

‘过山香’香蕉原生质体培养及植株再生

肖望^{1,2}, 黄霞¹, 魏岳荣¹, 赵杰堂¹, 戴雪梅¹, 黄学林^{1*}

(¹中山大学生命科学学院, 教育部基因工程重点实验室, 广州 510275; ²广东教育学院生物系, 广州 510303)

摘要: 以‘过山香’香蕉的胚性悬浮细胞(Embryogenic cell suspensions, ECS)为起始材料分离原生质体, 酶解液的组成为: 3.5%纤维素酶R-10、1%离析酶R-10、0.15%果胶酶Y-23、204 mmol·L⁻¹ KCl、67 mmol·L⁻¹CaCl₂和0.41 mol·L⁻¹甘露醇, 原生质体产量为 $3.1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ PCV ECS (PCV: packed cell volume, 细胞密实体积)。分别以培养基‘A’和‘B’为培养成分在液体浅层培养和看护培养两种培养系统中进行原生质体培养。结果表明: 在液体浅层培养系统中, 采用培养基‘B’比培养基‘A’效果好, 原生质体的细胞分裂频率和细胞团形成频率分别约是采用培养基‘A’的3倍和10倍; 所获得的培养物为只能增殖而不能进一步分化的非胚性细胞团。在看护培养系统中, 采用培养基‘A’与培养基‘B’时, 细胞分裂频率和细胞团形成频率没有显著差异; 所获得的细胞团具有典型的胚性细胞特征。将从看护培养中获得的细胞团转移到体胚诱导培养基上, 培养45 d后, 从 10^5 个原生质体获得1550个体胚。继续在体胚诱导培养基上培养30 d, 7.8%的体胚能萌发。萌发的体胚在MS+0.1%活性炭的培养基中发育成健壮植株, 移栽后成活良好。

关键词: 香蕉; 胚性悬浮细胞; 原生质体; 植株再生

中图分类号: S 668.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 06-0873-06

Plant Regeneration from Protoplast Culture of Musa AAB Silk ‘Guoshanxiang’

XIAO Wang^{1,2}, HUANG Xia¹, WEI Yue-rong¹, ZHAO Jie-tang¹, DAI Xue-mei¹, and HUANG Xue-lin^{1*}

(¹The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Zhongshan (Sun Yat-sen) University, Guangzhou 510275, China; ²Biology Department, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510303, China)

Abstract: A protocol for plant regeneration from protoplast of Musa AAB Silk ‘Guoshanxiang’ via somatic embryogenesis was developed. Viable protoplasts were isolated from embryogenic cell suspension (ECS) in an enzyme mixture of 3.5% cellulose R-10, 1% macerozyme R-10, 0.15% pectinase Y-23 and 0.41 mol·L⁻¹ manntitol, the yield was 3.1×10^7 protoplasts per mL packed cell volume (PCV) ECS. Liquid and feeder layer culture systems with medium ‘A’ and medium ‘B’ were used respectively for protoplast culture. In liquid culture system, medium ‘B’ was more efficient for inducing cell division and colony formation which was about 3-fold and 10-fold respectively, compared to that with medium ‘A’. However, all protoplast-derived cell colonies obtained from liquid culture system could not develop further. In feeder layer culture system, there was no significant difference between medium ‘A’ and medium ‘B’ on cell division and colony formation of the cultured protoplasts. Protoplast-derived cell colonies from feeder layer culture system were then transferred onto embryo induction medium for somatic embryogenesis. After forty-five days the cell colonies were transferred on embryo induction medium, 1550 mature embryos were obtained from 10^5 protoplasts. After another 30 d of culture, 7.8% of mature embryos germinated. Normal plantlets were obtained from MS

收稿日期: 2007-12-20; 修回日期: 2008-04-21

基金项目: 国家青年自然科学基金项目(30400287); 广东省自然科学基金博士启动项目(04300538); 广东省自然科学基金项目(06023159); 广东省科技攻关项目(2006B20101014); 广州市科技计划项目(2006Z3-E0281)

* 通讯作者 Author for correspondence (Email: Huangxl@mail.sysu.edu.cn)

basal medium supplemented with 0.1% activated charcoal and the plantlets were transferred into pots and grew well.

Key words: banana; protoplast; somatic embryogenesis; plant regeneration

香蕉 (*Musa* spp.) 是世界上重要的热带、亚热带水果。目前香蕉产业面临着严重的病虫害、台风、冷害等的袭击，尤其是香蕉枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 对香蕉产业造成的危害最大，现已成为我国乃至全世界香蕉产业的毁灭性病害 (卓国豪 等，2005)。因此尽快培育出具有抗香蕉枯萎病的香蕉新品种，是解决当前问题最根本的措施。但大多数香蕉栽培种属于三倍体，果实无种子，难于采用传统的杂交育种来进行品种改良。体细胞杂交育种为香蕉种质的遗传改良提供了一条有效途径，目前关于香蕉体细胞杂交的研究还处于初步探讨阶段。

自从 Bakry (1984) 分离获得第一个活的香蕉原生质体以来，已陆续有关于香蕉原生质体培养成功的报道 (Megia et al., 1993; Panis et al., 1993; Matsumoto & Oka, 1998; Assani et al., 2001, 2002, 2006; 魏岳荣 等, 2007; Xiao et al., 2007)。研究结果表明，香蕉原生质体培养的成功除取决于以胚性悬浮细胞 (Embryogenic cell suspensions, ECS) 为分离原生质体的材料外，采用看护培养方法也是一个重要的因素。由于所需要的技术复杂以及培养基试剂的昂贵，限制了香蕉原生质体培养的推广应用。

‘过山香’香蕉 (*Musa* AAB Silk ‘Guoshanxiang’) 是我国特有的优良香蕉种植品种，但植株易感枯萎病 (黄秉智 等, 2005)，需要进行品质改良以适应日益严峻的环境。

作者以‘过山香’的 ECS 为外植体分离原生质体，通过比较液体浅层培养和看护培养以及改良培养基成分的研究，采用简化配方的培养基 ‘B’，通过体细胞胚胎发生途径获得了‘过山香’香蕉的原生质体再生植株。

1 材料与方法

1.1 材料

‘过山香’香蕉的 ECS 由本实验室通过多芽体途径建立 (魏岳荣 等, 2005a)，用于原生质体分离与培养；贡蕉 [*Musa acuminata* cv. Mas (AA)] ECS 由本实验室通过雄花序途径获得 (魏岳荣 等, 2005b)，用作原生质体培养的看护细胞。

所有的 ECS 都在 M2 液体培养基中，每 15 d 继代一次，接种密度为 1.5%。

M2 培养基 (Côte et al., 1996) 组成为：MS 基本培养基 (Murashige & Skoog, 1962) + 100 mg · L⁻¹ 麦芽水解物 + 680 μmol · L⁻¹ 谷氨酰胺 + 4.1 μmol · L⁻¹ 生物素 + 4.5 μmol · L⁻¹ 2, 4-D + 130 mmol · L⁻¹ 蔗糖。除另有说明外，文中所有的培养过程都在黑暗 (27 ± 2) 条件下进行。

1.2 原生质体的分离

取继代培养 4 个月的‘过山香’ECS 用于原生质体分离。在最近继代的 4 ~ 7 d 时取样，ECS 用 200 μm 的筛网过滤后，取 0.5 mL 细胞密实体积 (packed cell volume, PCV) 的 ECS 加入到 10 mL 酶液进行酶解，酶液组成为 3.5% 纤维素酶 R-10、1% 离析酶 R-10、0.15% 果胶酶 Y-23、204 mmol · L⁻¹ KCl、67 mmol · L⁻¹ CaCl₂、0.41 mol · L⁻¹ 甘露醇，pH 5.6 ~ 5.8。酶解 8 ~ 11 h 后，采用过滤离心法进行原生质体的洗涤和纯化 (Xiao et al., 2007)，然后采用荧光素双醋酸酯染色法进行原生质体活力检测 (Widholm, 1972)。

1.3 原生质体的培养

将原生质体分别用培养基 ‘A’ 和 ‘B’ 悬浮，密度调整到 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹，采用以下两种方法进行培养。

(1) 液体浅层培养：取 2 mL 原生质体悬浮液加入直径 6 cm 培养皿，用 Parafilm 密封，刚开始 1~2 d 经常轻轻摇动，避免原生质体分布不均匀并帮助通气。

(2) 看护培养：以贡蕉 ECS 作看护培养细胞，看护培养基的制作参考 Xiao 等 (2007) 所描述的方法，在制作好的看护培养基上覆盖混合纤维素滤膜。将 1 mL 原生质体悬浮液转移到混合纤维素滤膜上进行培养。

培养 14 d 时统计原生质体细胞分裂频率，28 d 时统计细胞团形成频率。细胞分裂频率 (%) = 分裂一次或一次以上的原生质体数 / 原生质体接种总数 × 100；细胞团形成频率 (%) = 含 4~6 个以上细胞的细胞团 / 原生质体接种总数 × 100。

培养基 ‘A’ 的组成参考文献 (Assani et al., 2001)：N6 盐 (Chu et al., 1975) + KM 维生素、有机酸、糖醇 (Kao & Michayluk, 1975) + Morel 维生素 (Morel & Wetmore, 1951) + 1.9 mmol · L⁻¹ KH₂PO₄ + 0.5 mmol · L⁻¹ MES + 0.9 μmol · L⁻¹ 2, 4-D + 5.4 μmol · L⁻¹ NAA + 2.3 μmol · L⁻¹ ZT + 117 mmol · L⁻¹ 蔗糖 + 0.4 mol · L⁻¹ 葡萄糖，pH 5.7，过滤灭菌。

培养基 ‘B’ 的组成为：MS 基本培养基 + 100 mg · L⁻¹ 麦芽水解物 + 680 μmol · L⁻¹ 谷氨酰胺 + 4.1 μmol · L⁻¹ 生物素 + 0.5 mmol · L⁻¹ MES + 4.5 μmol · L⁻¹ 2, 4-D + 117 mmol · L⁻¹ 蔗糖 + 0.4 mol · L⁻¹ 葡萄糖，pH 5.7，过滤灭菌。

1.4 体胚发生与植株再生

将获得的细胞团转到体胚诱导培养基 (Xiao et al., 2007)，培养 45 d 时统计体胚数。所获得的体胚转移到新鲜的体胚诱导培养基上，一个月后统计体胚萌发频率。将萌发出芽 2~3 cm 的体胚转移到 MS 基本培养基 + 0.1% 活性炭的培养基中，促进植株发育。体胚萌发和植株发育在 16 h/8 h 光周期下进行。再生苗长至高 10~15 cm 时移到温室种植。

2 结果与分析

2.1 原生质体的分离和培养

2.1.1 原生质体分离

刚分离的原生质体球形，细胞质浓厚，内含物丰富，细胞大小不一 (图版，1)。原生质体产量为 3.1×10^7 个 · mL⁻¹ PCV ECS，活力 85% 以上。

2.1.2 液体浅层培养

进行液体浅层培养时，不同培养基对细胞形态和细胞分化过程的影响没有明显差异。培养 4~5 d 后，一些原生质体开始膨大变为椭圆形；培养 10 d 左右，原生质体出现第 1 次分裂 (图版，2)；继续培养 20 d 后，可见到 4~6 个细胞组成的小细胞团 (图版，3)；所获得的细胞团表现为中空，内含物少，失去明显的胚性特征 (图版，3)。这些细胞团只能增殖，转移到体胚诱导培养基上不能进一步分化。

不同培养基对细胞分裂频率和细胞团形成频率的影响有明显差异，采用培养基 ‘B’ 培养 14 d 时，细胞分裂频率约是采用培养基 ‘A’ 的 3 倍；培养 28 d 时，细胞团形成频率约是采用培养基 ‘B’ 的 10 倍 (表 1)。

2.1.3 看护培养

进行看护培养 (图版，4) 时，培养基 ‘A’ 或 ‘B’ 对细胞形态和细胞分化过程的影响没有明显的差异。经过 3 d 的培养，原生质体变成椭圆形的细胞，细胞质浓厚，内含物丰富 (图版，5-a)。经过 7 d 左右的培养，原生质体开始第一次分裂 (图版，5-b)，随后进行第二次分裂。15 d 后，分裂形成 8~10 细胞组成的细胞团 (图版，5-c)。经过 20 d 的培养，成为肉眼可见的细胞团，45 d 时可见大量的肉眼可见的细胞团。

由于细胞分裂是不同步的，因此在同一时期可看到单个细胞、二细胞、四细胞以及多细胞团。所形成的细胞团细胞质浓厚，球形，具有典型的胚性细胞特征（图版，5），转移到体胚诱导培养基上能进一步分化。

采用培养基‘A’和培养基‘B’对细胞分裂频率和细胞团形成频率的影响没有显著差异（表1）。



图版说明：

1. 刚分离的原生质体，标尺 = 50 μm；2. 在液体浅层培养系统中发生的第一次细胞分裂，标尺 = 50 μm；3. 液体浅层培养系统中形成的细胞团，标尺 = 50 μm；4. 看护培养装置，标尺 = 2.5 cm；5. 看护培养时，(a) 原生质体复壁变成椭圆形的细胞，(b) 第一次分裂，(c) 细胞团，标尺 = 100 μm；6. 体胚，标尺 = 2.5 mm；7. 体胚萌发，标尺 = 1 cm；8. 温室驯化成活的原生质体再生苗，标尺 = 10 cm。

Explanation of plates:

1. Freshly isolated protoplasts, bar = 50 μm; 2. First division of the protoplasts in liquid culture system, bar = 50 μm; 3. Cell colonies derived from protoplasts in liquid culture system, bar = 50 μm; 4. Protoplasts cultured on feeder layer, bar = 2.5 cm; 5. Protoplast became large and oval in shape (arrow a), the first division (arrow b) and cell colonies (arrow c) in feeder layer culture system, bar = 100 μm; 6. Somatic embryos, bar = 2.5 mm; 7. Germinating embryos, bar = 1 cm; 8. Regenerated plants after transfer to soil, bar = 10 cm.

表 1 培养方法和培养基对‘过山香’原生质体培养的影响

Table 1 Effects of culture methods and culture media on protoplast culture of Musa AAB Silk ‘Guoshanxiang’

培养系统 Culture systems	培养基 Culture media	培养 14 d时分裂频率 /% Division frequency after 14 days of culture	培养 28 d时细胞团形成频率 /% Colony formation frequency after 28 days of culture
液体浅层培养 Liquid culture system	‘A’ ‘B’	12.6 ±2.34b 34.2 ±5.22a	0.8 ±0.17b 8.3 ±2.19a
看护培养 Feeder layer culture system	‘A’ ‘B’	51.7 ±5.46a 54.5 ±4.76a	42.2 ±4.77a 45.6 ±3.93a

注：数据表示 3次重复的平均值 ± 标准差。在同一培养系统内，采用邓肯氏多重分析法进行数据分析，数据后面的相同字母表示在 $P = 0.05$ 水平上差异不显著。

Note: Data represent average ± S.E. of three replicates. Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's multiple-range test ($P = 0.05$) in the same culture system.

2.2 体胚发生与植株再生

经看护培养获得的细胞团在体胚诱导培养基上培养 20~25 d 左右，可见到长椭圆形、直径大约 1.0~1.5 mm 的发育成熟的体胚（图版，6）。

经过 45 d 的培养，由 10^5 个原生质体总共获得 1 550 个左右的体胚。这些体胚在新鲜的体胚诱导培养基上再经过 30 d 的培养，7.8% 的体胚萌发（图版，7）。

萌发的体胚在 MS + 0.1% 活性炭的培养基上，30 d 后发育为 10~12 cm 高的幼苗。这些幼苗在温室驯化培养 3 个月后长成健壮的植株（图版，8）。

3 讨论

到目前为止，香蕉原生质体培养还没有通过液体培养获得原生质体再生细胞团以及再生植株。采用看护培养是取得香蕉原生质体培养较易成功的方法，但看护培养操作复杂，容易污染；现有的培养基‘A’中有些成分价格昂贵，如维生素 A、维生素 D₃、维生素 B₁₂ 和玉米素等。这些都是制约香蕉原生质体培养及其应用进展的因素，因此有必要进一步研究培养方法以及对培养基成分进行改良。

在本研究中，采用改良的培养基‘B’与目前文献报道的培养基‘A’相比，成本下降了约 30%，同时不影响‘过山香’香蕉原生质体看护培养的效果。特别是采用改良的培养基‘B’通过液体浅层培养首次获得了频率为 8.3% 细胞团，尽管目前没有获得再生植株，但液体浅层培养方法在香蕉的原生质体培养上应该是有潜力的，值得进一步研究。

References

- Assani A, Chabane D, ForoughiWehr B, Wenzel G. 2006. An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa* spp.). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 85 (3): 257 - 264.
- Assani A, Haour R, Wenzel G, Côte F X, Bakry F, ForoughiWehr B, Ducreux G, Aguilar M E, Grapin A. 2001. Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*, 20: 482 - 488.
- Assani A, Haour R, Wenzel G, ForoughiWehr B, Bakry F, Côte F X, Ducreux G, Ambroise A, Grapin A. 2002. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Sci*, 162: 355 - 362.
- Bakry F. 1984. Choix du matiel utiliser pour l'isolation de protoplasts de bananier (*Musa* sp.). *Fruit*, 39: 449 - 452.
- Chu C C, Wang C C, Sun C S. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the

- nitrogen source. *Sci Sin.*, 17: 659 - 668.
- Côte F X, Domergue R, Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant J V. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. Grand Naine. *Physiol Plant.*, 97 (2): 285 - 290.
- Huang Bing-zhi, Xu Lin-bin, Yang Hu, Tang Xiao-lang, Wei Yue-tong, Qiu Ji-shui, Li Guan-qiu. 2005. Preliminary results of field evaluation of banana germplasm resistant to Fusarium wilt disease. *Guangdong Agri Sci.*, (6): 9 - 10. (in Chinese)
- 黄秉智, 许林兵, 杨 护, 唐小浪, 魏岳荣, 邱继水, 李贵球. 2005. 香蕉种质资源枯萎病抗性田间评价初报. 广东农业科学, (6): 9 - 10.
- Kao KN, Michayluk M R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*, 126 (2): 105 - 110.
- Matsumoto K, Oka S. 1998. Plant regeneration from protoplasts of a Brazilian dessert banana (*Musa* spp., AAB group). *Acta Hort.*, 490: 455 - 462.
- Megia R, Hacour R, Tizioutine S, Bui Trang V, Rossignol L, Sihachakr D, Schwendiman J. 1993. Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp., ABB group). *Plant Cell Rep.*, 13: 41 - 44.
- Morel G, Wetmore R H. 1951. Fem callus tissue culture. *Am J Bot.*, 38: 141 - 143.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15: 473 - 497.
- Panis B, Wauwe A W, Swennen R. 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.*, 12 (7 - 8): 403 - 407.
- Wei Yue-tong, Huang Xue-lin, Huang Xia, Li Jia, Xiao Wang, Li Xiao-ju. 2005a. The induction of multiple buds and somatic embryogenesis of *Musa* AAB Silk 'Guoshanxiang'. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (3): 414 - 419. (in Chinese)
- 魏岳荣, 黄学林, 黄 霞, 李 佳, 肖 望, 李筱菊. 2005a '过山香'香蕉多芽体的诱导及其体细胞胚发生. 园艺学报, 32 (3): 414 - 419.
- Wei Yue-tong, Huang Xue-lin, Li Jia, Huang Xia, Li Zhe, Li Xiao-ju. 2005b. Establishment of embryogenic cell suspension culture and plant regeneration of edible banana *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Chinese Journal of Biotechnology*, 21: 58 - 65. (in Chinese)
- 魏岳荣, 黄学林, 李 佳, 黄 霞, 李 哲, 李筱菊. 2005b. 贡蕉 [*Musa acuminata* cv. Mas (AA)] 胚性细胞悬浮系的建立和植株再生. 生物工程学报, 21: 58 - 65.
- Wei Yue-tong, Yang Hu, Huang Bing-zhi, Huang Xia, Huang Xue-lin, Qiu Ji-shui, Xu Lin-bing. 2007. Effects of Picloram, ABA and TDZ on Somatic Embryogenesis of Banana. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 81 - 86. (in Chinese)
- 魏岳荣, 杨 护, 黄秉智, 黄 霞, 黄学林, 邱继水, 许林兵. 2007. Picloram, ABA 和 TDZ 对香蕉体细胞胚胎发生的影响. 园艺学报, 34 (1): 81 - 86.
- Widholm J M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.*, 47: 189 - 194.
- Xiao W, Huang X L, Huang X, Chen Y P, Dai X M, Zhao J T. 2007. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 90: 191 - 200.
- Zhuo Guo-hao, Chen Shao-ping, Zheng Kang-yan, Cai Li-li, Zhong Li-bo. 2005. Occurrence and control of *Fusarium* wilt disease in banana. *Guangdong Agri Sci.*, (1): 56 - 57. (in Chinese)
- 卓国豪, 陈绍平, 郑康炎, 蔡丽丽, 钟丽波. 2005. 香蕉枯萎病发生原因及控制对策. 广东农业科学, (1): 56 - 57.

图书推荐

《植物界中的不亲和性》

《植物界中的不亲和性》一书由甘肃科技出版社出版, 50万字, 58元, 分总论和各论两部分。总论涉及进化、生理、遗传、变异、研究方法及利用和繁殖等问题; 各论描述了30个科中80个属200多个种的植物自交和异交不亲和性。

欲购买者请与出版社(13893488372)或编者安彩泰(0931-7631270)、马静芳(0931-7632965)联系。