

高效诱导甜菜再生植株的研究

张剑峰

李天然* 邓香兰

(内蒙古甜菜制糖工业研究所 呼和浩特 010070) (内蒙古大学生物系 呼和浩特 010021)

摘 要 研究了栽培甜菜(*Beta vulgaris* L.) 4 倍体品系 405 叶柄外植体的离体培养, 成功地建立了一套高频率诱导再生芽的程序。外植体取自生长在改良 MS(MSB) 附加 BA 和 NAA 或者单加 BA 的培养基中, 经过 30d 以上预培养后的幼苗叶柄, 在 MS 附加 BA 1.0mg/L 或 NAA 0.3mg/L, BA 1.0mg/L 培养基上直接诱导再生芽, 并发育成苗, 诱导频率最高可达 51.3%。在 1/2MS(MS 培养基大量元素减半) 附加 NAA 0.5~1.0mg/L 的培养基上诱导生根, 这一程序为甜菜扩大繁殖和遗传转化提供了一个良好的试验系统。

关键词 甜菜, 叶柄, 离体培养, 再生植株

由于甜菜栽培驯化时间较短^[1], 加上它又是一种 2 年生的异交作物, 遗传背景狭窄, 资源贫乏。特别是自交高度不亲和性, 往往使得优良单株基因型很容易丢失, 给优良品种选育材料的繁殖和保存带来了不少的困难。现代生物工程技术的发展及在甜菜上应用, 给甜菜育种方法开辟了一条新途径。自 Margara J 用甜菜 2 年生种株花芽离体诱导产生不定芽以来, 许多研究者, 相继报道了用不同外植体进行离体培养。但从愈伤组织诱导再生植株并不容易^[2~5], 而成功再生芽则仅限于一些采用花芽培养的报道中^[6~8]。De Greef^[9]报道了一种改进的培养基, 使一个株系的愈伤组织产生了芽。Tetu. T 等^[10]应用 TIBA(2,3,5-三碘苯甲酸) 生长素抑制剂, 利用叶柄、胚轴等外植体愈伤组织诱导出了芽, 并用无激素与激素交替法诱导了甜菜体细胞胚胎发生。Doley W. P^[11]利用无激素 MS 培养基, 从叶片上诱导愈伤组织, 并获得了再生植株。其诱导频率分别是: 愈伤组织 6.2%, 再生植株是 1.9%。Krens F. A *et al*^[12]采用了甜菜不同外植体诱导再生芽, 诱导频率最高的是叶柄为 5.29%。Hussey *et al*^[13]在培养中观察到老叶片上可直接产生芽。随后一些作者在甜菜叶外植体培养过程中发现不经过愈伤组织可以诱导出不定芽^[3,4]。Detrez^[14]采用 BA, NAA 和 TIBA 不同组合从叶柄上诱导出不定芽, 出苗率为 6.9% 并对其进行了组织学观察。虽然有关甜菜组织培养的报道日渐增多, 但除了以花序为外植体进行材料繁殖已在育种上应用外^[15]。其它外植体的应用由于受到诱导频率、重复性、基因型及内源激素平衡^[16]等复杂因素影响, 进展缓慢。我们采用甜菜四倍体品系 405 进行离体培养, 用转换培养基的方式, 建立了从叶柄, 整株试管苗叶柄高频率诱导不定芽再生的简便而有效的方法, 诱导频率可高达 51.3%, 为甜菜扩繁及遗传转化奠定了实验基础。

本项课题由国家自然科学基金资助。

* 通讯联系作者。

本文于 1996 年 4 月 15 日收到。

1 材料和方法

1.1 材料

栽培甜菜 4 倍体品系 405, 内蒙古甜菜制糖工业研究所提供。种子播于含石英砂的花盆中, 待种子发芽长出子叶后, 取完整苗接种于培养基中。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 取具两片叶子的幼苗作外植体, 用自来水冲洗 1h, 在无菌条件下, 用 0.1% HgCl_2 溶液, 加 1~2 滴 Tween80 浸泡 4~8min, 然后无菌水淋洗材料至少 3 遍。接种在培养基 MSB 中, (见表 1, P1~5), 或附加同样激素的 MS 培养基中(见表 1, A1~5)预培养, 培养基 MSB 是 Murashige and Skoog(MS)(1962)的无机盐, 加 Gamborg (B_5)的有机元素即肌醇 100mg/L, 烟酸 1.0mg/L, 盐酸吡哆醇 1.0mg/L, 盐酸硫胺素 10mg/L。

上述培养基均加 0.6% 琼脂、3% 蔗糖、MES 500mg/L、NaOH 调 pH 至 6.0, 1.5 kg/cm² 高压灭菌 20min, 在 2000lx 光照 24℃ ± 2℃ 下培养。

1.2.2 在预培养基中生长约 30d 左右的幼苗, 取其真叶叶柄(从基部包括与叶片连接处)、叶片及整株幼苗在 MS 的诱导培养基中, 诱导不定芽, (见表 1 A1~5)。

1.2.3 待不定芽长成 4~5 片叶子的幼苗时, 切下转入 1/2MS 生根培养基中(见表 1 的 R1~3), 诱导生根, 发育成完整植株。

表 1 预培养、诱导不定芽及生根培养的培养基配方

Table1 Composition of precultural media and media for inducing adventitious shoots and rooting

No. of media	Basal medium	Content of hormones mg·L ⁻¹	Function
P ₁	MSB	0	Preculture of seedlings
P ₂	MSB	BA 0.5	
P ₃	MSB	BA 1.0	
P ₄	MSB	BA 1.0 + NAA 0.3	
P ₅	MSB	BA 2.0 + NAA 0.3	
A ₁	MS	0	Shoot inducing
A ₂	MS	BA 0.5	
A ₃	MS	BA 1.0	
A ₄	MS	BA 1.0 + NAA 0.3	
A ₅	MS	BA 2.0 + NAA 0.3	
R ₁	1/2MS	0	Root inducing
R ₂	1/2MS	NAA 0.5	
R ₃	1/2MS	NAA 1.0	

1.2.4 植株移栽: 小苗基部长成白色粗壮根后, 幼苗正常生长 1 月时, 取出植株, 用自来水洗去根部琼脂块, 种植在石英砂: 泥炭土(1:1)花盆中, 罩烧杯保湿, 10d 后即可成活。

1.2.5 细胞学观察: 取芽尖放入饱和对二氯苯溶液中, 4℃ 过夜, 取出水洗。用乙醇: 浓盐酸(3:1)处理 3~5min, 压片, 用醋酸地衣红染色, 观察染色体数目。

2 结果与分析

2.1 预培养对幼苗生长的影响

在不同培养基及不同激素组合的预培养基上幼苗生长表现不同,表 2 示预培养一个月后的形态变化。在 MS 中幼苗生长速度较快,而且产生大量腋芽,在 20d 左右就长出 10 片以上真叶,叶柄及叶片伸长,长势很好。而在 MSB 中长到一定程度后,生长就变得缓慢了。苗型比 MS 中小的多,大部分叶柄短而粗,叶片小。在单独使用 BA 的 MS 中,幼苗生长到一定程度后往往苗基部变褐,从而影响幼苗生长。在有高浓度激素(BA2.0、NAA0.3mg/L)的 MSB 中生长也较快,叶柄伸长,而在同种激素的 MS 中则愈伤化现象严重,在没有激素的培养基中幼苗的叶柄细长,苗基部常见有大量的毛状细根。

表 2 不同培养基及激素组合对幼苗生长的影响

Table 2 The effects of media and hormone content on growth of seedling

Medium	No.	Hormone content	Growth of seedlings	Morphology of leaves and petioles
MSB	P1	0	Slow	Long petioles and normal leaves
	P2	BA 0.5	Slow	Short and thick petioles, petiolaceous leaves
	P3	BA 1.0	Slow, more axillary buds	Short and thick petioles, petiolaceous leaves
	P4	BA 1.0 NAA 0.3	Slow	Short and thick petioles, petiolaceous leaves
	P5	BA 2.0 NAA 0.3	Fast	Long petioles and swelling leaves
MS	A1	0	Fast	Thin and long petioles and normal leaves
	A2	BA 0.5	More quickly	Thicker and longer petioles and small leaves
	A3	BA 1.0	More quickly	Thick petioles and small leaves
	A4	BA 1.0 NAA 0.3	Quickly more axillary buds	Long petioles and normal leaves
	A5	BA 2.0 NAA 0.3	Fast more axillary buds	With long, thick petioles and swelling leaves

2.2 不定芽在外植体的发生

取在 MSB 中生长 1 月左右幼苗的叶柄为外植体,在 MS 培养基上诱导芽,结果见表 3。大部分来源于预培养中的叶柄外植体可诱导出不定芽,其中以在 MSB BA1.0mg/L 和 NAA 0.3mg/L(P4)组合中生长的幼苗的叶柄,在 A4 诱导培养基中诱导效果最好,以接种叶柄数与诱导生芽叶柄数统计其诱导率高达 51.3%。不定芽往往是在叶柄凹面(近轴面)上,成排发生,首先产生许多小突起继而发育成芽,每个叶柄可产生 1 到数个芽(见图版 I-1),在 A4 中这些芽生长速度很快,而且生长正常。来源于预培养中的叶柄化叶片更容易发生不定芽,不定芽常常是密集发生,呈丛生状。另外经过 P2 和 P3 预培养的苗和叶柄在 A3 中诱导率也较高,诱导率分别为 33.3% 和 32.6%,但不定芽生长缓慢。外植体在 A5 中很快膨大,产生的不定芽常常有愈伤化现象。在 A1 中诱导的不定芽生长比较正常,有时还有生根现象,但频率较低。预培养整株幼苗外植体由 P3 转到 A3 中或 P4 转到 A4 中也可诱导叶柄发生小突起,继而发生芽(见图版 I-3),每株上一些较老的叶柄都可产生不定芽。在试验中发现以整株幼苗作为外植体,诱导芽发生频率较以离体叶柄为外植体的高。来源于 P3(BA 1.0)中幼苗叶片转接在具同样激素的 A3 上诱导芽较好,芽常发生在叶脉处(见图版 I-2),39 个叶片有 6 个再生芽,诱导频率 15.4%。

表 3 不同预培养幼苗的叶柄在诱导培养基上诱导不定芽结果

Table 3 The generation of adventitious shoots, initiated from petioles of seedlings after different preculture

Media for preculture		A1	A2	A3	A4	A5
Media for shoot inducing	Results	BA 0	BA 0.5	BA 1.0	BA 1.0 NAA 0.3	BA 2.0 NAA 0.3
MSB ₀ (P1)	No. of explants inoculated	22	32	48	37	17
	No. of shoots induced	0	2	2	3	0
	Inducing rate	0	6.2	4.2	8.1	0
MSB BA 0.5 (P2)	No. of explants inoculated	19	25	21	26	19
	No. of shoots induced	2	4	7	2	0
	Inducing rate	10.5	16	33.2	7.7	0
MSB BA 1.0 (P3)	No. of explants inoculated	34	54	43	41	29
	No. of shoots induced	3	11	14	9	2
	Inducing rate	8.8	20.4	32.6	21.9	6.9
MSB BA 1.0 NAA 0.3 (P4)	No. of explants inoculated	37	26	49	39	47
	No. of shoots induced	4	3	13	20	3
	Inducing rate	10.8	11.5	26.5	51.3	6.4
MSB BA 2.0 NAA 0.3 (P5)	No. of explants inoculated	24	25	31	29	38
	No. of shoots induced	1	0	3	4	2
	Inducing rate	4	0	9.6	13.8	2.6

在 A4 培养基中诱导产生的不定芽,在继代培养过程中其展开叶的叶柄上又可再生不定芽,而新产生的不定芽的叶柄还可继续产生新的不定芽,在一株上有 3 级这样的芽,这种现象在无激素的 MS 培养基上也能维持 2~3 代,随后就消失了。这点为我们下一步转基因植株的无性快速繁殖提供了方法和条件。

2.3 生根和移植

选择具有 4~5 片叶的再生芽,转入 1/2MS 培养基中,在附加 NAA 0.5mg/L 或 1mg/L 的培养基中均可生根,结果见表 4。生根 20d 后,完整小植株即可移栽。不定芽长期在诱导芽的培养基上生长,对诱导生根不利。一般在含 NAA 1.0mg/L 的培养基上生长白色粗壮的根(见图版 I-4b),移栽后也容易成活(见图版 I-5)在 MS₀ 中也能生根,但根是细长的,移栽成活率稍低。

2.4 细胞学观察及再生小植株的形态特征

取再生芽尖固定、压片观察染色体数目,观察了来自 14 个再生株的 19 份材料,染色体数目均为 2N=36,没有发现混倍体和染色体数目减少的现象。再生小植株在形态上与正常 4 倍体植株类似,无异常表现(见图版 I-5)

2.5 植株田间表现

幼苗移栽到花盆成活 1 个月后,转移到田间,1995 年 6 月幼苗移入田间共 30 株,生

长正常,叶片繁茂,10月份收获块根(母根)26株,经冬贮母根保存正常,翌年春天栽植,抽苔开花并结籽,为正常的四倍体。

3 讨 论

研究表明预培养对外植体产生不定芽的影响很大,经激素处理后的整株叶柄和离体叶柄诱导不定芽均比较容易,提高了叶柄外植体诱导不定芽的频率,Miedema, P.^[17]曾报道直接取大

表 4 NAA 浓度对再生芽生根的影响
Table 4 Effect of concentration of NAA on rooting of regenerated adventitious shoots

Basal medium	NAA /mg·L ⁻¹	No. of regeneration shoots inoculated	Rate of rooting /%
1/2MS	1.0NAA	12	100
1/2MS	0.5NAA	17	98
1/2MS	0	7	70

田生长的叶片,在各种激素组合培养中没有分化能力。而 Saunders J. W *et al*^[18]等发现在大田子叶期喷施 BA,在其后产生的真叶中很易诱导不定芽。我们的试验结果与这一试验很类似。培养基的组成,特别是有机元素的组成对预培养后小植株诱导的作用也是不容忽视的,我们的试验表明 MSB 比 MS 效果要好,此点值得进一步深入研究。

我们采用 BA 与 NAA 组合的 P4 培养基,长时期培养幼苗,其叶柄诱导不定芽效果最好,而且随着继代次数的增加,芽的诱导就更加容易,这说明甜菜诱导芽发生时需维持一定量的生长素和细胞分裂素的比例平衡,适当的细胞分裂素和生长素配合如 BA1.0mg/LNAA0.3mg/L 不但诱导频率高,而且再生芽发育良好。在降低到无激素培养基上,叶柄发生芽的作用会逐渐消失。这表明维持在一定浓度激素水平与配比时,对芽的诱导才起有效作用。这在沿海甜菜的研究上取得的结果一致^[20]。生长素与细胞分裂素配比不当,常使芽的形态发生变化,Sabir^[21]也有过报道,我们也观察到高浓度的 BA 易产生愈伤化幼苗。

不定芽往往在叶柄凹面上成排簇生,而且更多发生于叶片与叶柄连接,转换部位,这种特定位置上芽的发生,石建明(1991)^[22]也有过报道,但是为何产生这种现象,其机理还有待进一步探明。

在预培养过程中,叶片边缘缩小形成叶柄化的现象,这种表型变异在甜菜其它培养过程中是罕见的,而我们发现这种表型的叶柄更加容易诱导分化。但我们观察染色体数目并未发生变化。所以我们推测培养基中的维生素含量的增加促进了这种表型的变化也提高了愈伤组织的生长和分化的能力,此点还有待进一步的证明。不定芽上的叶柄的继代过程中,可连续数代诱导再生不定芽,这就为转基因植株或优良品系的大量无性繁殖,保存优良遗传特性提供了一个良好的实验方法和手段。

通过上述预培养幼苗再转入诱导培养基中直接诱导不定芽再生小植株的程序,为甜菜资源保存和快速繁殖及进一步的转基因工作建立了一套良好的实验系统。

参 考 文 献

- [1]孙振国. 甜菜糖业——甜菜分册,1986(1):24.
- [2]Margara L. CR Acad Sci Paris. 1970, 270:698.
- [3]Butenko R G, Atanassov A, Urmantseva W. Phytomorphology, 1973, 22:140.

- [4] Hooker M P, Nabors M W Z. *Pflanzenphysiol.* 1977, **84**:237.
- [5] Van Geyt J P C, Jacobs M. *Plant Cell Rep.* 1985, **4**:66.
- [6] Coumans—Gilles M F, Revers C, Courmans M et al. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 1981, **1**:93.
- [7] Margara J, CR Acad Sci Paris 1971, **285**:1041.
- [8] Saunders J W. *Crop Sci.* 1982, **22**:1102.
- [9] De Greef W, Jacobs M. *Plant Sci Lett.* 1979, **17**:77.
- [10] Tetu T, Sangwan P S, Sangwan—Norree B S. *J Exp Bot.* 1987, **38**:505.
- [11] Doley W P et al. *Plant Cell Rep.* 1989, **8**:222.
- [12] Krens F A, Jamar D. *J Plant Physiol.* 1989, **134**:651.
- [13] Hussy G, Hephher A. *Ann Bot.* 1978, **42**:477.
- [14] Detrez C, Tetu T, Sang wan RS et al., *J Exp Bot* 1988, **204**:917.
- [15] Mezei Z et al. *J of Sugar Beet Res.* 1990, **27**(3~4):90.
- [16] Jacq B et al. *Plant Breeding*, 1993, **110**(3):185.
- [17] Miedema P Groot P S, Zuidgeest J H M et al. *Euphtica.* 1980, **29**:425.
- [18] Saunders J W, Mahoney M. *Euphtica.* 1982, **31**:801.
- [19] 张剑峰、王秀荣、卫群等. *中国甜菜糖业*, 1993, **2**:90
- [20] Sabir A A et al. *Journal of Biotechnology*, 1991, **17**(3):257.
- [21] 石建明、朱至清、王伏雄. *甜菜糖业通报*, 1991, **3**:1.

High Efficient Induction of Sugar Beet Plant Regeneration

Zhang Jianfeng

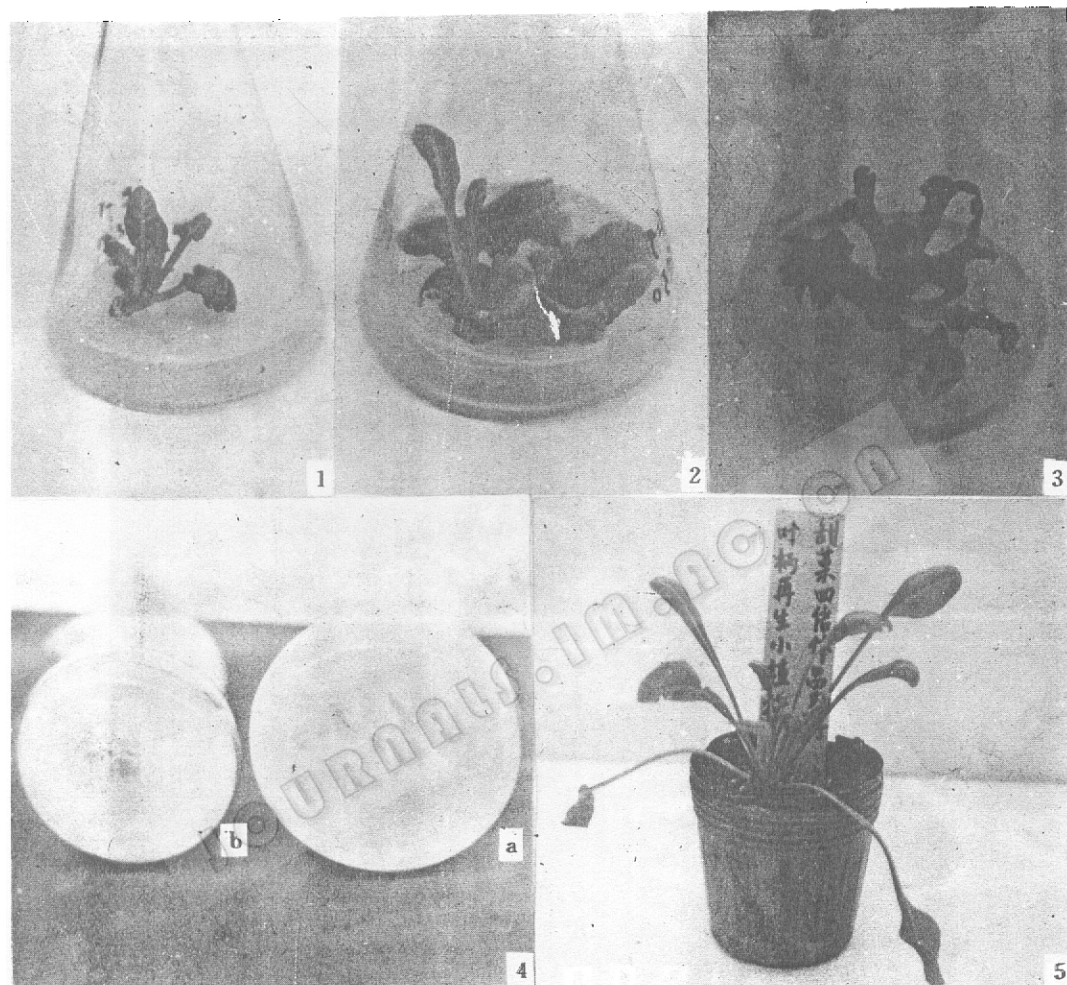
(*Sugarbeet and Sugar Industry Research Institute of Inner Mongolia, Huhehaote* 010070)

Li Tianran Deng Xianglan

(*Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhehaote* 010021)

Abstract A method for high frequency *in vitro* regeneration of adventitious shoots from petiole explants was established on a tetraploid breeding line 405 of *Beta vulgaris* L. Plant regeneration was obtained by direct bud formation from petioles. Explants were precultured in a medium containing MS inorganic salts supplemented with Gamborgs' B5 vitamins, named MSB. Adventitious shoots were developed when petiole explants excised from 20~30 days old seedlings grown on MSB containing 0.3mg/L naphthalene acetic acid (NAA), 1.0mg/L 6-benzylaminopurine (BA) and then were cultured on MS with 0.3mg/L NAA, 1.0mg/L BA. Shoots rooted on half-strength MS medium containing 0.5~1.0mg/L NAA. This procedure of the culture method may be very useful both for multiplication of sugarbeet and for introducing foreign genes into *Beta vulgaris*.

Key words *Beta vulgaris* L, explant, petiole, *in vitro*, plant regeneration



1,3. The regenerated adventitious shoots from petioles and intact seedlings on MS-medium supplemented BA 1.0mg/L and NAA 0.3mg/L, respectively .

2. The regenerated adventitious shoots from leaves on MS medium supplemented BA 1.0mg/L

4. a, b. Root inducing of regenerated shoots on 1/2 MS medium supplemented NAA 0.5mg/L or NAA 0.1mg/L

5. The regenerated plant of sugarbeet in pot