

甜菜组织培养直接器官发生和植株再生

郝秀英¹,周勃²,王燕飞³,李大伟²,狄月华¹,孙立军⁴,张立明³,闫建庆³

(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所,新疆 乌鲁木齐 830000;

2. 中国农业大学农业生物技术国家实验室,北京:100089;

3. 新疆农业科学院经济作物研究所,新疆 乌鲁木齐 830000;4. 新疆农业大学,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:根据甜菜营养生长的特点,通过在 MS 培养基中添加植物激素 BA 和 NAA 或 IBA,建立了由茎节和叶子两种外植体的直接器官发生再生植株的技术。

关键词:甜菜;直接器官发生;植株再生

中图分类号:S566.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0551(2006)01-0019-03

甜菜是重要的糖料作物之一,由甜菜生产的食糖约占世界食用糖量的 30%,甜菜在农业生产中占有重要地位。甜菜还是重要的可再生资源作物以及营养价值丰富的饲料作物,在液体燃料生产和畜牧业发展中有着光明的前景。

从培养细胞、组织、器官再生出植株的离体培养技术是运用基因操作对作物和种质资源进行改良的前提^[10]。由于甜菜的多种外植体的愈伤组织诱导率都相当低,愈伤组织分化频率也很低,而且受基因型和品种差异的影响很大,所有这些都一定程度上限制甜菜转基因植株的获得^[2]。本实验通过对甜菜营养生长——丛生叶的特点分析和离体培养及影响因子的研究,掌握了甜菜直接器官发生再生植株的技术,克服了诱导愈伤组织的困难。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用甜菜种子由新疆农业科学院经济作物研究所甜菜育种课题和内蒙古甜菜制糖工业研究所提供,共计 6 份,名称分别为 W7208、WJZSL-7、WZE-2(2n)、CGM-NM-1-3、CGB-1 和 722(内蒙)。

实验以 MS 作为基本培养基。

1.2 方法

1.2.1 敲碎果壳剥种子 将不同甜菜种子的种球

用工具轻轻砸开,选择并剥出完整无缺、不受伤害、发育饱满的种子。

1.2.2 种子消毒 在无菌条件下,种子消毒先用 70%乙醇消毒 30s,接着用 7.5%NaClO 溶液浸泡 8~10min,或者用 0.1%HgCl₂ 溶液浸泡 6~8min,沥干 NaClO 或 HgCl₂ 液体后再用灭菌水漂洗 4~6 次,之后接种于 1/2MS 培养基上使其长出无菌苗。

如果用这种消毒方法长出的无菌苗污染较多,可用下面的方法进行种子消毒。将种子先用 70%乙醇消毒 30s,接着用 0.1%HgCl₂ 溶液浸泡 6~8min,沥干 HgCl₂ 液体后用 15% H₂O₂ 溶液或者 7.5%NaClO 溶液浸泡 20~30min,沥干 H₂O₂ 或 NaClO 液体后再用灭菌水漂洗 4~6 次,即得到消毒的种子,然后接种于 1/2MS 培养基上使其长出无菌苗。

1.2.3 外植体制备

(1)茎节外植体的制备:对生长 7d 的无菌苗,切下含子叶、子叶节和 0.5~1.0cm 下胚轴的无菌苗上部,转接于 MS+BA1.0mg/L+NAA0.2mg/L+蔗糖 30g/L 培养基上,20~30d 后在原先子叶节处形成膨大的茎节,上面长着分枝的芽和叶子,在靠近茎节或分枝芽基 1~1.5mm 处齐刀剪去上部,并修剪茎节下部,从而获得 3~4mm 长的茎节外植体备用。

(2)叶子外植体的制备:制备茎节外植体时剪下的叶子,即可当作叶子外植体来用。

1.2.4 培养基配制 根据需要利用 MS 培养基母液配制成所要求的培养基,添加或除去不同的激素,用 1mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 为 5.8~6.0,加 0.8%琼脂粉,用三角瓶分装后在 1.1kg/cm²

收稿日期:2005-05-13

作者简介:郝秀英(1964-),女,新疆农业科学院微生物应用研究所,副研究员,在职博士,主要从事植物细胞工程研究工作。

压力(约 121℃)灭菌 15~20min。

1.2.5 培养条件 外植体接种于培养基后,置于温度为 22~24℃、光周期为 16h(昼)/8h(夜)光照培养室中,根据需要培养的天数进行转接。

2 结果和讨论

(1)甜菜为聚花果,一般由 3~5 个,多则 7~10 个果实聚合而成。但是在甜菜品种类型中,尚有非聚花果的单粒种(单芽种),即在每一种球中仅有一粒种子。除单粒种外,一个聚花果经过剥壳应该获得 3~5 个种子,但是在大多数情况下只能获得 2 个种子,少数情况下得到 4 个以上。这与甜菜种球质量关系较大,剥壳敲砸时用的力也有关系。若种球生长发育正常、饱满就可以获得多个种子;若果实发育受阻就只能得到较少的种子,甚至没有,若敲砸时用力过猛,种仁受伤或破碎,就不能使用,播种也只会长出畸形苗。

(2)与郝秀英等^[3]报道的对甜菜种球在消毒前用浓硫酸蚀刻处理相比,利用对剥果壳后的种子进行消毒,效果非常好,污染率低,并且出苗整齐、出苗率高、出苗周期短(见表 1)。而用浓硫酸蚀刻处理必须把握好处理的时间,否则严重影响种子出苗率,就是蚀刻处理后由于种子外表依然存在肉眼难以分辨的凸凹不平,产生污染几率仍然很大,同时由于蚀刻处理时浓硫酸的烧灼,导致出苗严重不齐。本试验所述的在消毒前对种子进行破壳处理的方法,可以作为甜菜和其它带壳植物种子获得好的消毒效果、高的出苗率、短の出苗周期的借鉴。但是,对于单粒种不必敲砸剥果壳,只需用浓硫酸蚀刻处理掉种球的棱角,然后进入消毒程序即可,因为敲砸剥果壳极易造成种子受伤,耗种量较大,并且费工、费时。

表 1 甜菜种球在消毒前使用不同处理方法的出苗情况

试验材料	浓硫酸蚀刻			敲砸剥果壳		
	播种数 (个)	出苗数 (株)	出苗所需 时间(d)	播种数 (个)	出苗数 (株)	出苗所需 天数(d)
CGB-1	40	16	15	40	28	7
W7208	40	22	20	40	31	9
CGB-NM-1-3	40	25	25	40	33	10
722	40	20	18	40	30	7

另外,本实验对带菌的种子采用除 70%乙醇外的两种消毒剂连续消毒的方法,获得较好的消毒

效果、低的毒害影响、高的出苗率,避免了对种子要获得好的消毒效果而延长 $HgCl_2$ 溶液的作用时间,造成 $HgCl_2$ 对胚芽点毒害的加重,导致出苗率大大下降的问题。

(3)从茎节和叶子外植体分别再生植株的流程见图 1 和图 2,再生植株数的统计见表 2。

种球敲砸剥果壳获得种子,种子消毒

7~10d ↓ 1/2MS培养基
无菌苗的上部
20~30d ↓ MS培养基+BA 1.0mg/L+NAA 0.2mg/L+蔗糖30g/L
茎节外植体
30d ↓ MS培养基+BA 0.2mg/L+NAA 1.0mg/L+蔗糖30g/L
无根苗
20~30d ↓ 1/2MS培养基+IBA 3mg/L+蔗糖30g/L
生根
5~7d ↓ 暴露试管苗于空气,珍珠岩:土为3:1的基质
炼苗移栽

图 1 由茎节外植体再生植株的流程

种球敲砸剥果壳获得种子,种子消毒

7~10d ↓ 1/2MS培养基
无菌苗的上部
20~30d ↓ MS培养基+BA 2.0mg/L+NNA 0.2mg/L+蔗糖30g/L
叶子外植体
30d ↓ MS培养基+蔗糖30g/L+BA或(BA+NAA)或(BA+IBA)
不定芽
20~30d ↓ MS培养基
壮苗
20~30d ↓ 1/2MS培养基+IBA 3mg/L+蔗糖30g/L
生根
5~30d ↓ 暴露试管苗于空气,珍珠岩:土为3:1的基质
炼苗移栽

图 2 由叶子外植体再生植株的流程

表 2 两种外植体再生植株数的统计

试验材料	茎节外植体			叶子外植体		
	外植体数 (个)	获得植株数 (株)	再生植株率 (%)	外植体数 (个)	获得植株数 (株)	再生率 (%)
CGB-1	15	37	71.2	15	90	85.7
W7208	15	43	74.1	15	105	87.5
CGB-NM-1-3	15	40	72.7	15	135	90.0
722	15	65	81.3	15	130	89.7

由图 1、图 2 和表 2 可见,一个茎节或叶子外植体可以在 3~4 个月的时间内平均再生出 3~7 倍的植株来,再生植株的频率很高,并且在再生植株的过程中无愈伤组织产生。植物组织培养再生途径有两条,即器官发生途径和体细胞胚发生途径。每条途径又有两种再生方式,即直接器官发生方式和间接器官发生方式,直接体细胞胚发生方式和间接体细胞胚发生方式;间接发生方式需要经过愈伤组织阶段,直接发生方式无愈伤组织产生^[6]。因此,可以认为本实验是通过直接器官发生方式再生植株的,这与间接发生方式相比,其优势在于降低了产生体细胞变异的概率,缩短了从外植体到获得完整植株的周期,确保克隆的再生植物的遗传稳定

性^[10]。

由于甜菜的丛生叶生长特点,使得每个叶腋处都有腋芽存在或可以在叶柄基部重新再生出腋芽^[1,5]。同时,每个腋芽在外源植物细胞分裂素的刺激作用下会分裂出多个芽^[8]。虽然在叶子结构中有由全能性细胞组成的分生组织,在外源植物激素的作用下可以分化出不定芽,但是叶子中分生组织的分化程度、多少、位置受基因型影响很大。然而,对于本实验建立的茎节外植体再生植株技术几乎不受基因型的影响,并且再生周期短、可重复性好,再生频率高。用植物激素 BA 从叶子外植体能够高频率诱导不定芽,这与张剑峰等^[7]的实验结果一致,与 Zhang Chunlai 等^[9]的实验结果有分歧。

(4)通过在培养基中添加 BA,由叶子外植体诱导不定芽发生再生植株受基因型限制(见表3)。

表3 不同甜菜材料的叶子外植体诱导不定芽发生的培养基配方比较和再生频率

材料名称	诱导不定芽发生的培养基组成	再生频率 (%)
CGB-1	MS+BA 4.0mg/L+IBA 0.5mg/L	85.7
CGB-NM-1-3	MS+BA 4.0mg/L+IBA 0.5mg/L	90.0
WZE-2(2n)	MS+BA3.0mg/L或MS+BA 4.0mg/L+NAA0.5mg/L	87.0
W7208	MS+BA 3.0mg/L或MS+BA 7.0mg/L+NAA 0.5mg/L	87.5
WJZSL-7	MS+BA 1.0mg/L或MS+BA 5.0mg/L+IBA 0.5mg/L	88.7
722	MS+BA1.2mg/L+NAA0.2mg/L	89.7

由表3可见,不同的甜菜材料只有筛选到合适的激素浓度、种类和配比,才能通过诱导不定芽获得再生植株,也说明植物激素 BA 从叶子外植体诱导不定芽是受基因型限制的。

(5)试管苗的炼苗移栽 按照本试验所述的再生植株程序培育出的试管苗健壮,根系发达,再加上甜菜本身具有的抗逆性,只要将具有根、茎、叶完整的试管苗移栽入珍珠岩:土为1:3比例的较疏松的基质中,不需要遮荫处理就可以成活,成活率可达90%以上。

参考文献:

- [1]白书农.植物发育生物学[M].北京:北京大学出版社,2003.
- [2]傅荣昭,孙勇如,贾士荣.植物遗传转化技术手册[M].北京:中国科学技术出版社,1994年.
- [3]郝秀英,于嘉林,王燕飞,等.新疆主栽甜菜品种(系)的基因转化和再生体系的建立[J].中国甜菜,2002,(4):5~7.
- [4]黄学林,李菽菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [5]薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001.
- [6]张剑峰,李天然,邓香兰.高效诱导甜菜再生植株的研究[J].生物工程学报,1997,13(3):273~278.
- [7]Sulekha Hazra, Dinesh C. Agrawal, Anjan K. Banerjee, et al. Induction of Multiple Shoots and plant Regeneration from 'Accessory Buds' of Nodal Segments from Field - Grown Mature Cotton Plants (*Gossypium hirsutum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2001, 37: 830~834.
- [8]Zhang Chun - Lai, Chen Dong - Fang, Malcolm C. Elliott, et al. Thidiazuron - Induced Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2001, 37: 305~310.
- [9]Zhang Chun - Lai, Chen Dong - Fang, Malcolm C. Elliott, et al. Efficient Procedures for Callus Induction and Adventitious Shoot Organogenesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Breeding Lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2004, 40: 475~481.

Production of direct organs and plant regeneration in sugarbeet tissue culture

HAO Xiu - ying¹, ZHOU Bo², WANG Yan - fei³, LI Da - wei², DI Yue - hua¹, SUN Li - jun⁴,
ZHANG Li - ming³, YAN Jian - qing³

(1. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Ulumuqi, 830000;

2. China Agriculture University, Beijing, 100091;

3. Institute of Economical Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Ulumuqi, 830000;

4. Xinjiang Agriculture University, Ulumuqi, 830000)

Abstract: By adding plant hormone BA and NAA or IBA to MS medium, a tissue culture technique inducing direct organogenesis and plant regeneration in sugar beet from stem nodes and leaves explants was suggested in this paper.

Key words: sugar beet; direct organogenesis; shoot regeneration