

## 食用稗成熟胚的组织培养及其细胞学特性

王静, 张欢欢, 傅雪琳\*, 刘向东\*

华南农业大学广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642

**摘要:** 研究食用稗成熟胚培养因素的结果表明, 愈伤诱导最适培养基为  $N_6+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D。  $N_6$  基本培养基上的愈伤组织分化率较高;  $B_5+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 的愈伤组织也具有较高的分化率。分化培养基  $N_6+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 利于绿芽分化。茎尖部位的愈伤组织分化率比根的高。最佳生根培养基为  $1/2\text{MS}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  AC。解剖和塑料半薄切片技术观察食用稗外植体的形态学和细胞学变化显示, 胚根和胚轴主要形成非胚性愈伤组织, 茎尖部位形成胚性愈伤组织。食用稗的器官建成途径倾向于以不定芽途径再生植株。芽原基为外起源, 而根原基为内外起源兼有。  
**关键词:** 食用稗; 成熟胚; 组织培养; 细胞学

## Mature Embryo Culture and Cytological Characteristics of *Echinochloa frumentacea* L.

WANG Jing, ZHANG Huan-Huan, FU Xue-Lin\*, LIU Xiang-Dong\*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** The factors of matured embryos culture in *Echinochloa frumentacea* were studied. It showed that  $N_6+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D was the best medium for callus induction. Calli from basic medium of  $N_6$  had the ability to regenerate more green shoots. High differentiation rate from calli in the medium of  $B_5+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA was observed. And the medium of  $N_6+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA was the most suitable for green shoot differentiation. The differentiation rate of calli derived from shoot tips was better than that of calli from roots. The highest rhizogenesis rate was obtained in the medium of  $1/2\text{MS}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  AC. Histological anatomy showed that non-embryonic calli mainly grew from radicle and hypocotyl, whereas embryonic calli grew from shoot tip. The organ-built way of *E. frumentacea* was inclined to be the adventitious bud formation way. And the shoot primordium originated from the surface of callus, while the root primordium originated from both the inside and surface of callus.

**Key words:** *Echinochloa frumentacea*; mature embryo; tissue culture; cytology

食用稗, 又称湖南稗子或小米草, 广泛栽培于亚洲热带及非洲温暖地区, 我国河南、安徽、四川、广西、云南和台湾等地也有引种栽培。食用稗除具有耐遮荫和耐瘠薄土壤的特性外, 其籽粒的蛋白质含量高, 营养价值好, 可以作为优良饲料或粮食。研究表明, 食用稗在盐逆境下高产且抗盐, 是生产上的高产牧草, 同时又是牧草育种的良好原材料(万力生和耿本仁1988; 王锁民等1995), 其地上、地下部分极其发达, 既能很好地适应水生环境, 生长优势超过水稻, 又能在干旱高温条件下保持极强的生长优势, 同时还是一种典型的  $C_4$  光合类型植物, 它的光合速率明显高于目前已知的几种  $C_4$  植物, 是开展高光效转基因研究的重要供体资源。王金明等(2007)采用 RT-PCR 技术克隆了家稗  $C_4$  光合途径的关键酶 *PPDK* 基因, 并对其进行了序列分

析和表达研究。张彬等(2007)首次将单子叶  $C_4$  植物野生稗草(*Echinochloa crusgalli*)的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(*Ecppc*)导入不同基因型小麦受体, 并得到具有潮霉素(Hyg)抗性的转化植株。但是迄今有关食用稗组织培养的研究仅见 Sankhla 等(1992)的报道, 他们以食用稗的幼穗作为外植体, 在添加  $3\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 的 MS 培养基上诱导产生出 3 种不同质地和结构的愈伤组织, 其中质地致密且

收稿 2008-08-14 修定 2008-10-23

资助 国家自然科学基金(30771328)和教育部“高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划”(2002383)。

致谢 实验得到汤丽云先生的技术指导和俞淑红女士的协助。  
\* 通讯作者(E-mail: fuxuelin@scau.edu.cn, xdlu@scau.edu.cn; Tel: 020-85280205)。

透明状的愈伤组织形成体细胞胚并分化出植株。成熟胚是诱导愈伤组织常用的外植体, 具有出愈率较高, 分化再生所需周期较短等优点。因此, 有必要对食用稗的组织培养特性及其相关问题进行详细研究。本文以食用稗去稗种子为外植体, 研究其成熟胚愈伤组织的诱导和分化特性, 并通过培养过程的解剖和塑料半薄切片观察, 观察愈伤组织发生及植株再生的形态学和细胞学变化, 旨在弄清食用稗成熟胚的组培特性及其机制, 供进一步研究、开发和利用食用稗的参考。

### 材料与方 法

材料为食用稗(*Echinochloa frumentacea* L.)自然授粉获得的种子, 由吉林省农业科学院水稻研究所张三元先生提供。

取当季收获的食用稗种子晒干, 去掉果皮及稗皮后 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 0.2%  $\text{HgCl}_2$  溶液灭菌 25 min, 经无菌水冲洗 4~5 次后用无菌滤纸吸干种子表面水分, 直接种到愈伤组织诱导培养基上。每皿 15 粒, 10 皿为 1 个重复, 每个处理 2 个重复。( $25 \pm 1$ ) 暗中培养或光照强度  $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  光照  $24 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$  培养。40 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率(%) = 产生愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数  $\times 100\%$ 。

愈伤组织诱导的基本培养基为  $\text{B}_5$ 、 $\text{N}_6$  和 MS, 分别添加  $1.0\sim 3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 和  $0\sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA、 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖和  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂。具体见表 1。

植株分化培养时选择相同诱导培养基中生长旺盛的愈伤组织, 转接到不同分化培养基(表 2)上, 每皿接 20 块, 10 皿为一个重复, 设 2 个重复, ( $25 \pm 1$ ) , 光照强度  $36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $10 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$  培养, 30 d 后统计分化的芽数。按公式计算分化率: 绿芽分化率(%) = 分化出绿芽数(个) / 接种愈伤组织块数(块)  $\times 100\%$ 。

待芽长 3~4 cm 时, 将芽切下转至生根培养基(表 3)上诱导生根, 20 d 后统计生根的芽数。按公式计算根分化率: 根分化率(%) = 生根的芽数(个) / 培养的芽数(个)  $\times 100\%$ 。

统计分析用 SPSS 10.0 软件进行, 平均数据以平均数  $\pm$  标准误(S. E.)表示, 计算 S. E. 时作反正弦转换, 方差分析采用邓肯氏新复极差检验法。

愈伤组织形成的形态学观察, 取在诱导培养基

表 1 食用稗的愈伤组织诱导培养基

Table 1 Callus induction media of *E. frumentacea*

| 培养基代号          | 基本培养基          | 2,4-D 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 6-BA 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----------------|----------------|--|---|
| L <sub>1</sub> | N <sub>6</sub> | 3.0                                      | 0                                       |
| L <sub>2</sub> | MS             | 3.0                                      | 0                                       |
| L <sub>3</sub> | B <sub>5</sub> | 1.0                                      | 0                                       |
| L <sub>4</sub> | B <sub>5</sub> | 2.0                                      | 0                                       |
| L <sub>5</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                                      | 0                                       |
| L <sub>6</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                                      | 0.2                                     |
| L <sub>7</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                                      | 0.5                                     |
| L <sub>8</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                                      | 1.0                                     |

表 2 食用稗的绿芽分化培养基

Table 2 Green shoot regeneration media of *E. frumentacea*

| 培养基代号          | 基本培养基          | NAA 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 6-BA 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----------------|----------------|--|---|
| F <sub>1</sub> | N <sub>6</sub> | 0.5                                    | 1.0                                     |
| F <sub>2</sub> | N <sub>6</sub> | 0.5                                    | 2.0                                     |
| F <sub>3</sub> | N <sub>6</sub> | 0.5                                    | 3.0                                     |
| F <sub>4</sub> | N <sub>6</sub> | 1.0                                    | 2.0                                     |
| F <sub>5</sub> | N <sub>6</sub> | 2.0                                    | 2.0                                     |

表 3 食用稗的生根培养基

Table 3 Root regeneration media of *E. frumentacea*

| 培养基代号          | 基本培养基 | NAA 浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | AC 浓度 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----------------|-------|--|--------------------------------------|
| G <sub>1</sub> | 1/2MS | 1.0                                    | 1.0                                  |
| G <sub>2</sub> | 1/2MS | 1.0                                    | 0                                    |
| G <sub>3</sub> | 1/2MS | 0.2                                    | 1.0                                  |
| G <sub>4</sub> | 1/2MS | 0.2                                    | 0                                    |

上生长 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、20、24 d 的外植体, 置解剖镜下进行解剖观察, 以判断愈伤组织的形成。

愈伤组织形成与分化的塑料半薄切片观察, 取在诱导培养基上培养 1、2、3、4、5、6、7、10、13、16、20、24 d 的外植体, 室温下用 FAA 固定 48 h, 70% 酒精冲洗 3 次, 依次在 70%、80%、90%、95% 系列浓度酒精脱水, 每次间隔 30 min, 然后转入中间渗透液中, 置 4 °C 冰箱中 1~2 d 后, 转入纯渗透液中在室温下渗透 1~7 d, 待材料呈半透明状时, 将其包埋切片, 切片厚度  $2\sim 3 \mu\text{m}$ 。0.1% 甲苯胺蓝染色 5 min, 待片子干燥后以中性树胶封片, 在 Leica DMRXA 自动显微镜下观察并拍照。

## 实验结果

### 1 食用稗成熟胚愈伤组织的诱导

观察了基本培养基、外源激素配比浓度和光照条件对食用稗成熟胚愈伤组织诱导的影响。在基本培养基为 B<sub>5</sub>、N<sub>6</sub> 及 MS 的 3 种诱导培养基上, 当 2,4-D 浓度为 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, N<sub>6</sub> 培养基上愈伤组织诱导率最高, 其次是 B<sub>5</sub>, MS 培养基上愈伤诱导率最低, 三者之间差异达显著水平 [ $F=13834.81$ ,  $F_{0.05(2,3)}=9.55$ ] (表 4)。在 B<sub>5</sub> 基本培养基上添加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 的愈伤诱导结果表明(表 5), 在 6 种激素组合中, 只添加 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D、不添加 6-BA 的 L<sub>5</sub> 培养基上愈伤组织的诱导率最高, 为 91.01%, 不同激素浓度组合的培养基愈伤组织诱导率的差异达显著水平 [ $F=63.87$ ,  $F_{0.05(3,4)}=6.59$ ]。说明添加相对高浓度的 2,4-D 有利于食用稗胚脱分化形成愈伤组织, 而添加 6-BA 则不利于食用稗胚愈伤组织的形成。此外, 将去稗种子接种在诱导培养基 L<sub>5</sub> 上, 分别置于暗培养和光照条件下培养。结果表明, 暗培养和光照条件下的愈伤组织诱导率分别是 91.01% 和 65.01%, 差异达显著水平 [ $F=241.71$ ,  $F_{0.05(1,2)}=18.5$ ], 表明暗培养条件有利于食用稗胚愈伤组织的形成。

表 4 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Influence of basic media on callus induction

| 培养基代号          | 基本培养基          | 愈伤诱导率/%                 |
|----------------|----------------|-------------------------|
| L <sub>1</sub> | N <sub>6</sub> | 94.49±0.06 <sup>a</sup> |
| L <sub>5</sub> | B <sub>5</sub> | 91.01±0.10 <sup>b</sup> |
| L <sub>2</sub> | MS             | 69.99±0.10 <sup>c</sup> |

不同字母表示差异显著。下表同此。

### 2 食用稗成熟胚愈伤组织的绿芽分化

**2.1 不同来源愈伤组织的绿芽分化** 将来源于不同诱导培养基上的愈伤组织接种到分化培养基 F<sub>1</sub> 上进行分化培养。由表 6 可见, 基本培养基不同的愈伤组织的绿芽分化率差异显著 [ $F=27.87$ ,  $F_{0.05(2,3)}=9.55$ ], 3 种基本培养基中, N<sub>6</sub> 培养基诱导的愈伤组织分化率最高, 表明该愈伤组织质量最好。

诱导培养基中的激素比对愈伤组织分化率的影响达显著水平 [ $F=83.77$ ,  $F_{0.05(5,6)}=4.39$ ] (表 7)。在基本培养基同为 B<sub>5</sub> 的 6 种激素浓度的诱导培养基

表 5 激素浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Influence of phytohormone on callus induction

| 培养基代号          | 2,4-D 浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 6-BA 浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 愈伤诱导率/%                  |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| L <sub>5</sub> | 3.0                         | 0                          | 91.01±0.10 <sup>a</sup>  |
| L <sub>4</sub> | 2.0                         | 0                          | 68.76±1.25 <sup>b</sup>  |
| L <sub>3</sub> | 1.0                         | 0                          | 65.41±2.75 <sup>bc</sup> |
| L <sub>7</sub> | 3.0                         | 0.5                        | 57.35±2.67 <sup>cd</sup> |
| L <sub>6</sub> | 3.0                         | 0.2                        | 54.48±1.15 <sup>d</sup>  |
| L <sub>8</sub> | 3.0                         | 1.0                        | 51.71±4.30 <sup>d</sup>  |

表 6 来自不同基本培养基的愈伤组织的绿芽分化

Table 6 Shoot differentiations of calli derived from different basic media

| 培养基代号          | 基本培养基          | 绿芽分化率/%                 |
|----------------|----------------|-------------------------|
| L <sub>1</sub> | N <sub>6</sub> | 15.74±1.02 <sup>a</sup> |
| L <sub>2</sub> | MS             | 9.42±1.02 <sup>b</sup>  |
| L <sub>5</sub> | B <sub>5</sub> | 5.51±0.43 <sup>c</sup>  |

中, 激素配比为 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基上来源的愈伤组织绿芽分化率最高。在不含 6-BA 的 3 种诱导培养基(L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>、L<sub>5</sub>)中, 含 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 的 L<sub>3</sub> 培养基上的愈伤组织分化率最高。表明诱导培养基的 2,4-D 浓度越高, 越不利于分化。然而在添加同样 2,4-D 和 6-BA 的 3 种培养基(L<sub>8</sub>、L<sub>7</sub>、L<sub>6</sub>)中, 含 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的 L<sub>8</sub> 培养基的分化率最高, 它与另外两种培养基的分化率之间的差异达显著水平。表明含有较高浓度 6-BA 的诱导培养基的愈伤组织分化能力强。尤其在含 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 的培养基中添加 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 能显著提高愈伤组织的分化率, 表明高浓度的 6-BA 能缓解 2,4-D 对分化的抑制作用。可见诱导愈伤组织

表 7 诱导培养基不同激素比对愈伤组织分化的影响

Table 7 Influence of different phytohormone components in induction media on shoot differentiations of calli

| 培养基代号          | 基本培养基          | 2,4-D 浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 6-BA 浓度/mg·L <sup>-1</sup> | 绿芽分化率/%                 |
|----------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| L <sub>8</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                         | 1.0                        | 15.31±0.82 <sup>a</sup> |
| L <sub>3</sub> | B <sub>5</sub> | 1.0                         | 0                          | 15.10±0.17 <sup>a</sup> |
| L <sub>7</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                         | 0.5                        | 6.43±0.76 <sup>b</sup>  |
| L <sub>4</sub> | B <sub>5</sub> | 2.0                         | 0                          | 5.85±0.11 <sup>b</sup>  |
| L <sub>5</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                         | 0                          | 5.51±0.43 <sup>b</sup>  |
| L <sub>6</sub> | B <sub>5</sub> | 3.0                         | 0.2                        | 3.66±0.76 <sup>c</sup>  |

时的基本培养基和激素配比均对所产生愈伤组织的绿芽分化产生影响。

在成熟胚愈伤组织诱导过程中,发现种子根和茎尖部位都会形成愈伤组织。将在培养基 $L_1$ 中种子根和茎尖部位的愈伤组织接种在分化培养基 $F_1$ 上进行绿芽分化。结果表明,茎尖所形成愈伤组织的分化率(36.41%)显著高于根的(5.31%) [ $F=208.69$ ,  $F_{0.05(1,2)}=18.5$ ],表明茎尖愈伤组织的质量比种子根的好,易于分化绿芽。

**2.2 外源激素对愈伤组织绿芽分化的影响** 将愈伤组织接种在不同激素配比的分化培养基 $F_1$ ~ $F_5$ 上进行绿芽分化。由表8可见,不同的激素对比对愈伤组织分化率的影响达显著水平 [ $F=122.58$ ,  $F_{0.05(4,5)}=5.19$ ]。5种培养基中,除 $F_4$ 和 $F_1$ 的分化率差异不显著外,其余分化率差异均达显著水平。 $F_2$ 培养基的分化率最高,达到8.71%。表明当分化培养基中激素配比为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA时最有利于芽的分化。

表8 分化培养基中激素对愈伤组织分化的影响

Table 8 Influence of phytohormones in regeneration media on shoot differentiation

| 培养基代号 | NAA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 6-BA 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 分化率/%            |
|-------|---------------------------------------|--|------------------|
| $F_2$ | 0.5                                   | 2.0                                    | $8.71\pm 0.55^a$ |
| $F_3$ | 0.5                                   | 3.0                                    | $4.22\pm 0.01^b$ |
| $F_4$ | 1.0                                   | 2.0                                    | $2.37\pm 0.22^c$ |
| $F_1$ | 0.5                                   | 1.0                                    | $2.22\pm 0.49^c$ |
| $F_5$ | 2.0                                   | 2.0                                    | $1.12\pm 0.03^d$ |

**2.3 外源激素和活性炭对生根的影响** 将高为3~4 cm的幼苗转至不同的生根培养基中诱导生根。在4种培养基中(表3),只有添加 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  AC的 $G_3$ 培养基上的幼苗有根长出,根分化率为86.75%。20 d左右可长出5 cm左右的1~6条根,炼苗2~3 d即可移栽。表明低浓度的生长素和适量活性炭有利于根的形成。

### 3 食用稗胚愈伤组织的形成过程

食用稗去稗种子接种到愈伤组织诱导培养基上后,1 d萌发出根;2 d萌发出芽。4~7 d根部出现水浸状物质,并逐渐覆盖整条根,胚轴两侧出现许多白色小颗粒状突起,并逐渐被水浸状物质所覆盖。10 d根及胚轴上的水浸状物质逐渐膨大,并

且逐渐转变成白色至浅黄色的颗粒,最终形成质量较差的愈伤组织。茎尖部位在10 d时开始膨大,膨大处有浅黄色小颗粒形成;20 d后这些小颗粒逐渐长大最终形成质量较好的愈伤组织(图1-a)。

### 4 食用稗胚愈伤组织发生的形态学变化

在解剖镜下进一步观察发现,外植体诱导培养2 d时,芽突破种皮,根伸长,根基部形成一团水浸状类似愈伤组织的细胞团。10 d时,该细胞团明显膨大,形成愈伤组织,其内部包裹一条或几条类似不定根的结构;茎尖部位形成圆周状膨大,并于膨大处出现半透明或淡黄色的不规则突起。16 d时水浸状的表层下逐渐形成淡黄色、质地脆软的颗粒状愈伤组织,内部包裹结构较为致密的白色小颗粒;茎尖部位膨大由水浸状变得较为干燥,并且形成白色至淡黄色的块状愈伤组织;24 d不定根周围的愈伤组织逐渐变多、长大,且易散落(图1-b、c);茎尖部位形成淡黄色愈伤组织,进一步解剖,发现内部包裹一条状物,条状物一端膨大形成鲜黄色结构致密的愈伤组织(图1-d、e)。

### 5 食用稗胚愈伤组织发生的细胞学变化

外植体诱导培养2 d后,胚芽萌发突破种皮,胚芽表皮下为不规则薄壁细胞,这些细胞失去了原来的结构和功能,成为具分生特性的细胞;胚根维管束周围细胞染色较深,细胞质浓厚,液泡化程度低,细胞核大且位于细胞中央,核仁明显,具双核仁,标志着细胞启动脱分化过程(图1-f)。3 d后,胚轴维管束周围形成分生细胞团(图2-a)。4 d后,根维管束附近的分生细胞团形成具有明显根冠组织的根原基,根原基背向维管束向外生长,逐渐突破表皮(图2-b)。6 d后,愈伤组织内部形成单细胞及多细胞原胚(图2-c),这些原胚一般情况下不能发育成熟。10 d后,胚根上的非胚性愈伤组织表皮处有根原基形成;茎尖分生区皮层深处的薄壁细胞和胚轴维管束鞘细胞细胞质变浓,细胞核变大且移至细胞中央,出现明显的核仁,液泡化程度降低,启动脱分化过程(图2-d、e)。13 d后,维管束周围形成的愈伤组织表皮处细胞质变浓,形成芽原基(图2-f)。表明芽原基的发生是外起源的,往往发生于愈伤组织的表面或近表面。

## 讨 论

有关稗属植物组织培养的研究报道不多。

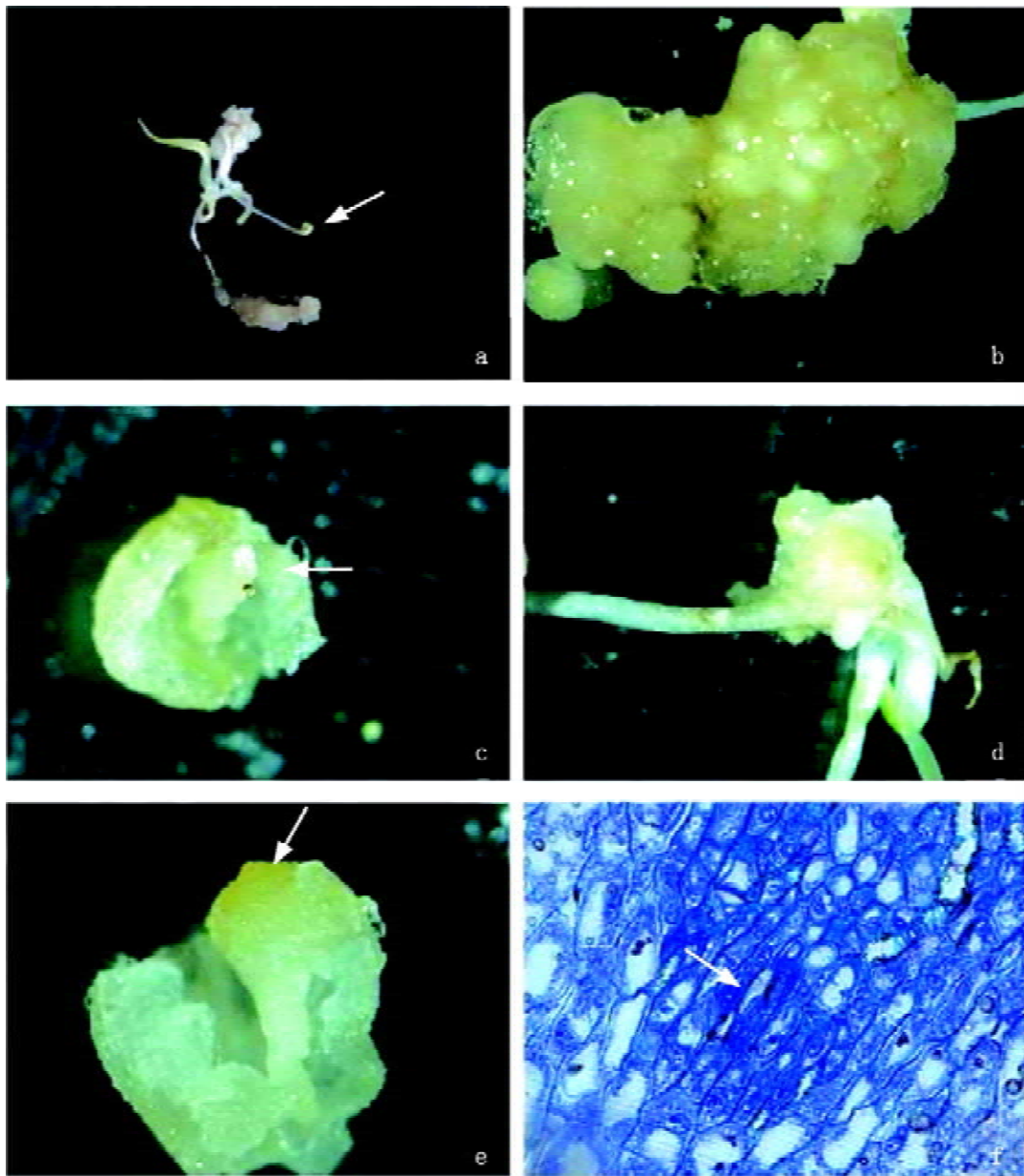


图1 食用稗成熟胚愈伤组织的形态及解剖结构

Fig.1 Morphology and anatomy structure of callus in matured embryos of *E. frumentacea*

a: 培养 40 d, 根及胚轴形成湿软的淡黄色愈伤组织, 同时茎尖部位形成乳白色、质地松脆的愈伤组织(箭头所示); b: 培养 24 d, 根及胚轴形成带有黏液的淡黄色颗粒状愈伤组织( $\times 10.65$ ); c: 培养 24 d, 根上颗粒状愈伤组织质地脆软, 内部包裹一条不定根(箭头所示,  $\times 37.5$ ); d: 培养 24 d, 淡黄色茎尖愈伤( $\times 10.65$ ); e: 培养 24 d, 茎尖愈伤内部包裹的金黄色愈伤组织(箭头所示,  $\times 37.5$ ); f: 培养 2 d 种子, 胚轴维管束鞘细胞启动(箭头所示,  $\times 400$ ).

Sankhla等(1992)以食用稗的幼穗作为外植体, 在添加  $3\sim 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D 的 MS 培养基上诱导产生出 3 种不同质地和结构的愈伤组织, 其中质地致密且透明状的愈伤组织形成了体细胞胚并分化出植株。光头稗(*E. colonum*)是食用稗的近缘野生种(Yamaguchi 等 2005), 由于其对重金属和其他逆

境胁迫具有较强的抗性, 因此成为育种家关注的重要资源之一。对其体细胞胚发生途径和器官再生途径的研究是提供利用体细胞融合和 DNA 重组技术将其抗性基因转入作物育种的重要基础。Samantaray等(1997)以光头稗的叶基和叶尖作为外植体诱导体细胞胚胎发生, 并再生出植株。而且叶



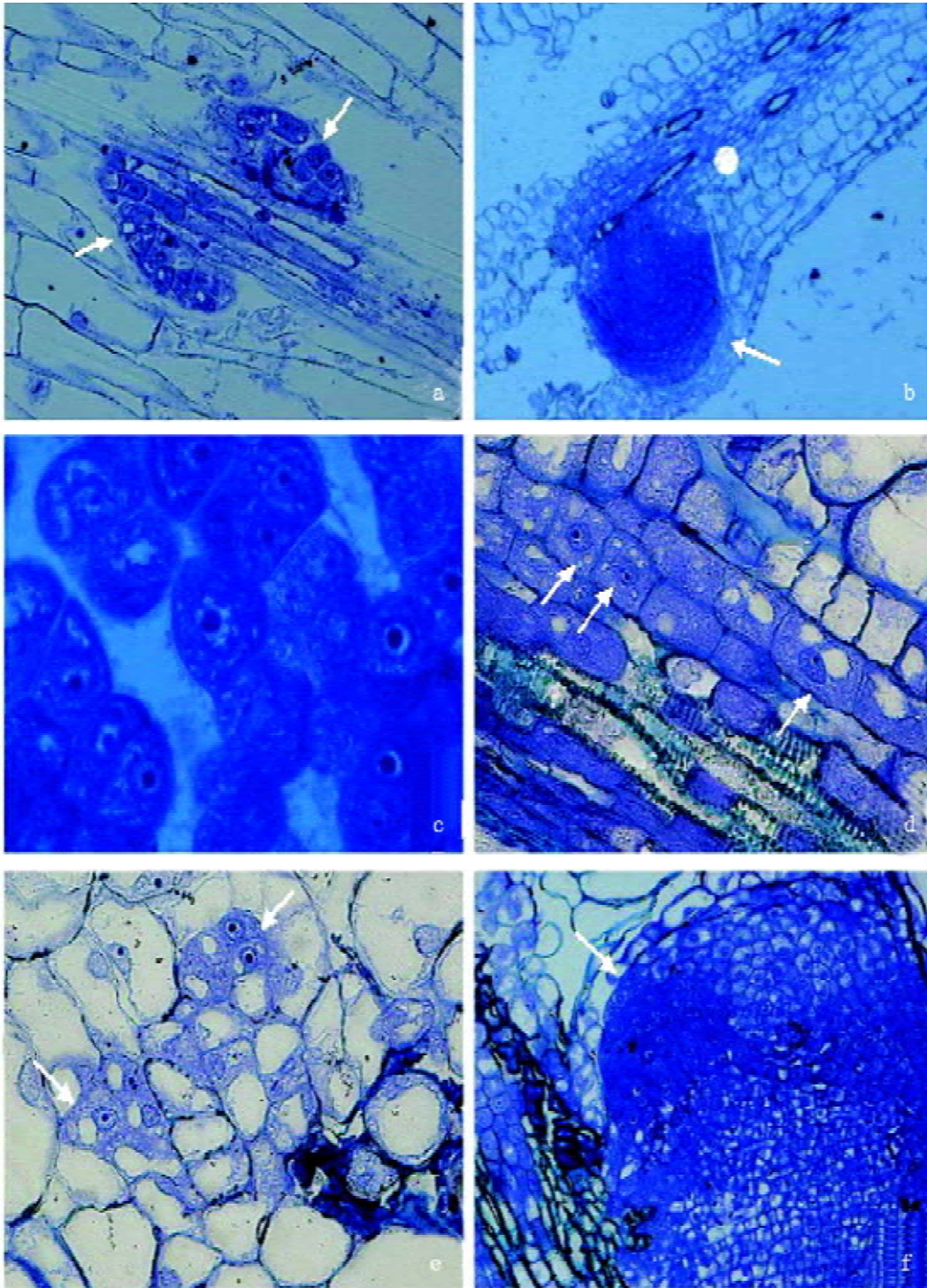


图2 食用稗胚愈伤组织的形成

Fig.2 Callus formation process of *E. fumentacea*

a: 培养 3 d, 胚轴维管束周围分生细胞团(箭头所示,  $\times 200$ ); b: 培养 4 d, 根维管束的分生细胞团形成具有明显根冠组织的根原基(箭头所示,  $\times 100$ ); c: 培养 6 d, 空腔内形成单细胞原胚、二细胞原胚和四细胞原胚( $\times 1000$ ); d: 培养 10 d, 茎尖胚轴维管束鞘细胞启动(箭头所示,  $\times 400$ ); e: 培养 10 d, 茎尖薄壁细胞启动(箭头所示,  $\times 400$ ); f: 培养 13 d, 愈伤组织表皮和下表皮细胞再次启动, 形成芽原基(箭头所示,  $\times 400$ )。

基比叶尖的体细胞胚产率高。证明了体细胞胚发生途径是光头稗离体培养再生植株的可行途径。

为了探明食用稗胚的组织培养特性, 本文对影响食用稗胚培养的因素进行了探讨, 并观察了组织培养过程中外植体的形态学和细胞学变化。结果表明在食用稗胚愈伤组织诱导时, 培养基成分对愈伤组织的形成有显著影响。最适宜采用的诱导培养基为  $N_6+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$ 。此外, 光照对愈伤组织诱导率的影响显著, 暗培养条件下诱导率明显高于光照培养诱导率。诱导培养基显著影响愈伤组织的质量, 而芽分化率受愈伤组织质量的影响。3种基本培养基中,  $N_6+3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$  培养基诱导出的愈伤组织的分化率最高。基本培养基同为  $B_5$  的6种激素配比中,  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}$  诱导出的愈伤组织的分化率最高。生长于外植体不同部位的愈伤组织的分化率也有显著差异, 茎尖愈伤组织的分化率比根的高。外源激素对愈伤组织分化率的影响也很显著, 基本培养基同为  $N_6$  的5种激素配比中,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}+2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}$  的分化率最高。活性炭和NAA对组培苗的生根均有显著影响, 最佳的生根培养基为  $1/2\text{MS}+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}+1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{AC}$ , 不添加活性炭或NAA浓度过高都不能形成根。

胚根及胚轴主要形成非胚性愈伤组织, 很少能够分化成苗。茎尖部位形成2种愈伤组织, 一种是结构致密、质地坚硬的块状愈伤组织, 另一种是介于块状和颗粒状之间的愈伤组织。这两种愈伤组

织都是较易分化的胚性愈伤组织。食用稗的胚根及胚轴愈伤组织由维管束鞘细胞启动分裂形成, 茎尖愈伤组织由维管束鞘细胞和周围薄壁细胞分裂形成。食用稗的愈伤组织器官建成途径倾向于以不定芽途径再生植株。芽原基起源于愈伤组织的表皮和下表皮细胞, 为外起源; 根原基形成于维管束鞘细胞或表皮和下表皮细胞, 因此根原基为内外起源兼有。

### 参考文献

- 万力生, 耿本仁(1988). 湖南稗子的叶片特征与高产性能. 中国草业科学, 5 (5): 14~16
- 王金明, 丁在松, 张桂芳, 赵明(2007). 家稗丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK)基因的克隆及序列分析. 作物学报, 33 (6): 927~930
- 王锁民, 沈禹颖, 朱兴运(1995). 湖南稗子离子吸收与分配特性研究. 草业学报, 4 (2): 71~74
- 张彬, 丁在松, 张桂芳, 石云鹭, 王金明, 方立锋, 郭志江, 赵明(2007). 根癌农杆菌介导获得稗草 *Ecppc* 转基因小麦的研究. 作物学报, 33 (3): 356~362
- Samantaray S, Rout GR, Das R (1997). Regeneration of plants via somatic embryogenesis from leaf base and leaf tip segments of *Echinochloa colona*. Plant Cell Tiss Org Cult, 47: 119~125
- Sankhla A, Davis TD, Sankhla D, Sankhla N, Upadhyaya A, Joshi S (1992). Influence of growth regulators on somatic embryogenesis, plantlet regeneration and post-transplant survival of *Echinochloa frumentacea*. Plant Cell Rep, 11 (7): 368~371
- Yamaguchi H, Utano A, Yasuda K, Yano A, Soejima A (2005). A molecular phylogeny of wild and cultivated *Echinochloa* in East Asia inferred from non-coding region sequences of *trn* T-L-F. Weed Biol Manag, 5: 210~218