

## 几种生长素对木薯体细胞胚发生和植株再生的作用

马国华 许秋生 羨蕴兰

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 嫩叶外植体在含 2,4-D ( $1-16 \text{ mg L}^{-1}$ ) 或 NAA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) 的诱导培养基上能直接诱导初生体细胞胚胎发生, 而低活性的生长素 IBA 或 IAA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) 或低浓度的 2,4-D ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) 则不能。而以木薯初生体细胞胚切段为外植体时, 次生体细胞胚的诱导对生长素的活性或浓度的要求降低。降低生长素浓度或活性能缩短体细胞胚诱导时间并促进根的形成, 有利于提高体细胞胚的再生频率。体细胞胚外植体在诱导培养基上的培养时间对下一步体细胞胚胎发生的诱导产生影响。通过石腊切片观察, 在含 2,4-D 诱导培养基上, 木薯体细胞胚不能形成芽分生组织。结果表明, 2,4-D 等生长素类物质对诱导木薯体细胞胚胎发生是关键因子, 但对体细胞胚的进一步发育和植株再生起抑制作用。

**关键词** 木薯; 生长素; 体细胞胚胎发生; 植株再生

**中图分类号** S533.0353

## EFFECTS OF SEVERAL AUXINS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN CASSAVA

Ma Guohua Xu Qiusheng Xian Yunlan

(South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650)

**Abstract** Primary somatic embryogenesis could be directly induced from immature leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) on the MS solidified medium supplemented with higher concentration of 2,4-D ( $1-16 \text{ mg L}^{-1}$ ) or NAA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ), but IBA and IAA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) could not induce it. When the somatic embryo fragments were used as explants, the need of auxin activity and concentration for the induction of secondary somatic embryogenesis decreased. The decrease of the concentration or activity of the auxins in the induction media could enhance somatic embryogenesis and root formation, and result in the increase of plant regeneration frequency. It was observed that somatic embryos could not develop shoot meristem on the induction medium containing  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D. The experiments showed that the auxins stimulated the induction of cassava somatic embryogenesis but inhibited the development of somatic embryos and decrease plant regeneration in cassava.

**Key words** *Manihot esculenta*; Auxins; Somatic embryogenesis; Plant regeneration

广东省自然科学基金项目资助

1997-11-26 收稿; 1998-06-09 修回

木薯为世界第六大粮食作物。它不仅是世界上发展中国家或地区五亿人口的主粮,而且是重要的饲料和化工原料。在华南地区,目前每年有大约  $4 \times 10^7$   $\text{hm}^2$  的种植面积。由于木薯主要分布于地处热带的发展中国家或地区,有关其生物技术的研究相对比较落后,直到最近几年才在世界范围内引起重视。木薯生物技术的发展需要建立一整套有效的遗传转化体系和植株再生体系。木薯体细胞胚胎发生是其最主要的植株再生途径,体细胞胚的植株再生至今仍然是一个限制因素。高活性的生长素(如 2,4-D 等),由它们诱导的初生或次生体细胞胚,其植株再生非常困难<sup>[1-4]</sup>。已有报道利用干燥法等能够提高木薯体细胞胚的再生频率<sup>[5]</sup>,但这些方法也存在局限性,其效果很不稳定,并在体细胞胚发育的大部分阶段没有效果。我们试验了几种不同活性的生长素如 2,4-D、NAA、IBA 和 IAA 对诱导木薯初生和次生体细胞胚胎发生及其植株再生的作用,并提出了促进木薯体细胞胚胎发生和植株再生的有效方法。

## 1 材料和方法

以木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 品种南植 188 试管苗嫩叶为外植体,在分别含有  $0.1-16 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D、 $40 \text{ mg L}^{-1}$  NAA、 $40 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 和  $40 \text{ mg L}^{-1}$  IAA 的  $\text{MS}^{[6]}$  固体培养基上暗培养,20 d 后观察初生体细胞胚的诱导情况。以  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 诱导的初生体细胞胚为外植体,将其横切成  $1-2 \text{ mm}$  的片段,在含  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 的诱导培养基上循环诱导次生体细胞胚胎发生。每隔 30 d 继代一次。

以通过循环诱导培养的木薯体细胞胚切段为外植体分别接种于新的诱导培养基上,以诱导次生体细胞胚胎发生。新的诱导培养基分别含有  $0.1-16.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D、 $1-40 \text{ mg L}^{-1}$  NAA、 $1-40 \text{ mg L}^{-1}$  IBA 和  $1-40 \text{ mg L}^{-1}$  IAA。同时将体细胞胚切段接种于分别含有  $10 \text{ mg L}^{-1}$  NAA、IBA 和 IAA 的诱导培养基上进行多次继代培养,继代间隔时间均为 20 d。体细胞胚外植体在诱导培养基上分别培养 20 d 后,将新诱导的体细胞胚转移到再生培养基(含  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  BA 和  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  NAA) 上培养并观察芽的形成。两个月后将芽转移到不含任何生长调节剂的  $\text{MS}_0$  培养基上以诱导生根。

体细胞胚切段在含  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 的诱导培养基上分别培养 20,30,40,50 和 60 d 以及在  $10 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 的诱导培养基上分别培养 15,20,30,40,50 和 60 d 后,将所诱导的体细胞胚横切成  $1-2 \text{ mm}$  大小的切段转移到相对应的诱导培养基上培养,以诱导次生体细胞胚胎发生。观察其体细胞胚胎发生频率。

为观察木薯体细胞胚的发育,木薯次生体细胞胚切段外植体在含  $4 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D 的诱导培养基上分别培养 20、40 d 后,用纳瓦兴溶液固定,同时将体细胞胚转移到再生培养基上培养 10 d,也用纳瓦兴溶液固定,按李正理方法<sup>[7]</sup>作石蜡切片。

## 2 实验结果

### 2.1 初生体细胞胚胎发生的诱导及植株再生

木薯嫩叶在不同的诱导培养基上表现出不同的结果,在含 2,4-D( $1-16 \text{ mg L}^{-1}$ ) 的诱导培养基上,嫩叶外植体在培养 3-5 d 后,逐渐膨大而脱分化成松散型的愈伤组织,在培养 15-

20 d 后, 在愈伤组织表面形成球型或鱼雷型的初生体细胞胚(图版 I:A), 极少有根的形成; 在含 NAA(40 mg L<sup>-1</sup>)的诱导培养基上, 培养9-13 d 后可形成鱼雷型或子叶型的初生体细胞胚, 并经常伴有芽和根的形成。

从表 1 看出, 2,4-D 的浓度越高(4-16 mg L<sup>-1</sup>), 越有利于提高初生体细胞胚的诱导频率。这一结论同 Szabados 一致<sup>[8]</sup>。2,4-D 浓度太低(0.1 mg L<sup>-1</sup>), 不能诱导初生体细胞胚的形成; 对于活性较低的 IBA 和 IAA, 尽管其浓度较高(40 mg L<sup>-1</sup>), 仍然不能成功诱导木薯初生体细胞胚胎发生。

表 1 不同生长素对木薯初生体细胞胚的诱导及植株再生的作用  
Table 1 Effects of auxins on the induction of primary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

生长素浓度 Auxins (mg L <sup>-1</sup> )	发生频率 (%) Induction rate	生根率 (%) Rooting percentage	植株再生频率 (%) Plant regeneration
2,4-D 0.1	0	97.1	0
2,4-D 1.0	8.4	87.6	8.7
2,4-D 4.0	27.3	2.8	4.1
2,4-D 16.0	31.6	0	1.7
NAA 40	33.4	57.5	48.2
IBA 40	0	100	NT
IAA 40	0	38.9	NT

每项数据所用的外植体数为 70-100, 试验重复两次, NT= 未试验

Data are the mean from two replications of each experiment using 70-100 explants. NT=Not tested.

## 2.2 体细胞胚外植体诱导体细胞胚胎发生和植株再生

以木薯体细胞胚为外植体, 生长素 NAA、IBA 和 IAA 的浓度在 1-40 mg L<sup>-1</sup> 范围内, 均能诱导体细胞胚胎发生和根的形成。并随着生长素浓度的增加, 体细胞胚胎发生频率有逐渐增加的趋势, 而根的诱导频率有逐渐减少的趋势。低浓度(0.1-1.0 mg L<sup>-1</sup>)的 2,4-D 也能诱导体细胞胚胎发生和根的形成。但当 2,4-D 浓度增加到 4-16 mg L<sup>-1</sup>时, 不能诱导根的形成(图 1)。

NAA、IBA 和 IAA 诱导体细胞胚较快, 在培养 8-10 d 后就能见到体细胞胚和根的形成; 而 2,4-D 所诱导体细胞胚相对较慢。随着 2,4-D 浓度的增加, 体细胞胚形成逐渐推迟。NAA、IBA 和 IAA 所诱导的体细胞胚数量比 2,4-D 所诱导的少(表 2)。

在诱导培养基上培养 15 d 后观察, NAA、IBA 和 IAA 所诱导的体细胞胚的类型主要为二极型, 胚的大小相对较大(图版 I:D); 低浓度的 2,4-D(0.1-1.0 mg L<sup>-1</sup>) 也能诱导二极型的体胚。但高浓度的 2,4-D(4-16 mg L<sup>-1</sup>) 只能诱导球型或鱼雷型的体细胞胚(图版 I:B)。

在次生体细胞胚胎发生过程中, NAA、IBA 和 IAA 所诱导的愈伤组织比 2,4-D 少, 高浓度的生长素有利于愈伤组织的形成。

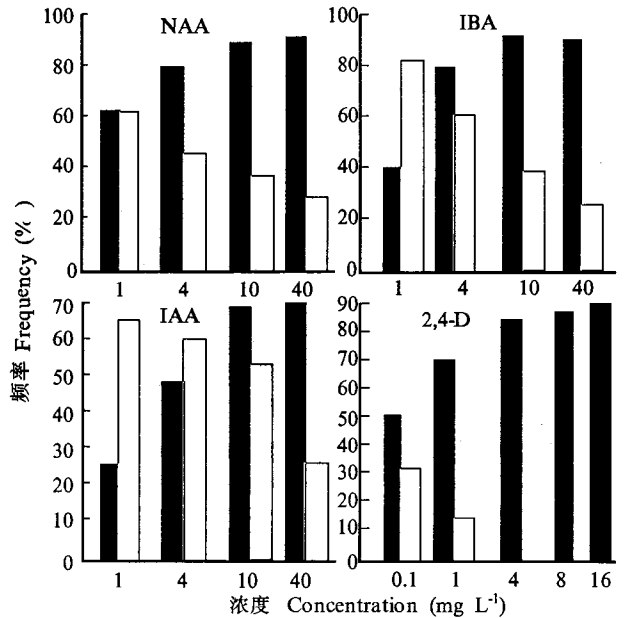


图 1 不同生长素浓度对木薯次生体细胞胚胎发生及生根的影响

Fig. 1 Effects of auxins on the induction of somatic embryogenesis and root formation from somatic embryo fragments of cassava

■ 体细胞胚发生 Somatic embryogenesis  
□ 生根 Root formation

由 NAA、IBA 和 IAA 诱导的体细胞胚的植株再生频率较高(表 2)，太高浓度的 2,4-D (16 mg L<sup>-1</sup>) 所诱导的体细胞胚不能萌发或植株再生。

表 2 生长素类型及其浓度对木薯次生体细胞胚胎发生及其植株再生的作用

Table 2 Effects of auxins with different concentrations on the induction of secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava

生长素浓度 Auxins (mg L <sup>-1</sup> )	体细胞胚出现天数 Days for appearance of visible somatic embryos	培养 20 d 后体 细胞胚大小 (mm) Embryo size after 20 days of culture	每个外植体诱导 的体细胞胚数 No. of somatic embryo per explant	植株再生率 Plant regeneration (%)
IBA 10	8-10	7.1	8.4	26.1
NAA 10	8-10	6.9	7.6	23.4
IAA 10	8-10	7.3	3.1	17.3
2,4-D 0.1	9-11	6.5	8.7	8.9
2,4-D 1.0	11-13	5.5	12.4	4.7
2,4-D 4.0	14-16	4.2	16.9	2.1
2,4-D 8.0	17-20	2.1	18.2	0.8
2,4-D 16	19-23	1.1	15.5	0

每项数据所用的外植体数为 70-100，试验重复两次。

Data are the mean from two replications of each experiment using 70-100 explants.

表 3 继代培养次数对木薯次生体细胞胚胎发生频率(%)的影响

Table 3 Effect of subculture times on the induction frequency (%) of cassava secondary somatic embryogenesis

生长素 Auxins (mg L <sup>-1</sup> )	继代培养次数 Subculture times				
	1	2	3	4	5
2,4-D 4	88.4	91.2	86.1	85.3	93.8
NAA 10	91.3	86.2	84.6	88.5	93.5
IBA 10	91.9	66.6	78.5	87.8	85.2
IAA 10	81.3	78.2	61.3	54.5	43.1

### 2.3 体细胞胚培养时间和继代培养

以木薯体细胞胚切段为外植体在诱导培养基上培养时间越长，下一步的体细胞胚胎发生的频率却越低。其中 NAA 比 2,4-D 下降得更快(图 2)。

2,4-D、NAA 和 IBA 均可通过多次的继代培养循环诱导次生体细胞胚胎发生(表 3)，体细胞胚胎发生频率保持在 70% - 90% 之间。至于 IAA，它所诱导的体细胞胚很少，并随着继代次数的增加，体细胞胚胎发生频率逐渐降低，不能达到长期继代繁殖的目的。

### 2.4 切片观察

通过石蜡切片观察，在含 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 诱导培养基上培养 20 d 的球状次生体细胞胚不能形成芽的分生组织(图版 I:C)，即使继续培养较长时间(40 d)，发育成两极型的体细胞胚也不能进一步发育形成突起状的芽分生组织(图版 I:E)。只有将体细胞胚转移到再生培养基上，胚才能进一步发育形成芽的分生组织(图版 I:F)，但这种频率也比较低，只达 4% 左右。

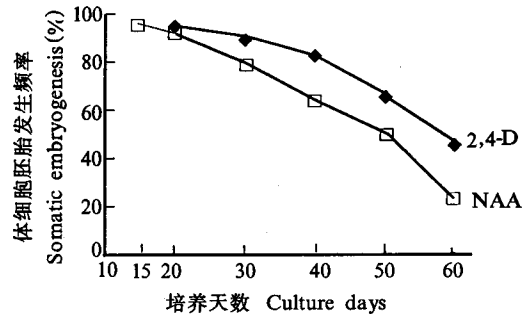


图 2 培养时间对木薯次生体细胞胚胎发生的影响

Fig. 2 Effect of culture time on the induction of secondary somatic embryogenesis of cassava

### 3 讨论

前人所有的研究表明, 生长素是诱导木薯初生或次生体细胞胚胎发生的唯一因子—目前尚无其它类型的激素或生长调节剂能够成功诱导木薯体细胞胚胎发生。木薯初生体细胞胚胎发生成功诱导均由较高活性的生长素如 2,4-D、毒秀定 (Picloram)、麦草畏 (Dicamba) 等来完成的, 最近作者还使用高浓度 NAA 首次成功诱导木薯初生体细胞胚和芽的器官发生<sup>[9]</sup>。NAA 同 2,4-D 比, 不仅能够缩短初生体细胞胚的诱导时间, 而且使初生体细胞胚的再生频率大大提高<sup>[2]</sup>。显然高浓度或高活性生长素对于诱导木薯初生体细胞胚胎发生是必须的。目前尚未见较低活性的生长素如 IBA 或 IAA 成功诱导初生体细胞胚胎发生的报道。但木薯次生体细胞胚的诱导则不同, 供试生长素在不同浓度下都能够诱导木薯次生体细胞胚胎发生。这表明木薯次生体细胞胚的诱导比初生体细胞胚的诱导容易得多, 它在生长素的类型和浓度方面的要求低得多。

木薯初生体细胞胚的诱导频率在不同基因型之间存在较大的差异性。至今尚有许多木薯品种不能成功诱导初生体细胞胚胎发生。但一旦成功诱导初生体细胞胚胎发生, 一般较容易以初生体细胞胚为外植体诱导次生体细胞胚胎发生。从我们的研究结果来看, 2,4-D、NAA 和 IBA 均能较高频率地循环诱导次生体细胞胚胎发生, 这将为木薯种质继代保存与繁殖奠定良好的基础。试验结果也表明, IAA 在木薯体细胞胚的诱导中是不理想的。

在木薯次生体细胞胚胎发生过程中, 木薯体细胞胚切段外植体在含生长素的诱导培养基上培养时间越长, 体细胞胚胎发生频率却越低, 这显然对提高木薯次生体细胞胚胎发生频率是不利的。然而在诱导培养基上培养时间越长, 所诱导的体细胞胚就越大, 这对体细胞胚的继代增殖是有利的。因此, 从提高木薯次生体细胞胚胎发生频率和体细胞胚继代增殖频率的双重因素来考虑, 2,4-D 所诱导的体细胞胚, 一般每隔 30—40 d 继代一次较为理想; 而对于 NAA, 每隔 15—25 d 继代一次较为理想。

Raemakers<sup>[10]</sup>曾描述了根的形成对木薯体细胞胚的正常发育和萌发的必要性。根据我们的实验结果, 提高诱导培养基中生长素的浓度或活性, 将有利于提高木薯初生或次生体细胞胚的诱导频率; 但另一方面, 它使木薯体细胞胚胎发生的诱导推迟或体细胞胚类型初级化, 并降低了根的形成和体细胞胚的植株再生频率。这对于胚的进一步发育和再生是不利的。通过石蜡切片观察, 在含 2,4-D 诱导培养基上, 所诱导的体细胞胚不能萌发, 而只有将体细胞胚转移到再生培养基上培养后, 体细胞胚上芽的分生组织才会进一步发育。显然生长素对体细胞胚上芽的分生组织的发育有抑制作用。因此, 在诱导木薯次生体细胞胚过程中, 通过适当降低生长素的浓度或活性, 将有利于减少生长素对体细胞胚发育的抑制作用并提高体细胞胚的再生频率。特别是在循环诱导木薯次生体细胞胚胎发生过程中, 通过使用较低活性的生长素如 NAA 和 IBA, 他们不仅能够诱导高频率的次生体细胞胚胎发生; 而且能够缩短木薯次生体细胞胚胎发生的诱导时间并提高体细胞胚的再生频率, 这对于改进木薯的再生体系和遗传转化体系都是有意义的。

### 参考文献

- 1 Konan N K, Sangwan R S, Sangwan B C. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava

- (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 37:91-102
- 2 Mathew H, Schopke C, Carcamo R et al. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Rep.* 1993, 12:328-333
  - 3 Taylor N J, Edwards M, Henshaw G G. Production of friable embryogenic calli and suspension cultures systems in two genotypes of cassava. In: *Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994. CIAT, Cali, Colombia. 1995, vol. I, 229-240
  - 4 Taylor N J, Henshaw G G. The induction of somatic embryogenesis in fifteen African and one South American cassava cultivars. In: *Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992, CIAT, Cali, Colombia, 1993, 134-139
  - 5 Schopke C, Chavarriaga P, Fauquet C et al. Cassava tissue culture and transformation: Improvement of culture media and the effect of different antibiotics on cassava. In: *Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*. Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992. CIAT, Cali, Colombia, 1993, 140-145
  - 6 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497
  - 7 李正理. 植物制片技术. 北京: 科学出版社, 1978
  - 8 Szabados L, Hoyos R, Roca W. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* 1987, 6:248-251
  - 9 马国华, 许秋生, 姜蕴兰. 从木薯嫩叶直接诱导体细胞胚胎发生和芽的形成. *植物学报*, 1998, 40(6):503-507
  - 10 Raemakers C J J M, Sofiari E, Kanju E et al. NAA-induced somatic embryogenesis in cassava. In: *Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network*, Bogor, Indonesia, 22-26 August 1994. CIAT, Cali, Colombia. 1995, Vol I, 355-363

## 图版说明

A. 在含 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>) 的诱导培养基上从木薯嫩叶诱导初生体细胞胚胎发生; B. 在含 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>) 的诱导培养基上木薯体细胞胚切段培养 25 d 后所诱导的次生体细胞胚; C. 在含 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>) 的诱导培养基上木薯体细胞胚外植体培养 20 d 后所诱导的球型体细胞胚; D. 在含 NAA (10 mg L<sup>-1</sup>) 的诱导培养基上木薯体细胞胚外植体培养 15 d 后所诱导的次生体细胞胚; E. 在含 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>) 的诱导培养基上木薯体细胞胚外植体培养 40 d 后所诱导的体细胞胚; F. 体细胞胚在再生培养基上的发育 (箭头示突起状的芽分生组织); G. 在再生培养基上培养一个月后, NAA 所诱导的体细胞胚萌发和芽的形成 (箭头示芽的形成); H. 芽在 MS<sub>0</sub> 培养基上培养形成根; I. 试管苗被转移到田间生长。

## Explanation of plate

- A. 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>)-induced primary somatic embryogenesis from immature leaves of cassava;
- B. 2,4-D (4 mg L<sup>-1</sup>)-induced secondary somatic embryogenesis from somatic embryo fragments after 25 days of culture on induction medium;
- C. Globular somatic embryos were induced from somatic embryo fragments after 20 days of culture on the induction medium containing 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D;
- D. NAA (10 mg L<sup>-1</sup>)-induced secondary somatic embryogenesis from somatic embryo fragments after 15 days of culture on induction medium;
- E. Somatic embryo induced from somatic embryo fragments after 40 days of culture on the induction medium containing 4 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D;
- F. Shoot tip meristem developed from somatic embryo on the regeneration medium (arrow shows the formation of shoot meristem);
- G. Germination and shoot development from NAA-induced secondary somatic embryos after one month of culture on regeneration medium (arrow shows the shoot formation);
- H. Rooting on MS<sub>0</sub> medium;
- I. Plantlet transplanting in the field.