

果用香蕉薄片外植体植株再生的研究

黄霞 黄学林* 王鸿鹤 李筱菊

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 利用薄片培养方法, 通过直接和间接器官发生途径分别获得了‘广东 631’香蕉的再生植株。该途径受多种因素影响。通过正交试验和单因子试验确定了最佳培养条件: (1) 直接器官发生培养基为 Ma (MS modified) + BAP 10 $\mu\text{mol/L}$ + KT 50 $\mu\text{mol/L}$ + IAA 1 $\mu\text{mol/L}$; (2) 愈伤组织诱导培养基为 Mb (B_5 modified) + Dicamba 10 $\mu\text{mol/L}$ + IAA 1 $\mu\text{mol/L}$ + 2,4-D 0.7 $\mu\text{mol/L}$ + NAA 0.5 $\mu\text{mol/L}$ + BAP 4.4 $\mu\text{mol/L}$ + 活性炭 1 g/L; (3) 愈伤组织继代培养基为 Mb + Dicamba 5 $\mu\text{mol/L}$ + IAA 1 $\mu\text{mol/L}$ + 2,4-D 0.4 $\mu\text{mol/L}$ + BAP 22 $\mu\text{mol/L}$ + KNO_3 500 mg/L + 维生素 B_1 40 mg/L + 活性炭 0.5 g/L; (4) 分化培养基为 1/2 Ma + BAP 1 $\mu\text{mol/L}$ + IAA 0.5 $\mu\text{mol/L}$ + 活性炭 1 g/L; (5) 成苗培养基为 Ma + BAP 1 $\mu\text{mol/L}$ + KT 4.6 $\mu\text{mol/L}$ + NAA 1 $\mu\text{mol/L}$ 。愈伤组织诱导和继代培养需在黑暗中进行。

关键词: 香蕉; 薄片培养; 器官发生

中图分类号: S 668.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 01-0019-06

用传统的育种方法培育优质香蕉比较困难, 而利用组织培养结合基因工程技术可望实现这一目的。目前国内尚无这方面的报道, 国外也只报道了以胚性悬浮细胞或原生质体为受体, 通过基因枪转化获得香蕉转基因植株^[1,2], 且成功的例子多为非果用香蕉, 而果用香蕉适合基因转化的再生体系尚不完善, 重复性差。最近, Okole^[3]报道利用薄片培养, 通过直接和间接器官发生分别获得了‘Horn’ plantain (AAB)、“Cachaco”(ABB)和‘Williams’(AAA)的再生植株。这一再生体系具有很大的应用潜力。不同品种的香蕉再生能力相差较大, 器官发生所需的培养条件也有差异, 而对香蕉器官发生的主要影响因素的研究甚少我们对华南地区的优良品种‘广东 631’香蕉薄片培养中直接和间接器官发生的最适培养条件及主要影响因素进行了研究, 可望为华南地区培育优质香蕉提供新的有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料 将‘广东 631’香蕉 (*Musa* var. AAA *cavendish* subgroup) 试管苗 (广州市蔬菜所组培室提供) 茎段徒手切成厚约 1 mm 的薄片作为外植体。除另有说明外, 同一组试验中外植体供体植株的培养代数 (第 6 代) 和培养时间 (2 月左右) 均相同。

1.2 直接诱导出芽培养基及影响因素的研究 以影响芽诱导的主要因素^[4]组成 16 种培

收稿日期: 2000 - 06 - 12; 修回日期: 2000 - 09 - 18

基金项目: 广州市科委重点资助项目 (96 - 2 - 24 - 3)

*通讯联系人。

培养基组合进行正交试验 $L_{16} (4^5)$ 。1~4 号培养基不加活性炭, 5~8、9~12 和 13~16 号培养基活性炭含量分别为 0.5、1.0 和 1.5 g/L。此外, 各培养基均以相同方式改变生长素的种类和浓度 ($\mu\text{mol/L}$): 0、IAA 1、NAA 1、IAA 1 + NAA 1; 6-BAP ($\mu\text{mol/L}$): 0、5、10、15; TDZ/ KT ($\mu\text{mol/L}$): 0、KT 50、TDZ 0.25、KT 25 + TDZ 0.1; 碳源 (g/L): 蔗糖 30 或 40、葡萄糖 30、蔗糖 20 + 葡萄糖 20。各处理均以 Ma 为基本培养基 (Ma 包含 MS 基本盐^[5], 11 种氨基酸和维生素溶液^[3], 下同), 添加琼脂粉 6.5 g/L, pH 5.8。每个组合接种外植体 48 个以上, 处理重复 3 次。培养 1.5 个月, 统计各处理外植体的出芽频率 (发生芽的外植体占外植体总数的百分率, SFF) 和出芽指数 (发生芽的外植体上的平均出芽数, SFI), 挑选出培养基最佳组合, 以此为基础进行单因子试验, 找出最佳培养条件。

1.3 诱导愈伤组织培养基的确定 以影响诱导愈伤组织的主要生长调节物质^[4]的种类及浓度配比组成 16 种培养基组合进行正交试验 $L_{16} (4 \times 2^{12})$ 。其中 Dicamba 浓度, 1~4 号培养基为 15 $\mu\text{mol/L}$, 5~8、9~12 和 13~16 号培养基分别为 10、5 和 0 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 各培养基均以相同方式改变其它激素的种类和浓度 ($\mu\text{mol/L}$): IAA 0、1; 2,4-D 0、0.7; NAA 0、0.5; 6-BAP 0、4.4。各处理均以 Mb (B_5 基本盐^[6], 11 种氨基酸和维生素溶液^[3], 下同) 为基本培养基, 添加蔗糖 30 g/L, 活性炭 1 g/L 和琼脂粉 6.5 g/L, pH 5.8。每个组合接种外植体 34 个以上, 处理重复 3 次。培养 6 周后统计分析各处理愈伤组织诱导百分率, 选出最佳组合, 以此为基础进行单因子试验, 找出愈伤组织产生的最适条件。

1.4 愈伤组织继代培养基的确定 愈伤组织若在原诱导培养基上继代培养, 会大量褐变死亡。将其中可能的影响因素组成 18 种培养基组合进行正交试验 $L_{18} (2 \times 3^7)$, 其中 1~9 号培养基添加 Dicamba 5 $\mu\text{mol/L}$, 10~18 号添加 Dicamba 10 $\mu\text{mol/L}$, 各培养基均以相同方式改变 2,4-D 浓度 ($\mu\text{mol/L}$): 0.4、0.7、1.0, IAA/NAA ($\mu\text{mol/L}$): IAA 1、NAA 0.5、0, 6-BAP ($\mu\text{mol/L}$): 2.2、4.4、6.6, 碳源 (g/L): 蔗糖 30、葡萄糖 30、蔗糖 20 + 葡萄糖 20, 琼脂粉 (g/L): 6.5、7.0、7.5, 活性炭 (g/L): 0、0.5、1, 维生素 B_1 (g/L): 0.4、4、40。各处理均以 Mb 为基本培养基, pH 5.8。每个组合接种愈伤组织 24 块以上, 处理重复 2 次。继代培养 3 周后, 统计分析各处理的愈伤组织存活百分率, 选出最佳组合, 以此为基础进行单因子试验, 找出愈伤组织继代培养的最适条件。

1.5 从愈伤组织诱导不定芽 愈伤组织在诱导不定芽培养基 (1/2 Ma, 附加 IAA 0.5 $\mu\text{mol/L}$, BAP 1 $\mu\text{mol/L}$, 蔗糖 30 g/L, 活性炭 1 g/L 和琼脂粉 6.5 g/L, pH 5.8) 上培养 5 周后, 统计诱导出不定芽的愈伤组织的百分率和平均每块愈伤组织诱导出的不定芽数。

1.6 成苗 分别选取由薄片直接诱导出的芽和从愈伤组织诱导出的芽 40 个长约 1.5 cm, 转移到成苗培养基 (Ma, 附加 NAA 1 $\mu\text{mol/L}$, BAP 1 $\mu\text{mol/L}$, KT 4.6 $\mu\text{mol/L}$, 蔗糖 30 g/L 和琼脂粉 6.5 g/L, pH 5.8) 上, 培养 1 月后统计成苗百分率。

1.7 培养环境 除愈伤组织诱导和继代培养需在黑暗条件下进行外, 其余皆为光照培养 (12 h/12 h, 光/暗周期), 培养温度为 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 直接诱导芽的培养基的正交试验结果

正交试验 $L_{16} (4^5)$ 结果见表 1。外植体出芽频率最高的为培养基 2; 出芽指数最高的

为培养基 3。而应用正交表分析^[7]试验结果, 得出各因素最佳水平组成的培养基 M (Ma + BAP 10 $\mu\text{mol/L}$ + IAA 1 $\mu\text{mol/L}$ + KT 50 $\mu\text{mol/L}$ + 蔗糖 40 g/L), 进一步试验证实其出芽频率达 52.06%, 出芽指数 4.43, 均高于培养基 2 和 3。

2.2 影响外植体直接诱导芽的主要因素

2.2.1 BAP

由图 1 (A) 可见, 出芽频率和出芽指数在无 BAP 时均很低; 在 BAP 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内随浓度增加均逐渐增大; 当 BAP 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时分别比无 BAP 时上升 41.69% 和 32.16%; BAP 超过 10 $\mu\text{mol/L}$ 后开始下降。

Vuytsteke^[8]和 Lee^[9]报道高浓度 BAP 促进香蕉芽分化, 但我们发现高浓度 BAP 抑制芽分化, 这可能与香蕉品种、外植体的种类和大小, 以及外植体与培养基的接触程度有关。

2.2.2 KT

如图 1 (B) 所示, 当 KT 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 出芽频率和出芽指数分别比无 KT 时上升 22.22% 和 7.01%, 可见芽诱导的最适 KT 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

细胞分裂素的使用浓度决定其对芽分化的最佳作用, 将 BAP 和 KT 配合使用常可得到良好的效果^[4]。上述试验结果表明, BAP 和 KT 的浓度对芽诱导的影响较大, 其配合使用可促进芽的生长发育, 当它们的浓度不适合时则产生抑制作用。

2.2.3 活性炭

组织培养中为了防止褐变和有害物质的积累, 常在培养基中加入活性炭, 但活性炭具有正负两重效应^[10]。由图 1 (C) 可见, 添加活性炭使出芽频率和出芽指数均下降, 可能是由于活性炭在吸附有害物质的同时吸附了培养基的活性成分, 使培养基亚适合而造成的。

2.2.4 外植体供体植株的快繁代数

由不同代数的供体植株切取外植体, 接种在培养基 M 上, 培养结果如图 2 (A) 所示。供体植株为第 6 代和第 9 代时, 外植体的出芽频率和出芽指数相差不大 (0.3%);

表 1 不同培养基组合对香蕉薄片外植体出芽频率和出芽指数的影响

培养基 Medium	出芽频率 SFF (%)	出芽指数 SFI	培养基 Medium	出芽频率 SFF (%)	出芽指数 SFI
1	13.79	3.75	9	16.67	1.50
2	36.67	2.91	10	4.00	1.00
3	29.17	4.29	11	20.00	1.00
4	13.79	2.25	12	11.54	3.67
5	7.14	1.00	13	8.00	1.00
6	10.34	1.00	14	17.24	1.00
7	7.41	1.00	15	0	0
8	10.34	1.67	16	6.67	1.00

* SFF: Shoot forming frequency; ** SFI: Shoot forming index.

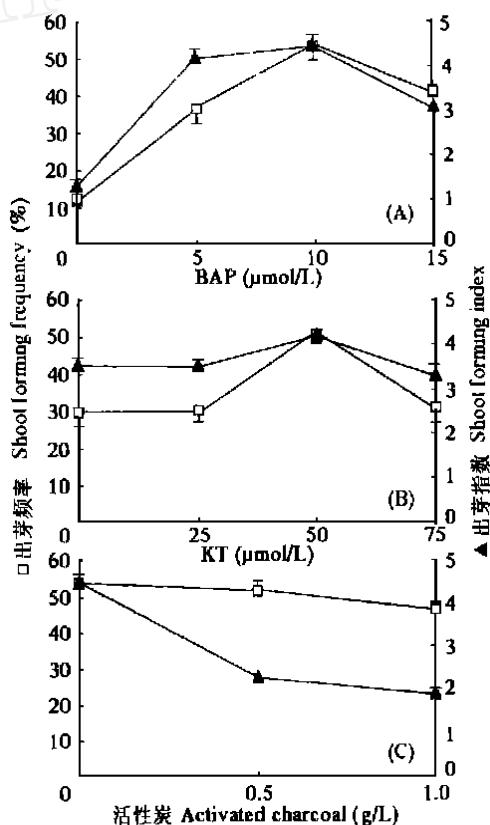


图 1 BAP、KT、活性炭对芽诱导中出芽频率和出芽指数的影响

Fig. 1 Influences of BAP, KT and activated charcoal on SFF and SFI during bud induction

而供体植株为第 18 代时, 其出芽频率和出芽指数皆下降约 30%, 可能是由于高代数的试管苗活力下降或变异率上升造成的。

2.2.5 外植体取材位置 将香蕉试管苗纵剖后可知离叶子最近的根附近即为靠近顶端分生组织的位置。以该位置为界, 在其上下各切取两片外植体作为位置 2, 接着往靠近叶的方向切取 4 片外植体作为位置 1, 往靠近地下部分的方向切取 4 片外植体作为位置 3。将它们分别接种在培养基 M 上, 结果如图 2 (B) 所示, 外植体越靠近顶端分生组织 (即位置 2), 其出芽频率越高, 形成不定芽的数目也越多。

2.3 影响愈伤组织诱导的主要因素

2.3.1 正交试验 $L_{16} (4 \times 2^{12})$ 的结果

应用正交表分析试验结果可知, 3,6- 双氯代茴香酸 (Dicamba) 是最主要的因素, 没有它诱导不出愈伤组织 (13 ~ 16 号培养基)。但根据愈伤组织的外观观察, Dicamba 浓度达到 $15 \mu\text{mol/L}$ 时, 愈伤组织变得十分疏松 (1 ~ 4 号培养基)。AAA、AAB 和 ABB 型香蕉的愈伤组织诱导培养基中加入 Dicamba 皆可诱导出“前胚性愈伤组织”, 然后诱导出体胚或不定芽; 但其浓度过高会使愈伤组织变得疏松, 失去胚性^[3]。7 号培养基上诱导出的愈伤组织较致密, 诱导频率高, 可达 55%, 因此确定其为愈伤组织诱导正交试验中的最佳组合培养基, 其组成为: Mb + Dicamba $10 \mu\text{mol/L}$ + IAA $1 \mu\text{mol/L}$ + 2,4-D $0.7 \mu\text{mol/L}$ + NAA $0.5 \mu\text{mol/L}$ + BAP $4.4 \mu\text{mol/L}$ 。

2.3.2 单因子试验结果 (1) 光: 在黑暗条件下培养, 诱导出无色愈伤组织; 在光照 (12 h/12 h, 光/暗) 条件下培养, 可诱导出绿色愈伤组织, 但量较少。(2) 活性炭: 在活性炭 0 ~ 1 g/L 浓度范围内, 随着其浓度增加, 愈伤组织诱导百分率上升, 直至 54.17%, 比无活性炭时上升 20.84%, 这是由于活性炭吸附了培养基中的有害物质, 从而促进愈伤组织的形成。但当活性炭浓度为 1.5 g/L 时, 愈伤组织诱导百分率比活性炭浓度为 1 g/L 时降低 12.5%, 可能是活性炭吸附了培养基中的活性成分而造成的。

2.4 影响愈伤组织继代培养的主要因素

应用正交表分析实验结果可知, 愈伤组织继代培养中, 以蔗糖作为碳源较好, 而维生素 B₁ 浓度升高有利于愈伤组织存活。其中 7 号培养基上的愈伤组织存活百分率最高, 可达 78.57%, 其组成为: Mb + Dicamba $5 \mu\text{mol/L}$ + IAA $1 \mu\text{mol/L}$ + 2,4-D $0.4 \mu\text{mol/L}$ + BAP $2.2 \mu\text{mol/L}$ + 维生素 B₁ 40 mg/L, 添加蔗糖 30 g/L, 琼脂粉 7.5 g/L 和活性炭 0.5 g/L。

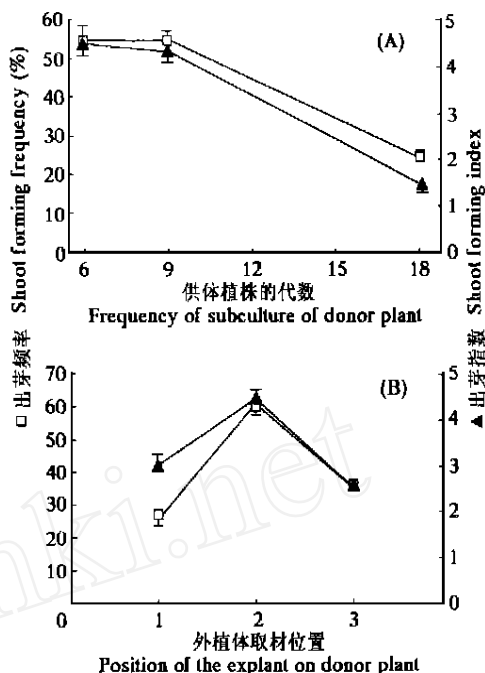


图2 供体的代数及取材位置对芽诱导中出芽率和出芽指数

Fig. 2 Influences of the frequency of subculture of donor plant and the position of the explant on donor plant on SFF and SFI during bud induction

2.4.1 氮源 如图 3 (A) 所示, 把培养基 7 的 KNO_3 浓度由 3 000 mg/L (a) 提高到 3 500 mg/L (b), 有利于愈伤组织的继代培养; 而把培养基 S 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度由 134 mg/L 提高到 184 mg/L (c), 则使愈伤组织存活百分率大为下降 (38.89%)。

2.4.2 BAP 由图 3 (B) 可知, 愈伤组织继代培养的最佳 BAP 浓度为 22 $\mu\text{mol/L}$, 其愈伤组织存活百分率比 BAP 浓度为 2.2、55 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时分别增加了 10 %、20 % 和 45 %。

2.4.3 KNO_3 与 BAP 的协同效应 试验发现, 培养基 7 同时添加 KNO_3 500 mg/L 和 BAP 22 $\mu\text{mol/L}$ 时, 愈伤组织存活百分率比单独添加时高, 可达 90 %。

2.5 愈伤组织形态发生能力

不定芽诱导培养基上的愈伤组织渐渐变成黄色, 5 周后开始有不定芽发生, 继续培养 1 周统计得出: 23.53 % 愈伤组织诱导出不定芽, 平均每块愈伤组织诱导出的不定芽数为 4.3。

2.6 成苗

无论是从薄片直接诱导出的芽或从愈伤组织诱导出的芽, 在成苗培养基上皆生长旺盛。1 个月分别得到 40 株具 3~4 片展开叶和健壮根的再生植株, 成苗率均达 100 %。

3 小结

我们利用薄片培养, 成功地通过直接和间接器官发生途径得到了 ‘广东 631’ 香蕉的再生植株, 并研究了其中的主要影响因素。与原有的再生体系相比, 该再生途径更适用于香蕉转基因研究, 原因主要为: (1) 以直接器官发生作为转化途径时, 薄片外植体的细胞数目远少于传统的茎尖外植体的细胞数目, 可相对降低转化时嵌合体的出现频率。而且, 外植体供体数量相同时, 薄片培养可比茎尖培养获得更多的外植体和再生植株。(2) 以间接器官发生作为转化途径, 可避免出现直接器官发生过程中外植体易褐化的现象, 操作也较利用悬浮细胞或原生质体进行转化简单。(3) 整个再生途径所需培养时间较短。

参考文献:

- 1 Sagi L, Remy S, Panis B, et al. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep.*, 1994, 13: 262~266
- 2 Sagi L, Panis B, Remy S, et al. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment.

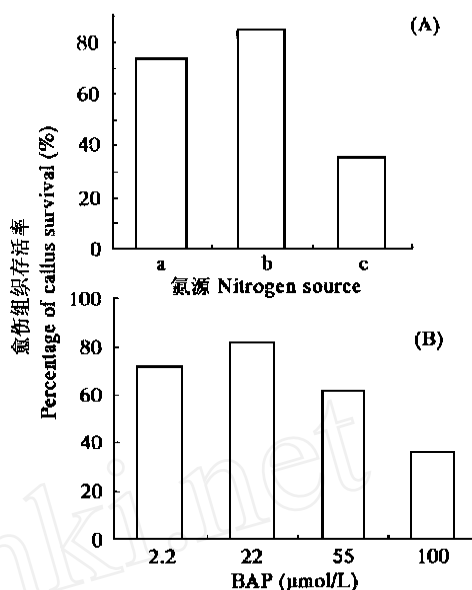


图3 氮源及 BAP 对愈伤组织存活百分率的影响

Fig. 3 Influences of nitrogen source and BAP on the percentage of callus survival

- a: KNO_3 3 000 mg/L + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 134 mg/L;
 b: KNO_3 3 500 mg/L + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 134 mg/L;
 c: KNO_3 3 000 mg/L + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 184 mg/L

- Biotechnology, 1995, 13: 481 ~ 485
- 3 Okole B N, Schulz F A. Micro-cross sections of banana and plantains (*Musa* spp.): Morphogenesis and regeneration of callus and shoot buds. *Plant Science*, 1996, 116: 185 ~ 195
 - 4 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 北京: 科学出版社, 1995. 30 ~ 90
 - 5 Muraskige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, 15: 473 ~ 497
 - 6 Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Plant cell cultures 1. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 1968, 50: 151 ~ 158
 - 7 马育华. 田间试验和统计方法. 北京: 农业出版社, 1986. 186 ~ 191
 - 8 Vuylsteke D R. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical manuals for handling crops in vitro (2). In: The International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome: 1989. 55
 - 9 Lee S W. Improvement of methods used in the regeneration of micropropagated banana plantlets, in: Valmayor R V, Hwang S C, et al. ed. Proceedings of an international symposium on the recent development in banana cultivation technology held in Pingtung, Taiwan: INIBAP/ ASPNET, 1992. 179 ~ 192
 - 10 朱海山. 活性炭对玉米花药培养的影响. *植物生理学通讯*, 1996, 32 (1): 16 ~ 18

Studies on the Plant Regeneration from the Micro-Cross Sections of Banana

Huang Xia, Huang Xuelin, Wang Honghe, and Li Xiaojun

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: The organogenesis of 'Guangdong 631' banana by micro-cross sections culture and the factors influencing plant regeneration were investigated. The optimal culture condition was established by a statistical method and making research on the single factor: (1) the medium for direct organogenesis contained Ma (MS modified), BAP 10 $\mu\text{mol/L}$, KT 50 $\mu\text{mol/L}$ and IAA 1 $\mu\text{mol/L}$; (2) the medium for callus induction contained Mb (B_5 modified), dicamba 10 $\mu\text{mol/L}$, IAA 1 $\mu\text{mol/L}$, 2, 4-D 0.7 $\mu\text{mol/L}$, NAA 0.5 $\mu\text{mol/L}$, BAP 4.4 $\mu\text{mol/L}$ and 1 g/L activated charcoal; (3) the medium for callus subculture contained Mb, 5 $\mu\text{mol/L}$ dicamba, IAA 1 $\mu\text{mol/L}$, 2, 4-D 0.4 $\mu\text{mol/L}$, BAP 22 $\mu\text{mol/L}$, KNO_3 500 mg/L, vitamins 40 mg/L B_1 and activated 0.5 $\mu\text{g/L}$ charcoal; (4) the medium for induction shoot buds from the callus was composed of half-strength Ma, BAP 1 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ IAA and 1 g/L activated charcoal; (5) the plant regeneration medium was composed of Ma, BAP 1 $\mu\text{mol/L}$, KT 4.6 $\mu\text{mol/L}$ and NAA 1 $\mu\text{mol/L}$. The callus induction and subculture was kept in darkness. The application of micro-cross sections of banana for regeneration of plants might be a useful alternative to cell suspensions and protoplast culture in banana transformation.

Key words: Banana; Micro-cross sections culture; Organogenesis