

## 大蕉(*Musa paradisiaca* ABB Linn.)花序愈伤组织的诱导及其体细胞胚发生

李哲 黄霞 李筱菊 黄学林\*

中山大学生命科学院, 广州 510275

**提要** 大蕉未成熟雄花接种到胚性愈伤组织诱导培养基中, 4~5个月后可诱导出胚性愈伤组织, 并可在继代培养基上增殖。胚性愈伤组织转移到体细胞胚诱导培养基中可诱导出体细胞胚。体细胞胚在成熟培养基上培养2个月后转移到含有 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA的分化培养基上可以萌发, 进而形成再生植株。组织学切片证明所诱导的愈伤组织是胚性组织, 其所产生的体胚具有典型的单子叶植物体细胞胚的组织结构。

**关键词** 大蕉; 胚性愈伤组织; 体细胞胚发生; 植株再生

## Callus Induction and Somatic Embryogenesis from Inflorescences of *Musa paradisiaca* ABB Linn.

LI Zhe, HUANG Xia, LI Xiao-Ju, HUANG Xue-Lin\*

School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

**Abstract** Immature male flowers of *Musa paradisiaca* ABB Linn. were inoculated on embryogenic callus induction media. Yellow granular calli emerged after 4–5 months were shown to be embryogenic calli. The embryogenic calli could be proliferated on the subculture medium. Somatic embryos could be induced after the embryogenic calli were transplanted on somatic embryo induction medium. Somatic embryos were cultured on the maturation medium for 2 months and were germinated on the differentiation medium containing  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA. A plantlet had been obtained. Histological sections proved that the embryos had a typical histological structure of monocot somatic embryos.

**Key words** *Musa paradisiaca* ABB Linn.; embryogenic callus; somatic embryogenesis; plant regeneration

目前, 香蕉生产受到病虫害的严重威胁, 如何进行香蕉品种改良是生产实践中迫切需要解决的问题。香蕉栽培品种多为三倍体, 具高度不育性, 采用传统的杂交育种方法难于改良品种, 而采用植物组织和基因工程等生物技术可望有助于解决这一问题。建立胚性细胞悬浮系及其植株再生体系是香蕉生物技术育种的前提。一般认为, 以香蕉花序为外植体, 通过体细胞胚发生途径再生植株, 是目前较有效和重复性最好的培养体系, 已在较多栽培品种中获得成功<sup>[1~4]</sup>。但花序外植体的胚性反应低(通常低于5%), 同时, 这一反应随脱离母株后的时间延长而逐渐下降; 所得的胚性愈伤组织也只有20%~50%能建立胚性细胞悬浮系(embryogenic cell suspension, ECS); 而且体细胞胚的萌发率和植株再生率也低<sup>[5]</sup>; 实验周期长, 通常需10~18个月。因此, 这一实验体系仍有待进一步完善和研究。

迄今为止, 还未见有用ABB型香蕉品种通过

未成熟雄花培养经体细胞胚发生得到再生植株的报道。大蕉是国内香蕉主要栽培品种, 本文用其未成熟雄花诱导胚性愈伤组织, 探索体细胞胚发生和植株再生的条件。

### 材料与amp;方法

大蕉(*Musa paradisiaca* ABB Linn.)花序取自南亚热带作物研究所蕉园(从假茎抽出约1个月)。除去外部的花和苞片, 剩下约5 cm的尖端, 于超净工作台上用75%酒精消毒, 无菌水冲洗。在无菌条件下继续解剖。取末端15梳雄花梳(图1-a)为外植体。

培养基有: (1)愈伤组织诱导培养基参考文献

收稿 2005-03-01 修订 2005-06-20

资助 国家自然科学基金(30400287)、广东省自然科学基金(011126和04300538)、广东省科技攻关项目(2KM0331DN)。

\*通讯作者(E-mail: ls17@zsu.edu.cn, Tel: 020-84110797)。

1和2的方法,以MS为基本培养基,添加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 生物素、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉。进行生长素诱导愈伤组织的实验时,加入浓度分别为0、2、4和 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2,4-D, pH 5.8。每种培养基接入12个花蕾上的未成熟雄花,每个花蕾取末端15梳雄花梳为外植体,即每种培养基共接入180梳未成熟雄花梳,每5梳雄花梳接入1瓶培养基。愈伤组织诱导和继代培养在黑暗条件下进行。(2)胚性愈伤组织继代培养基<sup>[3]</sup>为:1/2MS大量元素,MS微量元素及有机物,加入 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 生物素、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Gelrite, pH 5.8。(3)体细胞胚诱导培养基<sup>[6]</sup>为:1/2MS大量元素,MS微量元素及有机物,均加入 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米素、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Gelrite, pH 5.8。为研究生长素对体胚诱导的作用,分别加入浓度为0、0.2、0.5、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2,4-D。每种培养基各接入80块胚性愈伤组织,每5块胚性愈伤组织接入1瓶培养基。在 $28^\circ\text{C}$ 光照下培养,光照度为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期(白天/黑夜)为16 h/8 h。(4)体细胞胚成熟培养基<sup>[1,3]</sup>为:SH大量元素,MS微量元素和有机物,加入 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 生物素、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 麦芽提取物、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素、 $0.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米素、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $45\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Gelrite, pH 5.8。(5)体胚萌发培养基参考文献1和7的方法,把成熟体细胞胚接入体胚萌发培养基上,分别设计了以1/2MS为基本成,加入浓度为0、0.05、0.2、0.5、1、2、4、7、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA浓度以及不加生长调节物质的体胚萌发培养基。在 $28^\circ\text{C}$ 光照下培养,其中体胚诱导和成熟培养时光照度均为 $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,体胚萌时光照度为 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

取体胚发生各阶段的培养物用FAA固定液固定,按常规石蜡切片法切片<sup>[8]</sup>,切片厚 $6\sim 8\text{ }\mu\text{m}$ ,苏木精染色(铁矾分色),显微观察摄影。

## 实验结果

### 1 2,4-D对大蕉胚性愈伤组织诱导的影响

大蕉幼雄花在浓度分别为4和 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的愈伤组织诱导培养基中暗培养,4~5个月可诱导出呈黄色颗粒状的愈伤组织。此种愈伤组织在

继代培养过程中每50 d可增殖2~3倍。愈伤组织呈黄色颗粒状,较湿而粘,用镊子很容易将各部分分离(图1-b)。切片观察表明,愈伤组织特化结构中有分生细胞团,由细胞核大、细胞质浓厚的胚性细胞组成(图1-g),表明它们是胚性愈伤组织。在含有 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基中,从180块外植体中诱导出13块胚性愈伤组织,诱导率为7.2%;在含 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基中,从180块外植体中诱导出9块胚性愈伤组织,诱导率为5.0%;2,4-D浓度低于 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不能诱导出胚性愈伤组织。

### 2 2,4-D对体细胞胚诱导的影响

大蕉胚性愈伤组织培养于体细胞胚诱导培养基(都含 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米素)中,在含有 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基中,70 d可诱导出体细胞胚,发生率为11.3%;2,4-D的浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,体细胞胚发生率为5%;2,4-D低于 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 不利于大蕉体细胞胚诱导。体细胞胚容易从其所着生的胚性愈伤组织上剥落下来(图1-c)。

### 3 体胚成熟培养和分化

体胚的萌发与6-BA浓度有关。把成熟体细胞胚分别转入不加生长调节物质的和分别含有0、0.05、0.2、0.5、1、2、4、7、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的分化培养基中,只有在含 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的分化培养基中培养70 d的体胚能萌发,幼叶逐渐展开变绿,35 d时形成再生植株(图1-d~f)。

组织切片显示它有典型的单子叶的体胚结构,可观察到其中的茎端分生组织和根端分生组织(图1-h,箭头所示)。

## 讨 论

本文结果表明,大蕉花序末端第1~15梳未成熟雄花培养5~6个月可以诱导出胚性愈伤组织。一般来说,未成熟雄花越幼嫩,诱导胚性愈伤组织的效果越好。当花序抽出大蕉假茎约1个月时,及时摘取材料和消毒接种,可以提高胚性愈伤组织发生率。胚性愈伤组织诱导培养基中的2,4-D浓度为 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于从幼雄花诱导出胚性愈伤组织。胚性愈伤组织在含有 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 玉米素的培养基中,培养70 d可以诱导出体细胞胚。这表明2,4-D对诱导大蕉胚性

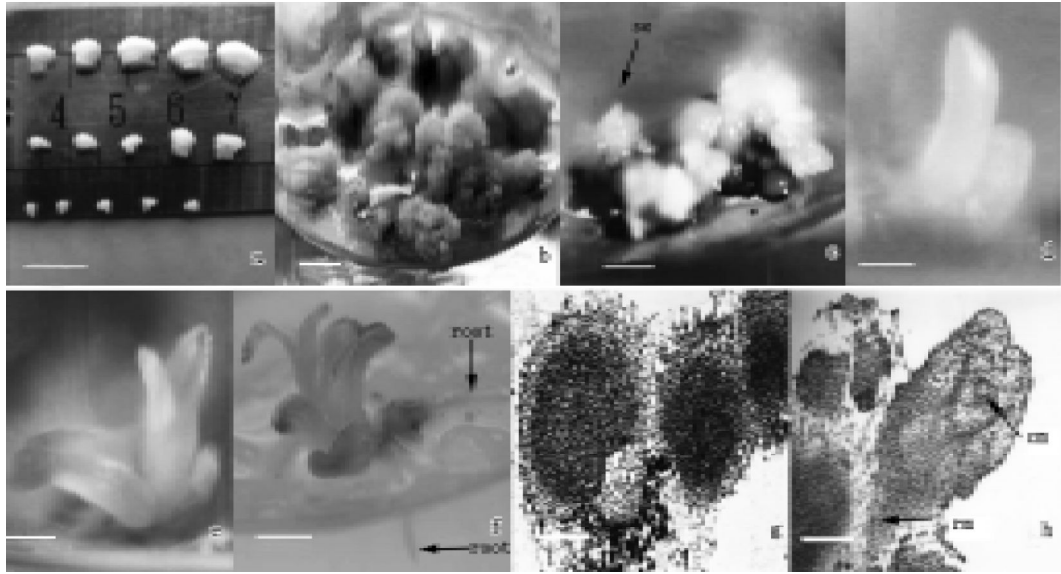


图1 大蕉未成熟雄花胚性愈伤组织诱导和体细胞胚发生

Fig. 1 Induction of embryogenic callus and somatic embryogenesis from immature male flowers of *M. paradisiaca*

a: 用于接种的大蕉花序末端第1~15梳未成熟雄花梳; b: 大蕉未成熟雄花胚性愈伤组织在继代培养基中培养40 d时的生长情况; c: 胚性愈伤组织在体细胞胚诱导培养基上培养70 d时形成的体细胞胚(箭头所示); d: 成熟体细胞胚在萌发培养基上培养70 d时萌发; e: 体细胞胚萌发后抽出小叶(萌发后第21天); f: 体细胞胚形成的完整植株(萌发后第35天); g: 大蕉未成熟雄花胚性愈伤组织在继代培养基中培养40 d时的组织切片, 示分生细胞团( $\times 200$ ); h: 大蕉体细胞胚在成熟培养基上培养60 d时的切片( $\times 100$ )。se: 体细胞胚; cm: 茎端分生组织; rm: 根端分生组织。线段分别表示150(g)、300(h)、3000(c、d)、5000(e)、10000(a、b、f) mm。

愈伤组织形成和体细胞胚发生来说是重要的生长调节物质。体细胞胚在成熟培养基中经60 d培养, 诱导成熟后, 转移到含有 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的1/2MS分化培养基中, 培养70 d能萌发, 进而形成再生植株。

2, 4-D诱导体胚的机制了解得尚不十分清楚。Loschiavo等<sup>[9]</sup>观察到, 2, 4-D浓度与核DNA甲基化有关。当胡萝卜悬浮培养物在含高浓度的2, 4-D的培养条件下, 其细胞核DNA甲基化从16%增加到45%。核DNA甲基化增加, 表明基因表达活性下降; 当不加2, 4-D或降低其浓度时, 核DNA便甲基化不足, 因而激活相应的基因表达。这些基因的表达对细胞获得胚性能力看来是有作用的, 其中机制有待探讨。

#### 参考文献

- Côte FX, Domergue R, Monmarson S et al. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand Nain. *Physiol Plant*, 1996, 97: 285~290
- Grapin A, Schwendiman J, Teisson C. Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1996, 32: 66~71
- Navarro C, Escobedo RM, Mayo A. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1997, 51(1): 17~25
- 魏岳荣, 黄学林, 李佳等. 贡蕉胚性细胞悬浮系的建立和植株再生. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 58~65
- Schoofs H, Panis B, Strosse H. Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis. *InfoMusa*, 1999, 8(2): 3~7
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B et al. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking Banana cv. Bluggoe (*Musa* spp. ABB group). *Fruits*, 1991, 46(2): 125~135
- Panis B, Warwe Van A, Swennen R. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 403~407
- 郑国钊, 谷祝平. *生物显微技术*. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1992. 381~383
- Loschiavo F, Pitto L, Giuliano G et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*, 1989, 77: 325~331