

贡蕉胚性细胞悬浮系的建立和植株再生

Establishment of Embryogenic Cell Suspension Culture and Plant Regeneration of Edible Banana *Musa acuminata* cv. Mas (AA)

魏岳荣^{1,2}, 黄学林^{1*}, 李 佳¹, 黄 霞¹, 李 哲¹, 李筱菊¹

WEI Yue-Rong^{1,2}, HUANG Xue-Lin^{1*}, LI Jia¹, HUANG Xia¹, LI Zhe¹ and LI Xiao-Ju¹

1. 中山大学生命科学院教育部基因工程重点实验室, 广州 510275

2. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640

1. The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Zhongshan (Sun Yat-sen) University, Guangzhou 510275, China

2. Fruit Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

摘 要 鲜食蕉品种的高度不育性和多倍性制约了用传统育种方法培育生产实践中所需的新品种, 建立稳定的胚性细胞悬浮系是香蕉生物技术育种的前提。以目前国内尚未建立该体系的鲜食蕉品种贡蕉(AA)未成熟雄花序的第1~15位花梳为外植体, 对胚性细胞悬浮系的建立和植株再生体系进行了优化。结果表明, 5~6个月的培养后可获得分生小球体和浅黄色、松散易碎的胚性愈伤组织。9 μ mol/L 2,4-D 对外植体愈伤组织的诱导效果最好, 诱导率为40.96%, 胚性愈伤组织诱导率可达7.45%, 其中5.79%的胚性愈伤组织来源于第6~12号位置的花梳。胚性愈伤组织悬浮培养后, 通过3个月的筛选和继代培养, 可得到均质的胚性细胞悬浮系。该培养体系合适继代周期为15d, 继代时合适的起始接种量为每30mL培养基加2 mL PCV ECS。培养6个月的胚性细胞在体细胞胚诱导培养基中培养15d后可见到白色半透明体细胞胚的发生, 体细胞胚诱导率为280 $\times 10^3$ 个/mL PCV。成熟体细胞胚的萌发率为17.28%, 其中发育成正常的再生植株的百分率为14.16%。

关键词 香蕉, 雄花序, 胚性细胞悬浮系, 体细胞胚, 植株再生

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0058-08

Abstract Conventional breeding for dual resistance of disease and pest of *Musa* cultivars remains a difficult endeavor, as the plant is polyploidic and high in sterility. Biotechnological techniques, eg., genetic engineering, *in vitro* mutation breeding, or protoplast fusion, may overcome the difficulties and improve the germplasm. Establishment of a stable embryogenic cell suspension (ECS) is a prerequisite for any of the biotechnological breeding methods. In this study an embryogenic cell suspension was established from immature male flower of *Musa acuminata* cv. Mas (AA), a popular commercial variety of banana in the South-East Asian region. After culture for 5~6 months on callus induction media, which consisted of MS salts, different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4.1 μ mol/L biotin, 5.7 μ mol/L indoleacetic acid (IAA), 5.4 μ mol/L naphthalene-acetic acid (NAA), other vitamins, 87mmol/L sucrose, and solidified with 7g/L agarose, meristematic globules and yellow, friable embryogenic cultures were induced from the explants of 1~15th row young floral hands of immature male flowers. Of the four treatments of 2,4-D, 9 μ mol/L was the most effective on the callus induction, it transformed 40.96% and 7.45% of the culti-

Received: June 7, 2004; Accepted: August 12, 2004.

This work was supported by Grant from the Department of Science and Technology of Guangdong Province (No. 701126 and No. 031995).

* Corresponding author. Tel: 86-20-84110797; E-mail: ls17@zsu.edu.cn

广东省自然科学基金(No. 701126 和 No. 031995) 资助。

vated male floral hands into callus and embryogenic callus respectively. The explants to produce highest frequency of the embryogenic calli were floral hands of 6 to 12th rows, which generated 5.79% of the embryogenic calli. Suspension cultures were initiated from these embryogenic calli in liquid medium supplemented with $4.5\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D. After sieving selection of the cultures using a stainless steel metallic strainer with pore sizes of $154\mu\text{m}$ at 15day intervals for 3 months, homogeneous and yellow embryogenic cell suspensions, composed of single cells and small cell aggregates, were established. Based upon the growth quantity and growth rate of ECS, it was determined that the appropriate inoculum was 2.0mL PCV ECS/ 30mL medium in 100mL flask, and the appropriate subculture cycle was 15 days. Planting of 6 months old ECS on semi-solid medium of somatic embryo induction and development (MSD) resulted in approximately 280×10^3 somatic embryos/ mL PCV ECS. MSD contained SH macronutrients, micro-nutrients, Fe-EDTA and MS vitamins supplemented with $4.5\mu\text{mol/L}$ biotin, $680\mu\text{mol/L}$ glutamine, 2mmol/L proline, 100mg/L malt extract, $1.1\mu\text{mol/L}$ NAA, $0.2\mu\text{mol/L}$ zeatin, $0.5\mu\text{mol/L}$ kinetin, $0.7\mu\text{mol/L}$ N^6 -(2-isopentenyl) adenine, 29mmol/L lactose, 130mmol/L sucrose and solidified with 2g/L gelrite. After 3 months of maturity on MSD, 17.28% of the somatic embryos were germinated on germination media (MG), consisted of MS salt, Morel and Wetmore vitamins, $0.2\mu\text{mol/L}$ 6-BA, $1.1\mu\text{mol/L}$ IAA, $87\mu\text{mol/L}$ sucrose and solidified with 2g/L gelrite; and 14.16% of the somatic embryos could develop into normal plantlets on rooting media contained the same composition as that of MG but without auxin and cytokinin.

Key words banana, male inflorescences, embryogenic cell suspension, somatic embryo, plant regeneration

作为继水稻、小麦、玉米之后的世界第4大粮食作物和近4亿人口的主要粮食,香蕉(含大蕉)年产量达10226.04万吨(FAO,2003)。然而,香蕉产业的发展目前正遭遇着前所未有的困难。大量的病毒、真菌病害和虫害,造成香蕉品质和产量的大幅度下降,并严重威胁到香蕉的生存,而由之引起的大量杀虫剂和农药的使用给人类的健康带来严重的影响。因此,选育高产并具有高度抗性的优良新品种是香蕉产业持续发展的根本出路。然而,鲜食蕉品种的高度不育性和多倍性制约了用传统育种方法培育生产实践中所需的新品种。利用生物技术方法,如基因工程、体细胞突变和体细胞杂交等,有望克服传统育种的限制因素而达到改善香蕉种质的目的,而所有这些技术的应用都有赖于一个高效的植株再生体系。

通过器官发生途径再生植株的离体培养技术在香蕉组织培养上已取得了很大的成功,并应用于生产中种苗的大量繁殖。但该再生体系并不适合于基因工程,因为转化后获得的再生植株为嵌合体。单细胞起源的体细胞胚胎发生体系无疑为最适合基因操作的有效体系,这样就避免了嵌合体的形成,并有利于目的性状的筛选^[1]。因此,香蕉胚性细胞悬浮系(Embryogenic Cell Suspension, ECS)的培养和利用成为近20年来全球香蕉科研工作者研究的重点,并取得了重要的进展。已分别利用合子胚^[2,3]、叶鞘和球茎组织^[4]、具有高度增殖能力的多芽体茎尖薄切片(Scalp)^[5,6]和未成熟雌花或雄花^[7-12]作为外植体,成功地实现了胚性愈伤组织的诱导和体细胞胚

胎发生,其中后两种方法成为目前相对重复性最好的技术体系,并建立了ECS^[13]。然而,该培养体系的建立却取决于品种特性^[14],而且常常存在胚性愈伤组织的诱导率低及其植株转化率低的問題。如根据报道,目前理想的胚性愈伤组织诱导率只有0.8%^[15],而Dheda^[4]和Novak^[4]等均报道体细胞胚萌发率及其植株转化率在1.5%~25%左右。因此许多香(大)蕉品种其完善的ECS有待建立,这也是目前香蕉生物技术育种的瓶颈和仍然有待突破的技术平台。

贡蕉(*Musa acuminata* cv. Mas)原产于印度,为AA基因型鲜食蕉品种,在东南亚地区广为种植,在我国广东和广西等地有少量的种植。其果实果皮薄,果质细滑,清甜,香味浓,品质特优,且对镰刀菌枯萎病1号生理小种具有抗性。尽管其株产低,但在香蕉品种的遗传改良计划中,贡蕉仍然为一种具有重要利用价值的优良种质^[16],但在国内尚未建立其ECS。本文利用其未成熟雄花序为外植体对培养体系进行了优化研究,建立了该品种的ECS,这对我国香蕉生物技术育种的实施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

贡蕉品种(*Musa acuminata* cv. Mas)(AA)的雄花序取自广东省农业科学院果树研究所建立的“国家果树种质——广州荔枝香蕉圃”。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选择与处理:取雌花刚坐完果的花

蕾,采用花蕾顶端 10~12cm 长的部分,即雄花序。剥除外部苞片及其包裹的雄花直至剩下花序顶端 1.5cm 长的部分,75%酒精消毒处理 1~2min 后,用无菌水清洗 1 次。在无菌条件下,借助解剖镜依次去除内部苞片,并将其包裹的单个未成熟花梳(floral hand,图 1,A)剥离。按照 Escalant 等^[7]的标准,以近花序顶端分生组织的花梳为第 1 位花梳,依次取第 1~15 位花梳置于愈伤组织诱导培养基中培养,并在培养瓶壁上标记好相应位置,观察统计不同位置的花梳愈伤组织的诱导情况。

1.2.2 愈伤组织的诱导和继代培养:愈伤组织诱导培养基 MJ 配方参照 Cote 等方法^[8]略作改动:MS 基本培养基^[17] + 4.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素 + 5.7 $\mu\text{mol/L}$ IAA + 5.4 $\mu\text{mol/L}$ NAA + 87mmol/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉。此外,为了确定合适的 2,4-D 浓度,本实验共设 4 个 2,4-D 浓度处理:0.9、18、27 $\mu\text{mol/L}$,同期同试验基地随机取样,每个处理接种 10 个花蕾,每个花蕾取第 1~15 位花梳,即每个处理共 150 个外植体。每个处理设三次重复。结合形态学和细胞学的观察,确定并挑选松散易碎的浅黄色愈伤组织为胚性愈伤组织^[18],进行继代培养。为了研究胚性愈伤组织诱导的影响因素,在外植体诱导培养后 60d 时统计愈伤组织诱导率,150d 时统计胚性愈伤组织诱导率。在 9 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 条件下观察并统计不同位置花梳的愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织诱导率。

1.2.3 悬浮培养:取胚性愈伤组织约 2g,加入到装有 30mL 液体培养基(ML)的 100mL 锥形瓶中进行悬浮培养。ML 组成为:MS 基本培养基 + 4.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素 + 680 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺 + 100mg/L 麦芽提取物 + 130mmol/L 蔗糖。此外,为了确定合适的 2,4-D 浓度,设计三个 2,4-D 浓度:2.25、4.5、9.0 $\mu\text{mol/L}$ 进行试验。在培养的第一个月中,每周更换一次新鲜培养基,用 900 μm 孔径筛网滤除不易分散的大颗粒培养物,其中包括愈伤组织团、褐化死亡组织、一些原胚等。其后每 2 周更换一次培养基,待培养物较为分散后,用 154 μm 孔径筛网过滤去除较大的细胞团。继代培养 3 个月后可得到较为分散、均质的 ECS。悬浮培养中细胞生长量用密实细胞体积(Packed Cell Volume, PCV)表示,测定方法参考文献[19]。拟用 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、5.0 mL PCV ECS 等 6 个起始浓度,通过定期测定 ECS 的生长量来绘制每一个继代周期中胚性悬浮细胞的生长曲线,并确定每次继代的合适起始量。

1.2.4 体细胞胚的诱导和成熟:取悬浮培养继代

后第 10d 的胚性悬浮细胞,经 154 μm 孔径筛网过滤后,在体细胞胚诱导培养基(MSD)中诱导体细胞胚的发生。MSD 的组成为:SH 培养基^[20]中的大量元素和微量元素及其铁盐 + MS 维生素 + 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 生物素 + 680 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺 + 2mmol/L 脯氨酸 + 100mg/L 麦芽提取物 + 1.1 $\mu\text{mol/L}$ NAA + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 玉米素 + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ kinetin + 0.7 $\mu\text{mol/L}$ 2-ip + 29mmol/L 乳糖 + 130mmol/L 蔗糖 + 2g/L gelrite。定期观察体细胞胚的诱导情况,60d 后统计体细胞胚发生数量。随后在同样的培养基中继续培养 30d,以促进体细胞胚的成熟。

1.2.5 植株再生:取在 MSD 培养基中培养 90d 的成熟体细胞胚,在加有萌发培养基(MG)的培养皿(直径 9.0cm)中萌发,30d 后统计体细胞胚的萌发率。MG 的组成为:MS 大量元素和微量元素及其铁盐 + Morel and Wetmore 维生素^[21] + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 6-BA + 1.1 $\mu\text{mol/L}$ IAA + 87mmol/L 蔗糖 + 2g/L gelrite。萌发后的体细胞胚被转移到 MR 培养基(不含任何植物生长调节剂的 MG 基本培养基)中生根,进一步发育成为完整的小植株。

1.2.6 培养条件:所有培养基中,除 ML 培养基 pH 值在灭菌前被调整为 5.3 外,其余均为 5.8,然后在 121 $^{\circ}\text{C}$ 条件下灭菌 15min。愈伤组织诱导、悬浮培养、体细胞胚的诱导和成熟在 $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下进行。植株再生初期的体细胞胚萌发在黑暗条件下进行,待浅绿色叶鞘抽出后转移到 $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强(白色荧光灯),16h/8h 光周期条件下生根。胚性细胞悬浮培养保持在持续 110 r/min 的旋转摇床上进行。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 花梳的不同位置与愈伤组织诱导:在含有 9 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 的愈伤组织诱导培养基中,不同位置的单个雄花花梳在愈伤组织诱导培养基中的外部形态特征变化表现有所不同。1~5 号位置的花梳大部分在培养 10d 后褐化死亡,愈伤组织诱导率较低。而 6~12 号位置的花梳在愈伤组织诱导培养基中培养 10d 后,单个花梳开始膨大,初期主要表现为花瓣伸长生长,花序轴和子房部分则变化很小。若分离的花梳苞片残留较多的话,可见到苞片膨大明显,边缘愈伤化呈白色致密状,但后期褐化死亡。30d 后花瓣停止伸长,由花序轴诱导产生白色松软并富含水分的愈伤组织,继代培养时易褐化死亡。这种由

件。HA1 与宿主细胞受体结合、HA2 参与病毒和细胞膜融合。未经裂解的 HA0 能识别红细胞表面的受体,也能识别宿主细胞表面的受体,但不能与宿主细胞膜发生融合,故不具有感染性。因此,HA 对细胞蛋白酶的易感性及这些酶在宿主组织细胞内的分布是病毒泛嗜性的决定因素^[8]。而 HA 对细胞蛋白酶的易感性是由 HA 的一级结构和空间结构决定的,HA 裂解位点的氨基酸序列可能是决定 AIV 毒力的关键因素^[9,10]。

通过对我国从水禽分离到的一株 H5N1 亚型 AIV 血凝素基因的克隆与序列分析,表明其 HA 基因共有 1707 个核苷酸,包含了 HA 基因完整的编码区,共编码 568 个氨基酸,其中前 16 个氨基酸为信号肽序列,主要是由疏水性氨基酸组成,其功能主要是使得蛋白质能被定向转运,在成熟的 HA 蛋白中并不包括信号肽。成熟的 HA1 蛋白有 329 个氨基酸,HA2 有 223 个氨基酸,其 N 段的 14 个氨基酸构成了 HA 蛋白的融合肽。在 HA2 的 185 到 212 位氨基酸为 HA 蛋白的非极性跨膜区,由疏水性氨基酸残基组成。最后 10 个氨基酸是 HA 蛋白的亲水性胞浆域,主要由亲水性氨基酸组成,它们高度保守。本分离株是 HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成为 RKKR↓GLF,含有连续的碱性氨基酸,具有高致病性 AIV HA 基因裂解位点的序列特征,符合高致病力毒株的分子特征。因此,从分子水平说明,此分离株为高致病力毒株,这与其在临床上所产生的高致病性结果是一致的。在教科书和一般研究文献中,水禽一直被认为是 AIV 的传播和携带者,而且野生水禽的迁徙被认为是大范围传播 AIV 的条件,D.J. Alexander 通过研究不同时期不同地理区域的 AIV 的发病规律验证了这一点^[11]。1996 年以前的一百年的时间内 AIV 虽一直流行于水禽中,鲜有引起发病的报道。我国最近的 AIV 爆发却屡屡引起水禽的大批死亡,以患病水禽全身器官和组织严重出血为特征^[12]。以前认为,由于种间障碍 AIV 不会直接感染人,是先传染给中间宿主——猪,病毒在中间宿主猪体内适应后,方可感染人。然而,1997 年 4 月,我国香港 3 个鸡场暴发 H5N1 型禽流感,随后在 1 名 3 岁男童的气管分泌物中分离出 1 株 H5N1,截止 1998 年 2 月,确诊共有 18 人感染 H5N1 并发病,其中 6 人死亡。经过对期间分离的毒株 8 个基因片段的序列分析,并分别与人源和禽源流感病毒进行比较,发现与该病毒 8 个基因片段同源率最高的毒株均为 AIV,未发现任何曾经在中间宿主中与人流感

病毒发生重排的证据,由此分析该病毒来源于禽类。2003 年 2 月我国香港再次发生 H5N1 直接感染人事件(感染 2 例,1 例死亡)。最近禽流感突然袭击了亚太地区,10 个国家及地区受影响并造成了巨大的损失,并且在越南和泰国也发现了禽流感感染人的事件,更突出地显示了禽流感特别是高致病性禽流感的公共卫生学意义。

本研究在国内首次成功构建了禽流感病毒的 MuLV 假病毒体系。经过 Western-blot 发现 HA 在形成的假病毒颗粒表面得到了表达。通过感染性实验发现,其形成的假病毒具有感染性,能够感染 293T、COS-7 和 NIH3T3 等多种细胞,说明在这些细胞表面均有禽流感病毒 HA 蛋白的受体,表明其具有泛嗜性。经过 Western-blot 和感染性试验证明我们已经成功构建了鹅源禽流感病毒的 MuLV 假病毒体系,为研究水禽源禽流感病毒侵入细胞的机理提供了一个手段,为研究其在受体特性和组织嗜性上的变异提供了一个技术平台。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gan MH(甘孟侯). Avian influenza(Second Edition), Beijing: Chinese agriculture press, 2002
- [2] Lu HZ(卢洪洲), Pan XZ(潘孝彰). Development of avian influenza. *Chin J Infect Dis* (中华传染病杂志), 2004, 22(1): 63 - 65
- [3] Subbarao K, Klimov A, Katz J *et al*. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393 - 396
- [4] Guo JS(郭建顺), Jin NY(金宁一). Highly pathogenic avian influenza and communal hygienics. *Chin J Biologicals* (中国生物制品学杂志), 2004, 17(2): 126 - 128
- [5] John A. G. Briggs, Thomas Wilk, Stephen D. Fuller. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *Journal of General Virology*, 2003, 84: 757 - 768
- [6] David Avram Sanders. No false start for novel pseudotyped vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 437 - 442
- [7] Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE *et al*. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 628 - 633
- [8] David A. Steinbauer. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology*, 1999, 258: 1 - 20
- [9] Weis W, Brown JH, Cusack S *et al*. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 1988, 333: 426 - 431
- [10] Senne DA. Survey of the hemagglutinin(HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases*, 1996, 40: 425 - 437
- [11] Dennis J. Alexander. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74: 3 - 13
- [12] Wang YK(王永坤). Research and Prevention of avian influenza outbreaks in waterfowl. *China animal health* (中国动物保健), 2004, 3: 12 - 14

的花梳因大部分褐化死亡,愈伤组织诱导率较低,愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率分别平均为 36.58% 和 3.73%。6~12 号位置花梳的愈伤组织诱导效果最好,由其诱导获得的胚性愈伤组织占全部花梳诱导的胚性愈伤组织之和的 77.78%,其中以 10 号位置花梳的愈伤组织和胚性愈伤组织诱导率最高,分别为 76.47% 和 19.06%。而 13~15 号位置花梳的愈伤组织诱导效果最差,胚性愈伤组织诱导率平均只有 2%。因此,6~12 号位花梳为贡蕉雄花序法愈伤组织诱导取样的主要外植体。

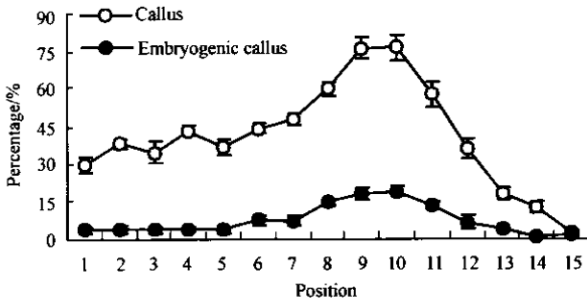


图 2 贡蕉雄花花梳位置与愈伤组织诱导的关系

Fig. 2 Relation between the position of male flower hands and the efficiency of callus induction in *Musa acuminata* cv. Mas (AA)

2.1.2 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响:从图 3 可见,2,4-D 在愈伤组织的诱导中起着关键的作用。不含 2,4-D 的对照愈伤组织诱导率仅 2.67%,未观察到胚性愈伤组织的发生。 $9\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 愈伤组织诱导效果最好,愈伤组织诱导率为 40.96%,胚性愈伤组织诱导率可达 7.45%。而 $18\mu\text{mol/L}$ 和 $27\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 诱导效果反而较差,尤其 $27\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 处理中花梳胚性愈伤组织诱导率只 $9\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 胚性愈伤组织诱导率的 26%。而在早期的诸多研究报道中,以 Pelipita (ABB)^[7]、Rasthali (AAB)^[22]、Grand naine (AAA)^[8, 23] 等不同品种未成熟花序作为外植体诱导愈伤组织时,都使用 $18.1\mu\text{mol/L}$ 浓度的 2,4-D,而未见关于 2,4-D 浓度的比较实验,其中 Grand naine 愈伤组织诱导率为 50%,胚性愈伤组织诱导率为 2%~6%^[23]。因此,愈伤组织诱导所需的合适的 2,4-D 浓度应因品种和基因型而异。

2.2 胚性细胞悬浮培养体系的建立与保持

被挑选的浅黄色胚性愈伤组织通过 2~3 个月的继代培养后,可得到大量浅黄色、松散易碎的、表面带有少量白色体细胞胚的胚性愈伤组织(图 1, C)。该类型胚性愈伤组织被转移到 ML 培养基后,在摇床的振动作用下较易散开,且不易出现褐化的

现象。初期悬浮液主要由单细胞、细胞团、原胚以及少量黄色结节状愈伤块组成(图 1, D)。在悬浮培养的第 1 个月通过不断的连续继代、滤网筛选,可剔除较大的原胚和结节状愈伤组织。经过 3 个月的继代培养可得到较为均质的由单细胞及结构较松散的小细胞团(图 1, F)组成的浅黄色 ECS(图 1, E)。这些细胞大多呈圆形、形态较小,具有浓厚的黄色的细胞质和大核仁。

2.2.1 不同浓度的 2,4-D 与悬浮培养体系的建立和保持:悬浮培养过程中,添加 $2.25\mu\text{mol/L}$ 、 $4.5\mu\text{mol/L}$ 和 $9\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 在 3 个月的继代培养后均可得到分散均匀的 ECS,胚性细胞可正常地增殖,形态结构也没有什么区别,每个继代周期的培养后细胞生长量也无显著差异(图 4)。但用 $2.25\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 建立的悬浮系经过 8 个月的继代培养后其颜色由浅黄色逐渐变为白色,而且在体细胞胚诱导过程中胚性细胞(团)易褐化死亡,可能是由于其胚性逐渐丧失的原因。而 $4.5\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 建立的 ECS 在继代保存 20 个月后依然具有旺盛的增殖能力和体细胞胚发生能力。因此,就贡蕉 ECS 的建立和胚性的保持而言, $4.5\mu\text{mol/L}$ 浓度的 2,4-D 最合适。

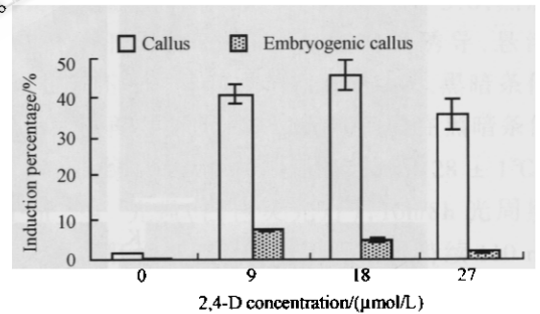


图 3 2,4-D 浓度对贡蕉未成熟花序花梳愈伤组织诱导的影响

Fig. 3 Effect of 2,4-D concentration on callus induction of young male flower in *Musa acuminata* cv. Mas (AA)

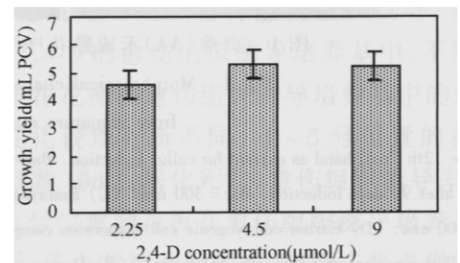
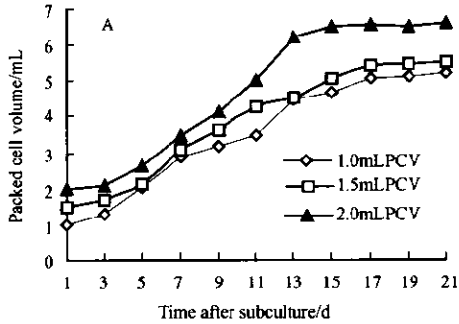


图 4 2,4-D 浓度对贡蕉胚性细胞悬浮系生长量的影响

Fig. 4 Effect of 2,4-D concentration on the growth of embryogenic cell suspensions in *Musa acuminata* cv. Mas (AA)

2.2.2 不同的起始接种量对悬浮培养体系继代培养的影响:如图 5 所示,6 个不同起始接种量的贡蕉

胚性培养物生长趋势大致相同,但其每个继代周期的最终生长量却有较大的差别。1.0mL PCV、1.5mL PCV、2.5mL PCV 和 3.0mL PCV 起动的 ECS 在 21d 的培养后最终增长量大约为 4.2mL PCV,2.0mL PCV 起动的 ECS 的最终增长量为 4.6mL PCV,而 5.0mL PCV 的最终生长量只有 3.0mL PCV,为 6 个起始接种量的最低值。可见,在该培养体系的继代培养中,起始接种量的大小与最终的增长量并不呈正相关,以 2.0mL PCV 的 ECS 启动悬浮培养最适合培养物的生长。



从 2.0mL PCV 起始量的贡蕉 ECS 的生长曲线来看(图 5),前 3d 胚性培养物处于滞后期,随后开始较快速的生长,进入指数增长期,到第 9d 时生长量增加了 1 倍,第 15d 达到生长最高峰,细胞密实体积达 6.6mL,比初始接种量增加了 2 倍以上。随后悬浮细胞系进入稳定期,由于培养液的成分消耗及 pH 值变化等因素影响,培养物的密实体积不再发生较大变化。因此贡蕉胚性细胞悬浮培养的继代周期为 15d 较合适。

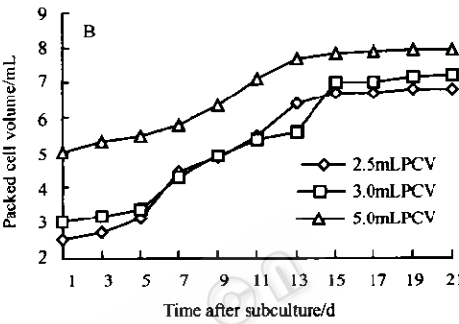


图 5 不同起始接种量对贡蕉胚性细胞悬浮系生长的影响

Fig.5 Effect of initial inoculation volumes on the growth of embryogenic cell suspensions of *Musa acuminata* cv. Mas (AA)

2.3 体细胞胚的诱导和成熟

贡蕉胚性悬浮细胞被转移到体细胞胚诱导培养基 MSD 中培养 15d 后肉眼可见到体细胞胚的出现(图 1,G),再经过 15~25d 的培养,可见到大量的体细胞胚发生,此时的体细胞胚呈白色半透明状,多数为球形胚(图 1,H)。90d 后,体细胞胚发育为不透明的、直径约 1.0~1.5mm 大小的成熟体细胞胚(图 1,I)。统计表明,贡蕉胚性悬浮细胞具有很强的体胚发生能力,平均为 280×10^3 个/mL PCV。

2.4 体细胞胚的萌发和植株再生

成熟的体细胞胚在 MG 培养基中培养 10d 后开始萌发,可见到伸长的绿色叶鞘(图 1,Ja)和开始抽出的幼根(图 1,Jb),20d 后可见到叶片的伸长生长(图 1,K)。但有些体胚则只是表现为膨大或出现愈伤化,可能是由于体胚发育的不同步导致其不完全发育而造成的。到第 30 天时,萌发率为 17.28%。已萌发的体胚在 MR 生根培养基中培养 10d 后开始出根(图 1,L),后发育成为健康的再生植株(图 1,M)。但其中约有 0.79% 已萌发体胚的叶鞘出现玻璃化(图 1,L 中箭头所指体胚),后期无法正常生根,所以植株转化率为 16.49%。

3 讨论

利用香蕉未成熟雄花序作为外植体诱导胚性愈伤组织,并建立 ECS 的方法曾在不同实验室、不同基因型和不同品种上获得成功^[7-12]。本实验在二倍体贡蕉(AA)品种上取得的成功进一步证明了香蕉未成熟花序具有较强的胚性潜力,并具有可重复性。同样,未成熟花序在其它植物上也有所应用并得到较高的胚性反应,如 *cocos nucifera*^[24]、*wheatgrass*^[25]、*kodo millet*^[26] 和 *Lolium multiflorum* Lam^[27] 等。本实验中,77.78% 的胚性愈伤组织来源于第 6~12 号位置的花梳,而其它位置的花梳胚性愈伤组织诱导率都很低。可见,处于不同发育阶段的花梳具有不同的生理状态,在愈伤组织诱导的过程中表现出的胚性反应差异很大。该结果与 Escalant 等^[7] 在 Grand Naine(AAA)品种中得到的结果(7~13 号位置的花梳胚性培养物的诱导率占 74%)较为吻合。而 *cocos nucifera*^[24] 和 *Lolium multiflorum* Lam^[27] 则表现为花序顶端 1~10mm 幼嫩的花序比其后位置的花序具有更强的胚性发生能力。我们认为,第 1~5 号位花梳胚性反应较低的原因主要是由于其在愈伤组织诱导过程中容易褐化死亡造成的。因此,6~12 号位置的花梳应为该培养体系中愈伤组织诱导培养的主要

外植体。

关于香蕉胚性愈伤组织的鉴别, 大多研究组认为白色易分散的愈伤组织为胚性愈伤组织, 利用该类愈伤组织可启动悬浮培养, 但在液体培养过程中容易出现褐化^[8, 11, 23]。本实验结果表明, 贡蕉的胚性愈伤组织呈浅黄色、易分散, 利用该类愈伤组织启动悬浮培养时, 在摇床的振荡作用下细胞团容易松散开, 且未见到褐化现象。可见该类型的愈伤组织更适于悬浮培养, 但胚性愈伤组织形态的差别可能与研究材料的品种以及研究方法有关。香蕉胚性愈伤组织的诱导与多因素有关, 其中包括基因型、植物生长调节物质、有机添加物、外植体、花梳的位置、大小甚至分离的方法、季节、气候和培养方法等^[14], 导致实验的重复性不高, 且诱导周期长, 需 5~6 个月不等, 从而使胚性愈伤组织的获得成为香蕉胚性细胞悬浮培养体系建立的关键。就植物生长调节物质的影响而言, 在前人以香蕉未成熟花序为外植体的类似研究中, 愈伤组织的诱导均同时配合使用 2,4-D、IAA 和 NAA 三种生长素, 而没有任何细胞分裂素的参与, 这有别于组织培养的普遍理论: 高生长素和低细胞分裂素浓度有利于愈伤组织的诱导和增殖^[28], 其作用原理和机制未见研究报道。由于对多数植物材料而言, 2,4-D 是诱导愈伤组织和细胞悬浮培养的最有效物质^[28], 本实验研究了 2,4-D 浓度对贡蕉愈伤组织诱导的影响。结果表明, 9 $\mu\text{mol/L}$ 比 18 $\mu\text{mol/L}$ 和 27 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 诱导效果好, 愈伤组织诱导率为 40.96%, 胚性愈伤组织诱导率可达 7.45%。而在早期的诸多研究报道中, 以 Pelipita (ABB)^[7]、Rasthali (AAB)^[22]、Grand naine (AAA)^[8, 24] 等属于不同基因型的不同品种未成熟花序作为外植体诱导愈伤组织时, 都沿用 Ma^[29] 最初使用的 18 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D, 而未见关于 2,4-D 浓度的比较实验, 其中 Grand naine 愈伤组织诱导率为 50%, 胚性愈伤组织诱导率为 2%~6%^[23]。本实验结果表明香蕉胚性愈伤组织诱导所需的合适的 2,4-D 浓度应因品种和基因型而异。

优质的香蕉 ECS 的建立需要经历一个从胚性愈伤组织的诱导、然后不断筛选的培养过程, 这个过程至少需要 1 年以上的时间, 才具备稳定的形态发生能力, 并应用于基因转化、原生质体分离和融合、体细胞诱变以及种质资源的保存等其他领域。然而 ECS 的形态发生能力会随着反复的继代培养而逐渐下降, 甚至完全消失^[19, 28], 对此原因曾提出三种假说: “遗传学说”、“生理学说”和“竞争学说”, 但尚无

定论^[19]。在本实验中我们同样观察到贡蕉 ECS 在继代培养中形态发生能力的下降和丧失的现象, 而且与继代培养时使用的 2,4-D 浓度有关。4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 建立的悬浮系在继代培养保持 20 个月后至至今依然具有很强的体细胞胚胎发生能力, 而 2.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 建立和保持的悬浮系的形态发生能力只能保持 8 个月左右。黄怡菁等^[18] 的研究结果同样表明, Pei-chiao 和 Sen-Jen Chiao 等品种的 ECS 的保持也与 2,4-D 浓度有关, 其中 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 可使悬浮系保持到 5 年, 而在低于和高于 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,4-D 条件下悬浮细胞生长较差, 且导致 1.5~2.5 个月内悬浮细胞逐渐失去胚性, 而去除 2,4-D 的作用, 悬浮细胞则发育为体细胞胚, 从而失去悬浮培养循环生长的特性。可见合适浓度的 2,4-D 是香蕉悬浮培养所必须的。结合“生理学说”分析, 合适浓度的 2,4-D 可能具有调节悬浮系胚性发生能力的保持所必需的内源激素平衡的作用。由于目前尚无十分有效的方法能抑止悬浮系细胞在培养过程中胚性的丧失, 日渐成熟的超低温保存技术为优质的 ECS 的长期保存提供了新的保障。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Grapin A, Schwendiman J, Teisson C. Somatic embryogenesis in plantain banana, *In vitro*. *Plant Cellular and Development Biology*, 1996, 32: 66-71
- [2] Cronauer SS, Krikorian AD. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Reports*, 1988, 7: 23-25
- [3] Escalant JV, Teisson C. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports*, 1989, 7: 665-668
- [4] Novak FJ, Afza R, Van Duren M *et al*. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology*, 1989, 7: 147-158
- [5] 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: 125-135
- [6] Schoofs H, Panis B, Swennen R. Competence of scapels for somatic embryogenesis in *Musa*. *Acta Hort.*, 1998, 490: 475-483
- [7] Escalant JV, Teisson C, Cote F. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro Dev Biol*, 1994, 30: 181-186
- [8] Cote FX, Domergue R, Monmarson S *et al*. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand naine. *Physiol Plant*, 1996, 97: 285-290
- [9] Grapin A, Ortiz JL, Lescot T *et al*. Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of False Horn Plantain, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 2000, 61: 237-244

- [10] Rafael GK, Manuel de FS, Laisyn PP *et al.* Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor, *Plant cell. Tissue and Organ Culture*, 2002, **68**: 21 – 26
- [11] Jalil M, Khalid N, Othman RY. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA), *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 2003, **75**: 209 – 214
- [12] Xu CX(徐春香), Panis B, Strosse H *et al.* The induction of embryogenic callus and the establishment of embryogenic cell suspension of *Musa* spp. *Journal of South China Agricultural University* (Natural Science Edition) (华南农业大学学报(自然科学版)), 2004, **25** (1): 70 – 73
- [13] Wei YR(魏岳荣), Li Z(李哲), Li J(李佳) *et al.* Recent progress in biotechnological research on bananas. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2003, **23** (5): 64 – 68
- [14] 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
- [15] Strosse H, Domergue R, Panis B *et al.* Banana and plantain embryogenic cell suspensions (Vezina A. and Picq C, eds). INIBAP Technical Guidelines 8. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, 2003
- [16] Department of sciences and education of Guangdong agricultural office (广东省农业办公室科教处) and Pomology research institute of Guangdong academy of agricultural sciences (广东省农业科学院果树研究所) edited. The atlas of banana and pineapple in Guangdong. Guangzhou: Guangdong science and technology press, 1998, pp. 21
- [17] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473 – 497
- [18] HUANG IC(黄怡菁), XU ZT(许圳涂), MA SS(马溯轩). Cycling growth characters in embryogenesis cell suspension culture of banana AAA Cavendish subgroup and AAB cultivars. *J Chinese Soc Hort Sci.* (中国园艺), 1999, **45** (2): 130 – 143
- [19] Li JM(李浚明). *Plant Tissue Culture Lectures*. 2nd ed, Beijing: China Agricultural University Press, 2002: pp. 101 – 102
- [20] Schenk RU, Hildebrandt AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot*, 1972, **50**: 199 – 204
- [21] Morel G, Wetmore RH. Tissue culture of monocotyledons. *Amer J Bot*, 1951, **38**: 138 – 140
- [22] Ganapathi TR, Suprasanna P, Bapat VA *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from male flower buds in banana. *Current Science*, 1999, **76**(9): 1228 – 1231
- [23] Navarro C, Escobedo RM, Mayo A. *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana, *Plant cell. Tissue and Organ Culture*, 1997, **51**: 17 – 25
- [24] Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F *et al.* Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 1994, **13**: 218 – 221
- [25] Wang ZY, Bell J, Hopkins A. Establishment of a plant regeneration system for wheatgrasses (*Thinopyrum*, *Agropyron* and *Pascopyrum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2003, **73**: 265 – 273
- [26] Kaur P, Kothari SL. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2, 4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, **77**: 73 – 79
- [27] Dale PJ, Thomas E, Brettell RIS *et al.* Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1981, **1**: 47 – 55
- [28] Huang XL(黄学林), Li XJ(李筱菊). *Morphogenesis and Regulator of In Vitro Culture in Higher Plant*, Beijing: Science Press, 1995
- [29] Ma SS. Somatic embryogenesis and plant regeneration of banana. *Proceedings of a Symposium on tissue culture of Horticultural crops*, National Taiwan University, 1991