

体胚发生途径‘大矮蕉’植株的再生

徐春香¹, B. PANIS², H. STROSSE², R. SWENNEN², 李华平¹, 肖火根¹, 范怀忠¹

(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: ‘大矮蕉’ *Musa* AAA cv. Grande Naine 的胚性细胞悬浮系(ECS)在 M2 液体培养基中预培养 1 周和 2 周后, 分别将其接种在 RD1 或 M3 培养基上, 于光照或黑暗条件下进行体胚的再生。再生体胚在接种后 3 周左右开始出现, 经 8 周的培养后, 在不同预培养时间、再生培养基种类及培养条件下, 胚性细胞(团)质量增长了约 5~18 倍, 从沉积细胞体积(SCV)为 1 mL 的 ECS 获得的再生体胚数为 $0.71 \times 10^5 \sim 3.07 \times 10^5$ 。植株的再生率及从 SCV 为 1 mL 的 ECS 获得的再生植株数也因上述体胚再生条件的不同而异。

关键词: 香蕉 *Musa* spp.; 胚性细胞悬浮系; 体胚发生; 植株再生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)02-0063-04

Plant regeneration through somatic embryogenesis of *Musa* AAA cv. Grande Naine

XU Chun-xiang¹, B. PANIS², H. STROSSE², R. SWENNEN²,

LI Hua-ping¹, XIAO Huo-gen¹, FAN Huai-zhong¹

(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 cell suspensions (ECS) of ‘Grande Naine’ (*Musa* AAA group) were plated on RD1 or M3 medium for the regeneration of somatic embryos, 1 to 2 weeks after last subculture. The first regenerable somatic embryos were observed about 3 weeks after inoculation. After 8 weeks of culture, the mass of the embryogenic mass increased about 5 to 18 times and the number of somatic embryos that could be regenerated from 1 mL settled cell volume (SCV) of ECS ranged between 0.71×10^5 and 3.07×10^5 , depending on pre-culture time in liquid medium before regeneration, regeneration media and incubation conditions (light/dark). The frequency of plant recovery and the amount of plantlets regenerated from 1 mL SCV of ECS were indirectly affected by somatic embryos regeneration conditions that were studied.

Key words: banana (*Musa* spp.); embryogenic cell suspension; somatic embryogenesis; regeneration of plants

香蕉(*Musa* spp.)是世界上重要的热带亚热带水果与粮食作物, 由于其主要栽培品种均为 3 倍体, 具高度不育和单性结实的特点, 长期以来生产上都采用无性繁殖的方式繁育后代, 因而缺乏遗传变异性, 很难获得品质好、抗性强的优良品种。生物技术能克

服一些限制传统的香蕉种质水平提高的因素。但这建立在掌握通过胚性细胞悬浮系(embryogenic cell suspension, ECS)获得再生植株技术的基础上^[1,2]。香蕉胚性愈伤组织的诱导率极低, 植株再生率也不高, 且品种间差异极大^[3-6], 虽经国内外学者不懈的努

收稿日期: 2003-09-09

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); 广东省科技攻关资助项目(C20209)

力,但通过 ECS 获得再生植株的技术仅在少数品种上获得成功^[4,5,7]. 本文报道了世界上重要的香蕉栽培品种 *Musa* AAA cv. Grande Naine 从 ECS 通过体胚发生途径获得再生植株的过程,希望为通过体胚发生途径获得我国香蕉品种再生植株的研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 供试材料

‘大矮蕉’*Musa* AAA cv. Grande Naine 的胚性细胞悬浮系(ECS),保存在 M2^[5]液体培养基中. ECS 的建立过程参见文献[8].

1.2 体胚再生

体胚再生前将 ECS 的起始接种浓度调整至沉积细胞体积(settled cell volume, SCV)等于 1.5%,悬浮液总体积为 60 mL. 在 M2 液体培养基中分别预培养 1 周和 2 周后,测量沉积细胞的总体积,计算 SCV 的增长率. 然后吸取 0.5 mL 具有 10% SCV 的 ECS,测量沉积细胞的质量后,分别培养于含有 RD1^[3]和 M3^[5]培养基的培养皿中,在光照或持续黑暗下进行体胚的再生. 培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天光照 16 h,光照强度为 4 500 lx. 悬浮系中的胚性细胞在接种至再生培养基后每 2 周进行 1 次质量测量,8 周后测量再生材料的总质量,取样测量质量后计算再生体胚的数量并另取样测量质量后转至 RD2^[3]培养基上光照下培养,以促进体胚的进一步成熟与萌发,光培养条件同上.

1.3 体胚的成熟、萌发与植株再生

再生材料在 RD2 培养基上培养 4 周后,取样转入 REG^[3]培养基,再经 4 周的培养后转入 MS^[9]培养基进行导根,统计再生植株的数量并计算植株的再生率. 植株再生率 = 再生植株数量/体胚数量 $\times$ 100%. 培养条件同 1.2.

2 结果与分析

2.1 SCV 及其增长率

ECS 在 M2 液体培养基中预培养 1 周和 2 周后,SCV 从原来的 0.9 mL 分别增至 2.3 和 2.6 mL,SCV 的周增长率为 255.56%,2 周增长率为 288.89%,第 2 周期间的增长率为 113.04%.

2.2 体胚再生

ECS 接种至再生培养基后,其中直径小于 50 μm 的胚性细胞团很容易死去,不死的或形成节状突起或形成根,直径约为 50 ~ 800 μm 的胚性细胞团则在再生培养基上不断增殖,再生体胚在接种约 3 周后开始出现于愈伤组织表面. 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而变得不再透明(图 1). 再生体胚较大的通常以单个的形式出现,较小的体胚则多以体胚群的形式聚集在一起. ECS 在 2 种再生培养基(M3 和 RD1)上和不同的培养条件(光照和黑暗)下都能较好地生长,只是当接种在 M3 培养基上光照下培养时有较明显的变褐现象. 经 8 周的培养后,较大的体胚直径约有 1.5 mm,多数再生的体胚尚处在不同阶段体细胞原胚或球形胚阶段,此外还有大量增殖的胚性愈伤组织.

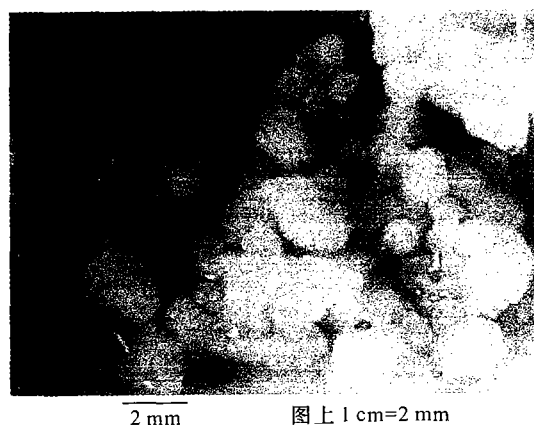


图 1 再生体胚

Fig.1 Regenerable somatic embryos

从 SCV 为 1 mL 的 ECS 再生所获得的体胚数量,受预培养时间、再生培养基的种类及培养条件的影响为 $0.71 \times 10^5 \sim 3.07 \times 10^5$. 除在液体培养基中预培养 2 周后、在 2 种再生培养基上暗培养所获得的再生体胚数比较接近外,其他情况下在 RD1 培养基上获得的再生体胚数均显著多于在 M3 培养基上的;当以 RD1 作为再生培养基时,预培养 2 周后所获得的再生体胚数显著多于 1 周的,光照条件下培养所获得的再生体胚数显著多于黑暗条件下的(表 1).

接种到再生培养基后,胚性细胞(团)的质量随着培养时间的延长而逐渐增加,2 周后因预培养时间、再生培养基种类及培养条件不同增长了 1.6 ~ 4.2 倍,8 周后增幅最高达将近 18 倍之多,最少的也增长了近 5 倍. 相比之下,培养在光照条件下的胚性细胞(团)其质量的增长快于在黑暗条件下的,在液体培养基中预培养 2 周的其质量的增长略快于 1 周的,接种在 RD1 培养基上的其质量的增长快于 M3 培养基上的. 胚性细胞(团)质量的增长与从 SCV 为 1 mL 的 ECS 再生所获得的体胚数呈显著正相关($r = 0.8399^*$),且都是当 ECS 在液体培养基中预培养 2 周后在 RD1 培养基上光培养时获得最大值(表 1).

表 1 胚性细胞(团)质量的增长与再生体胚数¹⁾

Tab. 1 Mass increase of embryogenic mass and amount of regenerable somatic embryos

在液体培养基中的 预培养时间 pre-culture time in liquid medium	再生培养基 regeneration media	培养条件 incubation conditions	质量增长倍数 times of mass increased	再生体胚数 amount of regenerable somatic embryos ²⁾ ($\times 10^5$)/mL ⁻¹
1 周 1 week	RD1	光照 under light	10.83b	2.29b
1 周 1 week	RD1	黑暗 in dark	6.74c	1.04c
1 周 1 week	M3	光照 under light	9.84bc	1.33c
1 周 1 week	M3	黑暗 in dark	4.72c	0.71d
2 周 2 weeks	RD1	光照 under light	17.86a	3.07a
2 周 2 weeks	RD1	黑暗 in dark	11.16b	2.36b
2 周 2 weeks	M3	光照 under light	12.52b	1.30c
2 周 2 weeks	M3	黑暗 in dark	11.17b	2.24b

1) 表中同列数据后具不同字母者表示经方差分析(DMRT法)在 0.05 水平差异显著; 2) 指从 1 mL 沉积细胞体积的胚性细胞悬浮系中所获得的再生体胚数

2.3 体胚成熟、萌发与植株再生

在 RD2 上培养 4 周以后,许多再生体胚已萌发,同时出现部分具有或多或少已萌发的簇生状叶鞘的紧密团块,以及部分分散、膨大的圆球形颗粒.转入 REG 培养基 4 周后,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的叶鞘,紧密团块的变化不大,只是原来团块中的白色叶鞘逐渐转变成绿色.已长出绿色叶鞘的无根小苗转入 MS 培养基后约半个月后开始生根,最后发育成完整的植株(图 2);尚未长出绿色叶鞘的已萌发体胚在 MS 培养基上先诱导产生芽,而后再产生根;已获得绿色叶鞘的紧密团块,如能正确地去除周围的组织块,转入 MS 一段时间后也能诱导出根.

表 2 的结果表明:受体胚再生条件的间接影响,所获得的植株再生率最小为 7.04%,最大为 19.42%.除个别例外,在 RD1 培养基上再生所获得的体胚,其植株再生率显著高于在 M3 培养基上所获

得的再生体胚的;在液体培养基中预培养 2 周后在 RD1 培养基上暗培养所获得的体胚其植株再生率最高,而在液体培养基中预培养 2 周后在 M3 培养基上光培养所获得的体胚其植株再生率最低.



图 2 再生植株

Fig. 2 Regenerable plants

表 2 体胚再生条件对植株再生率及再生植株数的影响¹⁾

Tab. 2 Effects of somatic embryo regeneration conditions on plant recovery frequency and amount of regenerable plantlets

在液体培养基中的 预培养时间 pre-culture time in liquid medium	再生培养基 regeneration media	培养条件 incubation conditions	植株再生率 plant recovery frequency / %	再生植株数 amount of regenerable plants ²⁾ ($\times 10^4$)/mL ⁻¹
1 周 1 week	RD1	光照 under light	18.69b	4.39a
1 周 1 week	RD1	黑暗 in dark	19.42b	2.01b
1 周 1 week	M3	光照 under light	15.11b	2.05b
1 周 1 week	M3	黑暗 in dark	8.92c	0.81c
2 周 2 weeks	RD1	光照 under light	14.00b	4.00ab
2 周 2 weeks	RD1	黑暗 in dark	24.17a	5.61a
2 周 2 weeks	M3	光照 under light	7.04c	0.96c
2 周 2 weeks	M3	黑暗 in dark	7.30c	1.66bc

1) 表中同列数据后具不同字母者表示经方差分析(DMRT法)在 0.05 水平差异显著; 2) 指从 1 mL 沉积细胞体积的胚性细胞悬浮系中所获得的再生植株数

从 SCV 为 1 mL 的 ECS 所获得的再生植株数同样也因体胚的再生条件不同而异:当体胚在 RD1 培养基上再生时,从 SCV 为 1 mL 的 ECS 所获得的再生植株数显著多于在 M3 培养基上的;在液体培养基中预培养 2 周后在 RD1 培养基上暗培养时所获得的再生植株数最多;在液体培养基中预培养 1 周后在 M3 培养基上暗培养时所获得的再生植株数最少;在预培养 2 周后在 M3 培养基上光培养时所获得的再生植株数也不多(表 2)。

3 讨论

在‘大矮蕉’体胚的再生过程中,胚性细胞(团)质量的增长与从 SCV 为 1 mL 的 ECS 所获得的再生体胚数呈正相关,且都是在液体培养基中预培养 2 周后再在 RD1 培养基光培养时获得最大值,因此可根据细胞质量的增长情况来初步筛选该品种的体胚再生条件。但是,植株的再生率与从 SCV 为 1 mL 的 ECS 所获得的再生植株数,则是在液体培养基中预培养 2 周后在 RD1 培养基上暗培养时获得最大值,而且在 M3 培养基上光培养时出现了褐变现象。由此可见,黑暗条件更有利于再生体胚的萌发。植株再生率除受在液体培养基中的预培养时间、再生培养基种类及培养条件等因素影响外,还受其他因素的影响,如体胚的大小及成熟度,体胚越大越成熟其萌发率越高^[5]。因此,如果适当延长 ECS 在再生培养基上的培养时间,有可能进一步提高植株的再生率。

虽然从 ECS 繁殖的角度,第 2 周期间的周增长率远小于第 1 周的,但从遗传转化的角度,在液体培养基中预培养 2 周后从 SCV 为 1 mL 的 ECS 所获得的再生体胚数、植株数及植株再生率往往多于 1 周的。因此,在进行遗传转化试验时,宜将 ECS 在液体培养基中预培养 2 周后再进行体胚的再生。

参考文献:

- [1] KRIKORIAN A D, CRONAUER S S. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement [J]. *Economic Botany*, 1984, 38: 322 - 331.
- [2] SAGI L, PANIS B, REMY S, et al. Genetic transformation of banana and plantain via particle bombardment [J]. *Bio/Technology*, 1995, 13: 481 - 485.
- [3] DHEDA 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.
- [4] ESCALANAT 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.
- [5] 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.
- [6] SCHOOF 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.
- [7] 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.
- [8] 徐春香, PANIS B, STROSSE H, 等. 香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立. 华南农业大学学报(自然科学版), 2004, 25(1): 70 - 73.
- [9] 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】