

# 大蕉胚性培养物及其原生质体再生植株的染色体分析

肖望<sup>1,2</sup>, 黄少丽<sup>2</sup>, 陈晓娜<sup>2</sup>, 戴雪梅<sup>1</sup>, 黄霞<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学院, 广东广州510275;

2. 广东教育学院生物系, 广东广州510303)

**摘要:** 采用看护培养法对大蕉胚性细胞悬浮系 (Embryogenic cell suspensions, ECS) 来源的原生质体进行培养, 并研究了不同品种的看护细胞对原生质体培养的影响, 以及大蕉 ECS 及其原生质体再生植株的染色体数目。结果发现, 采用贡蕉 ECS 作为看护细胞时, 大蕉原生质体培养 15 d 后细胞分裂频率达到 8.5%, 培养 30 d 后细胞团形成率为 0.35%; 而以大蕉 ECS 作为看护细胞时, 全部原生质体褐化, 不能正常发育。染色体检测结果表明, 大蕉 ECS 的染色体数目不稳定, 除含有正常的三倍体染色体数目的细胞 ( $2n=3x=33$ ) 外, 还出现大量染色体数目异常的细胞。其中绝大部分细胞含有多倍和非整倍的染色体数目, 仅 14.5% 的细胞含正常三倍体染色体数目; 但通过 ECS 原生质体培养获得的再生植株具有正常的三倍体染色体数目 ( $2n=3x=33$ )。

**关键词:** 大蕉 *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB; 胚性细胞悬浮系 (Embryogenic cell suspensions, ECS); 再生植株; 原生质体培养; 染色体数目

中图分类号: S668.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2009) 02-0071-05

## Chromosome Number of Embryogenic Cultures and Protoplast-regenerated Plants of *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB

XIAO Wang<sup>1,2</sup>, HUANG Shaoli<sup>2</sup>, CHEN Xiaona<sup>2</sup>, DAI Xuemei<sup>1</sup>, HUANG Xia<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510303, China)

**Abstract:** Protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions of *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB were cultured on feeder layer. Then the effect of nurse cells on protoplast culture, the chromosome numbers of embryogenic suspension cells and protoplast-regenerated plants of Da Jiao (ABB) were studied. When embryogenic cell suspensions of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) were used as nurse cells, the cell division frequency at 14 days and colony formation frequency at 28 days were 8.5% and 0.35%, respectively. And the protoplasts were necrosis when embryogenic cell suspensions of Da Jiao (ABB) were used as nurse cells. The chromosome numbers of embryogenic cell suspensions of Da Jiao (ABB) showed a wide range of variation. Most of them were aneuploidy and polyploidy, while only about 14.5% of cells were observed to be triploid ( $2n=3x=33$ ). But the chromosome number of the protoplast-regenerated plants was triploid ( $2n=3x=33$ ).

**Key words:** *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB; embryogenic cell suspensions; protoplast culture; regenerated plants; chromosome number

香蕉 *Musa* spp. 是世界上重要的热带亚热带水果和粮食作物。目前绝大多数栽培蕉面临着被枯萎

病感染而可能导致种族灭绝的困境, 尽快培育出高产量、高品质和高抗性的香蕉新品种, 是解决当前

\* 收稿日期: 2008-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400287); 广东省自然科学基金资助项目 (011126, 06023159); 广东省科技计划资助项目 (2006B20101014); 广州市科技计划资助项目 (2006Z3-E0281)

作者简介: 肖望 (1970年生), 女, 博士; 通讯作者: 黄霞; E-mail: huangxia@mail.sysu.edu.cn

问题最根本的措施。但由于大多数香蕉栽培种属于三倍体, 具有高度不育性, 果实无种子, 难于采用传统的杂交育种来进行品种改良。近年来日益发展的生物技术, 如转基因技术、体细胞杂交技术等, 有望克服传统育种的限制而达到改善香蕉种质的目的。香蕉原生质体培养体系可应用于基因转化、体细胞杂交及诱变育种, 因此研究者一直致力于建立各香蕉品种的原生质体培养再生植株体系, 而香蕉胚性细胞悬浮系 (Embryogenic cell suspensions, ECS) 的建立及保持是取得成功的重要前提条件。

很多植物胚性愈伤组织或 ECS 在培养过程中, 细胞染色体数目发生了广泛的变异。例如, 在荔枝 *Litch chinensis* Sonn.<sup>[1]</sup>、龙眼 *Dimocarpus longan* Lour.<sup>[2]</sup> 等植物的胚性愈伤组织的培养过程中, 细胞染色体数目发生很大变异, 导致细胞再生能力下降。到目前为止, 还没有关于香蕉 ECS 遗传稳定性等方面的研究报道。

大蕉 *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB 抗性强, 耐贫瘠, 研究表明, 大蕉还具有较强的枯萎病抗性<sup>[3]</sup>。因此在香蕉种质改良中, 大蕉是一重要的种质资源, 可用于抗性基因的克隆, 或通过体细胞杂交进行新品种的培育。本实验室通过大蕉未成熟的雄花序诱导出胚性愈伤组织, 并通过体胚发生途径获得了再生植株<sup>[4]</sup>。建立了大蕉的 ECS 后, 希望能成功建立原生质体培养再生植株体系, 为进行体细胞杂交奠定基础。本文研究不同品种的看护细胞对大蕉原生质体培养的影响, 并对大蕉 ECS 及其原生质体再生植株的染色体数目进行检测, 以期对大蕉原生质体培养过程进行优化, 同时探明大蕉 ECS 在长期继代培养后染色体数目变化的规律, 为进一步利用大蕉为材料进行生物技术育种研究提供遗传学参考数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以本实验室建立的, 保存于液体培养基 (MS 基本培养基<sup>[5]</sup> + 4.5 μmol/L 2, 4 - D, + 4.1 μmol/L 生物素 + 680 μmol/L 谷氨酰胺 + 100 mg/L 麦芽提取物 + 45 g/L 蔗糖, pH = 5.3) 中的大蕉和贡蕉 (*Musa acuminata* cv. Mas, AA) 的 ECS 为材料, 进行大蕉原生质体培养及染色体数目分析。

### 1.2 方 法

1.2.1 大蕉原生质体的分离和培养 按照 Xiao 等方法进行大蕉原生质体的分离和培养<sup>[6]</sup>。分别采用贡蕉和大蕉的 ECS 作为看护细胞制作看护培养

层, 研究不同香蕉品种的 ECS 对大蕉原生质体培养的影响。原生质体培养 14 d 统计细胞分裂频率

$$\text{分裂频率} = \frac{\text{分裂一次或以上的原生质体数}}{\text{原生质体接种总数}} \times 100\%$$

培养 28 d 后统计细胞团形成频率

$$\text{细胞团形成频率} = \frac{\text{含 6 个以上细胞的细胞团}}{\text{原生质体接种总数}} \times 100\%$$

45 d 后, 将获得的细胞团转移到分化培养基<sup>[7]</sup>上进行体胚诱导, 得到成熟体胚后转移到新鲜的分化培养基上进行体胚萌发, 待再生苗约 2 ~ 3 cm 高后转移到添加了  $w = 0.1\%$  活性炭的 MS 基本培养基中, 以促进植株进一步发育。

所有培养都在  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  条件下进行, 其中原生质体培养和体胚诱导在黑暗条件下进行, 体胚萌发和植株发育在 16 h/8 h (光/暗) 光周期下进行。

1.2.2 大蕉 ECS 及其原生质体再生植株的染色体检测 在 10:00 点左右, 取最后一次继代 5 ~ 7 d 的均质分散的大蕉 ECS 以及大蕉原生质体再生植株的健壮根尖, 分别参考孙敬三等<sup>[8]</sup>, 李懋学和张赞平<sup>[9]</sup>的方法进行 ECS 和根尖染色体数目分析。每个样品至少统计 200 个染色体分散、清晰的中期分裂相, 在 Olympus CX41 显微镜下观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体的分离

经过 8 h 的酶解, 大蕉原生质体产量达到  $5 \times 10^7 \sim 6 \times 10^7$  个/mL PCV. (PCV, packed cell volume, 细胞密实体积) ECS。刚分离的原生质体在大小上呈现很大的差异 (图 1 - A), 其中 9.4% 的原生质体的直径大于 20 μm, 18.3% 的原生质体直径为 10 ~ 20 μm, 72.3% 的原生质体直径小于 10 μm。

### 2.2 原生质体的培养及植株再生

采用贡蕉 ECS 作为看护细胞时, 经过 2 ~ 3 d 的培养, 大蕉原生质体变为椭圆形; 经过 4 ~ 5 d 的培养, 出现第一次细胞分裂; 经过 7 ~ 8 d 的培养, 出现第二次分裂, 细胞分裂为均等分裂 (图 1 - B)。培养 7 ~ 8 d 左右可见 3 - 4 - 细胞团 (图 1 - C); 培养 10 ~ 12 d 可见到更大的多细胞团或早期的球形原胚 (图 1 - D)。培养 30 d 左右, 部分细胞团继续增大, 形成肉眼可见的细胞团 (图 1 - E)。组成这种细胞团的细胞呈球形, 内含物丰富 (图 1 - D)。细胞分裂频率在 15 d 时达到 8.5%, 30 d 时细胞团形成率为 0.35%。

而采用大蕉 ESC 作为看护细胞时，大蕉原生质体褐化死亡，发育受阻（图 1 - F）。

将以贡蕉 ECS 为看护细胞进行大蕉原生质体培养所形成的细胞团转移到分化培养基上，培养 30 d 时，得到成熟体胚（图 1 - G），从  $1 \times 10^6$  个原生质体可获得 2 200 个左右的体胚。成熟体胚在分化培养基上继续培养 10 ~ 15 d 后萌发（图 1 - H）。最后从  $1 \times 10^6$  个原生质体获得 3 棵正常植株。

2.3 大蕉 ECS 细胞和再生植株根尖染色体数目

分析

如表 1 所示，大蕉 ECS 染色体数目呈现很大变异，分布在 6 ~ 61 之间。其中含有整倍染色体数目的细胞占 29.9%，包括单倍体、二倍体、三倍体和四倍体细胞；含非整倍染色体数目的细胞占 70.1%（表 1）。染色体数目在 12 ~ 32 之间的非整倍体细胞最多，约占 58.1%；而染色体数目为正常三倍体的细胞（ $2n = 3x = 33$ ）仅占 14.5%

但由原生质体培养所得到的再生植株都含有正常的三倍体染色体数目（ $2n = 3x = 33$ ）。

表 1 大蕉 ECS 染色体数目分布及所占的比例

Table 1 Distribution and percentage of chromosome number in embryogenic cell suspensions of *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB

染色体数目	单倍体	二倍体	三倍体	四倍体	非整倍体				
	$2n = x = 11$	$2n = 2x = 22$	$2n = 3x = 33$	$2n = 4x = 44$	$2n < 11$	$2n = 12 - 21$	$2n = 23 - 32$	$2n = 34 - 43$	$2n > 45$
比例 / %	3.4	11.1	14.5	0.9	1.8	22.2	35.9	4.3	5.9

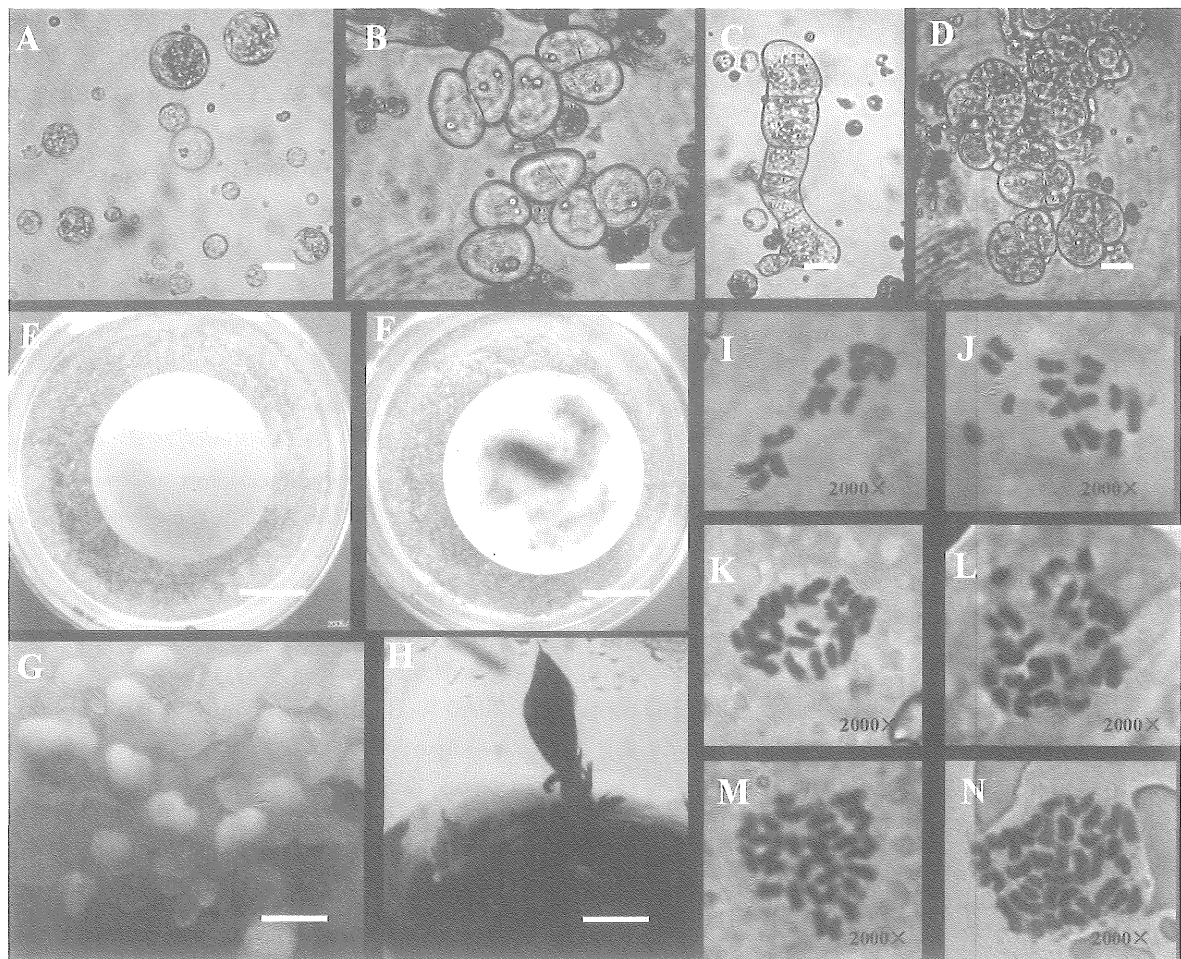


图 1 大蕉原生质体培养及 ECS 染色体数目分布

Fig. 1 Protoplast culture and distribution of chromosome number in ECS of *Musa paradisiaca* Linn. cv. Da Jiao, ABB  
 A: 刚分离出来的原生质体，标尺 = 20  $\mu$ m；B: 正在进行第一次细胞分裂，标尺 = 20  $\mu$ m；C - D: 原生质体形成的细胞团，标尺 = 40  $\mu$ m；E: 用贡蕉 ECS 作看护细胞时，原生质体发育良好，标尺 = 1 cm；F: 用大蕉 ECS 作为看护细胞时，原生质体褐化，标尺 = 1 cm；G: 成熟体胚，标尺 = 4 mm；H: 原生质体再生植株，标尺 = 2 cm；I: 染色体数目为 11 条（2 000  $\times$ ）；J: 染色体数目为 16 条（2 000  $\times$ ）；K: 染色体数目为 22 条（2 000  $\times$ ）；L: 染色体数目为 28 条（2 000  $\times$ ）；M: 染色体数目为 33 条（2 000  $\times$ ）；N: 染色体数目为 37 条（2 000  $\times$ ）

### 3 讨论

#### 3.1 看护细胞品种对大蕉原生质体培养的影响

采用大蕉 ECS 作为大蕉原生质体培养的看护细胞时,导致原生质体褐化,不能进一步发育。有研究表明,植物抗性强,更易分泌酚类物质,酚类物质褐化后可以阻止病原物的侵染从而提高抗性<sup>[10]</sup>。大蕉是抗逆性比较强的香蕉品种,在作为看护细胞时,可能会分泌较多的酚类物质导致原生质体褐化而不能进一步发育。采用贡蕉 ECS 作为看护细胞,可以促进大蕉原生质体的细胞分裂和细胞团的形成,这可能与贡蕉本身的细胞分裂能力、胚性状态以及贡蕉本身不易褐化有关。在进行香蕉原生质体培养时,选择合适的 ECS 作为看护细胞是非常重要的。

#### 3.2 大蕉 ECS 的染色体变异与原生质体植株再生的关系

本研究发现,虽然从  $1 \times 10^6$  个原生质体获得 2 200 个左右的体胚,但植株再生频率非常低,只获得 3 棵正常植株。染色体分析表明,大蕉 ECS 的染色体数目发生了很大的变异,具有正常染色体倍性的细胞只占 15.4%。这可能是引起原生质体再生频率低的因素,但还需要进一步的研究证明。

尽管大蕉 ECS 出现了广泛的染色体倍性变异,但通过原生质体培养仅再生了大蕉固有倍性 ( $2n = 3x = 33$ ) 的再生植株。这种现象在苹果 *Malus pumila* Mill.<sup>[11]</sup> 和草莓 *Fragaria ananassa* Duch.<sup>[12]</sup> 中也有报道,说明植物的固有倍性具有选择优势。植株再生也是一个对变异细胞的选择过程,非整倍性或者多倍体在竞争中被淘汰,从而使再生植株保持了固有特征,这对于种质资源的离体保存是十分有利的,能保持该物种的遗传稳定性。

#### 3.3 大蕉 ECS 染色体变异的可能原因

体细胞无性系变异是组织培养中非常普遍的现象<sup>[13]</sup>。杜捷等对兰州百合 *Lilium davidii* var. *Unicolor* (hong) cotton 组织培养过程中的细胞染色体行为进行研究,发现随着继代次数的增加,染色体数目变异的愈伤组织细胞随之增加<sup>[14]</sup>。向凤宁等对玉米 *Zea mays* L. 胚性愈伤组织细胞的染色体观察发现,随着继代时间的延长,二倍体细胞减少,而四倍体和非二倍体细胞增多<sup>[15]</sup>。王正询等也曾提出香蕉试管苗混倍性变异会积累<sup>[16]</sup>。这可能与植物组织离体培养因素有关。邓秀新等<sup>[17]</sup>、Vardi 和 Spiegel-Roy<sup>[18]</sup> 发现各种激素特别是 2, 4-D 的使用,会导致细胞染色体的变异。本试验所用材料在

各个培养阶段都大量使用 2, 4-D, 是否因此导致细胞变异频率高还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 黄素华,赖钟雄. 荔枝胚性愈伤组织及其体胚发生过程中染色体数目的变化[J]. 福建农业大学学报:自然科学版,2003,32(4):458-463.  
HUANG Suhua, LAI Zhongxiong. The change of the chromosome number in the embryogenic calli and in the process of the somatic embryogenesis in litchi[J]. Journal of Fujian Agricultural University: Natural Science, 2003, 32(4):458-463.
- [2] 赖钟雄,陈春玲,黄素华,等. 龙眼胚性愈伤组织长期继代培养及其染色体数目变异[J]. 福建农业大学学报:自然科学版,2001,30(1):29-32.  
LAI Zhongxiong, CHEN Chunling, HUANG Suhua, et al. Long-term subculture of embryogenic calli and their genetic variation of the chromosome number in longan [J]. Journal of Fujian Agricultural University: Natural Science, 2001, 30(1):29-32.
- [3] 黄秉智,许林兵,杨护,等. 香蕉种质资源枯萎病抗性田间评价初报[J]. 广东农业科学,2005,(6):9-1.  
HUANG Bingzhi, XU Linbin, YANG Hu, et al. Preliminary results of field evaluation of banana germplasm resistant to Fusarium wilt disease [J]. Guangdong Agricultural Science, 2005, (6):9-10.
- [4] 李哲,黄霞,李筱菊,等. 大蕉 (*Musa paradisiacal* ABB Linn.) 花序愈伤组织的诱导及体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯,2005,41:616-618.  
LI Zhe, HUANG Xia, LI Xiaojun, et al. Callus induction and somatic embryogenesis from inflorescences of *Musa paradisiaca* ABB Linn. [J]. Plant Physiology Communications, 2005, 41:616-618.
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15:473-497.
- [6] XIAO W, HUANG X L, HUANG X, et al. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2007, 90:191-200.
- [7] 肖望,黄霞,魏岳荣,等. “过山香”香蕉原生质体培养及植株再生[J]. 园艺学报,2008,35(6):873-878.  
XIAO Wang, HUANG Xuelin, HUANG Xia, et al. Plant regeneration from protoplast culture of *Musa* AAB Silk cv. Guoshanxiang [J]. Acta Horticulture Sinica, 2008, 35(6):873-878.
- [8] 孙敬三,路铁刚,SONDAHL M R. 超甜玉米单倍体悬浮细胞系的建立及其生长特性[J]. 植物学报,1989,31(10):742-749.

- SUN Jingsan, LU Tiegang, SONDAHL M R. Establishment and characterization of haploid suspension cells in super-sweet Maize [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1989, 31(10): 742-749.
- [9] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 252-257.
- LI Maoxue, ZHANG Zanping. Crops chromosome technology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1996: 252-257.
- [10] 曹若彬. 果树病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 37-41.
- CAO Ruobin. Fruits pathology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 37-41.
- [11] 潘增光. 苹果原生质体培养再生及融合研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 1998: 41-43.
- PAN Zengguang. Studies on the culture, regeneration and fusion of protoplast in apple [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 1998: 41-43.
- [12] 张学英. 草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)原生质体培养及植株再生研究[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2004: 34-36.
- ZHANG Xueying. Studies on protoplast culture and plant regeneration in strawberry [D]. Shijiazhuang: Hebei Agricultural University, 2004: 34-36.
- [13] PESCHKE V M, PHILLIPS R L. Genetic implication of somaclonal variation in plants [J]. *Advances in Genetics*, 1992, 30: 41-75.
- [14] 杜捷, 王刚, 幸亨泰, 等. 兰州百合继代培养过程中的染色体变异[J]. 西北师范大学学报: 自然科学版, 2003, 39(2): 61-65.
- DU Jie, WANG Gang, XING Hengtai, et al. Chromosome aberration in the course of subculture of *Lilium davidii* var. *Unicolor* (hong) cotton [J]. *Journal of Northwest Normal University: Natural Science*, 2003, 39(2): 61-65.
- [15] 向凤宁, 张举仁, 陈惠民, 等. 玉米胚性愈伤组织的长期继代及其染色体分析[J]. 西北植物学报, 1994, 14(3): 157-163.
- XIANG Fengning, ZHANG Juren, CHEN Huimin, et al. Long-term culture and chromosome variations of embryogenic calli in *Maize* [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 1994, 14(3): 157-163.
- [16] 王正询, 刘鸿先, 周伯春. 香蕉试管苗混倍性变异的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(3): 257-269.
- WANG Zhengxun, LIU Hongxian, ZHOU Bochun. Studies of the mixoploid variation in banana micropropagated plants [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(3): 257-269.
- [17] 邓秀新, 刘功弼, 章文才. 柑桔愈伤组织染色体变异研究[J]. 中国柑桔, 1985, (3): 4-6.
- DENG Xiuxin, LIU Gongbi, ZHANG Wencai. A study of chromosome variation of *Citrus callus* [J]. *Chinese Citrus*, 1985, (3): 4-6.
- [18] VARDI A, SPIEGEL-ROY P. Plant regeneration from citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1982, 62: 171-176.