

# 甜菜组培快繁及植株再生的研究

牛素清, 白 晨, 张惠忠, 赵尚敏, 付增娟, 李晓东, 轩继雨, 李树生

(内蒙古农牧业科学院 甜菜研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031)

**摘要:**以甜菜 8 个品系种子、幼苗的茎节、茎尖、叶片(带叶柄)、腋芽等作外植体, 对甜菜快繁、植株再生以及再生植株的移栽等技术进行了研究。结果表明, 不同外植体在 MS + 6-BA 0.8~1.5mg/L + NAA 0.2~0.3mg/L 培养基上, 诱导效果最佳, 而且幼苗生长健壮。生根培养在 MS + NAA 1.0~1.5mg/L 或 MS + NAA 1.0~1.2mg/L + IBA 0.2mg/L 上, 生根率可达 85% 以上, 且根系发达, 再生植株的移栽成活率达 90% 以上。建立了甜菜组培快繁及植株再生的技术体系, 同时该再生体系可作为基因转化的受体系统。

**关键词:**甜菜; 组织培养; 快繁; 植株再生

中图分类号: S566.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007) 专辑-0016-04

## Study on Rapid-Multiplication in Vitro and Plantlet Regeneration of Sugerbeets

NIU Su-qing, BAI Chen, ZHANG Hui-zhong, ZHAO Shang-min, FU Zeng-juan,  
LI Xiao-dong, XUAN Ji-yu, LI Shu-sheng

(Sugarbeet Institute, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot  
010031, China)

**Abstract:** Four kinds of explants including seeds, stem segments of seedling, shoot tips with petioles, leaves and axillary bud of eight sweet beets strains were used to study the rapid-multiplication, the regeneration of plantlets, plat transplanting of plantlets in vitro. The results showed: MS+6-BA 0.8~1.5mg/L+NAA 0.2~0.3mg/L is the best medium for regenerated plantlets induction to all kinds of explants, and the plantlet grows robust. Using MS+NAA 1.0~1.5mg/L or MS+NAA 1.0~1.2mg/L+IBA 0.2mg/L as rooting culture media, the rooting rate will be more than 85%, and root is developed, the survival rate of regenerated plantlets reaches more than 90%. A series of plantlet regeneration and rapid-multiplication in vitro system of sweet beet has been set up, which can also be used as receptor system for gene transfer.

**Key words:** Sugarbeet; Tissue culture; Plantlet regeneration; Rapid-Multiplication

甜菜是我国重要的糖料作物之一, 我国主要分布在东北、华北、西北地区, 为二年生异花授粉作物, 由于其具有自交不亲和性, 用有性繁殖方法很难保持优良的基因型特性, 影响了常规育种中优良基因型的繁殖和保存<sup>[1]</sup>。利用植物组织培养技术进行快速繁殖来解决上述问题, 是国内外普遍采用的一条途径和方法, 同时, 组织培养也是甜菜遗传转化必不可少的技术支撑<sup>[2]</sup>。本试验经过四年时间, 探索出一套甜菜高效诱导再生植株的方法, 建立了从组培苗到大田采种、株系比较的一系列甜菜快速

扩繁技术措施, 为甜菜的遗传转化和新品种选育奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

甜菜高糖品系 AB19/120, 高抗性品系 N98122, 饲料甜菜新品系饲黄、饲红, 单粒不育株 HBB-1, 单粒保持系 960764、960766、960767。

#### 1.2 取材方法

将甜菜种子(去壳), 种植于花盆和大田中的幼

收稿日期: 2007-11-12

基金项目: 国家“863”资助项目

作者简介: 牛素清(1972-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 助理研究员, 内蒙古农业大学硕士研究生, 主要从事甜菜遗传育种工作。

苗的茎节、茎尖、叶片(带叶柄);二年生种株腋芽等作外植体,将样品在自来水下冲洗 30min,在超净工作台上,用 70%乙醇消毒 30s,接着用 0.1% $\text{HgCl}_2$  溶液灭菌 3~8min(因材料而定),灭菌水冲洗 3~5 次,切成 0.5~1.0cm 小段,接种到诱导培养基上培养。种子接种于 1/2MS 培养基上,待苗长到 3~5cm 时切段,再接种到诱导培养基上培养。

1.3 培养基及培养条件

培养基配方参考张剑峰等<sup>[9]</sup>的方法,略有改动。诱导培养基为 MS+不同种类及浓度的激素+30g/L 蔗糖+6g/L 琼脂粉(表 2),培养基 pH 值 5.8~6.0, 121℃高温灭菌 20min。外植体接种后,置于温度为 25±2℃、12h/d 光照下培养,丛芽发生后每 15~20d

继代 1 次,待到分化芽长至 2~3cm 高时,切下移入 1/2MS 生根培养基上诱导生根成苗,其余丛生芽继续继代培养,从而达到扩繁的目的。

2 结果与分析

2.1 不同外植体消毒灭菌效果比较

不同的外植体用 0.1% $\text{HgCl}_2$  溶液消毒,灭菌时间不同,消毒灭菌的效果不同,其中种仁消毒时间在 5min 左右,茎节、茎尖、叶片(带叶柄)4~6min,二年生种株腋芽 6~8min,消毒灭菌后污染率低,外植体死亡或畸形率低,成活率较高,灭菌效果好(表 1)。灭菌时间长短与组织的幼嫩程度有关,幼嫩的

表 1 不同外植体消毒效果比较  
Tab.1 Comparison of sterilization efficiencies different explants

外植体	灭菌时间(min)	污染率(%)	死亡或畸形率(%)
种仁	3	80.5	4.7
	5	30.3	20.2
	10	3.8	85.4
茎节、茎尖、叶片(带叶柄)	2	60.4	4.5
	4	15.6	7.7
	6	8.7	11.8
腋芽	4	57.8	2.4
	6	25.3	8.5
	8	11.3	15.6

外植体灭菌时间较短;反之,则稍长。

2.2 影响诱导分化的主要因素

2.2.1 培养基对诱导率的影响 15 种诱导培养基(表 2)都能不同程度地诱导出再生芽(表 3、图 1)。试验结果表明,随着 6-BA 浓度的增加,诱导分化能力也增强,但如果 6-BA 浓度太大,丛生芽的玻璃化程度增加,丛生芽容易变成畸形,再生苗生长不正常。NAA 的加入可配合一定量的 6-BA 共同

诱导不定芽的分化,但浓度太大会使丛生芽提前生根。本试验表明,当以幼苗茎节、茎尖为外植体时选择 9 号培养基最佳,平均诱导率可达 44.5 %,而且再生苗比较健壮;当以叶片(带叶柄)为外植体时,选择 10 号培养基最佳,平均诱导率为 9.7 %;当以二年生种株腋芽为外植体时,选择 8 号培养基最佳,平均诱导率可达 55.1%。同时要针对不同的基因型,对培养基应给予适当调整。

表 2 诱导分化培养基成分  
Tab.2 Media composition

激素	培养基														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
6-BA(mg/L)	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5
NAA(mg/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

2.2.2 外植体对诱导率的影响 外植体的不同对诱导分化能力影响非常明显(表 3)。其中以二年生腋芽为外植体时诱导率最高,平均诱导率为 52.1%;其次是幼苗茎节、茎尖,平均诱导率为 32.5%;而以叶片(带叶柄)的平均诱导率仅为 5.2%。本试验还对不带叶柄的叶片的再生能力作

了研究,发现该叶片的再生能力较差,每 100 个叶盘(将叶片切成 0.5~1.0cm<sup>2</sup> 大小)仅能分化出 3~5 个再生芽。所以在试验中,应根据不同的需求选择最佳的外植体及培养基配方。

2.2.3 基因型对诱导丛生芽的影响 参试的 8 种基因型材料,在设置的 15 种培养基上都能诱导成

芽,基因型不同,诱导率不同(表 3)。在本试验中,960766 诱导率最高,以幼苗茎节、茎尖为外植体时,诱导率可达 37.5%,以腋芽为外植体时,诱导率可达 53.4%;饲料甜菜饲红、饲黄的诱导率相对较低,分别为 30.0%和 33.6%。而且不同的基因型材料,再生苗的健壮程度不同,如 N98122 的诱导率虽然不及 960766,但再生苗生长非常健壮。

### 2.3 丛生芽的继代增殖

切割上述诱导培养基中获得的丛生芽,再转移到同样配方的新鲜培养基中,继续培养,7d 以后又可形成许多不定芽,待小苗长至 2~3cm 高时分割下来,诱导生根,余下的部分小芽继续继代培养,如此反复进行,在短时间内就可得到大量性状一致的小苗,丛芽增殖倍数由几倍到几十倍,而且培养的小苗生长健壮,即可达到扩大繁殖的目的(图 2)。

### 2.4 生根培养

将继代培养的植株分割下来,转接到 8 种不同激素种类和浓度的 1/2MS 生根培养基中(表 4),诱

导生根,15d 以后,植株基部出现白色突起,25d 后各材料在不同培养基中都诱导生根,生根率为 80%以上(图 3)。

试验结果表明,基因型不同对生根率有影响,其中饲料甜菜的生根率略低一些,但差异不明显,不生根的经过二次生根培养一般都能生根。但不同激素配比会影响到须根的数量和健壮程度:如果激素浓度太低(如 1 号和 5 号培养基),须根数量少,且须根细长,移栽成活率会大幅度下降;如果激素浓度太高(如 4 号和 8 号培养基),须根极易变成畸形,且容易褐化,同样会影响移栽成活率。本试验研究表明,根据试验材料的不同,培养基激素配比在 1/2 MS + NAA 1.0~1.5mg/L 或 1/2 MS + NAA 1.0~1.2mg/L + IBA 0.2mg/L 左右比较适宜,生根率较高,须根发达健壮,移栽成活率也高(图 4)。对首次移入生根培养基的分化苗,如果不生根或根系不发达的幼苗,可再次切割下来移入生根培养基中二次生根。

### 2.5 炼苗移栽

表 3 不同基因型甜菜在不同培养基上的诱导率 (%)

Tab.3 Induction rate of sugar beet of 8 genotypes on several media (%)

外植体	基因型	培 养 基															平均
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
茎节茎尖	AB19/120	10.2	15.3	18.3	25.6	30.5	13.4	23.3	36.7	42.2	50.4	20.8	22.8	30.6	33.5	52.6	28.4
	N98122	12.1	16.2	15.2	26.2	34.7	13.3	26.3	42.0	43.4	54.5	33.3	22.0	42.1	50.4	63.5	33.0
	960766	16.4	17.4	18.3	24.1	36.6	13.1	30.7	54.5	48.2	53.3	28.4	34.8	50.2	62.6	73.8	37.5
	饲黄	15.1	20.2	20.2	22.6	30.8	18.9	25.8	50.6	45.5	54.5	23.3	25.4	46.7	48.4	56.6	33.6
	饲红	8.2	16.0	19.2	21.5	30.4	10.6	23.3	45.0	43.3	55.2	23.3	24.7	35.4	42.8	50.6	30.0
	平均	12.4	17.0	18.2	24	32.6	13.9	25.9	45.8	44.5	53.6	25.8	25.9	41.0	47.5	59.4	32.5
叶片(叶柄)	饲红	0.2	1.0	1.2	2.5	2.4	0.6	2.3	5.0	8.3	10.2	2.3	5.7	10.4	12.8	13.9	5.3
	N98122	0.1	1.2	1.0	1.8	2.5	0.3	2.3	2.0	7.4	8.5	4.3	5.1	6.1	10.4	12.5	4.4
	960766	0.0	1.4	1.3	2.1	3.6	1.1	3.7	6.5	9.2	10.3	6.4	7.8	7.2	13.6	14.8	5.9
	平均	0.1	1.2	1.2	2.1	2.8	0.7	2.8	4.5	8.3	9.7	4.3	6.2	7.9	12.3	13.7	5.2
腋芽	HBB-1		40.3	45.2	55.4			50.2	57.2	60.8			50.2	51.5	58.6		52.2
	960764		42.6	44.3	53.6			49.3	54.3	59.7			49.6	51.6	59.8		51.6
	960766		43.8	44.8	54.5			51.8	55.5	61.2			52.5	54.6	62.2		53.4
	960767		48.1	43.4	53.2			50.4	53.4	55.6			48.4	50.8	58.8		51.3
	平均		43.7	44.4	54.2			50.4	55.1	59.3			50.2	52.1	59.9		52.1

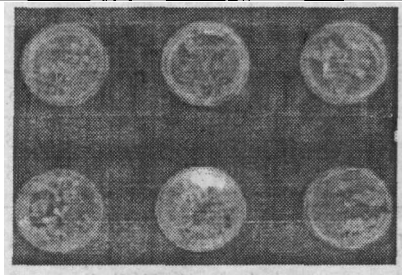


图 1 诱导再生芽

Fig.1 Inducing regeneration shoots

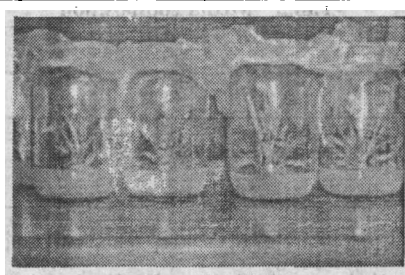


图 2 丛生芽增殖

Fig.2 Rapid-multiplication

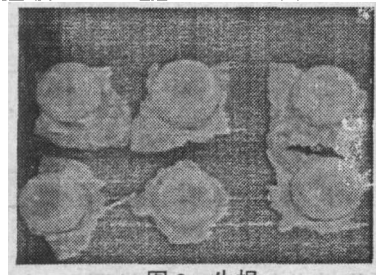


图 3 生根

Fig.3 Rooting

当植株须根长到 1~2cm、苗高达到 3~5cm 时,放在自然光下,去掉封口膜炼苗 5~7d,取出植株,洗去根部粘附的培养基,移入盛有蛭石的花盆中,保持

湿度在 70%左右,成活率达 90%以上。移栽 10d 后开始抽出新叶,这时可适当降低盆内湿度。当外界气温适宜时(呼和浩特市地区在 5 月 20 号以后),坐水

移入大田,每隔 2~3d 浇一次水,待抽出新叶后,管理同大田一样,移栽成活率可达 100%(图 5)。

### 2.6 块根的收获、贮藏及二年生隔离采种

组培收获的块根和大田直接播种收获的块根形状不同,多分枝,根的含水量相对较少,在贮藏中应注意保持湿度。第二年栽入大田隔离采种,观察其整齐度、株型、结实率、粒性、育性、花期、成熟期,

经观察发现组培苗后代表现整齐一致(图 6)。

### 2.7 株系比较

将上年种子单株收获,下一年进行株系比较,进一步观察提纯。

## 3 讨论

植物离体再生一方面受内部基因控制,另一方

表 4 不同激素种类和浓度下各材料的生根率 (%)

Tab. 4 Rooting rate of sugar beet of 8 genotypes on several media (%)

编号	培养基	基因型								平均
		AB19/120	N98122	饲黄	饲红	HBB-1	960764	960766	960767	
1	1/2MS+NAA0.5mg/L	80.2	89.5	81.2	80.2	89.7	88.5	83.1	82.8	84.4
2	1/2MS+NAA1.0mg/L	92.3	96.4	93.3	86.1	90.8	89.7	92.2	91.1	91.5
3	1/2MS+NAA1.5mg/L	94.1	92.1	87.8	86.7	92.3	90.6	93.8	90.2	91.0
4	1/2MS+NAA2.0mg/L	100.0	97.5	88.2	82.4	98.5	92.7	95.6	95.4	93.8
5	1/2MS+NAA0.5mg/L+IBA0.2 mg/L	81.2	82.6	81.3	82.3	89.6	89.4	84.8	85.6	84.6
6	1/2MS+NAA1.0mg/L+IBA0.2 mg/L	92.8	91.5	90.6	91.6	90.8	90.7	90.6	91.2	91.2
7	1/2MS+NAA1.0mg/L+IBA0.5 mg/L	93.2	86.2	91.5	92.6	92.7	92.5	93.2	91.2	91.6
8	1/2MS+NAA1.5mg/L+IBA0.5 mg/L	92.8	92.5	92.6	91.5	93.5	91.6	92.5	90.1	92.1
	平均	90.8	91.0	88.3	86.7	92.2	90.7	90.7	89.8	90.0



图 4 移栽的再生植株

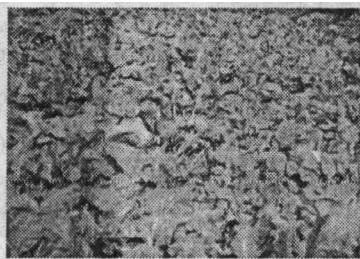


图 5 移入大田的再生植株

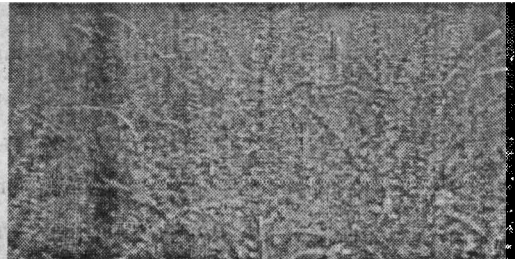


图 6 组培苗的二年生采种株

Fig.4 Transplanting of plantlet

Fig.5 The regenerated plants

Fig.6 Biennial stock plants regenerated in field

面也受外界因素调节。基因型、外植体种类和生理状况以及生长调节物质是影响离体植物体再生的重要因素<sup>[4]</sup>。本试验结果表明,N98122、960766 这两个品系易再生不定芽,而且对同一种基因型来说,二年生腋芽、茎节具有较强的再生能力。

Todi 等认为甜菜组织离体培养中再生植株真正有效的途径是通过直接的器官发生,借助于愈伤组织等非直接途径效率较低<sup>[5]</sup>。本试验是通过直接器官发生方式再生植株的,其优势在于降低了产生体细胞变异的概率,在继代培养中形成丛生芽并迅速增殖,缩短了从外植体到获得完整植株的周期,确保克隆的再生植株的遗传稳定性。

试验发现,不论基因型如何,培养基中附加 0.8~1.5mg/L 6-BA 和 0.2~0.3mg/L NAA,诱导分化能力比较强,而且幼苗生长健壮。生根培养基中附加 1.0~1.5mg/L NAA 或 1.0~1.2mg/L NAA +0.2mg/L IBA,生根率均可达 85%以上,而且根系发达。本试验经过 4 年时间,建立了由不同外植体快速、高

效诱导分化成苗,并且进入大田株系比较试验的一系列配套技术方案,为甜菜品种改良和遗传转化奠定了基础。

鸣谢:此试验得到内蒙古农牧业科学院生物中心全体员工的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!

### 参考文献:

- [1] 张荣,蔡葆.中国甜菜概论[M].呼和浩特:内蒙古科学技术出版社,2000.
- [2] 张悦琴,等.生物技术在甜菜育种中的应用研究[J].中国糖料,1997,(1):8-13.
- [3] 张剑峰,李天然,等.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.
- [4] 周维燕.植物细胞工程原理与技术[M].北京:中国农业大学出版社,2001.
- [5] Otto Todi, Gabor Gyulai et al. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet(*Beta vulgaris* L) [J]. Plant Cell Reports, 1996, (15): 851-854
- [6] 黄彩云,邵明文,张悦琴,等.甜菜种株腋芽的培养[J].中国甜菜,1991,(2):1-4.