

文章编号: 1674-7054(2013)01-0081-07

影响木薯器官发生主要因素的优化

黄 琴^{1,2}, 王 颖², 吴坤鑫², 王文泉², 赵羿鸾^{1,2}, 贾 贤^{1,2}, 陈雄庭²(1. 海南大学 农学院 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究
所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101)

摘 要: 为了给木薯主栽品种的转基因改良提供条件, 对木薯4个主栽品种 NZ188, SC8, C3 及 C4 器官发生的影响因素(基因型, 蔗糖, IBA, AgNO₃)进行了优化研究。结果表明: 在体细胞胚的发生、器官发生等能力上, 不同基因型之间存在明显差异, NZ188, SC8 和 C3 在黑暗条件下侧芽膨大, 初级体细胞胚的诱导率可达80%以上, 而 C4 品种则在光照培养下效果较好; 在进行体细胞胚诱导和成熟子叶胚的诱导时, 培养基中蔗糖质量浓度为 25~30 g·L⁻¹ 时效果最好; 不定芽诱导培养基中添加 0.3 mg·L⁻¹ 的 IBA 及 4 mg·L⁻¹ 的 AgNO₃ 时, 不定芽的诱导率及芽再生数目明显提高。

关键词: 木薯; 器官发生; 体细胞胚; 基因型

中图分类号: S 533

文献标志码: A

木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 又名木番薯、树薯, 属大戟科(Euphorbiaceae) 木薯属(*Manihot*) 植物, 原产于南美洲亚马逊河流域^[1-2]。木薯根部膨大形成的储藏根含有丰富的淀粉, 作为一种重要的粮食和能源作物, 具有极高的开发前景和经济效益。目前, 我国已将木薯纳为发展生物质能源产业的重要原料之一, 选育优良品种已成为木薯科技的重点领域。生产上用木薯茎秆进行无性繁殖, 生长周期长, 采用常规育种方法选育新品种难度大, 一方面体现在木薯的基因型高度杂合(heterozygosity)、基因冗余(genetic overloading)、有性子代严重分离等复杂的遗传背景上; 另一方面, 木薯存在开花数量少、花粉育性低、自交不亲和、坐果率低等问题^[3]。利用转基因技术选育新品种将弥补传统育种方法的缺陷, 能将具有抗病、抗逆、低氰化物、高蛋白和高淀粉等优良的农艺性状的基因导入作物, 却不改变其原有特性^[4]。因此, 转基因选育木薯新品种的技术备受关注。经过多年发展, 木薯育种研究者们基于2条途径, 即体细胞胚胎发生诱导成熟子叶胚进行芽器官发生和脆性愈伤组织建立了转化体系, 为木薯遗传改良奠定了一定的基础^[5]。但木薯遗传转化效率依然较低, 且木薯基因型依赖性强, 不同品种建立的体系差异大, 而木薯离体器官发生系统的建立是实现遗传转化的首要条件, 因此, 建立针对主栽木薯品种的高效植株再生体系已成为当前木薯基因工程研究的任务之一。笔者以我国培育及引进的几个主栽木薯品种为材料, 采用相对成熟的组织培养技术^[6-7] 对不同品种的再生途径进行了优化, 旨在为进一步开展木薯主栽品种的转基因改良提供条件。

1 材料与方法

1.1 材料 木薯4个主栽品种 NZ188, SC8, C3 及 C4 的试管苗。

1.2 方法

1.2.1 侧芽膨大及体细胞胚的诱导 以培养6~8周的组培苗为材料, 按不同基因型将木薯组培苗切成1~2 cm 的带侧芽茎段, 侧芽向上, 平放于 MS + 6-BA 10 mg·L⁻¹ 的培养基上, 培养温度为(28±1)℃,

收稿日期: 2013-01-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2010CB126601)

作者简介: 黄琴(1988-), 女, 湖北宜昌人, 海南大学农学院2010级硕士研究生。

通信作者: 陈雄庭(1957-), 男, 广东高州人, 研究员, 博士生导师. E-mail: cxt66988063@163.com

光照强度为 2 000 lx, 每天光照 14 h 或黑暗培养。

接种 3~5 d 后, 将膨大的侧芽放在 20 倍体视解剖镜下, 观察侧芽膨大情况, 用注射器针尖小心挑取侧芽生长点, 转移到体细胞胚诱导培养基 MS + picloram $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上, 于黑暗条件下进行体细胞胚诱导, 14 d 后, 在体视显微镜下观察统计初级体细胞胚诱导的情况。

出胚率 = 诱导出体细胞胚的组织数 / 接种的侧芽生长点数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 体细胞胚的继代诱导 在体视显微镜下, 将诱导出的初级体细胞胚从愈伤组织中挑出, 转移到新的 MS + picloram $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 体细胞胚诱导培养基上, 蔗糖质量浓度分别为 15, 20, 25, 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在黑暗条件下培养 14 d 后, 用体视显微镜观察统计继代体细胞胚的生长情况。

1.2.3 成熟子叶胚的诱导 将继代培养 2~3 代的木薯体细胞胚转接到 MS + 6-BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 成熟子叶胚诱导的培养基上, 蔗糖质量浓度分别为 15, 20, 25, 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养条件为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度为 2 000 lx, 每天光照 14 h, 培养 14 d 后, 观察统计成熟子叶胚的生长情况。

1.2.4 不定芽诱导及茎伸长培养 将培养 15 d 的成熟子叶胚切成 $0.2 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$ 的小叶盘, 正面朝上转接到分别附加 0, 0.3, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 及 0, 2, 4, 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 的 MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 不定芽诱导培养基上, 约 25 d 更换 1 次培养基, 50 d 后观察统计不定芽生长情况。

将分化出的不定芽从子叶块上切下, 转移到茎伸长培养基 MS + 6-BA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中继续培养, 使其不定芽更加健壮。

1.2.5 成苗培养和移栽 待不定芽长到约 2 cm 时, 自基部切下, 转移到无激素的 MS 培养基中, 约 10 d 即可生根, 35 d 后, 苗高可达 8~12 cm, 不定根 4~10 条, 此时可打开瓶盖, 移到常温室室内散射光下, 3~5 d 后, 将小苗从培养瓶中取出, 用清水冲洗附着在根系上的培养基, 用 $w = 0.1\%$ 的多菌灵浸泡 10 min 后, 在干净的培养瓶中用自来水培养 7 d, 然后移栽到 $V_{\text{沙}} : V_{\text{表土}} = 1 : 2$ 的混合基质中, 浇足定根水, 并用塑料薄膜密封 7 d, 保持湿度, 棚内温度约为 30°C 。

2 结果与分析

2.1 培养条件对木薯侧芽膨大及初级体细胞胚的影响 将木薯的带侧芽茎段平放在 MS + 6-BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上, 黑暗或光照条件培养 3~5 d 后, 不同品种的木薯侧芽大部分都发生膨大, 小部分出现侧芽抽芽的情况。相比之下, 黑暗培养条件下的侧芽生长点膨大, 抽芽较少(图 1A), 而光照培养条件下抽芽情况较多(图 1B)。将各品种的侧芽生长点转接到 MS + picloram $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上, 黑暗培养 14 d 后, 笔者发现, 不抽芽的侧芽生长点更容易产生较纯的体细胞胚(图 1C), 而抽芽的侧芽容易产生愈伤组织, 从而难出现体细胞胚(图 1D)。这可能是产生的愈伤组织抑制了初级体细胞胚的生长。统计结果表明, 黑暗条件下培养 3~5 d, 对木薯 3 个品种 NZ188, SC8 及 C3 的初级体细胞胚诱导较快, 体细胞胚诱导效果较高; 而 C4 品种由于生长较缓慢, 光照培养条件更适合其侧芽生长点的膨大, 且较少出现抽芽, 体细胞胚诱导效率要高于黑暗培养(表 1)。

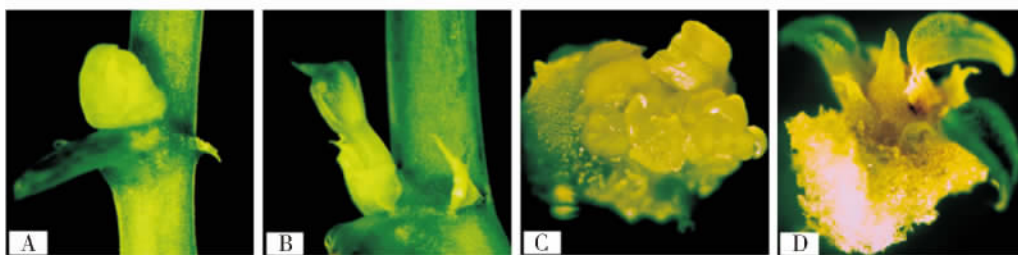


图 1 光照及黑暗条件对木薯侧芽膨大的影响

A: 黑暗条件侧芽生长点膨大; B: 光照条件下侧芽生长点抽芽; C: 来源于图 A 诱导出的初级体细胞胚; D: 来源于图 B 诱导出的初级体细胞胚

Fig. 1 Effects of light and dark conditions on cassava lateral bud swelling

A: Lateral bud growing point swelling in dark condition; B: Lateral bud growing point shooting forth in light condition;
C: Primary somatic embryogenesis induced from Plate A; D: Primary somatic embryogenesis induced from Plate B

表 1 黑暗及光照培养对木薯初级体细胞胚诱导频率的影响
Tab. 1 Effects of light and dark conditions on primary somatic embryogenesis in cassava

品种 Cultivar	黑暗培养 Cultured in the dark			光照培养 Cultured in the light		
	侧芽数/个	出胚数/个	出胚率/%	侧芽数/个	出胚数/个	出胚率/%
	Number of	Number of	Frequency of	Number of	Number of	Frequency of
	nodal explants	somatic embryos induced	somatic embryo induction	nodal explants	somatic embryos induced	somatic embryo induction
A1	119	104	87.4	120	96	80.0
H8	120	97	80.8	119	86	72.3
C3	120	85	70.8	107	72	67.3
C4	108	59	54.6	100	65	65.0

2.2 蔗糖质量浓度对不同品种木薯继代体细胞胚的影响 从表 2 中可知,在木薯体细胞胚继代诱导过程中,相同蔗糖质量浓度条件下,产胚数量因基因型不同而出现明显的不同,在供试的 4 个木薯品种中,以 NZ188 产生继代体细胞胚的数量最多,SC8 和 C3 次之,C4 最少。此外,不同蔗糖质量浓度对同一品种的影响也很大,其中,NZ188 以蔗糖质量浓度 30 g·L⁻¹产生的体细胞胚数量最多,相当于一个初级体细胞胚可以产生 7.5 个新的体细胞胚;SC8 和 C3 在蔗糖质量浓度为 25 g·L⁻¹时,可以产生较多的体细胞胚,平均 1 个初级体细胞胚可分别产生 7.3 和 6.1 个继代体细胞胚,C4 产生的体细胞胚相对较少,但在蔗糖质量浓度为 30 g·L⁻¹时,也能达到平均 1 个初级体细胞胚产生 5.3 个继代体细胞胚。

表 2 蔗糖质量浓度对木薯继代体细胞胚的影响
Tab. 2 Effects of different concentrations of sucrose on secondary somatic embryogenesis in cassava

品种 Cultivar	蔗糖质量浓度 Concentration of sucrose/(g·L ⁻¹)											
	15			20			25			30		
	体细胞	产胚	产胚	体细胞	产胚	产胚	体细胞	产胚	产胚	体细胞	产胚	产胚
	胚块数	个数	倍数	胚块数	个数	倍数	胚块数	个数	倍数	胚块数	个数	倍数
	Number	Number	Ploidy	Number	Number	Ploidy	Number	Number	Ploidy	Number	Number	Ploidy
	of	of	of	of	of	of	of	of	of	of	of	of
	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic	somatic
	embryo	embryos	embryos	embryo	embryos	embryos	embryo	embryos	embryos	embryo	embryos	embryos
	clumps	induced	induced	clumps	induced	induced	clumps	induced	induced	clumps	induced	induced
NZ188	21	99	4.7	40	267	6.7	40	281	7.0	40	298	7.5
SC8	20	79	4.0	40	247	6.2	39	283	7.3	40	251	6.3
C3	17	67	3.9	40	211	5.3	40	244	6.1	40	220	5.5
C4	15	32	2.1	40	125	3.1	36	180	5.0	35	186	5.3

2.3 蔗糖质量浓度对培养成熟子叶胚的影响 将继代 2~3 次的木薯体细胞胚经光照成熟培养,可以得到大量绿色的成熟子叶胚。从图 2 可知,4 个品种的成熟子叶胚形态有很大差别,NZ188 成熟子叶胚最绿,但子叶片卷曲(图 2A~D),SC8 子叶绿且叶片较大(图 2E~H),C3 子叶稍绿(图 2I~L),C4 的成熟子叶胚较黄(图 2M~P)。低质量浓度的蔗糖会影响子叶的发育,抑制体细胞胚形成大而绿的成熟子叶胚,对于成熟子叶胚的形成来说,较高质量浓度的蔗糖有利于子叶的发育,蔗糖质量浓度达到 30 g·L⁻¹时,最有利于子叶胚的成熟。

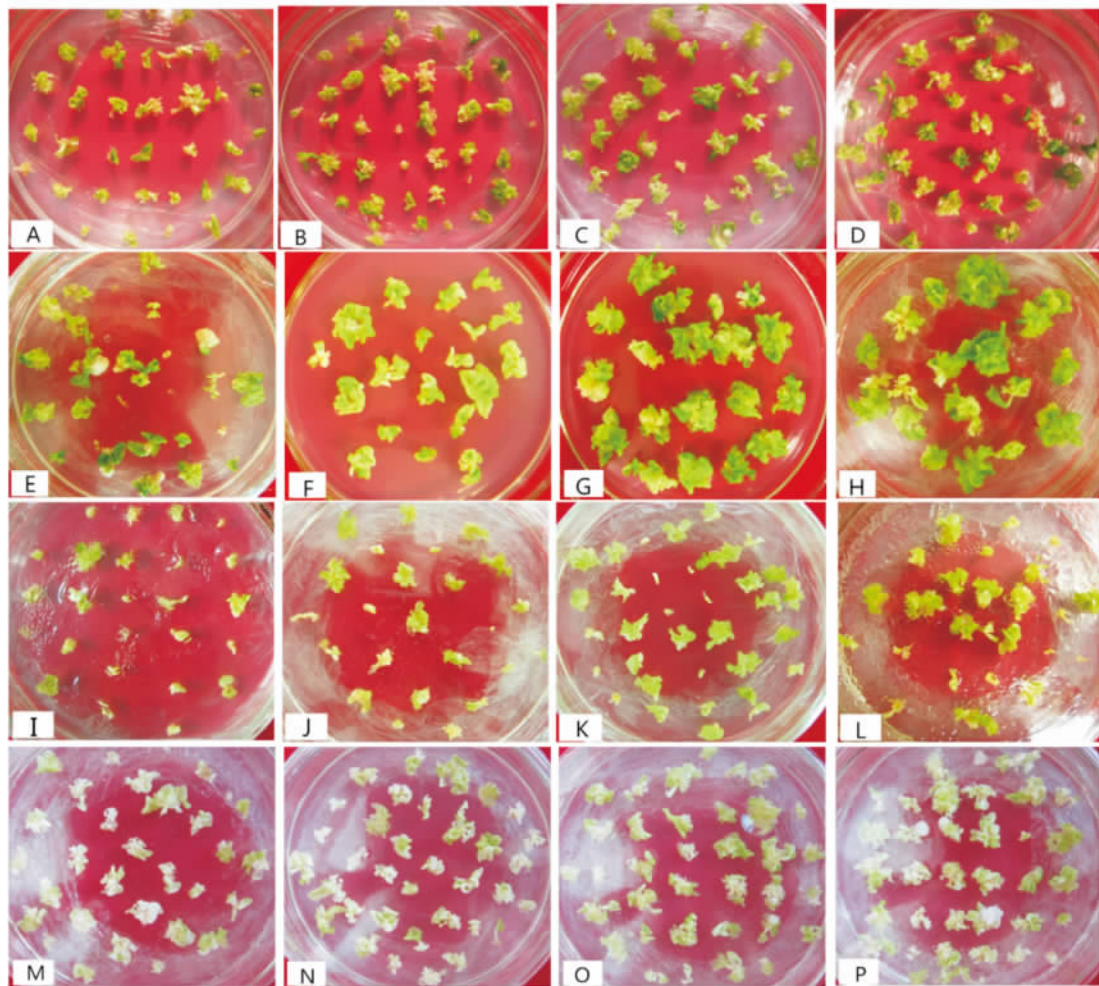


图2 蔗糖质量浓度为 $15 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对成熟子叶胚的影响

A~D: NZ188 的成熟子叶胚; E~H: SC8 的成熟子叶胚; I~L: C3 的成熟子叶胚; M~P: C4 的成熟子叶胚

Fig. 2 Effects of different concentrations of $15 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose on mature somatic embryos in cassava

A—D: Mature somatic embryos of NZ188; E—H: Mature somatic embryos of SC8;

I—L: Mature somatic embryos of C3; M—P: Mature somatic embryos of C4

2.4 IBA 对木薯不定芽诱导的影响 成熟子叶胚经过光照成熟培养 14 d 后, 得到大量成熟的绿色子叶胚, 将其切成小块转接到不定芽诱导培养基上, 结果见表 3。从表 3 可见, 添加 IBA 处理不定芽诱导率比对照高; 当 IBA 为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 各品种的不定芽诱导率都有所提高, 以 SC8 的不定芽诱导率最高(图 3A), 为 75.9%; 当 IBA 达到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽的诱导率反而有所降低, 部分子叶块出现生根现象(图 3B), 且生根的子叶块很少能诱导出不定芽。可见, 在不定芽诱导培养基中添加 IBA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导不定芽效果最好。

2.5 AgNO_3 对木薯不定芽诱导的影响 AgNO_3 作为乙烯合成抑制剂, 可有效地防止植物细胞在离体培养中积累过多的乙烯, 因为乙烯过多会对植株的生长和不定芽的分化造成一定的影响。在培养基中添加 AgNO_3 可以明显地促进不定芽诱导, 降低愈伤组织的产生。由表 4 可见, 不同质量浓度的 AgNO_3 对不同品种子叶胚的不定芽诱导率影响不同; 在未添加 AgNO_3 的不定芽诱导培养基中, 子叶块切口处产生大量白色致密的愈伤组织(图 4A), 不定芽诱导率均低于 60%; 随着 AgNO_3 质量浓度的增加, 不定芽诱导率也随之增加, 当质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NZ188 的不定芽诱导率达到最高, 为 76.8%, 每个子叶块上的不定芽数目也相应增加, 最高的可达到 10 个, 而且愈伤组织明显减少; 当 AgNO_3 质量浓度达到 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织受到明显的抑制(图 4B), 但不定芽诱导率并没有进一步升高, 相反呈下降趋势。此外, 笔者还发现, 在含有 AgNO_3 的培养基中培养时间超过 30 d 时, 容易出现畸形苗(图 4C)。所以, 在不定芽诱导培

培养基中 添加 AgNO_3 $4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养时间为 30 d 以内可获得最佳效果。

表 3 IBA 对木薯不定芽诱导的影响

Tab.3 Effects of different concentrations of IBA on inducing adventitious shoots of cassava

品种 Cultivar	IBA 质量浓度 Concentration of IBA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)								
	0			0.3			0.5		
	子叶 块/块	不定 芽/个	芽诱导 率/%	子叶 块/块	不定 芽/个	芽诱导 率/%	子叶 块/块	不定 芽/个	芽诱导 率/%
	Cotyledon sections	Number of Adventitious shoots	Frequency of shoot inducing	Cotyledon sections	Number of Adventitious shoots	Frequency of shoot inducing	Cotyledon sections	Number of Adventitious shoots	Frequency of shoot inducing
NZ188	51	29	56.9	62	45	72.6	51	36	70.6
SC8	50	30	60.0	54	41	75.9	50	35	70.0
C3	42	21	50.0	50	27	54.0	48	24	50.0
C4	40	18	45.0	48	23	47.9	47	25	53.2

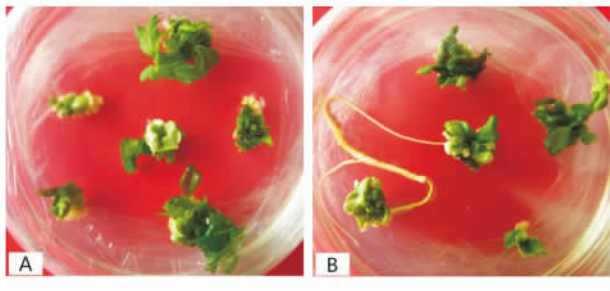


图 3 IBA 对木薯芽器官发生的影响

A: IBA $0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时子叶块产生的不定芽; B: IBA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时子叶块出现生根

Fig.3 Effects of different concentrations of IBA on the adventitious shoots in cassava

- A: Adventitious shoots were developed well when cultured on shoot organogenesis medium within IBA $0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
B: Cotyledon sections produced roots when cultured on shoot organogenesis medium within IBA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

表 4 AgNO_3 对木薯不定芽诱导率的影响

Tab.4 Effects of different concentrations of AgNO_3 on inducing rate of adventitious shoots of cassava

品种 Cultivar	AgNO_3 质量浓度 Concentration of AgNO_3 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)											
	0			2			4			6		
	子叶块 /块	不定芽 /个	诱导率 /%	子叶块 /块	不定芽 /个	诱导率 /%	子叶块 /块	不定芽 /个	诱导率 /%	子叶块 /块	不定芽 /个	诱导率 /%
	Cotyledon sections	Number of adventitious shoots	Frequency of shoot inducing	Cotyledon sections	Number of adventitious shoots	Frequency of shoot inducing	Cotyledon sections	Number of adventitious shoots	Frequency of shoot inducing	Cotyledon sections	Number of adventitious shoots	Frequency of shoot inducing
NZ188	51	29	56.9	52	33	63.5	56	43	76.8	52	36	69.2
SC8	50	30	60.0	52	32	61.5	54	40	74.1	51	35	68.6
C3	42	21	50.0	51	24	47.1	51	32	62.7	49	24	49.0
C4	40	18	45.0	55	23	45.0	54	25	46.3	45	21	46.7

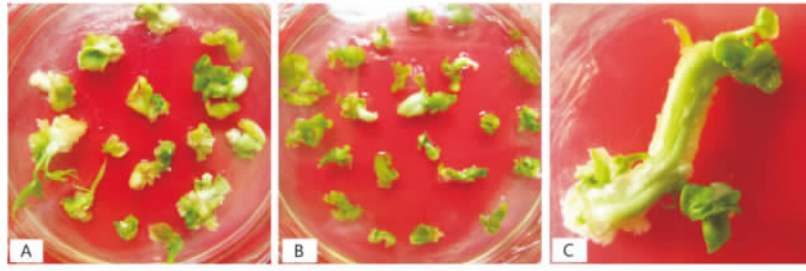


图4 AgNO_3 对木薯不定芽诱导的影响

A: 不加 AgNO_3 的不定芽诱导培养基有大量愈伤组织的产生; B: 在 AgNO_3 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的不定芽诱导培养基中不定芽诱导率较高, 且没有愈伤组织; C: 畸形苗

Fig. 4 Effects of different concentrations of AgNO_3 on inducing of adventitious shoots of cassava

A: Large number of calli emerged on the adventitious shoot organogenesis medium without AgNO_3 ; B: Inducing frequency of adventitious shoots was high when cultured on shoot organogenesis medium at the presence of $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 and no callus was induced therein; C: Abnormal plantlets

2.6 植株炼苗及移栽 在植物组织培养过程中, 植株处于温度适宜、湿度较大的环境中, 而移栽后环境会改变, 因此, 移栽后应注意苗的保湿保温。首先将小苗置于自来水中培养, 每2天换1次水(图5A), 7 d后, 移栽到 $V_{\text{沙}} : V_{\text{表土}} = 1 : 2$ 的混合基质中(图5B), 用塑料薄膜密封7 d, 以保持湿度和温度, 1个月后, 成活率可达到85%以上。

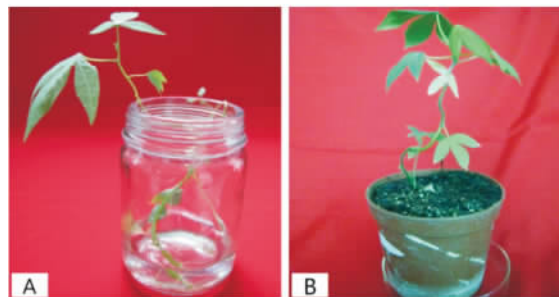


图5 植株炼苗及移栽

A: 自来水中培养; B: 泥土与沙混合物中栽培

Fig. 5 Hardening off and transplanting of the tissue cultured plantlets of cassava

A: Cultured in tap-water; B: Cultivated in the mixture of clay and sand

3 讨 论

多数植物体细胞胚发生对光照的变化不太敏感, 但也有些植物易受光线的影响。有报道认为, 花生体细胞胚诱导中光照明显抑制胚胎的发生^[8], 胡萝卜培养中强的白光和蓝光抑制体细胞胚的发生, 但低强度的蓝光下, 体细胞胚的诱导率比黑暗条件下高, 红光对心形胚发育有促进作用^[9]。WEATHERWAX等^[10]认为, 光周期通过光敏素调控细胞中内源 ABA 的水平, 最终影响体细胞胚的发生, 另外, 光敏素还可影响到细胞的多种合成代谢, 它也可以通过影响多胺的合成以及调控特异基因的表达来控制体细胞胚的发生。对于本研究的4个主栽木薯品种的研究表明, 黑暗条件下诱导侧芽膨大更有利于体细胞胚的形成, 光照更有利于外植体细胞的多种合成代谢正常进行, 有利于使侧芽抽芽, 而抽芽的侧芽分化较严重, 不利于体细胞胚的形成, 这与邓向阳等^[8]研究的结果一致。

由于木薯遗传转化涉及2个可转化外植体, 即脆性胚性悬浮细胞和体细胞胚来源的子叶切块, 两者都需经体细胞胚发生过程而形成, 所以, 建立不同品种木薯的体细胞胚发生体系是进行基因工程研究的第一步。由于体细胞胚诱导采用的外植体是植株的侧芽, 取材受到一定的限制, 转基因工程中要利用体细胞胚成熟获得的子叶切块作为外植体进行侵染, 因此, 在短时间内获得大量的体细胞胚相当重要。高质量浓度的蔗糖可以改变培养基的渗透压, 使细胞失水, 内含物浓度升高, 从而直接影响体细胞胚的成

熟。有报道还指出,蔗糖可以通过改变体细胞胚中内源 ABA 含量来调节体细胞胚的发生,例如培养小麦、胡萝卜等植物时,适当高浓度的蔗糖可以提高体细胞胚的诱导率^[11]。对于 4 个木薯品种,体细胞胚的诱导、继代和成熟子叶胚的诱导中,蔗糖质量浓度为 $25 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, NZ188、SC8 与 C3 都比低质量浓度的诱导效果好,这 3 个品种在蔗糖质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,诱导的成熟子叶胚也比低质量浓度的明显绿且大,生活能力更强。而对于体细胞胚诱导率较低的 C4,提高蔗糖质量浓度对继代体细胞胚的影响效果较小,对成熟子叶胚的效果不明显。综合来看, NZ188、SC8 和 C3 这 3 个品种更适合作为下一步遗传转化平台的优选品种。

在植物组织培养中,生长素对诱导不定芽的控制很重要,在生长素中,IBA 主要用于生根培养,或在相对低浓度水平与细胞分裂素结合促进芽苗再生与增殖。本研究也证明了 IBA 在木薯品种中的积极作用。不同质量浓度的 IBA 对品系之间的不定芽诱导能力有一定的影响,例如 SC8 与 NZ188 相比,在未加 IBA 时,不定芽诱导率分别是 60.0% 和 56.9%,当加入质量浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 后,两者的不定芽诱导率明显提高,但当质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,两者的不定芽诱导率有所下降。在 IBA 质量浓度达到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,4 个品种都出现部分成熟子叶块生根现象,抑制不定芽,不利于不定芽的形成。因此,针对不同木薯基因型可尝试加入不同质量浓度的 IBA 来提高一些品种的不定芽发生能力。

在植物离体培养时,培养基中添加 AgNO_3 可明显地促进体细胞胚形成和完整植株的再生,一般认为外植体在受到创伤后,创部会产生大量自我保护的物质(即乙烯),其对细胞的分化和器官的形成具有抑制作用,而 Ag^+ 是一种很好的乙烯活性抑制剂,通过竞争性结合位于细胞膜上的乙烯受体蛋白而阻止或是降低乙烯活性,从而缓解或解除乙烯对外植体再生的抑制作用^[12]。本研究结果与报道一致,适当质量浓度的 AgNO_3 可明显提高木薯成熟子叶胚外植体产生不定芽,抑制愈伤组织的形成,但添加 AgNO_3 培养外植体的时间过长,也会对外植体产生影响,导致其发生畸变,这可能是由于 AgNO_3 质量浓度过高,而对外植体产生了胁迫效应。所以,在植物外植体培养时只有添加适当浓度的 AgNO_3 ,才能有效地促进不定芽的诱导和离体植株的再生。

参考文献:

- [1] OLSEN K, SCHAAL B A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999(96): 5586–5591.
- [2] NASSAR NMA, ORTIZ R. Cassava genetic resources: manipulation for crop improvement [J]. Plant Breed Rev, 2008(31): 247–275.
- [3] 方佳敏, 刘佳, 张鹏, 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.
- [4] 赵珊珊, 张鹏, 李海霞, 等. 我国主要栽培木薯品种体细胞胚胎发生与芽器官发生的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(1): 37–44.
- [5] LIU J, ZHENG Q, MA Q, et al. Cassava genetic transformation and its application in breeding [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(7): 552–569.
- [6] ZHANG P, GRUISSEM W. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Cratz) [C]. Transgenic Crops of the World—Essential Protocols, 2004: 301–319.
- [7] BULL S E, OWITI J A, NIKLAUS M, et al. Agrobacterium-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava [J]. Nat Protoc, 2009(4): 1845–1854.
- [8] 邓向阳, 卫志明. 幼胚长度、2,4-D 浓度、光照强度对花生体细胞胚发生的影响及高效再生系统的建立 [J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 525–531.
- [9] MICHLER C H, LINEBERGER R D. Effects of light abscisic levels in carrot suspension cultures [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1987(11): 189–207.
- [10] WEATHERWAX S C, ONG M S, DEGENHARDT J, et al. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression [J]. Plant Physiol, 1996, 111: 363–370.
- [11] 袁澍, 贾勇炯, 林宏辉. 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 508–512.
- [12] 姚庆荣, 郭安平, 郭运玲, 等. 影响木薯芽器官发生及植物再生的因素 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16781–16783.

(下转第 93 页)

Artificial Propagation and Seed Breeding Technology of *Sipunculus nudus*

LIU Tianmin¹, FENG Quanying¹, YANG Mingqiu¹, FU Yifan¹, WU Pengfei²

(1. Hainan Fisheries Institute, Haikou 570206, China; 2. Haikou Nanji Fisheries Development Co., Ltd., Haikou 570206, China)

Abstract: Observation on the maternal culture, artificial spawning and breeding of marine worm *Sipunculus nudus* were conducted. The marine worm was distributed in the natural sea waters at the ratio of the male to female of about 1 : 1.1, and the survival rate of the maternal marine worms was the highest when cultured in fine sand (0.1—2.0 mm). Maternal marine worms spawned best when forced by a combined spawning method (drying in the air for 3 hours + running water stimulating + semen inducing) as compared with other different artificial spawning methods. When the temperature for embryonic development fell in the range of 26.5 °C to 31.5 °C, the initial time for larvae to hatch from the fertilized eggs was reduced as the temperature increased. Our artificial breeding tests had produced a total of 152 000 marine worms with an average body size of 2.8 cm long.

Key words: *Sipunculus nudus*; maternal culture; artificial spawning; embryonic development; fry rearing

(上接第 87 页)

Optimization of Major Factors Influencing Cassava Organogenesis

HUANG Qin^{1,2}, WANG Yin², WU Kunxin², WANG Wenquan²,

ZHAO Yiluan^{1,2}, JIA Xian^{1,2}, CHEN Xiongting²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Factors (genotypes, sucrose, IBA and AgNO₃) affecting organogenesis of 4 cassava cultivars (NZ188, SC8, C3 and C4) were analyzed and optimized for genetic improvement. The results showed significant differences in somatic embryogenesis and organogenesis among the genotypes tested. Axillary buds of the cultivars NZ188, SC8 and C3 swelled in the dark condition and their primary somatic embryos had an inducing frequency of more than 80%, while C4 grew better in the light condition. Somatic embryogenesis and mature somatic embryos were induced best on the medium containing 25—30 g · L⁻¹ sucrose. The inducing frequency of adventitious shoots and the shoot regeneration rate were improved significantly on the shoot organogenesis medium at the presence of 4 mg · L⁻¹ AgNO₃ and 0.3 mg · L⁻¹ IBA.

Key words: *Manihot esculenta* Crantz; somatic embryogenesis; shoot organogenesis; genotype