

从香蕉胚性细胞悬浮系获得再生植株

徐春香* 陈厚彬 李建国 张海岚 彭国康 梁铨荣

华南农业大学园艺学院热带亚热带果树研究室, 广州 510642

提要 2个主栽香蕉品种的未成熟雄花诱导产生的胚性愈伤组织接种至液体培养基中, 经3~4个月的继代培养后长成质地均匀的胚性细胞悬浮系(ECS), 悬浮系中60%~80%是胚性细胞团。ECS接种至体胚再生培养基上约4~5周后开始出现再生体胚, 萌发的体胚以MS培养基培养后可获得再生植株。

关键词 香蕉; 胚性细胞悬浮系; 植株再生

Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension of Banana

XU Chun-Xiang*, CHEN Hou-Bin, LI Jian-Guo, ZHANG Hai-Lan, PENG Guo-Kang, LIANG Quan-Rong

Tropical and Subtropical Fruit Research Laboratory, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642

Abstract Embryogenic calli derived from immature flowers of 2 banana cultivars (*Musa* spp., AAA Group) widely grown in China were used to establish embryogenic cell suspension (ECS). ECS was obtained after continuous subculture and selection for 3~4 months, in which about 60%~80% was embryogenic cell aggregates. Regenerable somatic embryos emerged after the ECS was cultured on somatic embryo regeneration medium for 4~5 weeks. Banana regenerated plants were obtained after the germinated somatic embryos were transferred to MS medium.

Key words banana; embryogenic cell suspension; plant regeneration

香蕉(*Musa* spp.)的主要栽培品种均为3倍体, 具高度不育性和单性结实特点。长期以来生产中均采用简单的无性繁殖方式繁育后代, 少有遗传变异性, 因而有必要采用基因工程技术改变这一状况而提高香蕉的种质水平。通过体胚发生途径从胚性细胞悬浮系(embryogenic cell suspension, ECS)获得再生植株是香蕉进行遗传转化的基础^[1]。香蕉是一种胚性愈伤组织诱导率很低的作物, 尤其是我国主栽香蕉品种所属的Cavendish(卡文迪许)亚组^[2], 品种间差异又大^[2~6], 建立ECS耗时长^[2], 植株再生率也不高^[2~6], 到目前为止仅少数品种通过ECS获得了再生植株^[3~6]。我国研究香蕉胚性细胞培养的不多, 虽有通过体胚发生途径获得再生香蕉植株的报道^[7~9], 但没有获得胚性愈伤组织, 也未采用ECS。为了奠定这方面的基础, 我们建立了2个我国主栽香蕉品种的ECS, 并通过体胚发生途径获得再生植株, 现报道如下。

材料与amp;方法

实验材料为我国目前广泛种植的香蕉(*Musa* spp., AAA Group)品种“巴西蕉”和“威廉

斯”, 采自广东省番禺。花序顶端幼嫩的雄花经常规灭菌后, 接种于MI诱导培养基(MS^[10]+2, 4-D 6 mg·L⁻¹+生物素1 mg·L⁻¹+IAA 1 mg·L⁻¹+NAA 1 mg·L⁻¹+麦芽抽提物100 mg·L⁻¹+谷氨酰胺100 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉6.5 g·L⁻¹)上进行暗培养。每处理设5次重复, 每重复200排雄花。4~5个月后, 调查分生小球体(meristematic globules)及胚性愈伤组织的诱导率。将获得的胚性愈伤组织接种在含有适量ZZ^[3]液体培养基(1/2MS+2, 4-D 1.1 mg·L⁻¹+玉米素0.23 mg·L⁻¹+抗坏血酸10 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹)的三角瓶中, 置于转速为100 r·min⁻¹的摇床上光培养。接种初期每周继代1次, 建立好的ECS每10 d继代1次。植株再生时先将悬浮液置于RD1^[3]培养基(1/2MS+肌醇100 mg·L⁻¹+抗坏血酸10 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉7 g·L⁻¹)上光培养, 以促进体胚的再生。3个月后取样(3次重复),

收稿 2003-05-19 修定 2003-10-28

资助 华南农业大学校长基金(5300-K02082)和广东省重大专项(2002A208010102)。

* E-mail: chunxiangxu@tom.com, Tel: 020-85280231

计算其中再生体胚的数量后, 将其先后转入RD2^[3] (1/2MS+6-BA 0.225 mg·L⁻¹+肌醇100 mg·L⁻¹+抗坏血酸10 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉7 g·L⁻¹)和REG^[3]培养基(MS+ IAA 0.175 mg·L⁻¹+6-BA 0.225 mg·L⁻¹+抗坏血酸10 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂粉10 g·L⁻¹)上各培养1个月, 以促进体胚的进一步成熟与萌发。已萌发的体胚转入MS培养基中进行生根和长梢, 计算植株再生率(植株再生率=再生植株总数/再生体胚总数×100%)。培养温度均为(28±2)℃, 光源为日光灯, 每天光照10 h, 悬浮培养时的光照度为3 000 lx, 体胚与植株再生时为4 500 lx。

结果与讨论

1 愈伤组织诱导

未成熟雄花接种至诱导培养基上1~2周后开始膨大, 经6周培养, 开始陆续出现黄白色颗粒状的分生小球体, 淡黄色、松脆的胚性愈伤组织则要在接种3个月以后才开始出现在部分分生小球体的表面, 并随着培养时间的延长而逐渐增多, 胚性愈伤组织的表面常有体胚再生(图1-a)。此外, 还可观察到白色或黄白色紧密、松软而富含水分的多种类型的愈伤组织。部分外植体在接种后的培养过程中逐渐褐化死亡, 不产生任何愈伤组织。分生小球体是最主要的愈伤组织, “巴西蕉”和“威廉斯”分生小球体的诱导率分别高达(70.8±10.7)%和(63.2±8.6)%, 但胚性愈伤组织的诱导率分别只有(1.3±0.8)%和(0.8±0.4)%。这与在其他香蕉品种上所获得的胚性愈伤组织诱导率处在同一水平^[4, 6, 11], 而在小麦等其他单子叶作物上所获得的胚性愈伤组织诱导率通常在50%左右, 有时甚至高达100%^[12]。

一般说来, 胚性愈伤组织的诱导率除受遗传型的影响外, 还受培养基成分(如水解酪蛋白)、生长素(如2, 4-D)的浓度、生长素与细胞分裂素的浓度及比例、外植体的来源及年龄等因素的影响^[13]。Escalant等^[4]对香蕉外植体的年龄、接种时期等因素进行了筛选, 我们实验室也对香蕉组培中2, 4-D的浓度等因素作过探讨(未发表资料), 结果是即使在最佳条件下获得的胚性愈伤组织诱导率仍很低。不过, 我们相信, 如果诱导培养基中的生长素与细胞分裂素种类、浓度及比例等因素得到优化, 仍有可能提高香蕉胚性愈伤组织

的诱导率。

2 ECS建立

淡黄色、松脆的胚性愈伤组织(通常带有部分不同发育阶段体胚)接种至ZZ液体培养基后迅速分散开来, 在倒置显微镜下体胚不透光, 愈伤组织呈现一种无序状态, 分散成为单个的细胞或大小不等的细胞团。接种1周后, 体胚的边缘开始变透明, 同时还可观察到透明的小胚性细胞团和少量的空细胞团; 再经2~3周的培养, 体胚几乎全部再分化成紧密的胚性细胞团, 悬浮系中的胚性细胞团逐渐增加, 空细胞团相对减少。在连续继代的刺激下, 接种后3~4个月即可获得质地均匀、良好的ECS。建立好的ECS外观为卵黄色、淡黄色至淡黄褐色, 其中60%~80%为呈不规则的云雾状边缘的胚性细胞团(图1-b), 还含有节状突起、体细胞原胚、空细胞团和单个的空细胞等。

据Schoofs等^[2]的报道, 从香蕉多芽体茎尖(scalps)诱导产生的胚性愈伤组织建立ECS, 由于基因组类型和品种的不同, 常需要9~26个月。而本文从雄花外植体接种到ECS的建立只需约8~9个月, 其原因可能有两个方面: (1)以雄花为外植体直接诱导胚性愈伤组织时可省去从吸芽诱导产生多芽体茎尖的过程, 因而能在相对较短的时间内获得ECS; (2)在建立ECS的过程中, 应选择适当大小的培养容器和适量的培养液。对一些种植数量少(如用于保存的种质资源)的品种, 以多芽体茎尖为宜。

3 体胚、植株再生

悬浮系的细胞(团)接种至再生培养基上, 经短暂的迟滞期后即开始增殖, 产生大量的胚性愈伤组织, 约4~5周后在解剖镜下可观察到胚性愈伤组织表面有再生体胚出现。幼龄体胚晶莹透明, 随着培养时间的延长, 体胚数量逐渐增多, 体胚也逐步发育成熟, 3个月后有部分体胚萌发(图1-c), 此外还可以观察到少量分生小球体的再次出现。再生材料转入RD2培养基上1个月以后, 大部分体胚萌发, 再经REG培养基的培养, 原来尚未萌发的体胚进一步成熟与萌发, 已萌发的体胚多数长出绿色叶鞘。具有绿色叶鞘的无根小苗转入MS培养基上后约1个月即发育成完整的植株(图1-d), 尚未长出绿色叶鞘但已萌发的体胚在MS培养基上先出芽, 而后再生根。“巴西蕉”

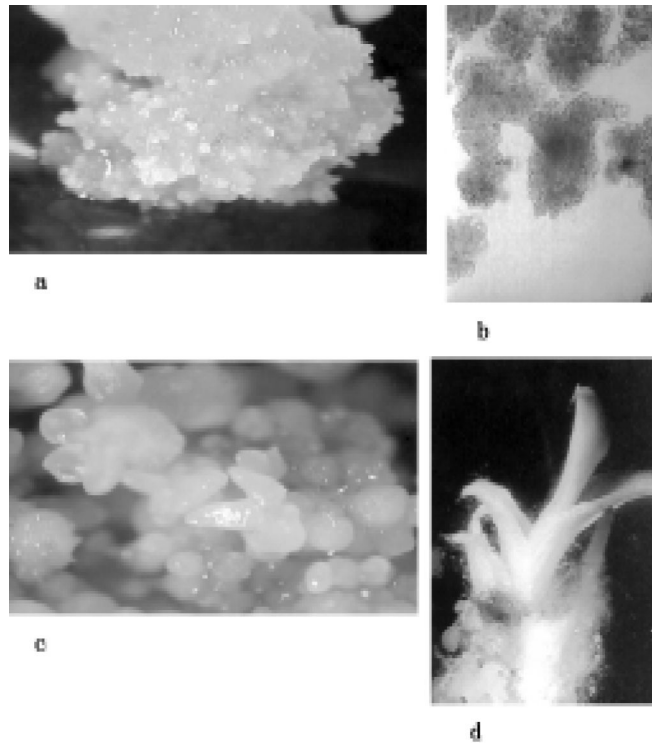


图1 通过胚性细胞悬浮系获得“巴西蕉”的再生植株

Fig. 1 Plant regeneration from embryogenic cell suspension of banana (*Musa* spp., AAA Group cv. Baxijiao)

a. 胚性愈伤组织; b. 胚性细胞悬浮系中的胚性细胞团; c. 再生体胚; d. 再生植株。

和“威廉斯”的植株再生率分别为 $(24.7 \pm 3.8)\%$ 和 $(16.7 \pm 1.5)\%$, 这与 Dhed'a 等^[3]和 Côte 等^[5]分别在香蕉品种“Bluggoe”(*Musa* spp., AAB Group)和“Grande Nain”(*Musa* spp., AAA Group)上所获得的结果比较接近。

植株的再生率除受基因组类型和品种的影响外, 还与体胚的大小、再生培养基及培养条件有关。体胚越大、越成熟, 其植株再生率越高^[4, 5]。因此, 如果分批将再生材料从体胚再生培养基中转入 RD2 培养基上(先将较大的体胚转移, 较小的留在原培养基上继续培养, 待其长大后再生转移), 可能会获得相对较高的植株再生率。此外, 我们参照 Dhed'a 等^[3]的方法进行香蕉体胚与植株再生, 时间大约是半年, 这仍然偏长。因此如何再进一步提高植株再生率和加速植株再生进程尚待深入研究。

参考文献

- 1 Krikorian AD, Cronauer SS. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement. *Econ Bot*, 1984, 38:322~331
- 2 Schoofs H, Panis B, Strosse H et al. Bottlenecks in the generation and maintenance of morphogenic banana cell suspensions and plant regeneration via somatic embryogenesis therefrom. *InfoMusa*, 1999, 8(2):3~7
- 3 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
- 4 Escalant JV, Teisson C, Côte FX. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 1994, 30:181~186
- 5 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
- 6 Grapin A, Ortiz JL, Lescot T et al. Recovery and regeneration of embryogenic culture from female flower of False Horn plantain (*Musa* AAB). *Plant Cell Tiss Org Cul*, 2000, 61:237~244
- 7 凌定厚, 陈琬英, 陈梅芳. 香蕉花序顶端组织的离体形态发生. *植物学报*, 1990, 32(12):966~968
- 8 周丽依, 马雪筠, 陈俊秋等. 香蕉通过胚状体途径的快速繁殖研究. *广东农业科学*, 1991, (3):22~26
- 9 周丽依, 曹静, 邝哲师等. 园艺植物体胚发生及植株再生技术研究. *热带作物学报*, 1998, 19(2):15~19
- 10 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473~497
- 11 Grapin A, Ortiz JL, Domergue R et al. Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *InfoMusa*, 1998, 7(1):13~15
- 12 Benkirane H, Sabounji K, Chlyah A et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tiss Org Cul*, 2000, 61:107~113
- 13 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体. II 影响植物胚状体发生和发育的因素. *植物生理学报*, 1982, 8(1):91~99