00	1.00	200.00	23.00 c	0.00 c
T3	1.00	0.00	0.00	1.00	200.00	3.20 i	0.00 c
T4	0.10	0.00	0.00	2.00	200.00	5.50 h	0.00 c
T5	0.50	0.00	0.00	2.00	200.00	1.10 j	0.00 c
T6	1.00	0.00	0.00	2.00	200.00	4.30 hi	0.00 c
T7	0.10	0.00	1.00	0.00	200.00	39.60 b	0.00 c
T8	0.50	0.00	1.00	0.00	200.00	51.00 a	0.00 c
T9	1.00	0.00	1.00	0.00	200.00	20.50 cde	0.00 c
T10	0.10	0.00	2.00	0.00	200.00	10.50 g	0.00 c
T11	0.50	0.00	2.00	0.00	200.00	20.00 e	0.00 c
T12	1.00	0.00	2.00	0.00	200.00	23.50 c	0.00 c
T13	0.00	0.10	0.00	1.00	200.00	10.00 g	5.00 a
T14	0.00	0.50	0.00	1.00	200.00	19.00 e	2.63 b
T15	0.00	1.00	0.00	1.00	200.00	18.50 e	2.70 ab
T16	0.00	0.10	0.00	2.00	200.00	25.00 c	6.00 a
T17	0.00	0.50	0.00	2.00	200.00	22.00 d	2.27 b
T18	0.00	1.00	0.00	2.00	200.00	22.50 cd	2.22 b
T19	0.00	0.10	1.00	0.00	200.00	0.00 j	0.00 c
T20	0.00	0.50	1.00	0.00	200.00	0.00 j	0.00 c
T21	0.00	1.00	1.00	0.00	200.00	1.00 j	0.00 c
T22	0.00	0.10	2.00	0.00	200.00	0.00 j	0.00 c
T23	0.00	0.50	2.00	0.00	200.00	0.00 j	0.00 c
T24	0.00	1.00	2.00	0.00	200.00	0.00 j	0.00 c

不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Different small letters represent significant difference at 0.05 level.

法成功获得了芝麻转基因植株。但以子叶等外植体直接诱导丛生芽体系进行芝麻遗传转化的效率低,且实验结果重复性差。2009–2010年,本实验室利用基因枪法开展了pCAMBIA1301和2301空表达载体的芝麻子叶遗传转化及不定芽抗性筛选研究,共轰击外植体3 000个,未能获得转基因植株(未发表资料)。因此,芝麻愈伤组织诱导及再生技术体系仍将是开展芝麻遗传转化研究的主要途径。

近年来国内外的研究结果表明,在芝麻愈伤组织诱导、分化及再生体系中,主要存在愈伤组织分化不成功或分化率过低、结果重复性差以及基因型对再生频率影响大等问题(Mary and Jayabalan, 1997; Were et al., 2006; Charaborti and Ghosh, 2009; Tiwari et al., 2011)。Baskaran和Jayabalan(2006)对栽培种L.VR11的下胚轴进行了愈伤组织诱导,诱导率达

90%以上,但未得到分化苗。Shashidhara等(2007)在芝麻栽培种Gujarat Till-II上获得了愈伤组织及再生植株,再生率最高为66.66%。国内也有少数关于利用芝麻*Sesamum orientale*的下胚轴进行愈伤组织诱导和分化(最高愈伤组织分化率为10%)研究并获得再生植株的报道(李宝平等, 1990);易永华等(1997)以中芝9号的下胚轴为外植体获得了愈伤组织及再生植株,分化率为36%。但本研究发现上述技术体系在栽培种的其它品种上不具重复性(未发表资料)。本文选用栽培种和野生种,并首次选用远缘杂交种建立了芝麻愈伤组织诱导及植株再生体系。结果证实基因型对愈伤组织的诱导率、愈伤组织质量以及再生率的影响最大。在该体系下,野生种愈伤组织的诱导率最高可达97.50%,分化率达94.02%;栽培种愈伤组织的诱导率最高为40.60%,分化率为8.16%;而远缘杂交后

代的诱导率及再生率介于野生种与栽培种之间。相比之下, 野生种更易产生好的胚性愈伤组织并获得高频率的再生植株; 远缘杂交种可能因保留了野生种的部分遗传特性, 其植株再生频率也较高。与野生种及远缘杂交种相比, 栽培种愈伤组织虽然也能够产生绿色芽点及类似胚状体的颗粒, 但更易衰老及发育成根(易永华等, 1997; Were et al., 2006; 卫双玲等, 2007; 崔彦慧等, 2010)。同时, 栽培种不同品种间也存在愈伤组织诱导率及分化率的差异, 与白芝麻品种相比黑芝麻品种愈伤组织的诱导率及分化率较高。因此, 基因型是制约芝麻栽培种再生技术发展的关键因素, 解决栽培种芝麻遗传基础狭窄问题仍将是今后芝麻遗传育种工作的重要内容。

除上述因素外, 激素类型及浓度对芝麻愈伤组织的诱导及分化也起着关键作用。Singh等(2006)的研究结果表明, 2,4-D和6-BA能够促进芝麻愈伤组织的形成。本研究结果证实, 2,4-D可促进细胞的分裂和膨大, 对提高芝麻愈伤组织的诱导率具重要作用, 但获得的愈伤组织易向生根方向发展, 不能分化出苗; 6-BA能够促进细胞的分裂, 且利于形成高质量的愈伤组织, 这与Baskaran和Jayabalan(2006)的研究结果相一致。另外, 有部分研究者认为, 在培养基中添加维生素B1(thidiazuron, TDZ)和玉米素(zeatin, ZT)或增加细胞分裂素含量对提高芝麻愈伤组织的诱导率或促进不定芽直接再生有重要作用(George et al., 1987; Were et al., 2006; Ahmed et al., 2008; Chakraborti and Ghosh, 2009; Raja and Jayabalan, 2011)。然而目前在芝麻愈伤组织分化研究方面有关激素作用机理的报道很少。因此, 为提高栽培种的愈伤组织分化率, 除应选择高频基因型外, 还需对外植体的脱分化条件及外植体对不同激素组合的响应机理作进一步研究, 以建立更高频率的芝麻栽培种愈伤组织诱导及分化体系。

## 参考文献

- 陈占宽, 王金兰, 鄧玉宝, 易明林 (1994). 芝麻丛芽的诱导及再生植株研究. 河南农业科学 **23**(11), 10–12.
- 陈占宽, 鄧玉宝, 易明林, 王金兰, 梁秀银, 屠礼传, 傅荣昭, 曹光诚, 史艳红, 孙勇如 (1998). 芝麻人工构建雄性不育基因的转化研究初报. 华北农学报 **11**(4), 33–38.
- 崔彦慧, 孙毅, 刘文萍 (2010). 黑芝麻下胚轴离体培养的研究. 贵州科学 **28**, 67–72.
- 李宝平, 陈柔如, 张江涛, 郝建平, 郭双生 (1990). 芝麻的组织培养与植株再生. 山西大学学报(自然科学版) **13**, 307–310.
- 李明军, 张嘉宝, 王秋香, 杨建伟, 王志尚 (1996). 芝麻下胚轴愈伤组织的形成和器官发生. 河南师范大学学报(自然科学版) **24**, 61–64.
- 刘璠 (1986). 芝麻组织培养试验初报. 河南农业科学 **15**(2), 15–16.
- 刘淑兰, 王耀东, 罗松, 张军, 吴政道, 韩碧文, 陈正华 (1994). 芝麻体细胞胚胎发生及其内源激素和可溶性蛋白质的变化. 农业生物技术学报 **2**(2), 44–49.
- 瞿祯, 吴新铺, 夏伏建 (1994). 芝麻远缘杂种胚胎的营救和植株再生. 中国油料 **16**, 33–35.
- 孙建, 张秀荣 (2009). 芝麻组织培养研究进展与展望. 山地农业生物学报 **28**, 72–78.
- 魏利斌, 马琴, 琚铭, 张体德, 王慧丽, 苗红梅 (2011). 芝麻子叶基因转化受体系统的建立. 分子植物育种 **9**, 770–778.
- 卫双玲, 张海洋, 郑永战, 张体德, 梅鸿猷, 高桐梅, 毛建平 (2007). 芝麻子叶及下胚轴愈伤组织诱导研究. 河南农业科学 **36**(2), 41–45.
- 易永华, 张海, 左田夫, 王喆之 (1997). 黑芝麻不同外植体离体培养研究. 西北农业学报 **6**(4), 26–29.
- 鄧玉宝, 蒋武生, 易明林, 陈占宽 (1998). 影响芝麻子叶离体培养植株再生频率的研究. 信阳农业高等专科学校学报 **8**(3), 12–15.
- Ahmed MMM, Abdellatef E, Khalafalla MM (2008). *In vitro* multiple shoot induction and plant regeneration in elite sudanese sesame cultivars (*Sesamum indicum* L.). *Am-Eurasian J Sustain Agric* **2**, 308–314.
- Baskaran P, Jayabalan N (2006). *In vitro* mass propagation and diverse callus orientation on *Sesamum indicum* L.—an important oil plant. *J Agric Technol* **2**, 259–269.
- Chakraborti P, Ghosh A (2009). Variation in callus induction and root-shoot bud formation depend on seed coat of sesame genotypes. *Res J Bot* **5**, 14–19.
- Chattopadhyaya B, Banerjee J, Bsau A, Sen SK, Maiti MK (2010). Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotech Rep* **4**, 173–178.
- George L, Bapat VA, Rao PS (1987). *In vitro* multiplication of sesame (*Sesamum indicum*) through tissue culture. *Ann Bot* **60**, 17–21.
- Mary RJ, Jayabalan N (1997). Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in sesame. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **49**, 67–70.
- Raja A, Jayabalan N (2011). *In vitro* shoot regeneration and

- flowering of sesame (*Sesamum indicum* L.) cv. 'SVPR-1'. *J Agric Technol* **7**, 1089–1096.
- Ram R, Catlin D, Romero J, Cowley C** (1990). Sesame: new approaches for crop improvement. In: Janick J, Simon JE, eds. *Advances in New Crops*. Portland: Timber Press. pp. 225–228.
- Saravanan S, Nadarajan N** (2005). Effect of media supplements on *in vitro* response of sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes. *Res J Agr Biol Sci* **1**, 98–100.
- Seo HY, Kim YJ, Park TL, Kim HS, Yun SJ, Park KH, Oh MK, Choi MY, Paik CH, Lee YS, Choi YE** (2007). High-frequency plant regeneration via adventitious shoot formation from deembryonated cotyledon explants of *Sesamum indicum* L. *In vitro cellular. Dev Biol* **43**, 209–214.
- Shashidhara N, Lokesh R, Tcctjaprasad GY, Chand-raeshker C, Gananes N** (2007). Transgenic sesame (*Sesamum indicum* L.) development: detrimental to Indian economy. In: Chengappa PG, Nagarj N, Kanwar R, eds. *Challenge to Sustainable Agri-food Systems*. India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. pp. 455–466.
- Singh RP, Singh SP, Pransad BK, Singh BD** (2006). Multiple plantlets regeneration from tissue culture of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Res Crops* **7**, 760–764.
- Tiwari S, Kumar S, Gontia I** (2011). Minireview: biotechnological approaches for sesame (*Sesamum indicum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* L. f. Cass). *AsPac J Mol Biol Biotechnol* **19**, 2–9.
- Were BA, Gudu S, Onkware AO, Carlsson AS, Welander M** (2006). *In vitro* regeneration of sesame (*Sesamum indicum* L.) from seedling cotyledon and hypocotyl explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **85**, 235–239.
- Xu ZQ, Jia JF, Hu ZD** (1997). Somatic embryogenesis in *Sesamum indicum* L. cv. 'Nigrum'. *J Plant Physiol* **150**, 755–758.
- Yadav M, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal PK** (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **103**, 377–386.

## Establishment of Sesame Callus Induction and Shoot Regeneration System

Hongmei Miao, Ming Ju, Libin Wei, Qin Ma, Haiyang Zhang\*

Henan Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

**Abstract** We examined the effect of genotypes, explant types, combinations and concentrations of growth regulators on sesame callus induction and shoot regeneration with the cultivars *Sesamum indicum* L.,  $2n=26$ ; the wild species *S. radiatum*,  $2n=64$ , and *S. schinzianum*,  $2n=64$ ; and their distant hybrid strain *S. schinzianum* × *S. indicum*. We established the technical system of sesame callus induction and shoot regeneration with high frequency. Among the growth regulators, BA and NAA are suitable for inducing compact green callus, which gives a high differentiation frequency. The optimal medium for sesame callus induction and differentiation was MS basal medium supplemented with  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose. With this medium, the ratios of the highest level of callus induction and differentiation were 97.50% and 94.02% respectively, which were obtained from wild sesame hypocotyl explants, with the corresponding frequencies of 40.60% and 8.16% for cultivar hypocotyl explants. For the immature embryo explants from the distant hybrids, we achieved the maximum ratios of callus induction (46.67%) and differentiation (89.29%) with this medium. These results form the basis for both germplasm conservation and transgene studies in sesame.

**Key words** callus, genotype, induction, regeneration, sesame

**Miao HM, Ju M, Wei LB, Ma Q, Zhang HY** (2012). Establishment of sesame callus induction and shoot regeneration system. *Chin Bull Bot* **47**, 162–170.

\* Author for correspondence. E-mail: zhy@hnagri.org.cn