

# 香蕉(*Musa spp.*)的体外植株再生及外源基因转移\*

高东微 黄霞 黄学林

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

广义上的香蕉(*Musa spp.*)属于芭蕉科芭蕉属<sup>[3]</sup>。所有的食用香蕉即芭蕉属的栽培种,除不重要的斐济香蕉外,都是由原始野生种阿加蕉(*Musa acuminata*,即尖叶蕉,染色体组 AA)和伦阿蕉(*Musa balbisiana*,即长梗蕉,染色体组 BB)自交或杂交后代进化而来<sup>[3]</sup>。最简单和主要的分类是香蕉(banana 或 dessert banana, AA 和 AAA)和芭蕉(plantain 或 cooking banana, AAB 和 ABB),此外还有 3 种(AB, BB, ABBB)少量栽培和 3 种(AAAA, AAAB, AABB)只见于实验室条件下人工合成<sup>[4]</sup>。盛产于我国华南地区的优良蕉种多为 AAA 和 ABB 型。

香蕉(banana)和芭蕉(plantain)是世界第一大宗水果,世界年产量达 7,600 万吨<sup>[17]</sup>,具有重要的经济价值。其中,香蕉(banana)含糖量较高多为鲜食,芭蕉(plantain)淀粉含量较高也可煮食,并且是某些赤道国家主食之一<sup>[3]</sup>。此外,香蕉(*Musa spp.*)还可用于酿酒、入药等<sup>[4]</sup>。然而,栽培蕉极易受各种病毒、微生物、害虫侵害,如由病毒引起的束顶病(bunchy top)、由镰刀菌引起的巴拿马病(Fusarial wilt 或 Panama disease)和线虫、象鼻虫等的侵害,因此以往的栽培蕉生产常常遭到巨大损失<sup>[15]</sup>。为了降低成本、提高产量和质量,生产实践中人们急需各种抗病、优质的新品种,以对传统的栽培和育种进行全面的改革。但是,栽培香蕉(*Musa spp.*)多为单性 3 倍体(AAA, AAB, ABB),具高度不育性,传统的育种方法难于改良这些香蕉品种,而利用基因工程可望解决上述问题。例如将香蕉花叶病毒外壳蛋白基因转入香蕉中,可望提高其抗该病能力;将某些抗冻蛋白质和脂肪酸合成酶基因转入香蕉中,可望提高其抗冻能力;将

ACC 合成酶的反义基因转入香蕉,可望控制香蕉的成熟和保鲜,提高香蕉的耐运输性。然而,这些新技术能否在改良香蕉上成功利用,首先决定于能否建立适合基因转化及其植株再生的有效体系。为此,在盛产香蕉的国家和地区,对于上述目的的研究极为重视,投入了大量资金,国际粮农组织(FAO)及世界银行等组织还专门设立了国际香蕉改良项目(Banana Improvement Project, BIP)及其网络(INIBAP)。下文将对近年来这方面的进展作一综述。

## 一、香蕉的植株再生体系

植株再生主要分为两个类型:器官发生途径和体细胞胚发生途径,其理论依据就是植物细胞的全能性<sup>[16,19]</sup>。传统的香蕉无性繁殖使用吸芽或球茎小块为种植材料,繁殖速度慢且易感染病虫害。自 1974 年 Berg 和 Bustamante 首先应用试管培养分生组织大规模生产、繁殖组培苗以来,世界各生产国已基本上运用此技术进行栽培蕉的工业化生产<sup>[4]</sup>。80 年代至今,栽培蕉通过器官发生途径再生植株已取得了多方面的成功。

在器官发生途径中,无论是直接器官发生还是间接器官发生,外植体为吸芽、球茎尖端分生组织、基生叶叶鞘分生组织和幼嫩的花序等<sup>[2,4,12]</sup>,通过或不通过愈伤组织阶段进行组织分化和器官发生并最终形成再生小植株。以这种方式形成的小植株为多细胞起源,由外植体或愈伤组织中的多个细胞同时向不同发育方向发展形成各种组织器官。

\*广州市高科技资助项目。

目前在全世界范围内进入工业化生产阶段的香蕉植株再生均通过直接器官发生方式进行<sup>[4]</sup>。培养步骤主要分为两个阶段:一是外植体接入含细胞分裂素类物质的培养基中培养,这一时期外植体大量发生不定芽,配合使用较低浓度生长素类物质可促芽壮大,但生长素浓度过高会减少出芽数目;二是增殖芽转入含有生长素的低离子浓度培养基中促不定根的形成。这样就得到具有芽、根分化的再生小植株。

此外,凌定厚等人报道以香蕉(*Musa acuminata*, AA)和芭蕉(*Musa paradisiaca*, ABB)座果后的顶端花序轴幼嫩部分为外植体直接诱导出芽和形成再生小植株<sup>[2]</sup>。诱导产生的芽来自花序上的小花花器。

与此同时也有许多通过间接器官发生途径再生植株的报道。此时,外植体经过一系列培养脱分化形成愈伤组织,并由愈伤组织再分化形成芽和根,从而产生完整再生小植株。

外植体选择范围很广,可以是营养器官或生殖器官。Jarret 等人、Bakry 等人及 Harran 分别报道了以不同组织、器官为外植体诱导愈伤组织形成并由有器官发生能力的愈伤组织分化出根和芽的成功例子<sup>[5,9,10]</sup>。外植体包括未成熟的合子胚、茎尖分生组织、叶鞘分生组织。据他们观察,由外植体诱导产生的愈伤组织分为两类:一是硬而致密、有结的、有或无器官发生能力的愈伤组织;另一类是疏松易碎的胚性愈伤组织。后者可用于建立细胞悬浮系统。凌定厚等人也用果用香蕉花序轴为外植体诱导出愈伤组织并形成完整小植株<sup>[2]</sup>。

另一常见的香蕉植株再生类型为体细胞胚发生途径。真正在果用香蕉(banana)上获得成功最早见于1989年<sup>[13]</sup>。因此,由体胚发生途径再生香蕉(*Musa spp.*)植株目前仍有许多问题值得深入研究。

80年代中期多位学者报道了取材于花序轴等多种外植体诱导形成类似体胚形态的球形愈伤组织团,但未在其上观察到芽的形成<sup>[6,10,13]</sup>。Cronauer-Mitra 等人 and Escalant 等人分别将结实的二倍体香蕉(*Musa ornata* 等)

的未成熟合子胚进行培养,得到胚性愈伤组织,并由悬浮培养的愈伤组织细胞得到体胚和再生植株<sup>[8]</sup>。然而,对于多数栽培蕉来说,它们不能形成合子胚而是进行无性繁殖,因此以合子胚为外植体的体胚发生方法缺乏广泛的应用前景。Novak 等人首次成功地获得四种食用(banana and plantain)香蕉品种的体胚及由体胚发育而来的小植株<sup>[13]</sup>。他们以基生叶叶鞘及根状茎分生组织为外植体,获得的体胚来自胚性愈伤组织悬浮培养细胞,并且悬浮培养诱导的体胚只有在转入一种双层培养基中才继续发育并转变为再生小植株。该双层培养基由含玉米素的底层固体培养基及无激素的上层液体培养基构成。他们证实了外加生长素类似物质 Dicamba 可较好地获得“前胚性愈伤组织(pre-embryogenic callus)”。此后,陆续有学者报道用增殖中的分生组织及雄花序等为外植体通过悬浮培养胚性愈伤组织诱导出体胚<sup>[2,7,8]</sup>。从各类报道中可知,胚性细胞可直接由外植体发生,而更为常见的是经“前胚性愈伤组织”发生。

胚性细胞具有发育为体胚的能力,一个胚性细胞相当于一个潜在的体胚。因此如何使胚性细胞维持和增殖关系到体胚和再生植株的产量。在香蕉(*Musa spp.*)体系中,近年来发展出一套通过细胞悬浮培养维持胚性细胞和通过原生质体培养增殖胚性细胞的方法。此阶段细胞分裂素是必需的,猜测该类激素可能与胚性的获得和维持有密切关系。特别值得一提的是原生质体培养,经细胞壁重新形成和持续细胞分裂形成大量胚性细胞团,具有高产的优点,而且可避免因直接由愈伤组织细胞形成体胚时可能发生的无性系变异<sup>[15]</sup>。有学者从二倍体香蕉(AA)的合子胚得到胚性愈伤组织,并把胚性愈伤组织悬浮培养得到的胚性细胞原生质体培养,得到大量胚性细胞团,从而达到了胚性细胞扩增的目的<sup>[12]</sup>。Bart Panis 等人以芭蕉品种 bluggoe(ABB)茎尖分生组织为外植体,利用原生质体培养技术在半固体培养基上诱导出体胚<sup>[16]</sup>。所有这些有关原生质体培养的报道,均采用半固体培养基以防止原生质体集聚、遗传

物质传递及嵌合体形成。为保证存活及生长正常,还应使用看护培养或原生质体初始密度不低于 $10^6$ 个/ml。

各类报道表明,细胞转变为体胚的过程中不应使用单纯的液体或固体培养基,否则体胚两极或两极中的一极发育不全。该过程应该在具有一定流动性而又保持一定固着力的培养基上进行,如上述半固体培养基、双层培养基或含液体培养基的滤纸棉花床<sup>[1]</sup>。

由此可见,在香蕉(*Musa spp.*)植株再生系统中,只有极少数例子是不通过愈伤组织直接再生为小植株的,多数报道均经历愈伤组织阶段,随后既可由器官发生途径生芽、生根,也可转入体胚发生途径并利用细胞悬浮培养和原生质体培养技术得到单细胞起源的小植株。因此,如何获得具有形态发生能力的愈伤组织在香蕉(*Musa spp.*)植株再生体系中显得非常重要。多数报道采用营养或生殖器官的分生组织为外植体,以外植体块的形式诱导直接器官发生或愈伤组织形成。能否以这种方法为基础建立一个高效、可靠、稳定的植株再生系统,不仅与外植体部位和年龄、培养基成分、培养环境(包括光、温等)、培养方式(如细胞悬浮培养和原生质体培养)等因素有关,而且往往与该外植体的基因型有密切关系。取得成功的报道多以AAB或ABB型的栽培品种为外植体。然而,恰恰属于AAA型的果用香蕉,无论是在生产上还是在科学研究上,都更加急需建立一套完善的植株再生体系。AAA型香蕉的适合于基因转化的植株再生体系一直是香蕉(*Musa spp.*)植株再生体系研究中的空白。最近以薄层培养技术为基础的植株再生系统的首例报道<sup>[14]</sup>使人耳目一新。与以前的报道最大的区别就是该系统能广泛适用于各种基因型的栽培蕉,甚至在AAA型品种中获得了优于AAB和ABB品种的器官发生和体胚发生能力。

从目前的报道来看,通过薄层培养再生植株是值得深入研究的。与细胞悬浮培养及原生质体培养相比,它具有简便易操作、成本低、效率高的特点,而且薄层培养得到的愈伤组织极

易获得胚性。

## 二、外源基因转移

目前在高等植物中已广泛运用的转基因方法主要有两种:一是基因枪法,运用表面吸附了外源基因的电加速粒子轰击植物原生质体,从而直接将外源基因转入;二是农杆菌法,利用携带了重组质粒的农杆菌侵染植物伤口,从而把外源基因整合到植物染色体上。前者成本高、操作难,但在多种单、双子叶植物中都取得成功;后者简便易行,却大多适用于双子叶植物。目前,适合于基因转化的香蕉(*Musa spp.*)植株再生体系,特别是适用于果用香蕉的成功报道极为有限,直到1994年有关栽培香蕉基因转移的报道才首次出现<sup>[18]</sup>。该报道以ABB型栽培种的茎尖分生组织为外植体,以胚性悬浮细胞的原生质体为材料,运用基因枪法导入带有gus基因的质粒并在原生质体中检测到gus基因的瞬时表达。随后,香蕉(*Musa spp.*)的转基因研究取得了新的进展。两个不同的实验室分别同时报道了不同的转基因方法<sup>[6,11]</sup>。Laslo Sagi等人报道以胚性悬浮细胞为基础的基因枪法。他们的贡献主要为两点:一是同时在AAA型、AAB型和ABB型栽培种上得到报道基因的表达,二是创立了以基因枪直接轰击胚性悬浮细胞导入DNA的方法并成功地获得单一转基因悬浮细胞起源的转基因植株。其重要意义在于:单细胞起源可避免嵌合体的形成。多细胞起源的植株,来自转基因细胞的部位表现出转基因特性,而来自非转基因细胞的部分则否,从而该植株只能部分地获得转基因特性而表现出嵌合现象。另一个实验室与此同时发表了以农杆菌为介导结合基因枪技术的转基因方法。其特点是先用不带有DNA的微粒轰击外植体致伤,随后用农杆菌感染;优点是不需经细胞悬浮培养、原生质体培养等步骤,直接以外植体块为转基因材料,简便快速;缺点是得到的转基因再生植株为多细胞起源,有出现嵌合体的可能。

转基因香蕉的研究必须依赖于可靠、高效

的植株再生体系;而日益丰富多样的香蕉(*Musa spp.*)植株再生体系只有和基因工程技术配合才具有广泛的实用价值。二者的结合,将彻底改变香蕉栽培的历史。虽然目前的研究尚局限于为数不多的几个栽培品种,而且转入的基因也仅限于各类报道基因,但是其包括的基因类型及报道基因的成功表达已经为人们展现了两者的广阔前景。香蕉(*Musa spp.*)的基因改造,包括各种抗病虫害和影响果质、风味的目的基因的导入,将会简化育种手段,极大地缩短育种时间,从而促使香蕉(*Musa spp.*)品质的日益优化和多样化。1996年4月7日法新社报道的以色列培育成功苹果风味的香蕉就是一个很好的例子。

### 摘 要

本文综述了香蕉(*Musa spp.*)体外植株再生的各种方式,着重讨论了近几年发展起来的用于食用(果用及煮食)香蕉的几种适用于基因转化的高效植株再生系统。

### 参 考 文 献

- [1] 何佳幸等, 1991, *Chinese Biochem. Society*, 20(1):9-20.  
 [2] 凌定厚等, 1990, *植物学报*, 32(12):966-968.  
 [3] Samson J. A. 著, 林伯达等译, 1984, 热带果树, 福建科学技术出版社.  
 [4] 许林兵, 1992, 香蕉生产技术, 中山大学出版

社.

- [5] Bakry F. and Rossignol L., 1985, *Fruits*, 40:697-708.  
 [6] Banerjee N., Schoofs J., Hollevoet S., Dumortier F. and Langhe De E., 1987, *Acta Hort.*, 212:727-729.  
 [7] Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D. and Langhe De E., 1991, *Fruits*, 46:125-135.  
 [8] Escalant J. V. and Teisson C., 1989, *Plant Cell Report*, 7:665-668.  
 [9] Harran S., 1991, Thesis Doc. Sci., Univ. Paris Sud., pp. 119.  
 [10] Jarret R. L. Fisher J. B. and Litz R. E., 1985, *J. Plant Physiol.*, 121:123-130.  
 [11] May G. D., Afza R., Mason H. S., Wiecko A., Novak F. J. and Arntzen C. J., 1995, *Bio Technology*, 13:486-492.  
 [12] Megia R., Haicour R., Rossignol L. and Si-hachakr D., 1992, *Plant Science*, 85:91-98.  
 [13] Novak F. J., Afza R., Duren Van M., Perea-Dallos M., Conger B. V. and Tang Xiaolang, 1989, *Bio Technology*, 7:154-159.  
 [14] Okole B. N. and Schulz F. A., 1996, *Plant Science*, 116:185-195.  
 [15] Panis B., Warwe Van A. and Swennen R., 1993, *Plant Cell Reports*, 12:403-407.  
 [16] Reinert J., 1959, *Planta*, 53:318-333.  
 [17] Sagi L., Panis B., Remy S., Schoofs H., Smet De K., Swennen R. and Cammue B. P. A., 1995, *Bio Technology*, 13:481-485.  
 [18] Sagi L., Remy S., Panis B., Swennen R. and Velekaert G., 1994, *Plant Cell Reports*, 13:262-266.  
 [19] Steward F. C., 1958, *Am. J. Bot.*, 45:705-708.

### 研究工作

## 凋亡而不出现 DNA 梯形带一例\*

胡庆柳 丁振华 谭小华

(第一军医大学基础部放射医学教研室 南方医院消化科 广州 510515)

凋亡在形态上和分子机制上与坏死有明显的区别<sup>[1]</sup>。凋亡是一个主动的、内在的、可控的现象,可以在生理和某些病理条件下发生。相反,坏死是一种自然的退变,总是在严重损伤的

情况下发生。两种细胞死亡在 DNA 断裂的方式上也表现出不同;许多报道认为细胞凋亡时

\*国家自然科学基金资助项目(No. 39670192)。