

# 香蕉分生小球体途径胚性细胞悬浮系的建立

徐春香\* 李华平\*\* 肖火根 范怀忠

(华南农业大学资源学院植物病毒研究室, 广州 510642)

**摘要:** 以 7 个香蕉品种未成熟雄花为外植体均获得了分生小球体 (meristematic globules)。分生小球体的诱导率因基因组型和品种而异, 为 15%~81%, 分生小球体的特点及开始出现的时间也受基因组型和品种的影响。以分生小球体为起始材料, 建立了‘广东 2 号’、‘华农 7 号’及‘河口龙牙’3 个品种的胚性细胞悬浮系, 并通过体胚发生途径获得了前两个品种的再生植株。

**关键词:** 香蕉; 分生小球体; 胚性细胞悬浮系; 植株再生

**中图分类号:** Q 943.1; S 668.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 05-0580-03

## 1 目的、材料与方法

香蕉 (*Musa* spp.) 主要栽培品种均为三倍体, 不能通过传统的杂交育种方式获得优良新品种。植物基因工程的发展为创新香蕉种质提供了新途径, 而其胚性细胞悬浮系 (Embryogenic Cell Suspension, ECS) 的建立与植株再生技术是进行遗传转化的基础<sup>[1]</sup>, 但到目前为止已获得 ECS 品种极少<sup>[2~4]</sup>, 且都是通过建立胚性愈伤组织获得的。本研究以我国种植的多个香蕉品种为试验材料, 以由未成熟雄花诱导产生的分生小球体 (meristematic globules) 为起始材料成功建立了 ECS 并获得再生植株。

供试材料包括 7 个香蕉品种。取未成熟雄花常规灭菌后接种在 M1 培养基<sup>[3]</sup>上, 于 (28 ± 2) °C 暗培养。5 个月后调查其分生小球体的诱导率。悬浮培养时挑选适量黄白色松脆的分生小球体放入 50 mL 的三角瓶中, 加入 10 mL 的液体培养基 (MS + 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup> + 蔗糖 30 g L<sup>-1</sup>) 于摇床上振荡培养 (100 r min<sup>-1</sup>)。在悬浮培养的初期每 3~4 d 继代 1 次, 1~2 个月后每周继代 1 次。待悬浮系中有适量的胚性细胞 (团) 后, 用直径为 0.45 mm 的不锈钢网筛进行分离。

植株再生时以‘华农 7 号’和‘广东 2 号’两个品种的 ECS 为试验材料。先轻轻摇晃三角瓶, 吸取其中的悬浮细胞 (团), 在 MR 培养基 (1/2 MS + 磷酸二氢钾 200 mg L<sup>-1</sup> + 肌醇 100 mg L<sup>-1</sup> + 抗坏血酸 10 mg L<sup>-1</sup> + 蔗糖 45 g L<sup>-1</sup> + 琼脂 7.0 g L<sup>-1</sup>) 上进行暗培养, 促进体胚的再生。获得的再生材料依次转入 RD2<sup>[2]</sup>和 REG 培养基<sup>[2]</sup>各进行 1 个月的光培养, 以利体胚的成熟与萌发。已萌发的体胚转入 MS 培养基<sup>[5]</sup>进行促根与导梢。培养温度为 (28 ± 2) °C, 每天光照 10 h, 光照强度为 4500 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

以 1999 年 9 月接种的‘广东 2 号’为例, 未成熟雄花接种至诱导培养基上 1~2 周后开始膨大, 经 6~8 周的培养后, 开始陆续出现细小的黄白色颗粒状愈伤组织, 再经 3~5 个月的继续培养, 黄白色的细小颗粒发育成为圆形至长圆形、直径为 0.5~2.5 mm 的黄白或黄绿色紧密的愈伤组织, 表面较

收稿日期: 2002-10-08; 修回日期: 2003-02-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39870434); 广东省自然科学基金项目 (990714)

\* 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, Email: huaping@scau.edu.cn

为光滑，即为分生小球体（图版，1）。分生小球体是香蕉未成熟雄花在 M1 培养基上产生的最主要的愈伤组织，其次是透明、松软而富含水分的愈伤组织，有时还可以观察到产生白至黄白色、透明而松脆的胚性愈伤组织，但其发生概率较低。

香蕉的基因组型和品种不同，分生小球体开始出现的时间、分生小球体的诱导率、大小及特点等均有所不同。基因组型为 ABB 的大蕉和粉蕉，分生小球体直径较大，约为 1~3 mm，表面有一层粘稠状淀粉物；而基因组型为 AAA 的香蕉，分生小球体的直径较小，表面也没有明显的粘稠状淀粉物；基因组型为 AAB 的龙牙蕉的分生小球体的特点与基因组型为 ABB 的较相似。与基因组型为 AAB、ABB 的比较，基因组型为 AAA 的香蕉诱导产生分生小球体所需要的时间较短，每排雄花产生的分生小球体数量较多，分生小球体的诱导率也较高。基因组型同为 AAA 的 4 个品种间，在上述几个方面也略有差异（表 1）。

表 1 基因组型与品种对分生小球体诱导的影响

Table 1 Effects of genotypes and cultivars on the induction of meristematic globules

基因组型 Genotypes	品 种 Cultivars	最早出现 The first appearance (week)	直 径 Diameter (mm)	每排花产生分生小球体数 Globules number from per raw flower	诱导率 Induction percentage (%)
AAA	巴西蕉 Baxijiao	6~10	0.5~2.0	10~35	69
AAA	广东 2 号 Guangdong 2	6~9	0.5~2.0	10~50	81
AAA	威廉斯 Williams	8~12	0.5~2.5	8~30	62
AAA	华农 7 号 Huanong 7	8~10	0.5~2.0	10~35	64
AAB	河口龙牙 Hekou Longya	9~13	1.0~3.0	1~15	23
ABB	沙巴大蕉 Shaba Dajiao	10~15	1.0~3.0	1~8	27
ABB	东莞粉蕉 Dongguan Fenjiao	10~15	1.0~3.0	1~10	15

注：A 代表尖叶蕉；B 代表长梗蕉。Note: A presents *Musa acuminata*, B presents *Musa balbischiana*.

## 2.2 ECS 的建立

黄白色、松脆的分生小球体接种入液体培养基中后，富含淀粉粒的表层细胞首先被释放出来。随着不断继代培养、分生小球体积增大、并逐渐失去原来的外形。因种类和品种不同，经 2~4 个月的培养后，主要形成两种不同类型的愈伤组织，一种是多突起状不规则球形，突起较大且较光滑，颜色较鲜黄，它们在整个培养过程中一直释放富含淀粉粒的细胞，不能获得 ECS；另一种是在表面有许多较小的颗粒状突起。后者在悬浮培养初期释放高度液泡化的细胞，培养 2~4 个月后开始释放椭圆形富含淀粉粒的细胞，在不断继代培养的刺激下，最终向悬浮系中释放胚性细胞（团）。当悬浮系中的胚性细胞团达到一定量后，将其与母体分离后得到含有许多胚性细胞团的 ECS。建立好的 ECS 每周继代 1 次，再经约 1 个月左右的培养后，悬浮系中又有部分细胞团会增大至 1 000  $\mu\text{m}$  左右，悬浮系中不仅含有胚性细胞团，同时还含有体细胞原胚、节状突起及单个的细胞。

香蕉的基因组型和品种不同，其通过分生小球体获得 ECS 的难易程度不同，从基因组型为 AAA 的香蕉建立 ECS 相对较易，而从基因组型为 ABB 的大蕉和粉蕉未能获得 ECS，基因组型为 AAB 的龙牙蕉则介于二者之间；基因组型同为 AAA 的 4 个香蕉品种之间又有所不同（表 2）。

## 2.3 体胚与植株的再生

悬浮系中的细胞（团）在 MR 培养基上经一段时间的培养后，可获得增殖的胚性愈伤组织、

表 2 分生小球体在液体培养基中的培养结果

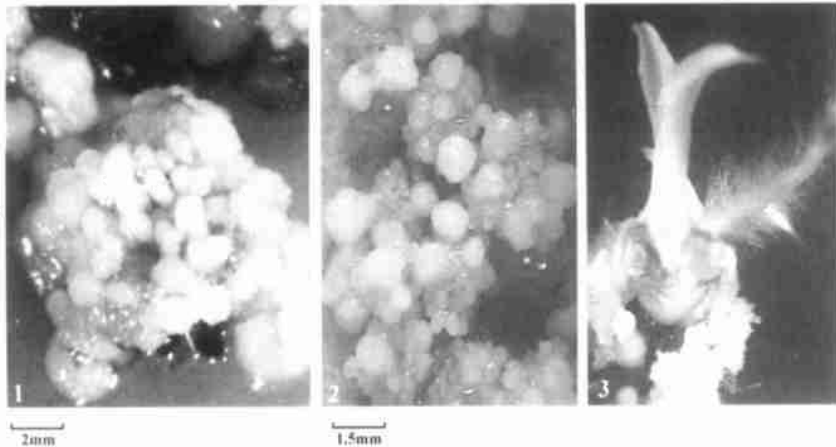
Table 2 Results obtained after culture of meristematic globules in liquid medium

基因组型 Genotypes	品 种 Cultivars	样品数 Samples	悬浮系数 ECSs
AAA	广东 2 号 Guangdong 2	16	2
AAA	华农 7 号 Huanong 7	24	4
AAA	巴西蕉 Baxijiao	18	0
AAA	威廉斯 Williams	7	0
AAB	河口龙牙 Hekou Longya	8	1
ABB	沙巴大蕉 Shaba Dajiao	15	0
ABB	东莞粉蕉 Dongguan Fenjiao	12	0

A 代表尖叶蕉；B 代表长梗蕉；ECS，胚性细胞悬浮系。

A presents *Musa acuminata*; B presents *Musa balbischiana*; ECS, Embryogenic Cell Suspension.

许多不同大小的颗粒状结构及再次产生的分生小球体。再生体胚在接种约 1 个月后开始出现, 有单个的, 也有许多体胚聚集在一起的体胚群。随着培养时间的延长, 体胚数量逐渐增多, 体胚也由透明的幼龄体胚逐步发育成熟 (图版, 2)。从每 mL 压缩细胞体积 (PCV) 的 ECS 中所获得的再生体胚数约为  $10^4$ 。转入 RD2 培养基 1 个月后, 大部分分散的体胚萌发, 再经 REG 培养基的培养, 膨大变绿或长出绿色的叶鞘。在 MR 培养基中获得的分生小球体及颗粒状结构经 RD2 和 REG 培养基的培养后通常只发生不同程度的膨大现象, 而不能获得再生体胚。转入 RD2 培养基时仍为愈伤组织者经 RD2 和 REG 培养基的培养后, 则形成一些表面具有颗粒状突起的紧密团块状结构, 同时依然伴有愈伤组织增殖现象。已萌发的体胚转入 MS 培养基后约半个月后开始长根, 并最终发育成完整植株 (图版, 3)。*‘华农 7 号’* 和 *‘广东 2 号’* 的植株再生率分别为 13.93 % 和 8.21 %。



图版说明: 1. 香蕉的分生小球体; 2. 再生体胚; 3. 再生香蕉植株

Explanation of plates: 1. Meristematic globules of *Musa* AAA; 2. Regenerable embryos; 3. Regenerable plants of *Musa* AAA

## 参考文献:

- 1 Krikorian A D, Cronauer S S. Aseptic culture techniques for banana and plantain improvement. *Economic Botany*, 1984, 38: 322 ~ 331
- 2 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
- 3 Côte F X, 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
- 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). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, 61: 237 ~ 244
- 5 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15: 473 ~ 497

## Establishment of Embryogenic Cell Suspensions from Meristematic Globules of *Musa* spp.

Xu Chunxiang, Li Huaping, Xiao Huogen, and Fan Huaizhong

(Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Meristematic globules were induced from immature male flowers of 7 different banana cultivars. The induction percentages of meristematic globules from immature male flowers was from 15 % to 81 %, depending on the cultivars. Furthermore, both of the characters and the induction time for the appearance of meristematic globules varied with the cultivars. Embryogenic cell suspensions (ECSs) of 3 banana cultivars, 'Guangdong 2', 'Huanong 7' and 'Hekou Longya' were established successfully from meristematic globules, and regenerable plants were got successfully from the ECSs of the first two cultivars.

**Key words:** Banana; Meristematic globules; Embryogenic cell suspension; Plant regeneration