

文章编号:1007-2624(2007)03-0011-03

甜菜不同基因型与外植体再生能力的研究

郑 洪

(黑龙江大学,哈尔滨 150080)

摘 要:通过对 10 个不同的甜菜品种进行基因型选择、培养基筛选以及不同外植体再生能力的测定,从中确定了 3 个再生能力较强的基因型 (06-5、06-7、06-9),并筛选出了适合植株再生的培养基组合 (0.5mg/L 6-BA、2.0mg/L KT、0.25mg/L NAA),验证了甜菜叶柄外植体再生能力较强的结论。

关键词:甜菜;基因型;外植体;组织培养

中图分类号:S566.301;Q81

文献标识码:A

植物组织培养与细胞培养的概念开始于 19 世纪后半叶,当时植物细胞全能性的概念还没有完全确定,但基于对自然状态下某些植物可以通过无性繁殖产生后代的观察,人们便产生了这样一种想法即能否将植物体的一部分在适当的条件下培养成一个完整的植物体,为此许多植物科学工作者开始了培养植物组织的尝试。1839 年 T.Schwann 提出细胞有机体的每一个生活细胞在适宜的外部环境条件下都有独立发育的潜能。1853 年 Trecul 利用离体的茎段和根段进行培养获得了愈伤组织。植物组织培养技术,是 20 世纪兴起的一项植物细胞工程技术。它的基本内容是:从外界植物体上取下任意的一个到几个细胞或者一块组织在全人工的离体条件下进行培养,经过细胞或者组织的分裂、分化及几何增殖达到植株的形态重建和快速繁殖的目的。植物组织培养技术,是植物细胞工程学、遗传学、植物生理学、生物化学与分子生物学研究的重要基本技术。也就是说,植物组织培养技术不仅仅用于快速繁殖,而是有着相当广泛的用途。

在甜菜育种研究领域中,培育高产、高含糖、高品质的甜菜新品种一直是育种工作的重要目标。目前甜菜品种的培育主要依靠常规育种,而常规育种存在见效慢、周期长、投资高的缺点。尤其甜菜是高度自交不亲和的作物,在育种研究中发现单株突变,依靠常规方法很难保存下来,而利用组织细胞培养技术可以有效地解决该问题。甜菜组织培养植株再生及快速繁殖,不仅在育种研究工作中有着重要作用,同时也是以重组 DNA 为特征的基因工程研究的前提,它为甜菜育种工作提供了新的手段,这对于提高我国甜菜育种研究的水平,改变我国目前甜菜生产低产、低糖、品种单一的状况都具有一定的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的甜菜品种为 10 种不同基因型的甜菜种子,是经品比试验筛选表现较突出的品种,各供试材料分别用代码 06-1、06-2、06-3、06-4、06-5、06-6、06-7、06-8、06-9、06-10 表示。

1.2 主要试验仪器

超净工作台、恒温培养箱、光照培养箱、手术刀、小烧杯、培养瓶、培养皿、滤纸。

1.3 主要试验试剂

75%酒精、无菌水、0.1%HgCl₂、琼脂、6-BA、KT、NAA、植物组织培养常用化学试剂。

2 试验设计与方法

2.1 试验设计

利用正交实验设计的方法和给定的因素,设计配制了 16 种以 MS 为基本培养基,添加了不同浓度、不同配比的 KT (糠氨基嘌呤)、6-BA (6-苄基腺嘌呤)、NAA (萘乙酸)3 种植物生长调节剂,对不同基因型的叶片、叶柄、子叶等不同外植体进行培养。3 种不同植物生长调节剂的配比浓度见表 1,16 种以 MS 为基本培养基添加了不同浓度配比的植物生长调节剂的配比见表 2。

表 1 3 种植物生长调节剂浓度设计

植物生长调节剂	1	2	3	4
KT	1.0mg/L	2.0mg/L	3.0mg/L	4.0mg/L
6-BA	0.5mg/L	1.0mg/L	1.5mg/L	2.0mg/L
NAA	0.00mg/L	0.25mg/L	0.50mg/L	0.75mg/L

收稿日期:2007-01-15

作者简介:郑 洪(1961-),女,黑龙江省牡丹江市人,黑龙江大学助理研究员。

2.2 试验方法

2.2.1 外植体的消毒处理 首先用手术刀将甜菜种子的外壳剥去,保证种胚完整。在超净工作台内采用常规方法对种子进行灭菌,将种子倒入小烧杯中,加入 75%酒精表面灭菌 1min,无菌水冲洗 2~3 次,0.1% HgCl₂ 灭菌 8min,无菌水冲洗 3~5 次。把灭菌后的种子(或种胚)接种在用水和琼脂配制的发芽培养基表面,每瓶放 10~15 粒种子,做好记录。接种后将种子放入恒温培养箱中 25℃ 恒温无光培养,待出芽后,胚轴长至 2cm 左右时,放入培养室见光培养。

2.2.2 培养基筛选 取无菌苗的叶柄,将其切成 0.5cm 长短,接种于 16 种按照正交设计配制的培养基中,置于 25℃、光强 2000lx、光照 16h 的培养室中培养,观察再生苗诱导情况,确定再生苗的诱导培养基。通过 30~40d 统计不定芽生成率,从中筛选最佳再生培养基。

2.2.3 甜菜不同基因型再生能力筛选 1) 将装有甜菜幼苗的果酱瓶的塑料纸打开,取出甜菜幼苗,置于垫有无菌滤纸的无菌培养皿内。2) 将茎尖接种于 MS 添加 0.5mg/L 6-BA 的增殖培养基中,进行扩繁。3) 取切割合适大小供试材料的叶柄、叶片,接种于 MS 添加 0.5mg/L 6-BA、2.0mg/L KT、0.25mg/L NAA 的培养基中,放在 25℃、光强 2000lx、光照 16h 的条件下培养,测试不同基因型甜菜再生能力差异。

2.2.4 甜菜不同外植体再生能力比较 选取再生能力较强的甜菜基因型材料,培养无菌苗。分别取其子叶、下胚轴、叶片以及叶柄,叶柄、下胚轴切取长度约 0.5cm、叶片和子叶切取 0.25cm×0.25cm 大小,接种于诱导分化培养基上,2 周后开始统计植株再生情况。

3 结果与分析

3.1 培养基的筛选

已有的研究表明,甜菜组织培养研究中一般采用 MS 培养基作为基本培养基,配合不同种类、浓度的植物生长调节物质。本试验采用正交设计方法设计再生诱导培养基,旨在筛选适宜的再生培养基植物生长调节物的配比。试验中采用同一品种甜菜叶柄作为外植体,接种到设计好的 16 种培养基中进行再生植株的诱导,30d 后观察叶柄外植体的再生率,结果见表 3。由表 3 可以看出 MS-5 培养基的再生频率最高,达到 9.21%。植株再生不仅与细胞分裂素和植物生长素的比值有关,而且还与其含量相关,培养基中细胞分裂素和生长素的比例与含量是获得较高再生率的关键。

3.2 甜菜不同基因型再生能力差异比较

甜菜的植株再生与基因型之间的关系十分密切,采用再生能力强的基因型甜菜品种(品系)可以获得数量较多的再生植株,为以后进一步开展基因工程研究打好基础。本研究选用 10 份不同基因型的甜菜作为起始材料,培养无菌苗,在增殖扩繁后,取各材料叶柄接种于 MS-5 的诱导分化培养基上,培养 20d 左右后调查其诱导情况,调查结果见表 4。由表 4 可以看出,各材料之间再生率存在明显差异,在采用的 10 种基因型甜菜中,06-5、06-7 和 06-9 的再生频率较高,分别达到 11.11%、8.89% 和 7.50%。

3.3 甜菜不同外植体再生能力差异比较

作物组织培养快速繁殖研究的第一步工作就是要有适合培养的起始材料,选择再生能力强的外植体。外植体选择应符合取材容易、再生能力强、数量大等特点。因此,对不同外植体再生能力进行

表 2 培养基加植物生长调节剂浓度配比

培养基序号	KT	6-BA	NAA
MS-1	1	1	1
MS-2	1	2	2
MS-3	1	3	3
MS-4	1	4	4
MS-5	2	1	2
MS-6	2	2	1
MS-7	2	3	4
MS-8	2	4	3
MS-9	3	1	3
MS-10	3	2	4
MS-11	3	3	1
MS-12	3	4	2
MS-13	4	1	4
MS-14	4	2	3
MS-15	4	3	2
MS-16	4	4	1

表 3 培养基筛选结果

培养基	接种数 (个)	再生苗数 (株)	再生率 (%)
MS-1	78	2	2.56
MS-2	65	2	3.08
MS-3	90	2	2.22
MS-4	80	0	0.00
MS-5	76	7	9.21
MS-6	71	4	5.63
MS-7	85	1	1.18
MS-8	83	2	2.41
MS-9	90	5	5.55
MS-10	87	3	3.45
MS-11	65	1	1.54
MS-12	74	3	4.05
MS-13	91	3	3.30
MS-14	82	4	4.88
MS-15	77	2	2.60
MS-16	84	1	1.19

表 4 不同基因型甜菜叶柄再生能力比较

培养基	接种外植 体数(个)	再生苗数 (株)	再生率 (%)
06-1	80	3	3.75
06-2	85	2	2.35
06-3	70	2	2.86
06-4	65	3	4.62
06-5	90	10	11.11
06-6	80	4	5.00
06-7	90	8	8.89
06-8	75	4	5.33
06-9	80	6	7.50
06-10	90	3	3.33

比较,确定再生能力高的外植体十分必要。本研究采用再生能力较强的3个基因型甜菜,比较子叶、下胚轴、叶片和叶柄4种外植体。结果叶柄的诱导率是最高的,分别达到11.67%、9.09%和8.00%,平均9.60%(见表5)。因此可以确定,甜菜叶柄是较为理想的组织培养外植体。

4 讨论

品种的基因型、培养基、外植体材料和培养条件是影响组织培养植株再生体系的4个主要因素。不同的培养基可以使组织分化再生率有明显的差异。培养基筛选是研究植物再生的关键,培养基不仅提供植株生长的必需营养,而且调节植株细胞渗透压、酸碱度和供给水分。固体培养基中添加的琼脂对植物材料起到了支撑的作用。甜菜的植株再生与基因型之间的关系十分密切,采用再生能力强的基因型甜菜品种可以获得数量较多的再生植株。本研究由于甜菜基因型的不同,在诱导植株的再生频率上就有明显不同的差异。培养基之间的差异也随着基因型的不同产生很大的变化,这种差异也体现了基因型与培养基之间的互作效应。10种不同基因型的甜菜中,06-5、06-7、06-9这3个材料的再生频率明显高于其它材料,再生频率分别达到了11.11%、8.89%和7.50%。这些数值虽然与其它作物的再生频率比低很多,但与以往报道的甜菜组培再生频率方面的数值比还是比较高的。本试验在10个不同的甜菜品系中,通过基因型选择、培养基筛选以及不同外植体再生能力的测定,从10个材料中确定了3个再生能力较强的基因型,筛选出适合于植株再生的培养基组合(MS+0.5mg/L 6-BA+2.0mg/L KT+0.25mg/L NAA),验证了甜菜叶柄外植体再生能力较强的结论,叶柄外植体的再生诱导率最高达到11.67%。

植物生物技术作为农作物遗传改良的高新手段之一,在21世纪现代农业的发展中,是维持高产、培育品质优良、营养价值高、抗病虫、抗逆的优良品种的技术基础。随着甜菜生物技术的发展、高新技术与常规育种的密切结合,产业化与基础研究并重,成熟技术尽快产业化,甜菜生物技术作为传统育种技术的发展和补充,有可能解决传统技术无法解决的问题,其在创制甜菜新种质、提高甜菜育种水平、发展我国甜菜制糖工业等方面必将发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 黄彩云,邵明文,张悦琴.甜菜种株腋芽的培养[J].中国甜菜,1991(2):1-4.
- [2] 李宏潮,杨晓辉,胡道芬,等.冬小麦原生质体培养及植株再生[J].植物学报,1991,33(9):706-711.
- [3] 覃建兵,何光源.不同小麦基因型及其不同外植体离体培养研究初探[J].华中农业大学学报,2001,20(6):522-527
- [4] 郝秀英,于嘉林,王燕飞,等.新疆甜菜品种(系)基因转化和再生体系的建立[J].中国糖料,2002(4):5-7
- [5] Lux H, Herrmann L, Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules[J]. Plant Breeding, 1990,104: 177-183.
- [6] Hall, R. D., T. Riksen-Bruinsma, G. J. Weyens, I. J. Rosquin, P. N. Denys, I. J. Evans, J. E. Lathouwers, M. P. Lefebvre, J. M. Dunwell, A. van Tunen & F. A. Krens. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells[J]. Nature Biotechnology, 1996,14: 1133-1138.

Regeneration Capacity Study on Different Genotype and Explants of Sugarbeet

ZHENG Hong

(Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

Abstract: Ten different sugarbeet genotypes were selected in culture medium, and the regeneration capacity of their explants was test. The results showed that the regeneration capacities of three sugarbeet genotypes (06-5, 06-7 and 06-9) were strong. The culture medium components for fitting plant regeneration were 0.5mg/L 6-BA, 2.0mg/L KT and 0.25mg/L NAA. The study further indicated that the regeneration capacity of sugarbeet leaf explants were comparatively strong.

Key words: Sugarbeet; Genotype; Explant; Tissue culture

表5 甜菜不同外植体植株再生诱导结果

材料	外植体	接种外植体数(个)	再生苗数(株)	再生率(%)
06-5	叶片	110	3	2.73
	叶柄	120	14	11.67
	子叶	67	2	2.99
	下胚轴	81	3	3.70
06-7	叶片	132	3	2.27
	叶柄	110	10	9.09
	子叶	72	2	2.78
	下胚轴	80	2	2.50
06-9	叶片	118	2	1.69
	叶柄	125	10	8.00
	子叶	90	2	2.22
	下胚轴	87	2	2.30
平均	叶片	120	3	2.23
	叶柄	118	11	9.60
	子叶	76	2	2.66
	下胚轴	83	2	2.83