

木薯再生体系建立的研究进展

文峰^{1,2}, 苏文潘¹, 黄建祺¹, 郑华¹, 俞奔驰¹, 付海天¹

(1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001; 2. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要 木薯是一种重要的粮食和工业原料作物。随着细胞工程和基因工程的发展, 生物技术育种要求一种高效的再生体系。从木薯的器官发生途径、体细胞胚发生途径、脆性胚性愈伤组织(FEC)再生和原生质体再生4个方面阐述了木薯再生体系的发展与建立, 以期为木薯组织培养和基于木薯再生体系的技术进步提供参考。

关键词 木薯; 器官发生; 体细胞胚发生; 脆性胚性愈伤组织(FEC); 原生质体; 再生

中图分类号 S533 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)08-0156-03

Research Progress of Establishment of Regeneration System in Cassava

WEN Feng^{1,2}, SU Wen-pan¹, HUANG Jian-qi¹ et al (1. Guangxi Institute of Subtropical Crops, Nanning, Guangxi 530001; 2. Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education), Wuhan, Hubei 430070)

Abstract Cassava is an important crop for food and industrial raw materials. With the development of cell engineering and gene engineering, highly efficient regeneration system is a prerequisite for biotechnology breeding. This review summarizes the development and establishment of regeneration of cassava, via organogenesis, somatic embryogenesis, friable embryogenic callus (FEC) and protoplast, hoping to provide some useful reference for the technical progress of tissue culture and regeneration system of cassava.

Key words Cassava; Organogenesis; Somatic embryogenesis; Friable embryogenic callus (FEC); Protoplast; Regeneration

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)别名树薯, 属于大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot*)多年生灌木, 常作为一年生作物栽培, 因其块根富含淀粉, 被誉为“淀粉之王”。木薯在热带、亚热带地区是重要的粮食作物, 还是生产淀粉、变性淀粉、酒精、葡萄糖等工业产品的重要原料, 被用于食品、化工、医药、纺织、造纸等多种行业, 其块根、嫩茎、枝叶也常用作饲料。

木薯遗传背景复杂, 具有基因型高度杂合、花粉育性低、种子萌发率低和有性子代性状严重分离^[1-2]的特性, 使其传统育种受到一定限制。生物技术育种是传统育种方法的一种补充手段。随着细胞工程和基因工程的发展, 生物技术育种要求一种高效的再生体系。木薯的组织培养技术起步较晚, 但在国际热带农业中心(International Center for Tropical Agriculture, CIAT)得到发展, 主要用于脱毒、无性繁殖、种质收集保存和种质交换。木薯种子显示了高度的基因多样性, 有性繁殖会导致基因严重分离, 因此作为无性繁殖作物, 从特定的组织再生植株显得尤为重要。木薯科研工作者也一直在朝着这个方向努力。目前, 木薯已经建立的再生体系主要有器官发生途径、体细胞胚发生途径、脆性胚性愈伤(FEC)再生和原生质体再生4种。笔者对木薯现有的4种再生体系发展与建立进行了总结与归纳, 以期为木薯组织培养和基于木薯再生体系的技术进步提供一些参考。

1 器官发生途径

1974年, Kartha等^[3]首次对木薯的顶端分生组织进行了培养, 获得5个品种的完整植株。1994年, Konan等^[1]用高

浓度的细胞分裂素6-BA(10 mg/L)培养木薯腋芽, 形成了致密的类似球茎的结构, 然后转移到低浓度的6-BA培养基上, 能形成多茎结构, 再生了植株。

在建立体细胞胚发生的基础上, 初生胚胎、次生胚胎以及循环胚胎形成的子叶都可在含1.0 mg/L 6-BA和0.5 mg/L IBA的培养基中经器官发生再生植株^[4]。初生胚胎的子叶器官发生的能力较低, 循环胚胎子叶器官发生能力最高^[5]。木薯器官发生途径可来源于腋芽、茎尖、嫩叶以及初生胚、次生胚、循环胚的子叶等外植体。

2 体细胞胚发生途径

2.1 体细胞胚发生的发展 自1982年Stamp等^[6]首次报道以木薯合子胚的胚轴和子叶为外植体成功诱导出胚状体以来, 该方法现已得到普遍发展。从最初的2步: ①在包含2,4-D的培养基中诱导体细胞胚胎; ②将诱导的胚状体转到含2,4-D、6-BA、含或不含GA的培养基中发展茎, 之后再生根^[7-8], 细化到现在的4步: ①在包含2,4-D等生长素的培养基中诱导体细胞胚胎; ②在含低浓度6-BA的培养基中成熟或萌发; ③在含高浓度6-BA的培养基中生长, 发展成茎; ④在含低浓度NAA或不含激素的培养基中生根^[9-11]。循环①、②步, 能产生次生胚胎和循环胚胎, 形成循环的体细胞胚发生体系, 循环的胚胎外植体诱导胚胎更显著^[9,11]。此后的相关体细胞胚发生研究也大多在此基础上, 根据基因型、外植体类型及激素类型等不同因素进行了优化。所用外植体也从最开始的合子胚的胚轴和子叶发展到茎尖、嫩叶、腋芽、花组织以及初生胚、次生胚、循环胚的子叶。

2.2 植物激素对体细胞胚发生的影响 植物激素在木薯体细胞胚发生中有重要作用。2,4-D、Picloram和NAA常作为诱导木薯体细胞胚发生的激素, 但根据木薯品种、外植体类型的不同, 诱导的能力也有所不同。2,4-D浓度在1~8 mg/L范围内增加时, 体细胞胚诱导率显著增加; 当浓度在

基金项目 国家自然科学基金项目(31401438); 农业部热带作物种质资源保护项目(13RZZY-39)。

作者简介 文峰(1983—), 女, 湖北荆门人, 助理研究员, 硕士, 从事木薯生物技术与育种研究。

收稿日期 2016-12-16

8~16 mg/L 时, 胚胎诱导率是相似的^[8]。研究显示, 在某些基因型中, 诱导初生胚胎, Picloram 比 2, 4-D 效果更好^[12-13]。起初的研究认为 NAA 没有诱导初生胚胎的能力, 但有诱导次生胚胎的能力^[14]。马国华等^[15] 研究显示, 采用高浓度的 NAA, 能成功地直接诱导初生体细胞胚发生和芽的形成。后来的研究也证实了这一结果^[16]。尽管研究的激素较多, 但目前常采用 12 mg/L 的 Picloram 诱导常规木薯的体细胞胚发生。

有研究认为在体细胞胚诱导早期, 生长素起关键作用, 而 6-BA 有抑制作用, 一旦胚胎形成后, 生长素抑制茎结构形成, 而 6-BA 促进茎结构形成。同时认为, 改变生长激素能调控木薯经体细胞胚发生途径或器官发生途径再生。外植体在含生长素的培养基上培养, 一旦胚性细胞团被诱导, 若继续在此培养基上培养, 则向体细胞胚发生途径发展, 若转入含 6-BA 的培养基上培养, 则向器官发生途径发展, 而诱导时间决定了胚性细胞团的诱导。在含生长素的诱导培养基上培养的时间越长, 越多的胚性细胞团发展成胚胎, 也越难改变再生路径^[17]。

3 脆性胚性愈伤组织 (FEC) 诱导与再生

在植物中, FEC 已经得到发展, 合子胚通常是用于诱导的首选外植体材料^[18]。在木薯中, 合子胚基因型严重分离, 不清楚基因型来源, 不适合作为外植体, 如同体细胞胚发生一样。

Taylor 等^[19] 描述 FEC 发生于嫩叶诱导初生胚胎, 经次生胚胎或循环胚胎发生, 将高质量的胚性组织在含 Picloram 的 GD 培养基上连续继代培养, 产生一种由数十个细胞组成的直径约 1 mm 的细小细胞团结构, 即脆性胚性愈伤组织。这种结构新陈代谢快, 分离出来后, 在 SH 液体培养基中悬浮培养可迅速扩增。嫩叶诱导初生胚胎的胚性组织质量不高, 次生胚胎或循环胚胎培养产生的胚性组织质量较高。

FEC 的诱导仍存在基因型限制。Taylor 等^[20] 在 20 个木薯供试品种中, 成功诱导了 14 个品种, 并且 FEC 产生的时间和植株的再生效率存在很大差异。Raemakers 等^[21] 报道, 供试的 10 个木薯基因型中只有 6 个获得了 FEC, 每个基因型的 FEC 都能再生植株, 但再生的效率不同。方佳敏等^[22] 对 11 个主栽木薯品种进行诱导 FEC, 经多次重复的诱导与条件优化, 结果表明只有 4 个木薯品种在 GD 培养基上多次继代培养后, 可获得 FEC。尽管木薯的 FEC 难诱导, 但一旦诱导了 FEC, 均能再生成植株。FEC 的再生过程与体细胞胚发生再生过程类似, 除起始材料不同外, 都经过诱导胚胎出现、胚胎成熟、茎伸长、生根 4 个阶段。

4 原生质体培养与再生

4.1 叶肉原生质体的培养与再生 木薯叶片分离原生质体再生植株仅有 1 例成功的报道^[23], 其他学者不能重复这个过程^[24-25]。Anthony 等^[24] 采用组培苗的叶片分离原生质体, 用固 (B5 培养基) 液 (无铵 MS 培养基) 双层法培养, 并在培养基中均匀垂直地插入短玻璃棒, 对照不插玻璃棒, 其他均相同, 结果原生质体只在插玻璃棒的培养基中持续分裂, 形成

肉眼可见的愈伤, 但仍没有再生植株。此后未见木薯叶肉原生质体培养的相关报道, 后人一般认为木薯叶肉原生质体不能再生植株。

4.2 胚性愈伤组织原生质体的培养与再生 20 世纪 90 年代, 木薯原生质体再生研究取得了突破性的进展。在建立 FEC 及其悬浮系的基础上^[19], 展开了木薯品种 TMS60444 原生质体分离、纯化及培养研究, 并再生了植株, 然而再生效率低, 主要是由于原生质体起源的愈伤组织分化体细胞胚的效率低, 并且成熟胚萌发效率也低造成的, 这成为木薯原生质体再生植株的瓶颈^[25]。2012 年, 笔者根据前人^[25] 的研究基础, 分离木薯品种 TMS60444 的 FEC 悬浮系原生质体并培养, 在胚状体发生过程中采用 MSN 培养基培养, 对前人提及的瓶颈问题有所改进, 原生质体再生效率有较大提高, 建立了相对完整有效的木薯脆性愈伤原生质体再生体系^[26]。目前原生质体再生成功的经验是先诱导胚性愈伤组织, 再建立胚性悬浮系, 利用胚性悬浮系分离原生质体, 这样分离的原生质体容易再生。该方法已在水稻^[27]、玉米^[28]、甘蔗^[29]、小麦^[30] 等多种作物的原生质体再生过程中成功应用。

5 结语

木薯是一种主要粮食作物, 对其再生体系的研究落后于水稻、小麦等粮食作物。直到 20 世纪 90 年代木薯的再生体系研究才得到了充分发展, 从器官发生、体细胞胚发生、FEC 再生, 再到原生质体再生, 都有了新的突破。当时木薯的体细胞胚发生是一个研究热点, 无论是品种、外植体类型, 还是激素影响的研究都非常多^[7-17]。这些促使了遗传转化技术的进步, 为木薯遗传转化的发展奠定了基础。

目前木薯再生体系的应用除种质保存、无性繁殖外, 主要应用于遗传转化。子叶和 FEC 常作为遗传转化的起始材料。木薯遗传转化有 2 种方式: 一种是利用体细胞胚发生得到的子叶, 经过器官发生得到转基因植株; 另一种是利用 FEC 再生得到转基因植株。器官发生应用于遗传转化研究, 其优点是基因型不受限制, 再生时间短, 简单、易操作, 缺点是再生效率低, 有假阳性和嵌合现象。FEC 是很多基础研究的重要起始材料, 是木薯高效遗传转化的最合适材料^[31]。FEC 再生应用于遗传转化研究, 其优点是转化效率高, 可以得到较多的转基因植株, 缺点是受基因型限制, 有嵌合现象, FEC 在继代保存及再生过程中可能发生体细胞变异。目前遗传转化的研究报道大多是模式品种 TMS60444、M. Col 22, 转换到栽培种中还需要优化。木薯原生质体再生, 其操作过程繁琐, 技术要求较高, 再生成功的报道少。若在原生质体再生的基础上原生质体融合及原生质体转化等研究成功, 将为木薯育种提供一条新途径。

参考文献

- [1] KONAN N K, SANGWAN R S, SANGWAN-NORREEL B S. Efficient *in vitro* shoot-regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Plant breeding, 1994, 113(3): 227-236.
- [2] MUSSIO I, CHAPUT M H, SERRAF I, et al. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1998, 53(31): 205-211.

- [3] KARTHA K K, GAMBORG O L, CONSTABEL F, et al. Regeneration of cassava plants from apical meristems[J]. Plant science letters, 1974, 2(2): 107-113.
- [4] LI H Q, SAUTTER C, POTRYKUS I, et al. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Nature biotechnology, 1996, 14(6): 736-740.
- [5] LI H Q, GUO J Y, HUANG Y W, et al. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis[J]. Plant cell reports, 1998, 17(5): 410-414.
- [6] STAMP J A, HENSHAW G G. Somatic embryogenesis in cassava [J]. Zeitschrift für pflanzenphysiologie, 1982, 105(2): 183-187.
- [7] STAMP J A, HENSHAW G G. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1987, 10(3): 227-233.
- [8] SZABADOS L, HOYOS R, ROCA W. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. Plant cell reports, 1987, 6(3): 248-251.
- [9] RAEMAKERS C J J M, AMATI M, STARITSKY G, et al. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava [J]. Annals of botany, 1993, 71(4): 289-294.
- [10] RAEMAKERS C J J M, BESSEMBINDER J J E, STARITSKY G, et al. Induction, germination and shoot development of somatic embryos in cassava [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1993, 33(2): 151-156.
- [11] SAEELIM L, PHANSIRI S, NETRPHAN S, et al. Optimization of *in vitro* cyclic somatic embryogenesis and regeneration of the Asian cultivars of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for genetic manipulation system [J]. Global journal of biotechnology & biochemistry, 2006, 1(1): 7-15.
- [12] SUDARMONOWATI E, HENSHAW G G. The use of picloram and dicamba to induce somatic embryogenesis in cassava [J]. Annales bogorienses, 1996, 4(1): 27-34.
- [13] RAEMAKERS C J J M, SOFIARI E, JACOBSEN E, et al. Regeneration and transformation of cassava [J]. Euphytica, 1997, 96(1): 153-161.
- [14] SOFIARI E, RAEMAKERS C J J M, KANJU E, et al. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1997, 50(1): 45-56.
- [15] 马国华, 许秋生, 袁蕴兰. 从木薯嫩叶直接诱导初生体细胞胚胎发生和芽的形成[J]. 植物学报, 1998, 40(6): 503-507.
- [16] 张红岩, 申乃坤, 王溪森, 等. 木薯初生体细胞胚发生及植株再生的影响因素[J]. 广西农业科学, 2010, 41(9): 882-885.
- [17] MA G H, XU Q S. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2002, 70(3): 281-288.
- [18] LIN H S, TOORN C V D, RAEMAKERS K J J M, et al. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria* [J]. Plant cell reports, 2000, 19(5): 529-534.
- [19] 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 biotechnology, 1996, 14(6): 726-730.
- [20] TAYLOR N J, MASONA M V, CARCAMO R, et al. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Euphytica, 2001, 120(1): 25-34.
- [21] RAEMAKERS K, SCHREUDER M, PEREIRA I, et al. Progress made in FEC transformation of cassava [J]. Euphytica, 2001, 120(1): 15-24.
- [22] 方佳敏, 刘佳, 唐克轩, 等. 根癌农杆菌介导的木薯遗传转化条件的优化[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1697-1703.
- [23] SHAHIN E A, SHEPARD J F. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation, and shoot formation [J]. Plant science letters, 1980, 17(4): 459-465.
- [24] ANTHONY P, DAVEY M R, POWER J B, et al. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 1995, 42(3): 229-302.
- [25] SOFIARI E, RAEMAKERS C J J M, BERGERVOET J E M, et al. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava [J]. Plant cell reports, 1998, 18(1): 159-165.
- [26] 文峰, 肖诗鑫, 袁扬眉, 等. 木薯脆性胚性愈伤组织原生质体培养与植株再生[J]. 中国农业科学, 2012, 45(19): 4050-4056.
- [27] KYOZUKA J, OTOO E, SHIMAMOTO K. Plant regeneration from protoplasts of indica rice: Genotypic differences in culture response [J]. Theoretical and applied genetics, 1988, 76(6): 887-890.
- [28] RHODES C A, PIERCE D A, METTLER I J, et al. Genetically transformed maize plants from protoplasts [J]. Science, 1988, 240(4849): 204-207.
- [29] CHEN W H, DAVEY M R, POWER J B, et al. Sugarcane protoplasts: Factors affecting division and plant regeneration [J]. Plant cell reports, 1988, 7(5): 344-347.
- [30] CHANG Y F, WANG W C, WARFIELD C W, et al. Plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant cell reports, 1991, 9(11): 611-614.
- [31] MA Q X, ZHOU W Z, ZHANG P. Transition from somatic embryo to friable embryogenic callus in cassava: Dynamic changes in cellular structure, physiological status, and gene expression profiles [J]. Frontiers in plant science, 2015, 6: 824.

(上接第80页)

(2) 模糊综合评判法能够较完整地考虑到各种水质因子的相互影响作用, 科学合理地进行水质综合评价。

(3) 由于模糊数学综合评判法是依据地下水水质标准采用隶属函数来描述水质分界, 意义明确; 结合评价集, 能够更加明确地对水质量化评级, 使评价结果更客观, 可信度高, 因此其在水质评价中使用范围较广。

参考文献

- [1] 薛联青, 汪家权, 于海玲. 改进的模糊水质评价方法探讨[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 1999, 24(2): 51-54.
- [2] 谷朝君, 潘颖, 潘明杰. 内梅罗指数法在地下水水质评价中的应用及存在

问题[J]. 环境保护科学, 2002, 28(1): 45-47.

- [3] 韩程辉, 刘文生. 模糊综合评判法在矿区地下水水质评价中的应用[J]. 矿业安全与环保, 2004, 31(5): 36-38.
- [4] 于皓, 刘志斌, 王昭君. 基于灰色聚类分析法的矿井水质评价[J]. 辽宁工程技术大学学报, 2003, 22(S1): 74-76.
- [5] 倪深海, 白玉慧. BP神经网络模型在地下水水质评价中的应用[J]. 系统工程理论与实践, 2000, 20(8): 124-127.
- [6] 王小军, 苏养平. 模糊综合评判法在地下水水质评价应用中若干问题的商榷[J]. 河南地质, 1992, 10(3): 217-223.
- [7] 黄克中, 毛善培. 随机方法与模糊数学应用[M]. 上海: 同济大学出版社, 1987.
- [8] 李彰明. 模糊分析在边坡稳定性评价中的应用[J]. 岩石力学与工程学报, 1997, 16(5): 490-495.
- [9] 扈垠. 实用模糊数学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1989.