

香蕉横切薄层切片芽分化的培养技术

陈廷速^{1,4} 张军² 夏宁邵² 陈如凯³ 李杨瑞⁴

(1 广西农科院生物技术研究所 南宁 530007;

2 厦门大学肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005;

3 福建农林大学 福州 350002;

4 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室 南宁 530007)

摘要 以香蕉横切薄层切片为材料,研究了不同因素对薄层切片芽分化的影响。结果表明:利用横切薄层培养技术能更有效、快速地进行香蕉的无性繁殖;TDZ(英文名为 thidiazuron, N-phenyl-N'-1,2,3,4-thiazol-5-ylurea, 中文译为苯基噻二唑基脲)对香蕉薄层切片芽的分化有抑制作用,没有得到生长正常的芽;横切薄层切片在暗培养且培养温度为 30℃时比 25℃有较高的不定芽分化率,不定芽分化能力强,丛芽多;蔗糖和 AgNO₃对薄层切片芽分化有一定的影响。

关键词 香蕉 横切薄层培养 植株再生

中图分类号 S668.136

香蕉 (*Musa spp.*) 是世界上著名的热带和亚热带水果,具有重要的经济价值。由于香蕉多为三倍体,高度不育性,其与主要粮食作物相比,研究工作相对滞后。生物技术的发展为香蕉的遗传改良育种带来希望,特别在抗病虫害、抗寒、延迟成熟等方面。因此,建立一个高效稳定的遗传转化受体系统是香蕉遗传改良的关键。香蕉的组织培养是一个很成熟的技术,已经在香蕉种苗生产中得到广泛的应用^[1]。作为外源基因的受体系统,香蕉外植体与一般生产上的植株繁殖体系既有联系,又有区别。植物薄层细胞培养(thin cell layer culture)技术是 20 世纪 70 年代发展起来的实验技术,最早是 Tran 以烟草的表皮细胞作为外植体培养材料并获得了根和芽的分化^[2],并用它来研究器官发生的机理^[3,4];一些研究把这一技术应用到植物组织 1~2 mm 的薄层切片培养上,进而应用到一些植物的基因工程中^[5,6]。笔者在对香蕉表达异源蛋白的研究中,采用横切薄层培养技术建立了较好的植株再生体系,为香蕉的遗传改良研究积累了一定的工作基础。现将不同因素对香蕉薄层切片芽分化影响的研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

供试果用香蕉 (*Musa spp.*) 品种为威廉斯 (Williams) 的低代香蕉试管苗。从香蕉园采集无病、高产香蕉植株的吸芽。经过表面处理后,在超净工作台上进行无菌操作,剥取顶芽接种在培养基 (BM1) 上,每 2 周继代 1 次;经过 3 代的增殖 (培养基 BM2) 获得大量含潜在芽分化的组织。对部分已分化成植株的材料,在超净工作台上将植株的假茎去除,将从芽横切成薄层切片 (1~2 mm),作为外植体实验材料。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 横切薄层切片芽诱导培养基 (BM1):改良的 MS 培养基 +BA4.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹;丛芽增殖培养基 (BM2):改良的 MS 培养基 +BA3.5 mg·L⁻¹+NAA0.3 mg·L⁻¹。以上培养基及培养条件如不加以说明,均附加蔗糖 30 mg·L⁻¹,琼脂 5.6 g·L⁻¹,pH5.8,均在生化培养箱进行暗培养,培养温度为 30℃。光照培养也在生化培养箱进行培养,培养条件为光照 16 h/黑暗 8 h,光照强度为 1500~2000 lx,培养温度为 30℃。

福建省自然科学基金项目(项目编号:C9910004),厦门凯立生物制品有限公司资助。

陈廷速 男(壮族),1966生,博士,副研究员。研究方向:植物基因工程。

通讯联系:chen20409@hotmail.com

收稿日期:2003-06-20 修回日期:2003-09-26

1.2.2 数据收集与处理 用显微镜 (Motic digital microscope DM-143 型) 对薄片切片培养过程中的形态发生变化情况进行 30 d 观察; 每个处理的薄片切片数为 20 片, 并进行 3 次重复实验, 观察结果用平均值表示。

2 结果与分析

2.1 不同横切方式对香蕉薄片切片芽分化的影响

在香蕉的薄片切片的处理方式中, 采用 2 种方法, 一种是先切去芽的全部叶鞘, 然后对丛芽进行纵切, 再进行横切成薄片切片; 另一种方法是先切去芽的全部叶鞘, 然后对丛芽进行横切得到薄片切片。研究表明, 2 种方式的薄片切片都能促进芽的分化, 但采用第一种方法更能增加芽分化的数量 (图 1~4)。

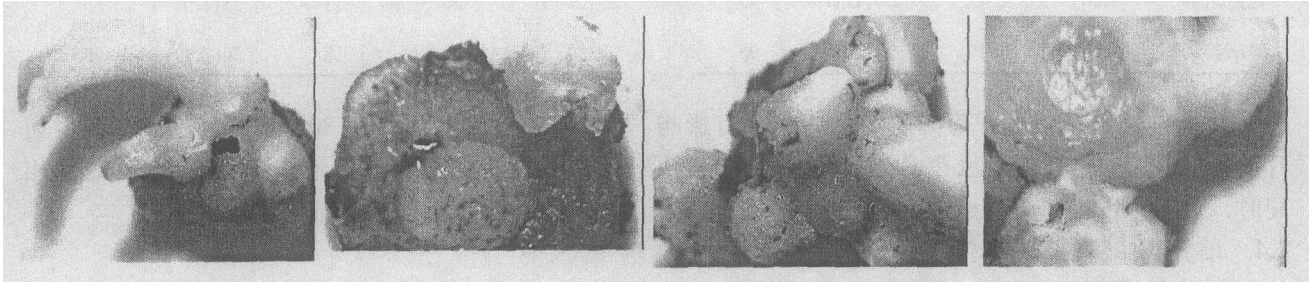


图 1 香蕉横切 (先纵切) 薄片培养 (光照培养 6 d) 图 2 香蕉横切 (不纵切) 薄片培养 (光照培养 6 d) 图 3 香蕉横切 (先纵切) 薄片培养 (暗培养 6 d) 图 4 香蕉横切 (不纵切) 薄片培养 (暗培养 6 d)

2.2 不同植物生长物质含量水平对香蕉薄片切片芽分化的影响

为了达到最佳的分化效果, 在已有的工作基础上, 选择不同的植物生长物质组合。结果 (表 1, 2) 表明 BA+NAA 对芽的分化效果好, 实验选用 $BA4.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (外植体芽诱导) 和 $BA3.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (丛芽的增殖)。研究还发现 TDZ 在实验浓度下对香蕉的芽分化的效果不理想, 没有得到生长正常的不定芽, 仅仅得到芽点。植物生长物质对植物细胞的脱分化过程有着重要的调控作用。由于 TDZ 具有强烈的细胞激动素作用, 对芽的分化有很强的调控能力, 有近 100 种再生困难的木本植物使用 TDZ 后都获得了成功。但某些研究也发现极低的 TDZ 浓度能促进腋芽的增殖, 浓度增高时促进愈伤组织形成, 抑制芽的生长和增殖^[7]。

表 1 不同植物生长物质组合对香蕉薄片切片芽分化的影响

| 植物生长物质组合 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 薄片切片总数 / 个 | 出芽外植体数 / 个 | 不定芽数 * / 个 | 芽分化率 / % | 备注 |
|--|------------|------------|------------|----------|-------------------|
| (1) IBA0.5 | 15 | 11 | 14(1.27) | 73 | 根多 |
| (2) NAA0.5 | 20 | 18 | 16(0.88) | 90 | 根多且长 |
| (3) BA4.0+NAA0.5 | 20 | 19 | 52(2.73) | 95 | 芽分化多 |
| (4) BA3.5+NAA0.3 | 20 | 19 | 46(2.42) | 95 | 芽分化多, 植株高。 |
| (5) BA3.0+IBA0.3 | 20 | 19 | 50(2.63) | 95 | 芽分化多, 芽不健壮, 个别长根。 |
| (6) 2,4-D0.25+KT0.5 | 20 | 0 | 0(0) | 0 | 大部分薄片褐化, 愈伤组织疏松。 |
| (7) 2,4-D0.25+BA0.5 | 20 | 0 | 0(0) | 0 | 全都褐化, 形成愈伤组织疏松。 |

说明: * 括号中的数字是出芽外植体材料的不定芽平均数 (下同)

表 2 不同浓度 TDZ 与 NAA、IBA 的组合对香蕉薄片切片芽分化的影响

| 植物生长物质组合 质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 薄片切片总数 / 个 | 出芽外植体数 / 个 | 芽点数 / 个 | 芽分化率 / % | 备注 |
|--|------------|------------|----------|----------|--------------------------|
| (1) TDZ1.5 | 20 | 14 | 18(1.28) | 70 | 分化成芽点但未形成植株。 |
| (2) TDZ1.0+NAA0.1 | 15 | 15 | 25(1.67) | 100 | 芽点多且粗壮, 但未形成植株; 个别基部有叶片。 |
| (3) TDZ2.5+IBA0.3 | 20 | 18 | 26(1.44) | 90 | 芽点相对少也未形成植株。 |
| (4) TDZ2.5+NAA0.3 | 20 | 20 | 28(1.4) | 100 | 芽点少, 也未形成植株。 |
| (5) TDZ4+NAA0.5 | 20 | 18 | 33(1.83) | 90 | 芽点多, 但未形成植株。 |

2.3 光照和培养温度对香蕉横切薄片芽分化的影响

结果表明,无论光照或暗培养条件薄片都有较多的芽分化(图 1,3)。在光照条件下,不定芽为绿色,粗壮;而在暗培养条件下,长出的不定芽为白色,丛芽点的量比光照的多(表 3)。在香蕉遗传转化研究中,发现采用暗培养条件得到的材料,褐化较轻,而且用它来进行转化可得到较高的报告基因的瞬时表达率^[8,9]。

表 3 光照条件对香蕉薄片芽分化的影响

| 处理方式 | 薄片总数 / 个 | 出芽外植体数 / 个 | 不定芽数 / 个 | 芽分化率 / % |
|------|----------|------------|----------|----------|
| 光照培养 | 20 | 19 | 30(1.58) | 95 |
| 暗培养 | 20 | 19 | 37(2.06) | 95 |

表 4 培养温度对香蕉薄片芽分化的影响

| 温度 / °C | 薄片总数 / 个 | 出芽外植体数 / 个 | 不定芽数 / 个 | 芽分化率 / % |
|---------|----------|------------|----------|----------|
| 25±1 | 20 | 13 | 25(1.9) | 65 |
| 30±1 | 20 | 18 | 50(2.78) | 90 |

不同的培养温度对香蕉薄片分化芽有影响。研究结果(表 4)表明,在 30 °C 培养条件下,薄片的不定芽分化能力强,丛芽多。虽然在 25 °C 培养条件下,也能得到相当多的不定芽,但在培养时间相同时,不定芽比 30 °C 时要少。在香蕉的工厂化生产中,笔者也常设定这个培养温度。

2.4 培养基中蔗糖浓度对香蕉薄片芽分化的影响

由于在研究以根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化时,在其侵染阶段使用了较高的蔗糖浓度,因此,笔者研究了培养基中不同的蔗糖浓度对芽分化的影响。结果表明,蔗糖浓度过高抑制了芽的分化。在蔗糖浓度 50 mg·L⁻¹ 以上时,随着蔗糖浓度的提高,芽的分化受到抑制愈严重(见表 5)。

表 5 培养基中蔗糖浓度对香蕉薄片芽分化的影响

| 蔗糖质量浓度 / mg·L ⁻¹ | 薄片总数 / 个 | 出芽外植体数 / 个 | 不定芽数 / 个 | 芽分化率 / % |
|-----------------------------|----------|------------|----------|----------|
| 30 | 20 | 18 | 50(2.78) | 90 |
| 50 | 20 | 13 | 32(2.46) | 65 |
| 100 | 15 | 9 | 16(1.78) | 60 |
| 150 | 20 | 4 | 4(1.0) | 20 |

2.5 AgNO₃ 对香蕉横切薄片芽分化的影响

关于 AgNO₃ 在植物离体培养中的作用,研究认为 AgNO₃ 能提高外植体不定芽分化率^[10]。本研究 AgNO₃ 对香蕉横切薄片芽分化影响的结果(图 5, 6)说明,AgNO₃ 在 20 mg·L⁻¹ 的质量浓度以内能促进薄片芽分化,芽点多。但以较低浓度下不定芽的质量较好,并且只有在 5 mg·L⁻¹ 左右所分化的芽点能生长成正常的植株。

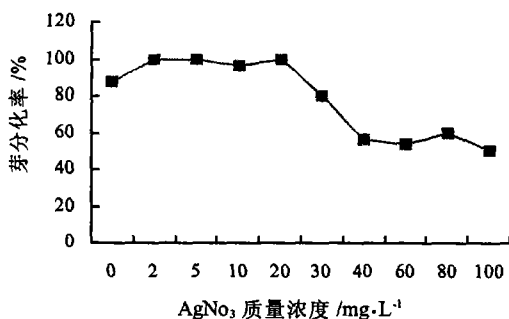


图 5 AgNO₃ 浓度对薄片芽分化影响

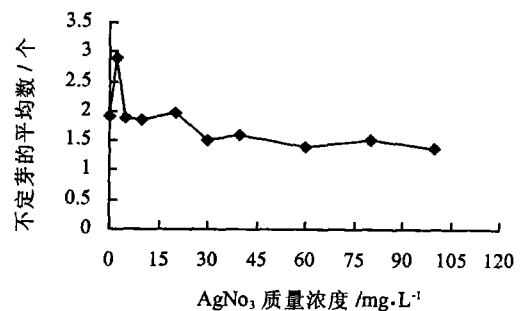


图 6 AgNO₃ 浓度对薄片芽再生的影响

3 讨论

香蕉在我国的福建、广西、广东、云南、海南等地大量种植,已是地方农业发展的支柱产业之一。因此,选育高产、优质、抗逆性强的新株系或新品种将有利于香蕉产业的进一步发展。香蕉品种改良技术包括体细胞突变、体细胞变异、诱变育种、基因工程等,都是建立在组织培养技术基础上的。近十年来,基因工程技术的发展使进行香蕉抗病虫、抗逆、品质改良的定向育种成为可能。虽然国内外有关香蕉的

遗传转化有过报道^[11-13],但由于香蕉是单子叶植物及不易被农杆菌浸染的特点,目前国内外尚未建立起较好的单独以农杆菌介导的遗传转化方法。

本研究以香蕉低代试管苗为材料,采用薄层技术研究芽分化情况。研究结果证明,以此为材料进行横切薄层切片的组织培养再生率高,周期短,这和黄霞等^[14]以香蕉假茎为材料相比,能够较快建立起遗传转化受体系统。在研究中发现影响薄层切片芽的分化的因素是:(1)作为薄层切片来源的无菌材料。从大田吸芽进行无菌操作取顶芽接种在分化培养基后,经过2~3代的继代培养后作为薄层切片材料是最理想的。因此,低代无菌材料是本研究与其它相关研究不同之处。因为此时靠近生长点的组织有大量的具有潜在分化能力的细胞,通过它得到的薄层切片芽分化最理想。(2)培养温度。在培养温度为30℃时,可得到较多的不定芽。(3)光照条件。暗培养有利于促进芽的分化,而在光照条件下分化的芽粗壮,在生根阶段光照有利于移栽成活率。在随之进行的以根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化研究中,以薄层切片作为转化受体能得到很高的GUS基因瞬时表达^[8,9]。因此,香蕉薄层培养技术将促进利用基因工程技术进行香蕉的育种研究。

参 考 文 献

- 1 陈廷速,胡德潜,周嘉运,等.香蕉产业发展概况及对策.广西农业科学,2002(1):39-41
- 2 Tran T V K. In vitro of de novo flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissue. Nature, 1973, 246:44-45
- 3 Tran T V K. Control of morphogenesis. Ann Rev Plant Physiol, 1981, 32:291-311
- 4 Tran T V K. Molecular aspects of flowering. In: Harding J, Singh F, Mol JNM(Eds.), Genetics and Breeding of ornamental Plants, New York: Plenum Press, 1991. 253-269
- 5 Bui VL, Do NTM, Jeanneau M, et al. Rapid plant regeneration of a C4 dicot species: *Amaranthus edulis*. Plant science, 1998, 132:45-54
- 6 Maria H C, Bui V L, Yasmine Z F, et al. Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. Plant science, 2000, 159:223-232
- 7 王关林,方宏筠,那杰.高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用.植物学通报,1997,14(3):47-53
- 8 陈廷速,张军,夏宁邵,等.影响根癌农杆菌介导的香蕉遗传转化因素研究.广西农业生物科学,2002,1:26-31
- 9 陈廷速,张军,夏宁邵,等.香蕉农杆菌介导高效转化体系.西南农业学报,2002,15(1):20-23
- 10 张鹏,傅爱根,王爱国. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制.植物生理学通讯,1997,33(5):376-379
- 11 Gregory D M, Afza R. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plant via Agrobacterium-mediated transformation. Biotechnology, 1995, 13:486-492
- 12 Sagi L, Panis B. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa spp.*) via particle bombardment. Biotechnology, 1995, 13:481-485
- 13 李华平,胡晋生,王敏,等.香蕉茎尖遗传转化法研究.热带作物学报,2000,21(4):33-38
- 14 黄霞,黄学林.果用香蕉薄片培养再生植株.植物生理学通讯,1998,34(4):268

Highly Efficient Regeneration of *Musa spp.* Plantlet Through Transverse Thin Cell Layer Culture

Chen Tingsu^{1,4} Zhang Jun² Xia Ningshao² Chen Rukai² Li Yangrui⁴

(1 Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanning 530007;

2 Tumour Cell Engineering Lab, Xiamen University, Xiamen 361005;

3 Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002;

4 Guangxi Key Lab for Crop Improvement and Biotechnology, Nanning 530007)

Abstract The effect of several factors were studied on the plant regeneration from transverse thin cell layer of *Musa spp.*. The results showed that the plantlet regeneration was highly promoted with transverse thin cell layer culture. The shoot differentiation was restrained by thidiazuron (TDZ) and no normal shoots were obtained. More shoots were regenerated from transverse thin cell layers under dark-culture at 30℃ as compared to light culture at 25℃. Both sugar and AgNO₃ had some effect on the shoot differentiation of transverse thin cell layer of *Musa spp.*

Key words *Musa spp.* transverse thin cell layer culture plant regeneration