

影响木薯次生胚状体发生及植株再生因素的研究

李洪清, 梁承邺, 黄毓文, 郭俊彦

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

摘要: 研究了在外植体的不同发育阶段中, 碳源以及不同的生长激素配比对木薯次生胚状体诱导及植株再生的影响。结果表明: 以固体成熟培养基上生长 15 d 的胚状体子叶为外植体, 次生胚状体的产量最高, 达 29.3 个成熟胚状体/1 个外植体。在次生胚状体的诱导阶段, 以麦芽糖(40 g/L)代替蔗糖作碳源, 能同时提高次生胚状体的产量(32.5 个胚状体/1 个外植体)及植株再生频率(74.3%)。2,4-D 与 PP₃₃₃ (0.1 mg/L) 配合能提高植株再生频率到 77.6%。2,4-D 与 BAP (2 mg/L) 或激动素 (2.0 mg/L) 配合则大大降低了胚状体诱导及植株再生频率。

关键词: 木薯; 次生胚状体发生; 植株再生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

5533035-3

Factors influencing the development of secondary embryoids and plant regeneration on Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

LI Hong-qing, LIANG Cheng-ye, HUANG Yu-wen, GUO Jun-yan

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: During the different growth stages of Cassava explants, the effects of carbon sources and growth regulators with different concentrations and combinations on the development of secondary embryoids and plant regeneration were investigated with an approach based on the cyclic embryogenesis liquid culture system. The highest embryoid production i. e., 29.3 maturation embryoids per explant, was obtained from initial embryoids being matured on the solid medium (MS medium supplemented with 0.1 mg/L BAP) for 15 d as explants. When maltose (40 g/L) was substituted for sucrose as carbon source in the culture medium, there was an increasing potential both in the efficiency of embryoid development (32.5 mature embryoids per explant) as well as the frequency of plant regeneration (74.3%). An increase of 38.5% to 77.6% regeneration frequency was demonstrated when 2,4-D and PP₃₃₃(0.1 mg/L) were contained in the culture in the culture medium. However, with a combination of 2,4-D and either BAP (2 mg/L) or kinetin (2.0 mg/L), a considerable reduction both in embryoid induction and frequency of plant regeneration was observed.

收稿日期: 1998-06-08

作者简介: 李洪清(1966-), 男, 博士, 助理研究员, 从事植物遗传转化研究。

基金项目: 中国科学院择优留学基金及中国科学院“九五”育种资助项目(KZ951A1101-314)

Key words: Cassava; secondary embryogenesis; plant regeneration

组织培养及再生系统是基因转化的基础之一, 就木薯而言, 其胚状体诱导的频率及植株再生频率, 是能否获得转化株的关键。从 1982 年木薯的胚状体诱导成功以来^[1], 木薯的胚状体发生及植株再生系统已成功地应用于多个品种^[2,3,4]。但由于木薯胚状体诱导及发育是一个连续的过程, 胚状体一经诱导就不可逆地向前发育, 进入成熟阶段, 而不能象其它植物一样通过愈伤组织继代培养而在前胚状体及球形胚状体阶段进行扩增^[5], 因而很难适应转化的要求。因此, 近年来的一些工作主要研究如何从初生胚状体诱导次生胚状体, 经过多次的连续胚状体诱导来快速扩增材料, 同时也方便转化体的筛选^[6]。在模式品种 M Col 22 上的研究结果表明, 次生胚状体可以由初生胚状体诱导并连续继代, 作为外植体的胚状体的发育程度会影响着次生胚状体的产量, 采用成熟的胚状体(即带绿色子叶)作外植体较采用非成熟胚状体作外植体效果更好, 因此, Raemakers 等^[3]提出在两次胚状体诱导之间, 增加一个胚状体成熟阶段, 即所谓循环胚状体的诱导。采用该方法大大地有利于胚状体的扩增, 也给转化带来了极大的方便。其它品种如 M Col 1505, TMS 604444 等也有不经成熟阶段而直接转入诱导培养基进行继代的。另外还有一种所谓“胚性愈伤组织培养”, Taylor 等^[7]发现某些品种如 M Col 1505, TMS 604444 在诱导培养基上能形成一种胚性愈伤组织, 经改变基本培养基, 以 GD 代替 MS, picloram 代替 2,4-D 后, 胚性愈伤组织的产量增加, 转入 SH 基本培养基可进行悬浮培养从而大量扩增。从上面研究看, 胚状体诱导效率已大大提高, 但无论是循环胚状体发生及脆性胚性愈伤组织发生, 所用的品种均有一定的局限性, 如何将 these 方法应用于更多的品种, 有待进一步的研究。

在植株再生的研究上, Raemakers 等^[3]发现较高浓度的 BAP (0.4 mg/L) 比较适合胚状体再生。Szabados 等^[2]认为在再生培养基中加入 GA₃ 能提高植株再生频率, 但频率均较低。至今在木薯再生上作用明显的处理是将胚状体首先在含活性炭的培养基上成熟培养, 然后进行脱水处理^[8], 该方法将初生胚状体的再生频率提高到 85.4%, 次生胚状体也得到一定程度的提高。但其高频率是以数量极少的、生理状态合适的成熟胚状体为基础的, 而大多数不同发育阶段的胚状体仍不能再生植株, 因此要想进一步提高木薯胚状体发生及植株再生效率, 还必须从胚状体的诱导, 即改善胚状体的状态方面进行研究。

鉴于以上原因, 本文以模式品种 M Col 22 为材料, 在液体培养的基础上, 研究通过采用不同发育阶段的胚状体, 在胚状体诱导阶段采用不同碳源、不同激素配比来提高次生胚状体诱导及植株再生频率。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

4 个木薯(*Manihot esculenta* Crantz)品种, 其中 M Col 22 和南植 188 来自 CIAT, Colombia (哥伦比亚热带作物研究中心), 华南 205 和红尾为中国品种。各品种的无菌苗培养保存在基本培养基上 (BM), 基本培养基的组成为 MS 培养基的大量元素、微量元素和维生素, 附加 20 g/L 蔗糖, 0.6% 琼脂糖, pH5.8, 高温高压灭菌 (121 °C, 20 min)。材料的培养温度为 28 ± 2 °C, 光照强度为 1 600 lx, 照光 16 h/d。1 个月继代一次, 中国品种红尾的幼叶直接取材于温室, 其生长条件为: 温度 21 ~ 28 °C、光照 12 h。

1.2 初生胚状体的诱导

参照 Stamp 和 Henshaw^[5]。取试管苗靠近顶端分生组织的幼叶 (其中红尾的幼叶取自温室, 经 5% 的次氯酸钠消毒 5 min, 洗净), 长约 3~6 mm 的外植体被切成 3~4 片, 培养在直径 10 cm 的

培养皿里, 胚状体诱导培养基为 BM 附加不同浓度的 2,4-D, 黑暗下培养, 温度为 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 。诱导培养 20 d 后, 统计胚状体诱导频率。

1.3 胚状体的成熟

所谓胚状体的成熟是指由球形胚或鱼雷胚发育到子叶胚, 成熟胚状体具有明显根、芽二级结构及伸展的绿色子叶。将诱导 20 d 左右的胚状体连同愈伤组织一起转入成熟培养基培养, 15 d 后统计成熟胚状体的数量。胚状体成熟培养基为 MS 附加 0.1 mg/L BAP 、培养温度为 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度为 1200 lx 、照光 16 h/d 。

1.4 循环胚状体诱导及植株再生

木薯的初生胚状体转入成熟培养基 (BM 附加 0.1 mg/L BAP)、光照强度及照光时间同上, 培养 15 d 后, 取子叶切碎进行次生胚状体的诱导。次生胚状体的诱导在液体培养基中进行, 将来源于 5 个成熟胚状体的子叶切碎, 放入 100 ml 的三角瓶中, 加入 20 ml 培养液 (液体 BM 附加 6 mg/L 2,4-D)。黑暗下培养, 摇床转速为 120 rpm, 后面的循环均采用与前面相同的过程, 即胚状体诱导——胚状体成熟——胚状体诱导。同时, 成熟的胚状体也可转入再生培养基, 分别长苗及长根, 具体过程如示:

1.5 胚状体阶段对次生胚状体诱导的影响

将液体悬浮培养诱导出的胚状体, 分别转入固体及液体成熟培养基, 光照培养下 5、10、15、20 d 后取出, 进行次生胚状体的诱导。

1.6 碳源、激素对次生胚状体发生及植株再生的影响

以成熟胚状体为外植体, 以 20、40 g/L 的蔗糖、葡萄糖及乳糖分别作为胚状体诱导阶段的碳源, 在悬浮培养下进行次生胚状体的诱导, 20 d 后, 将诱导的胚状体团转入含 20 g/L 蔗糖的胚状体成熟、萌发培养基上进行植株再生。激素配比的处理只在胚状体阶段进行。

2 结果

2.1 培养基类型及胚状体成熟培养时间对次生胚状体诱导的影响

以初生胚状体为外植体, 经诱导产生次生胚状体 (循环 I 次, cycle I)。本实验以次生胚状体 (循环 II 次, cycle II) 为外植体, 分别转入固体及液体的成熟培养基, 研究固体培养、液体培养及不同胚状体成熟时间对次生胚状体即对 cycle III 胚状体的产量的影响, 结果表明 (表 1): 固体培养基上胚状体生长较液体中的快, 而且次生胚状体发生频率随成熟培养时间的延长而提高, 在 15 d 左右达到最大值, 而在液体培养基上达到最大值的时间稍迟, 且在相同的胚状体成熟时间内次生胚状体发生频率

循环胚状体发生 (液体培养)

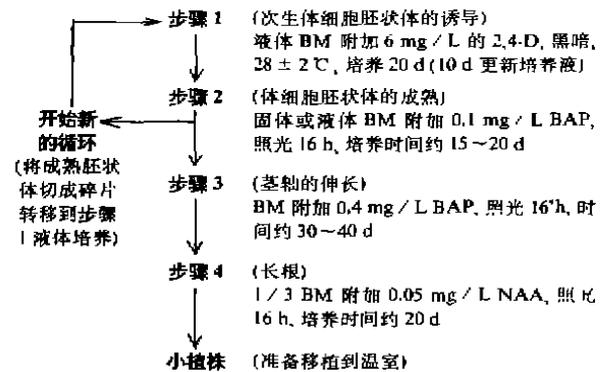


表 1 胚状体成熟培养时间及培养基类型对次生胚状体发生的影响

Table 1 Influence of maturation time and medium type on secondary embryogenesis

培养基类型 Medium type	成熟培养时间(d) Maturation time (days)	成熟胚状体 数/外植体 No. of maturation embryos / initial embryo
固体 solid	5	16.4 ± 2.5
	10	23.4 ± 2.8
	15	29.3 ± 4.1
	20	25.3 ± 3.0
液体 liquid	5	13.6 ± 1.9
	10	15.8 ± 1.8
	15	19.6 ± 2.4
	20	22.5 ± 3.1

Values are mean (\pm SD) of three replications, each containing 10 maturation embryos as explants.

较固体培养的要低。

2.2 不同的碳源对体细胞胚胎发生及植株再生的影响

分别以 20~40 mg/L 的麦芽糖、葡萄糖、乳糖及蔗糖为碳源, 加入胚状体诱导培养基, 研究它们对次生胚状体发生及植株再生的影响。四种碳源中以麦芽糖的效果最好, 当麦芽糖浓度为 40 g/L 时, 胚状体诱导效率较蔗糖 20 g/L 时稍高, 而植株再生的频率则由蔗糖的 38.5% 提高到 74.3%, 成熟胚状体的再生植株数由蔗糖的 11.6 增加到 24.1, 分别为蔗糖对照的 2 倍。葡萄糖及乳糖对胚状体的诱导效果均较蔗糖的差 (表 2)。

2.3 不同激素对比对木薯次生胚状体发生及植株再生的影响

为了研究不同的激素对比对次生胚状体诱导及植株再生的影响, 采用 2,4-D 6 mg/L 分别与其它激素, BAP、KT、GA₃ 及 PP₃₃₃ 配合进行了次生胚状体的诱导。结果表明 (表 3), 虽然 2,4-D 在诱导培养基中占主导地位, 但加入其它激素对胚状体的诱导频率及植株再生产生很大的影响。2,4-D 与 BAP 及 KT 配合, 外植体上愈伤组织生长旺盛, 胚状体产生数量极少, 胚状体表面出现一层海绵状愈伤组织。2,4-D 与 GA₃ 及 PP₃₃₃ 配合对胚状体的诱导较单独用 2,4-D 时稍差, 但对植株再生有显著的促进作用。2,4-D 与 PP₃₃₃(0.1 mg/L) 配合使用时, 植株再生频率由对照的 38.5% 提高到 77.6%, 提高 1 倍, 植株再生数量接近对照的 2 倍。进一步的实验采用 2,4-D 6 mg/L 与不同浓度的 PP₃₃₃ 配比的结果表明: 随着 PP₃₃₃ 浓度由低到高时, 次生胚状体的诱导频率及植株再生频率均下降 (表 4)。

3 讨论

在次生胚状体的诱导中, 作为外植体的胚状体, 其发育的程度对次生胚状体的诱导频率的影响很大, Raemakers 等^[3] 研究表明成熟胚状体较其前期的胚状体作为外植体形成的次生胚状体的数量多。本实验结果表明, 固体成熟培养较液体成熟培养, 其胚状体生长快, 在较短时间内能达到成熟, 而液

表 2 不同碳源对木薯次生胚状体发生及植株再生的影响

Table 2 Influence of carbon sources on cassava secondary embryogenesis and plant regeneration

碳源 Carbon sources	浓度 Concentration g/L	成熟胚状体 数/外植体 No. of maturation embryos / explant	再生率 Regeneration frequency (%)	再生植株数 / 外植体 No. of plants regenerated / initial embryo
蔗糖 (Cucose)	20	30.3	38.5	11.6
	40	20.4	24.3	5
麦芽糖 (Maltose)	20	25.5	56.8	14.3
	40	32.5	74.3	24.1
葡萄糖 (Glucose)	20	10.5	27.9	2.9
	40	8.3	19.7	1.6
乳糖 (Lactose)	20	8.3	41.4	3.4

20 maturation embryos were used as explants for each treatment

表 3 不同激素对比对木薯次生胚状体发生及植株再生的影响

Table 3 Influence of different combinations of growth regulators on secondary embryogenesis and plant regeneration in cassava

处理 Treatment (mg/L)	成熟胚状体 数/外植体 No. of embryos / explant	植株再生率 Plant regeneration frequency (%)	再生植株数/外植体 No. of plants regenerated / explant
2,4-D+BAP 2.0	0.6	0	0
2,4-D+KT 2.0	1.4	0	0
2,4-D+GA ₃ 0.5	25.3	54.8	13.9
2,4-D+PP ₃₃₃ 0.1	27.6	77.6	21.4
2,4-D(对照)	30.3	38.5	11.5

20 maturation embryos were used as explants for each treatment.
2,4-D concentration 6 mg/L

表 4 不同浓度的 PP₃₃₃ 与 2,4-D 结合对木薯次生胚状体发生及植株再生的影响

Table 4 Influence of 2,4-D and different concentrations of PP₃₃₃ on secondary embryogenesis and plant regeneration in cassava

处理 Treatment (mg/L)	成熟胚状体 数/外植体 No. of embryos / explant	植株再生率 Plant regeneration frequency (%)	再生植株数/外植体 No. of plants regenerated / explant
2,4-D PP ₃₃₃ 0.0	30.3	38.5	11.5
2,4-D PP ₃₃₃ 0.1	28.3	74.3	21.4
2,4-D PP ₃₃₃ 0.2	21.2	71.2	18.3
2,4-D PP ₃₃₃ 0.5	7.8	46.7	6.7
2,4-D PP ₃₃₃ 1.0	6.4	29.0	3.2

20 maturation embryos were used as explants for each treatment.
2,4-D concentration 6 mg/L

体培养则相对较差。其原因可能是固体培养中极性固定, 透气及光照好, 使得胚状体生长较快。

碳源在植物组织培养中起着非常重要的作用, 它们既可提供植物细胞生长的能量, 又可作为渗透调节剂。不同的糖类由于其特性而影响组培的效果。木薯的组培中主要是以蔗糖作为碳源。事实上, 其它的碳源如麦芽糖、葡萄糖、乳糖等在一些植物的组培上效果也很好^[9~11]。本实验结果也表明麦芽糖比蔗糖在木薯体细胞胚状体诱导及植株再生中更有效。

不同激素配合使用是常用的改善组培系统的方法之一。在木薯的胚状体诱导中常用的是2,4-D或picloram, 用NAA诱导次生胚状体。然而在许多其它植物的组培过程中发现, 生长素与细胞分裂素及其它激素一起使用能起到较好的效果。本实验采用2,4-D配合PP₃₃₃使得植株再生频率及数量都得到显著的提高, 由单独用2,4-D时的38.5%和11.5%增加到77.6%和21.4%。PP₃₃₃是一种植物生长的阻滞剂, 生产上常用于使植物生长呈矮壮形。我们以2,4-D和PP₃₃₃配合在胚状体的诱导上作用不大, 却显著提高了植株再生数量。鉴于目前使用PP₃₃₃提高植株再生的研究较少, 对其机理需进一步研究。

在双子叶植物中, 由胚状体的诱导到植株再生需经过球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚、胚状体的成熟及萌发各阶段。由于体细胞胚在早期发育过程中表现出形态的可塑性及多样性^[12], 即使非正常胚状体也不会妨碍其后续发育^[13], 以至许多研究都侧重于如何增加成熟胚状体的产量, 促进胚状体的萌发, 而没有充分注意到胚状体早期发育对最终植株再生的影响。在木薯的组培中也是如此。本文的结果表明在木薯的组培中改善早期胚状体诱导有助于植株再生。

参考文献:

- (1) Stamp J A, Henshaw G G. Somatic embryogenesis in cassava [J]. *Z Pflanzenphys*, 1982, 105: 183 ~ 187
- (2) Szabados L, Hoyos R, Roca W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava [J]. *Plant Cell Rep*, 1987, 6: 248 ~ 251
- (3) Raemakers C J J M, Amati M, Staritsky G *et al*. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. *Ann Bot*, 1993, 71: 289 ~ 94
- (4) Sudarnonowati E, Bachtiar A S. Induction of somatic embryogenesis in Indonesian cassava genotypes [Z]. In Cassava Biotechnology Network Proceedings of the 2nd International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia, CIAT working document, 1995, 150: 324 ~ 335
- (5) Stamp J A, Henshaw G G. Somatic embryogenesis from clonal leaf tissues of cassava [J]. *Ann Bot*, 1987a, 59: 445 ~ 450
- (6) Stamp J A, Henshaw G G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1987b, 10: 227 ~ 233
- (7) Taylor N J, Edwards M, Kiernan R J, *et al*. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Nature Biotechnol*, 1996, 14: 726 ~ 730
- (8) Mathews H, Schopke C, Carcamo R *et al*. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 328 ~ 333
- (9) Strickland S G, Nichol J M, McCall C M *et al*. Effects of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis [J]. *Plant sci*, 1987, 48: 113 ~ 121
- (10) Redenbaugh K, Viss P, Slade D *et al*. Artificial seeds [C]. In Green CE, Somer DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds). *Plant Tissue and Cell Culture*, 1987, 474 ~ 493
- (11) Thorpe T A. *In vitro* somatic embryogenesis [J]. *ISI Atlas Sci: Animal Plant Sci*, 1988, 1: 81 ~ 102
- (12) Last D I, Brettell R I S. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium [J]. *Plant Cell Rep*, 9: 14 ~ 16
- (13) Buchheim J A, Colburn S M, Ranch J P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth [J]. *Plant Physiol*, 1989, 89: 768 ~ 773