

# 香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立

徐春香<sup>1</sup>, B. PANIS<sup>2</sup>, H. STROSSE<sup>2</sup>, R. SWENNEN<sup>2</sup>, 李华平<sup>1</sup>, 肖火根<sup>1</sup>, 范怀忠<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642; 2 比利时荷语鲁汶大学 热带作物改良实验室, 鲁汶 B-3001)

**摘要:**分别以 3 个香蕉品种的多芽体茎尖和 5 个香蕉品种的未成熟雄花为外植体, 诱导产生胚性愈伤组织. 结果分别从 2 个基因组类型为 AAA 的品种的多芽体茎尖和未成熟雄花获得了胚性愈伤组织, 而未能从基因组类型为 AAB 或 ABB 的香蕉品种中获得胚性愈伤组织. 胚性愈伤组织的诱导率受基因组类型、品种和培养条件等因素的影响. 以上述 4 个品种的胚性愈伤组织为起始材料成功建立了胚性细胞悬浮系, 不同香蕉品种, 从其胚性愈伤组织建立胚性细胞悬浮系的难易程度有所不同.

**关键词:**香蕉; 胚性愈伤组织; 胚性细胞悬浮系

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)01-0070-04

## The induction of embryogenic callus and the establishment of embryogenic cell suspension of *Musa* spp.

XU Chun-xiang<sup>1</sup>, B. PANIS<sup>2</sup>, H. STROSSE<sup>2</sup>, R. SWENNEN<sup>2</sup>,

LI Hua-ping<sup>1</sup>, XIAO Huo-gen<sup>1</sup>, FAN Huai-zhong<sup>1</sup>

(1 Lab. of Plant Virology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Lab. of Tropical Crop Improvement, Catholic University of Leuven, B-3001 Heverlee, Belgium)

**Abstract:** Embryogenic callus was successfully induced starting from immature male flowers in 2 out of 5 banana cultivars and starting from scalps in 2 out of 3 cultivars. All these 4 cultivars from which embryogenic callus could be induced belonged to *Musa* AAA group. The frequency of embryogenic callus induction was depended on genotypes, cultivars and incubation conditions etc. Embryogenic cell suspensions (ECSs) were initiated successfully from embryogenic callus of all these 4 cultivars. The possibility of getting ECSs from embryogenic callus was also cultivar-dependent.

**Key words:** banana; embryogenic callus; embryogenic cell suspension

香蕉 *Musa* spp. 是重要的热带亚热带果树. 由于香蕉的绝大多数栽培品种均为 3 倍体, 不能通过传统的杂交育种方式获得品质好、抗性强的优良新品种, 因而香蕉的胚性细胞悬浮系 (embryogenic cell suspension, ECS) 的建立就成为香蕉实现基因转移的关键技术. 香蕉的体胚研究起步较晚, 经过近 20 年的努力, 虽已通过胚性愈伤组织建立了少数几个品种的 ECS<sup>[1-4]</sup>, 但胚性愈伤组织的诱导率很低且不同

的基因组类型和品种间差异显著<sup>[2,5]</sup>, ECS 的建立耗时长且不是所有的胚性愈伤组织都能建立 ECS<sup>[5]</sup>. 本研究分别选用了多个不同香蕉品种的多芽体茎尖和未成熟雄花为外植体, 研究了影响胚性愈伤组织诱导率的一些因素. 同时还以多个香蕉品种的胚性愈伤组织为起始材料来建立 ECS, 并仔细记录了胚性愈伤组织在液体培养基中的变化过程, 从而为解决上述问题提供参考.

收稿日期: 2003-02-17

作者简介: 徐春香(1969-), 女, 助理研究员, 博士. 现在华南农业大学园艺学院热带亚热带果树研究室工作. 通讯作者: 李华平(1961-), 男, 教授, 博士.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870434); 广东省自然科学基金资助项目(990714); 广东省科技攻关项目(C20209)

1 材料与方法

1.1 试验材料

诱导胚性愈伤组织的供试材料有香蕉的多芽体茎尖(图 1)和未成熟雄花. 前者包括 *Musa* AAA cv. Grande Naine (‘GNcu’和‘GNjd’2 个品系)、*Musa* AAA cv. Williams (‘Williams 365’和‘Wiljd’2 个品系)和 *Musa* AAA-h cv. Mbwarzirume 共 3 个品种,均保存在比利时鲁汶大学的热带作物改良实验室. 未成熟雄花包括 *Musa* AAA cv. 华农 7 号、*Musa* AAA cv. 广东 2 号、*Musa* AAB cv. 河口龙牙、大蕉 *Musa paradisiaca* 和粉蕉 *Musa nana* 等. 其中‘华农 7 号’、大蕉和粉蕉采自华南农业大学园艺系香蕉品种园,‘河口龙牙’采自广东省农科院果树研究所,‘广东 2 号’采自中山市黄圃镇.

建立胚性细胞悬浮系(ECS)的供试材料为在本研究获得的‘华农 7 号’、‘广东 2 号’、‘Grande Naine’和‘Williams’4 个品种的胚性愈伤组织.

1.2 方法

1.2.1 胚性愈伤组织的诱导 在解剖镜下小心分离含 2~4 个茎尖的多芽体茎尖薄片并将其接种在含 ZZ 半固体培养基<sup>[6]</sup>的试管中;未成熟雄花(经常规灭菌)顶端 6~13 排的小花接种于 MI 诱导培养基(MS<sup>[7]</sup> + 4 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg·L<sup>-1</sup> 生物素 + 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 100 mg·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺 + 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖 + 100 mg·L<sup>-1</sup> 麦芽提取物 + 7.5 g·L<sup>-1</sup> 琼脂)上. 设持续光照和持续黑暗 2 个处理,培养温度均为(28±2)℃,用荧光灯(Philips, 36 W)提供光照,光照强度为4 500 lx. 培养 4~5 个月后调查胚性愈伤组织的诱导率.

1.2.2 ECS 的建立 挑选黄白色、松脆、透明的胚性愈伤组织接种于 25 mL 的三角瓶中,加入适量 ZZ 液体培养基后置于转速为 70 r·min<sup>-1</sup> 摇床上培养. 培养温度为(28±2)℃,每天光照 10 h,光照强度为 3 000 lx. 初期每周继代 2 次,继代时小心吸取并除去褐色的及黄色富含淀粉粒的细胞团,至悬浮系中不再有褐色成份并开始快速增殖后每周继代 1 次,直至建立良好的 ECS,随后转入 250 mL 的三角瓶中培养,每 2 周继代 1 次. 继代时轻轻摇匀三角瓶,吸弃部分胚性细胞(团)及旧的培养液,留下旧培养液约 8~10 mL,加入新培养液至总体积为 80~100 mL,使胚性细胞的沉积细胞体积(Settled Cell Volume, SCV)约为 1.5%~3.0%.

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

不同品种的多芽体茎尖接种至诱导培养基上后的反应不同. ‘Grande Naine’和‘Williams’的多芽体茎尖刚接种到 ZZ 培养基上常因失水而呈轻微萎蔫状,接种后 1 d 左右常伴有不同程度的褐化现象,接种 3~5 d 后从培养基中获得水分,萎蔫现象基本消失并开始膨大. 在接种后约 45~60 d 开始出现细小的黄色颗粒状愈伤组织,称为分生小球体. 分生小球体随着培养时间的延长而逐渐增大到直径约 0.5~3.0 mm. 松脆、透明的胚性愈伤组织在接种 3~4 个月后开始出现在分生小球体的表面. 随着培养时间的延长胚性愈伤组织逐渐增多,并在表面出现体胚(图 2). ‘Mbwarzirume’多芽体茎尖的褐化现象则未因外植体膨大而得到遏制,而是随着培养时间的延长而加重,经几个月的培养,仅在部分外植体上观察到少量分生小球体的产生,而没有胚性愈伤组织的产生. 从多芽体茎尖诱导产生胚性愈伤组织的概率受品种(品系)、培养条件等因素的影响约为 0~10.83%(表 1).

表 1 品种(品系)、培养条件对胚性愈伤组织诱导率的影响  
Tab. 1 Effects of cultivars (lines) and incubation conditions on the frequency of embryogenic callus induction

| 品种/品系 <sup>1)</sup><br>cultivars/lines | 接种总管数<br>total tubes | 诱导率 induction frequency / % |            |
|----------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------|
|                                        |                      | 光照 under light              | 黑暗 in dark |
| GNcu(1)                                | 120                  | 0.83                        | 4.17       |
| GNcu(2)                                | 120                  | 7.50                        | 5.83       |
| GNjd                                   | 120                  | 0                           | 0.83       |
| Wiljd                                  | 120                  | 10.83                       | 7.50       |
| Williams365                            | 240                  | 0.42                        | 2.92       |
| Mbwarzirume                            | 120                  | 0                           | 0          |

1) ‘GNcu(1)’和 ‘GNcu(2)’表示在不同的日期进行接种

除了分生小球体与胚性愈伤组织外,常常还可以观察到许多透明而富含水分而非胚性的愈伤组织的出现,体胚直接从外植体上再生的现象也偶有发生(图 3).

在黑暗条件下培养的未成熟雄花,其反应与多芽体茎尖的基本相似,但其胚性愈伤组织的诱导率相对较低:本研究中‘华农 7 号’和‘广东 2 号’胚性愈伤组织的诱导率分别只有 2.6%和 3.5%,而大蕉、粉蕉和龙牙蕉的诱导率为零. 光照条件下培养的雄花则有明显的光合作用,外植体膨大变绿,不能诱导

产生胚性愈伤组织.

## 2.2 胚性愈伤组织的培养过程与 ECS 的建立

胚性愈伤组织接种至 ZZ 液体培养基中进行振荡培养后发生了一系列变化,本研究将其反应大体分为以下 3 种类型.

I 型. 胚性愈伤组织在接种后基本无褐化过程, 1 周后体胚即开始再分化成胚性细胞团, 很少有空的细胞团出现. 2~3 周后, 体胚几乎全部变成紧密而没有褐斑的胚性细胞团, 有时有许多单细胞出现在

悬浮系中. 此后 ECS 开始较快速地增长, 接种后 3 个月左右即可转入 250 mL 的大三角瓶中, 建立一个良好的 ECS (图 4). 通过胚性愈伤组织建立的 ECS 有约 80% 是以胚性细胞团形式存在的, 在光学显微镜下呈现不规则云雾状边缘, 常因许多细胞聚集在一起而呈不透明状(图 5). 悬浮系中除了有胚性细胞团外, 还可能观察到体细胞原胚, 空细胞团, 单个的细胞等的存在. 胚性细胞团的大小、颜色等特点常因品种或品系而异.

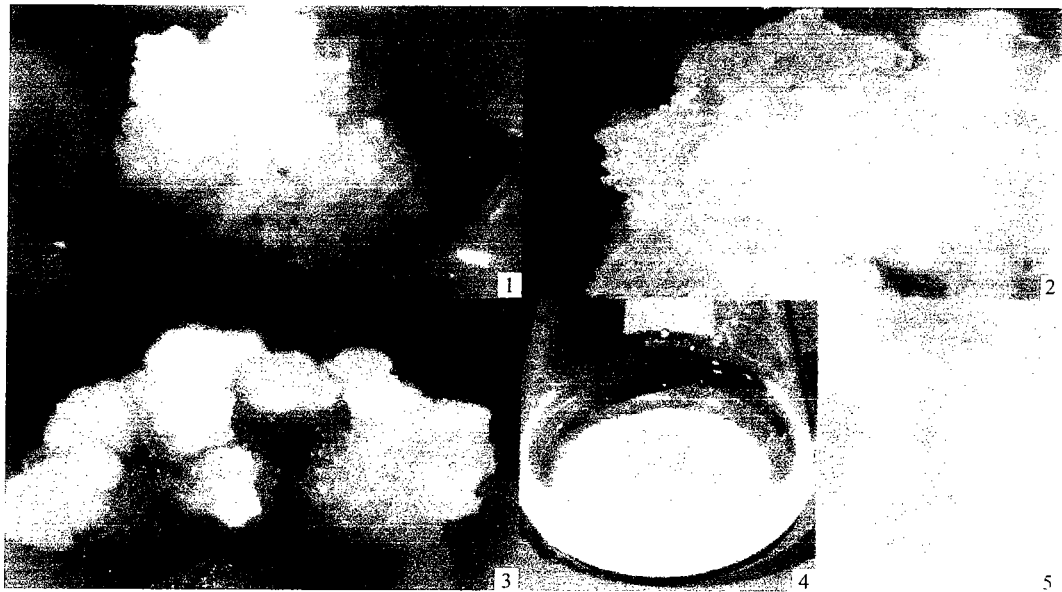


图 1 香蕉的多芽体茎尖,  $\times 3$ ; 图 2 胚性愈伤组织,  $\times 6$ ;

图 3 体胚直接在外植体再生,  $\times 3$ ; 图 4 建立好的胚性细胞悬浮系;

图 5 胚性细胞悬浮系中的胚性细胞团,  $\times 20$

Fig.1 Scapels of Musa AAA,  $\times 3$ ; Fig.2 Embryogenic callus,  $\times 6$ ;

Fig.3 Embryos regenerated directly from explants,  $\times 3$ ; Fig.4 Established embryogenic cell suspension;

Fig.5 Embryogenic cell aggregates in embryogenic cell suspension,  $\times 20$

II 型. 胚性愈伤组织放入液体中很易分散, 在倒置显微镜下可以观察到胚性细胞团的存在, 但这种细胞团的边缘不够饱满, 因而在外形上与建立好的 ECS 中的胚性细胞团是不同的. 3 d 后, 有一部分空细胞团出现, 原来的胚性细胞团也有局部变褐. 2 周后胚性细胞团逐渐减少, 空细胞逐渐增加, 幼龄的体胚开始降解, 在接种 5 周后基本上都变成了富含淀粉粒的黄色细胞团, 并且成为悬浮系的主要成份. 这时悬浮系中还有少量的胚性细胞团及空细胞团. 经几次继代后, 黄色富含淀粉粒的细胞团的边缘有时因胚性细胞团的出现而略呈黄白色, 但这种情况很不稳定, 黄色富含淀粉粒的细胞团边缘的胚性细胞团也会消失. 这时要根据具体情况来确定是否将这

种细胞团全部挑出. 如果悬浮系中, 除了这种黄色富含淀粉细胞的细胞团外, 很少有其他的胚性细胞团, 则要尽量将黄色细胞团周围的胚性细胞与之分离开来, 然后将黄色细胞团挑出. 在这种情况下, 通常需要较长时间(约 5~8 个月)的继代与选择后, 才能确定能否建立 ECS.

III 型. 胚性愈伤组织在接种后 3 d 内即有约一半左右变褐, 接种后 1 周即有 90% 以上的材料变褐, 很少有好的胚性细胞团存在, 在这种情况下通常不能获得 ECS.

研究结果表明: 香蕉的品种不同, 从其胚性愈伤组织建立 ECS 的难易程度也不同(见表 2): 如 'Williams' 的 3 个样品中就有 2 个能在较短的时间内

成功建立 ECS,所有样品在接种至液体培养基中后 一个能在较短的时间内建立 ECS,其他 7 个在接种至液  
都没有褐变现象;而‘华农 7 号’的 9 个样品也只有 2 体培养基中后均有不同程度的褐变现象.

表 2 从不同香蕉品种的胚性愈伤组织建立胚性细胞悬浮系的结果

Tab. 2 Results from establishing embryogenic cell suspension from embryogenic callus of different banana cultivars

| 品种<br>cultivars       | 样品总数<br>samples | 反应类型 reaction types |              |                |
|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------|----------------|
|                       |                 | I 型 type I          | II 型 type II | III 型 type III |
| 广东 2 号 Guangdong No.2 | 6               | 2                   | 3            | 1              |
| Grande Naine          | 9               | 2                   | 7            | 0              |
| 华农 7 号 Huanong No.7   | 9               | 2                   | 6            | 1              |
| Williams              | 3               | 2                   | 1            | 0              |

3 讨论

研究表明,香蕉的基因组类型和品种(甚至品系)不同,诱导产生胚性愈伤组织的概率相差很远,这与 Escalant 等<sup>[2]</sup>的观点一致,他们对 5 个分别属于 3 个基因组类型的香蕉品种进行了调查,结果愈伤组织和胚性愈伤组织的诱导率均因基因组类型和品种而异.此外,培养条件对胚性愈伤组织的诱导率也产生一定的影响.因此,当以多芽体茎尖为外植体时,针对不同的基因组类型和品种宜采取不同的培养条件,而当以未成熟雄花为外植体时最好在黑暗条件下进行培养.

本研究根据胚性愈伤组织在建立 ECS 的过程中的反应类型不同大体上将其分成 3 种类型,这有利于研究者及时对通过胚性愈伤组织建立 ECS 的可能性进行正确的判断,如对 II 型,则要有耐心不要过早放弃,当然也需要丰富的经验;而对 III 型,如实验材料不是很珍贵,应考虑及早放弃,以节省时间和提高工作效率.

香蕉胚性愈伤组织诱导率低(通常小于 1%)、品种间差异大,而且只能从大约 1/5 ~ 1/2 质量好的胚性愈伤组织获得 ECS<sup>[5]</sup>. 如何使香蕉胚性愈伤组织的诱导及 ECS 的建立成为常规化仍需长期而艰苦的努力.

参考文献:

[1] 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)[J]. Fruits, 1991, 46 (2): 125 - 135.

[2] ESCALANT J V, TEISSON C, COTE F X. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* sp.) [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1994, 30: 181 - 186.

[3] COTE F X, DOMERGUE R, MONMARSON S, et al. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand Nain [J]. Physiol Plant, 1996, 97: 285 - 290.

[4] GRAPIN A, ORTIZ J L, LESCOT T, et al. Recovery and regeneration of embryogenic culture from female flower of False Horn plantain (*Musa* AAB) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 61: 237 - 244.

[5] 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[J]. InfoMusa, 1999, 8(2): 3 - 7.

[6] SWENNEN R, van den HOUWE I, REMY S, et al. Biotechnological approaches for the improvement of cavendish bananas [J]. Acta Horticulturae, 1998, 490:415 - 423.

[7] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473 - 497.

【责任编辑 柴 焰】