

甜高粱离体再生体系的建立和组织结构变化的观察

徐丹, 陈立余, 徐子勤*

西北大学生命科学学院, 西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069

摘要: 以甜高粱成熟种子为外植体, 调节不同生长调节物质配比建立甜高粱离体再生体系。结果表明在MS+2.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.3 mg·L⁻¹ KT培养基上愈伤组织的诱导率可达77.26%; 比较不同浓度6-BA或TDZ与NAA配合诱导愈伤组织分化和苗形成的情况, TDZ的作用优于6-BA。观察培养组织的结构变化发现, 甜高粱离体再生过程中除了体细胞胚发生途径之外, 还伴随有器官发生途径。

关键词: 甜高粱; 植株再生; 体细胞胚发生; 器官发生

In vitro Regeneration and Histological Observation in Sweet Sorghum

XU Dan, CHEN Li-Yu, XU Zi-Qin*

Provincial Key Laboratory of Biotechnology of Shaanxi, Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: *In vitro* regeneration system of sweet sorghum was established in the present work. Mature seeds were adopted as explants. Various combinations of plant hormones were applied for callus induction and differentiation. The callus induction rate could reach 77.26% on MS medium supplemented with 2.5 mg·L⁻¹ 2,4-D and 0.3 mg·L⁻¹ KT. TDZ had better effect on regeneration of plantlets than 6-BA when combined with NAA, respectively. Histological analysis revealed that both somatic embryogenesis and organogenesis existed in the process of *in vitro* regeneration in sweet sorghum.

Key words: sweet sorghum; plant regeneration; somatic embryogenesis; organogenesis

甜高粱也叫“二代甘蔗”, 是普通粒用高粱(*Sorghum bicolor*)的一个变种。它起源于非洲, 有着5 000多年的栽培历史。甜高粱的光合效率是大豆、甜菜和小麦等作物的2~3倍。其茎秆生产的酒精超过木薯和玉米近一倍以上, 比甘蔗还能多产乙醇1 400 L·hm⁻², 是最具优势的能源作物(张志鹏等2005)。但是, 大多数甜高粱品种都存在不同程度的茎秆倒伏等问题, 不同品种之间的耐盐、耐旱特性也有很大差别。近年来随着植物生理学和分子生物学研究的深入, 利用转基因技术已经可以培育出具有抗倒伏、耐盐、耐旱和抗病虫害等优良性状的品种。遗传转化的成功依赖于有效的再生体系。与其它植物相比, 高粱通过离体培养途径获得再生植株相对比较困难, 且分化率较低(白志良等1995; 石太渊2003; Cai等1987), 甜高粱离体再生的报道也比较少(阳立恒等2008; 赵利铭等2008)。本文以甜高粱成熟种子为外植体, 建立了甜高粱离体再生体系, 并通过组织学观察, 分析了其再生途径。

材料与amp;方法

甜高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Meonch]品种

‘喜利普’种子购自陕西金道子公司。成熟种子用流水冲洗2 h, 用70%酒精消毒1~2 min, 无菌水冲洗2次; 再用0.1%升汞消毒13~15 min, 无菌水冲洗4~5次, 将籽粒横切后切口朝下接种在愈伤组织诱导培养基上进行暗培养, 一个月后统计愈伤组织诱导率, 按公式愈伤组织诱导率(%)=(产生良好愈伤组织块数/接种的外植体个数)×100%计算。将继代培养的愈伤组织转接于分化培养基上, 30天后统计分化率, 按公式分化率(%)=(分化出完整植株的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100%计算。上述培养基均添加3%蔗糖和0.8%琼脂, pH 5.8~6.2。愈伤组织诱导在暗处进行; 愈伤组织继代和分化在12 h·d⁻¹光照周期下进行, 光照强度约50 μmol·m⁻²·s⁻¹, 培养温度(25±2) °C。将愈伤组织用70%FAA(福尔马林-醋酸-酒精)固定, 常规石蜡切片法包埋, 切片厚度为8 μm, 番红固绿对染, 中性树胶封片, 在

收稿 2009-03-13 修定 2009-05-06

资助 国家自然科学基金(30870194)、陕西省自然科学基金(2006C103)、陕西省重点实验室科研计划(04JS07, 08JZ70)和陕西省教育厅科研计划(05JK304, 08JK466)。

* 通讯作者(E-mail: ziqinxu@163.com; Tel: 029-88303484)。

光学显微镜下观察拍照。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导与继代培养

实验发现在单独使用 2,4-D 时, 低浓度的 2,4-D 主要产生结构紧密、坚硬、不易分开, 表面有条状突起的 I 型愈伤组织。随着 2,4-D 浓度的升高, 形成结构松散、易碎, 呈白色或淡黄色, 有明显的颗粒状结构的 II 型愈伤组织。在 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 条件下 II 型愈伤组织诱导率达到 63.6%, 当 2,4-D 浓度升高到 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 外植体的 II 型愈伤组织诱导率反而降低, 其主要原因可能是随着 2,4-D 浓度的升高, 白色透明或半透明粘软或水浸状的 III 型愈伤组织比例增加, 且容易褐化。此外 2,4-D 配合一定浓度的 KT 能提高愈伤组织诱导率。在 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 配比的培养基上愈伤组织诱导率可以达到 77.26% (表 1), 且大部分为 II 型。将 II 型愈伤组织转接于继代培养基上, 1~2 周后产生大量的黄色愈伤组织。

2 愈伤组织分化和苗的形成

将继代培养过程中生长状态良好的 II 型愈伤组织接种于分化培养基上, 30 天后分化出少量芽点, 进一步长出子叶和根。为研究不同植物生长调节物质对比对植株分化的影响, 用不同浓度的 6-BA 或 TDZ 分别与一定比例的 NAA 配伍, 诱导苗形成。结果显示, TDZ 配合 NAA 的效果优于 6-BA 配合 NAA (表 2)。

3 形态学和组织学观察

最初接种的种子萌发长出幼苗, 苗的基部发生膨大, 形成大量的瘤状突起(图 1-a)。分生细胞团

表 1 不同植物生长调节物质组合对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different combinations of plant growth regulators on callus induction

| 植物生长调节物质 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | II 型愈伤组织诱导率 /% |
|--|-----|----------------|
| 2,4-D | KT | |
| 0.5 | 0 | 27.30±9.10 |
| 1.0 | 0 | 34.87±2.66 |
| 2.0 | 0 | 54.53±9.05 |
| 2.5 | 0 | 63.60±9.10 |
| 3.0 | 0 | 53.03±6.92 |
| 4.0 | 0 | 43.97±6.93 |
| 2.0 | 0.5 | 42.43±9.48 |
| 2.0 | 0.3 | 65.13±6.93 |
| 2.0 | 0.1 | 57.60±11.42 |
| 2.5 | 0.5 | 56.03±2.67 |
| 2.5 | 0.3 | 77.26±4.55 |
| 2.5 | 0.1 | 65.13±2.66 |

表面光滑, 呈淡黄色, 结构松散、易碎, 呈明显的颗粒状(图 1-b)。随着多细胞原胚的细胞分裂, 胚体逐渐增大呈圆球形(图 1-c)。晚期的球形胚由于胚体拉长而呈梨形, 也称梨形胚(图 1-d)。梨形胚进一步分化, 在其顶端或一侧出现凹沟, 标志着胚体分化开始(Nonohay 等 1999) (图 1-e、f)。凹沟一侧的细胞分裂迅速, 形成突起而成为盾片胚, 分化出胚芽胚根等结构, 最后分化出子叶(图 1-g), 形成完整的植株(图 1-h)。

为了进一步证实甜高粱离体再生的途径, 将各阶段材料进行切片观察。结果表明, 脱分化细胞细胞核大, 并位于细胞中央, 细胞质浓厚, 细胞体积小; 而分化细胞呈无规则状态, 细胞体积大, 核小, 胞质稀少。体细胞胚既可以起源于外层细胞(图 2-

表 2 不同植物生长调节物质的对比对植株分化的影响

Table 2 Effects of different combinations of plant growth regulators on plant regeneration

| 植物生长调节物质 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | 苗的分化率 /% | 分化情况 |
|--|-----|-----|------------|---------------------------|
| 6-BA | TDZ | NAA | | |
| 0.5 | 0 | 0 | 0 | 少量根, 未分化出苗, 愈伤组织严重褐化 |
| 0.5 | 0 | 0.1 | 6.8±3.25 | 长出少量根并分化出少量苗, 愈伤组织中度褐化 |
| 1.0 | 0 | 0 | 0 | 大量根, 未分化出苗, 愈伤组织长出许多白色毛状物 |
| 1.0 | 0 | 0.1 | 13.7±6.43 | 大量根, 并分化出少量苗, 愈伤组织中度褐化 |
| 0 | 0.5 | 0 | 0 | 少量根, 愈伤组织严重褐化, 未分化出苗 |
| 0 | 0.5 | 0.1 | 18.2±12.87 | 少量根, 分化出苗, 愈伤组织轻微褐化 |
| 0 | 1.0 | 0 | 0 | 少量根, 未分化出苗, 愈伤组织长出许多白色毛状物 |
| 0 | 1.0 | 0.1 | 22.8±6.43 | 少量根, 分化出苗, 愈伤组织轻微褐化 |

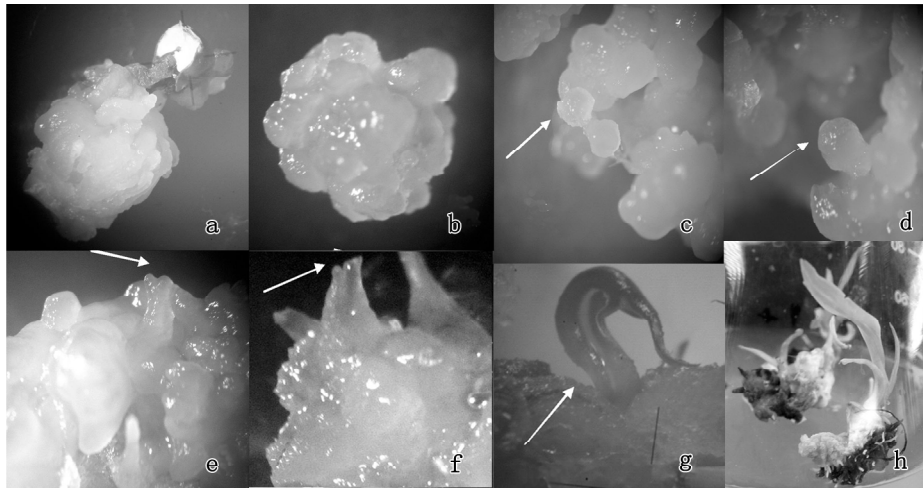


图1 甜高粱离体再生过程

Fig.1 Process of regeneration of sweet sorghum

a: 瘤状愈伤组织; b: 愈伤组织的表面结构; c: 球形胚状体类似结构(箭头所示); d: 梨形胚类似结构(箭头所示); e、f: 胚状体进一步分化, 在顶端出现凹沟(箭头所示); g: 分化培养基上形成的绿色芽点; h: 完整植株的形成。

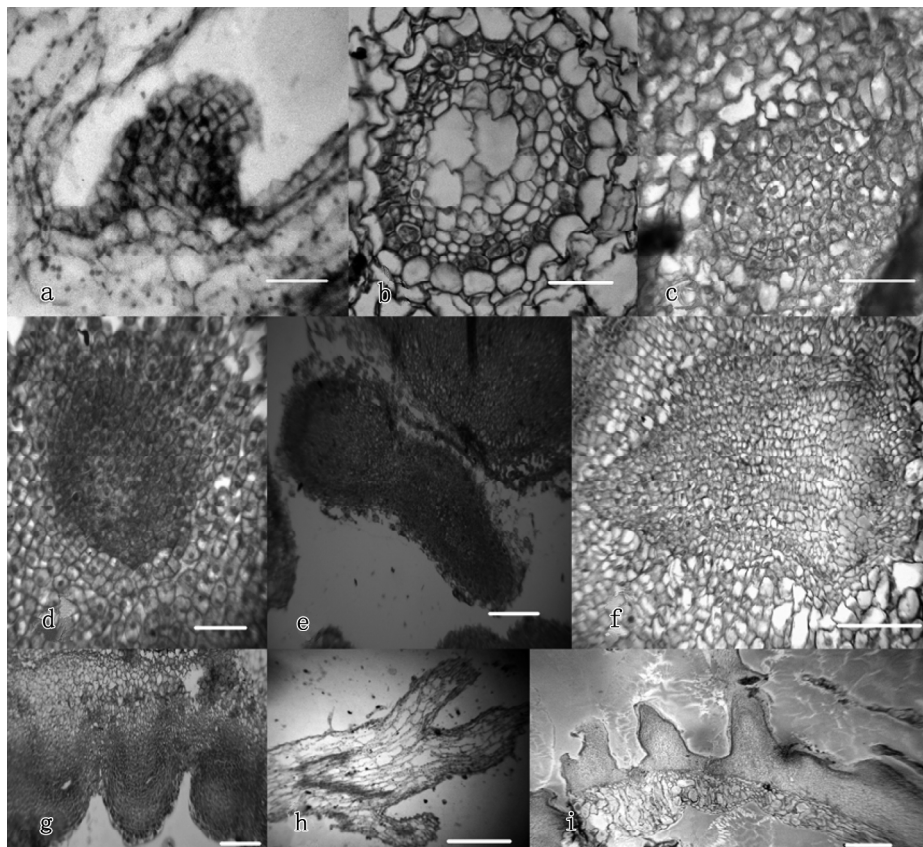


图2 甜高粱离体再生中体细胞胚和器官发生的组织学观察

Fig.2 Histological observation of somatic embryogenesis and organogenesis in sweet sorghum

a: 体细胞胚起源于愈伤组织外层细胞(bar=100 μm); b: 体细胞胚起源于愈伤组织内层细胞(bar=100 μm); c: 球形胚(bar=100 μm); d: 梨形胚(bar=100 μm); e: 分化出根原基和芽原基(bar=100 μm); f: 一个胚根多个胚芽的胚状体(bar=200 μm); g: 不定芽纵切面(bar=500 μm); h: 较为成熟的芽结构(bar=500 μm); i: 不定根的纵切面(bar=600 μm)。

a), 也可以起源于内部细胞(图 2-b)。从分生组织可以形成球形胚, 球形胚呈辐射对称, 细胞核大, 核仁明显, 细胞质浓厚(图 2-c)。球形胚进一步拉长形成梨形胚, 这时胚体周围的细胞逐渐趋于解离(图 2-d)。梨形胚进一步分化形成胚芽和胚根, 胚体开始形成根原基和芽原基(图 2-e)。同时还存在几个胚芽端共用一个胚根端的连体胚(图 2-f)。甜高粱离体再生除主要采用体细胞胚发生途径外, 还伴随有器官发生途径。愈伤组织表层细胞比内层更易接触诱导因子因而优先分化, 分化时细胞经平周分裂和垂周分裂形成突起, 出现生长点并由此分化出芽原基(图 2-g)。芽原基进一步分化形成较为完整的芽结构(图 2-h)。由于一定浓度生长调节物质的影响, 在愈伤组织表面分化出了很多不定根, 这些不定根发育良好并有根冠结构(图2-i); 但是这种根不能与芽通过维管组织相连, 而且会抑制芽的生长,

很难再生出完整植株。

参考文献

- 白志良, 王良群, 郑丽萍, 李爱军, 王丰林(1995). 高粱不同外植体离体培养. 华北农学报, 10 (1): 60~63
- 石太渊(2003). 高粱组织培养研究进展. 杂粮作物, 23 (6): 340~343
- 阳立恒, 郝秀英, 任磊, 曲延英, 康喜亮, 张蜀敏, 曹玉锦, 刘传军 (2008). 新疆甜高粱愈伤组织诱导及影响增殖的因素. 大麦与谷类科学, (1): 12~14
- 张志鹏, 杨镇, 朱凯, 王艳秋, 刘影(2005). 可再生能源作物——甜高粱的开发利用. 杂粮作物, 25 (5): 334~335
- 赵利铭, 刘树君, 宋松泉(2008). 甜高粱再生体系的建立. 植物学通报, 25 (4): 465~468
- Cai T, Daly B, Butler L (1987). Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 9: 245~252
- Nonohay JS, Mariath JEA, Winge H (1999). Histological analysis of somatic embryogenesis in Brazilian cultivars of barley, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae. *Plant Cell Rep*, 18: 929~934