

甜叶菊叶片高频再生体系的建立

蔡永智, 王爱英, 沈海涛, 祝建波

(石河子大学 生命科学院, 新疆 石河子 832003)

摘要:以“守田3号”甜叶菊叶片为外植体,研究了消毒时间、外源激素等因素对外植体成活率、不定芽的诱导、不定芽继代培养和生根的影响。结果表明:用0.1%的升汞处理3 min为最佳消毒方法,最佳的不定芽诱导培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IAA+300 mg/L 水解酪蛋白,平均诱导率为80%;最佳不定芽继代培养基为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L GA₃+4.0 mg/L KT;最佳生根培养基为1/2MS+0.2 mg/L IAA,生根率为100%,所获得的再生苗生长健壮且移栽后成活率高,最终建立了甜叶菊最佳的再生体系。

关键词:甜叶菊;叶片;再生体系

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0134-04

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)属菊科(Compositae)斯台维亚属^[1]宿根性、须根型、短日照、多年生草本植物^[2],原产地南美巴拉圭和巴西交界的阿曼拜山脉。又名“甜菊”、“甜草”。它是继蔗糖、甜菜之后发展起来的第三大糖原作物^[3]。甜叶菊糖苷(SGs)是从甜叶菊叶片中提取的一种天然甜味剂,在日本和巴西已被做为蔗糖的替代品广泛应用^[4],并且以其高甜度、低热量、安全无毒^[5-6]等特点,逐渐受到糖尿病、肥胖症患者的青睐。

但由于甜叶菊具有以下几方面特点,使其生产受到了限制,一是种子发芽率低(仅为30%~40%),苗期生长缓慢,育苗要求技术性强,移栽成活率低;二是甜叶菊为异花授粉作物,群体的基因组成为杂合型,遗传不稳定;三是种子带菌又是苗期及后期病害发生的主要因素之一。在国内的有关甜叶菊的组培快繁研究,如丛生芽诱导、生根诱导和再生植株驯化,都已有相关的报道^[7-10],但是报道的不多而且不系统。该研究采用甜叶菊“守田3号”的叶片为外植体,进行甜叶菊再生体系的建立研究,旨在能够克服以上缺点,保持亲本种苗原有的农艺性状,以期为进一步进行转化外源基因研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“守田3号”甜叶菊种子由石河子大学农业生物

技术重点实验室从山东省购买,种子种于温室中,取幼嫩叶片为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的灭菌 采集甜叶菊幼嫩叶片,先用自来水冲洗30 min,然后用蒸馏水浸泡10 min,在超净工作台内用70%酒精处理5 s,无菌水冲洗1~2次后用0.1%升汞做表面消毒处理,同时加入2滴吐温-80,处理时间分别为1、2、3、4和5 min。消毒后用无菌水清洗5次,每次5 min,最后将叶边缘和主叶脉剪掉,剪成大小为0.5 cm²的外植体,正面朝上接种于未添加激素的MS培养基上,比较消毒效果,3次重复。

1.2.2 培养基的配制 采用MS、1/2MS基本培养基,添加蔗糖20 g/L,琼脂7 g/L,pH 5.8,分装并高压灭菌后添加不同种类和浓度的植物生长调节剂,倒于培养皿或三角瓶中备用。

1.2.3 不定芽的诱导 采用MS基本培养基(附加300 mg/L 水解酪蛋白),添加不同浓度的6-BA和IAA作为再生诱导激素,采用正交设计L₁₆(4²),设置6-BA和IAA 2个因素,每个因素设置4个水平(表1),每个处理分别接种20个外植体,20 d后,统计外植体的分化率和平均每块外植体分化芽数。

1.2.4 不定芽的继代培养 将已分化出不定芽的外植体分别接种到添加不同浓度激素的MS培养基中,其中,6-BA浓度为0.5 mg/L,NAA浓度为0.05 mg/L,赤霉素浓度分别为0.2 mg/L和0.4 mg/L,KT的浓度分别为2.0 mg/L和4.0 mg/L。

1.2.5 生根与移栽 将生长健壮,且高度在3.0 cm左右的不定芽掰下分别接种于不同浓度IAA的1/2MS培

第一作者简介:蔡永智(1986-),男,新疆库尔勒人,在读硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:caiyongzhi1026@163.com.

责任作者:祝建波(1967-),男,博士,研究员,现主要从事转基因植物等研究工作。E-mail:zjbshz@126.com.

基金项目:新疆生产建设兵团博士基金资助项目(2009jc01)。

收稿日期:2012-12-13

表 1 正交实验因素与水平

| Table 1 Factors and levels | | |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 水平 | 因素 | |
| | 6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 1 | 1.0 | 0 |
| 2 | 2.0 | 1.0 |
| 3 | 2.5 | 1.5 |
| 4 | 3.0 | 2.0 |

培养基上。观察再生苗的生根情况并做记录。将已生根的外植体,打开瓶口置于室内自然光下练苗,并不断的往叶片上喷水,以防止失水过多干枯。2 d 后,取出生根苗,洗去根上附着的培养基,移入花盆中。花盆中的营养土与蛭石要经过消毒处理,土壤比例为:营养土:蛭石(3:1),湿度保持 80%左右,之后正常管理。

1.2.6 培养条件 丛生芽诱导、不定芽的继代培养以及不定根的诱导均在温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度 2 000 lx、光照时间 16 h/d 条件下进行培养。每 20 d 更换 1 次培养基,观察并记录。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对甜叶菊叶片外植体的影响

从表 2 可以看出,用 0.1% 的升汞溶液处理甜叶菊叶片,随着消毒时间的增加,污染率逐渐降低,但褐化率却逐渐上升,当消毒时间为 5 min 时,虽然污染率为 0%,但是褐化率达到了 56.7%,而外植体的成活率呈现出先上升后下降的趋势。综合比较外植体的污染率、褐化率与成活率 3 个指标,最终得出甜叶菊叶片外植体升汞消毒的最佳时间为 3 min,此时污染率为 6.7%,褐化率为 11.7%,成活率为 81.7%。

表 2 不同消毒时间对甜叶菊的污染率、褐化率及成活率的影响

| Table 2 The pollution rate, browning rate and survival rate of <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni in different disinfection time | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|
| 消毒时间/min | 污染率/% | 褐化率/% | 成活率/% |
| 1 | 90.0 \pm 2.9 | 0 | 10.0 \pm 2.9 |
| 2 | 50.0 \pm 5.7 | 6.7 \pm 3.3 | 41.7 \pm 4.4 |
| 3 | 6.7 \pm 1.7 | 11.7 \pm 1.7 | 81.7 \pm 3.3 |
| 4 | 3.3 \pm 1.7 | 35.0 \pm 5.8 | 61.7 \pm 4.4 |
| 5 | 0 | 56.7 \pm 3.3 | 43.3 \pm 3.3 |

注:试验数据以均值 \pm 标准差表示。
Note: Datas are Mean \pm SD.

2.2 不同激素浓度对外植体不定芽诱导的影响

按照正交设计表(表 3)将消毒处理的外植体正面朝上接种至不同浓度的 6-BA 和 IAA 组合的诱导培养基上,外植体分化程度差异明显。研究发现,接种 10 d 左右,个别外植体卷曲,边缘加厚,少量的外植体继续膨大形成淡黄色的愈伤组织,大部分外植体上形成许多淡绿

色的小颗粒,随后绿色渐深。20 d 左右时,有不定芽分化形成(图 1);从表 3 可以看出,最佳诱导培养基为 MSC(附加 300 mg/L 水解酪蛋白)+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IAA,分化率达 80%,叶片分化不定芽数达 6 个。

表 3 不同浓度 6-BA 和 IAA 对甜叶菊叶片分化不定芽的影响(20 d)

| Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and IAA combination on <i>in vitro</i> shoot induction of <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni | | | | | |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------------|
| 处理 | 6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 0.5 cm^2 的外植体 叶片数 | 分化率 /% | 平均每块外植体 分化芽数 |
| 1 | 1.0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 2 | 1.0 | 1.0 | 20 | 25 | 1 |
| 3 | 1.0 | 1.5 | 20 | 0 | 0 |
| 4 | 1.0 | 2.0 | 20 | 0 | 0 |
| 5 | 2.0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 6 | 2.0 | 1.0 | 20 | 80 | 6 |
| 7 | 2.0 | 1.5 | 20 | 65 | 4 |
| 8 | 2.0 | 2.0 | 20 | 40 | 2 |
| 9 | 2.5 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 10 | 2.5 | 1.0 | 20 | 60 | 4 |
| 11 | 2.5 | 1.5 | 20 | 45 | 2 |
| 12 | 2.5 | 2.0 | 20 | 30 | 1 |
| 13 | 3.0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 14 | 3.0 | 1.0 | 20 | 55 | 3 |
| 15 | 3.0 | 1.5 | 20 | 40 | 2 |
| 16 | 3.0 | 2.0 | 20 | 35 | 1 |



图 1 不定芽的再生

Fig. 1 Proliferation of explants

2.3 不同激素浓度对不定芽继代培养的影响

将已诱导出不定芽生长良好的外植体接种至不同种类的不定芽继代培养基上。研究发现,随着培养时间的延长,不定芽在激素为 6-BA 和 IAA 的 MS 培养基中时,株高增加缓慢,苗生长细弱,叶尖逐渐变黄,有的甚至玻璃化;当在培养基中添加 6-BA、NAA 以及不同浓度的 GA_3 和 KT 时,随培养时间的延长,不定芽不仅成倍的增殖,而且株高、直径和叶片颜色都有所提高(图 2)。在不同的激素水平,不定芽的生长速度与径粗的变化程度上存在明显差异。由表 4 可以看出,最佳的继代培养

的培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA₃+4.0 mg/L KT+0.05 mg/L NAA。

表 4 不同浓度激素对不定芽生长的影响

Table 4 Effects of different concentrations of hormones on the growth of *in vitro* shoots

| 编号 | 6-BA /mg·L ⁻¹ | GA ₃ /mg·L ⁻¹ | KT /mg·L ⁻¹ | NAA /mg·L ⁻¹ | 生长状况 |
|----|-----------------------------|--|---------------------------|----------------------------|---|
| 1 | 0.5 | 0.2 | 2.0 | 0.05 | 不定芽增殖明显,但是生长缓慢,约 15 d 后个别芽明显伸长,不定芽细弱,叶尖黄色 |
| 2 | 0.5 | 0.2 | 4.0 | 0.05 | 不定芽增殖明显,而且生长快,约 10 d 后芽开始有明显伸长,且不定芽生长健壮,叶尖深绿色 |
| 3 | 0.5 | 0.4 | 2.0 | 0.05 | 不定芽增殖明显,但生长较慢,15 d 后不定芽出现明显伸长,但不定芽细弱,叶尖黄色 |
| 4 | 0.5 | 0.4 | 4.0 | 0.05 | 不定芽增殖明显,而且生长较快,约 10 d 后不定芽出现明显伸长,但是不定芽细弱,叶尖绿色 |



图 2 不定芽的生长

Fig. 2 Enlongated adventitious shoot

2.4 再生苗的生根与移栽

由表 5 可知,在含有不同浓度 IAA 的所有生根培养基上试管苗的生根率均比较高,但是根的质量差别比较明显。从表 5 可以看出,不定芽在浓度为 0.2 mg/L IAA 的 1/2MS 培养基中根生长的最长、最壮,而且所需时间也最短,生根率达 100%(图 3)。试管苗经练苗后移入土壤中,移栽成活率达 95%以上。

表 5 不同浓度的 IAA 处理对不定芽生根的影响

Table 5 Effects of different concentrations of IAA on rooting rate of *in vitro* shoots

| 生根培养基 | IAA/mg·L ⁻¹ | 生根率/% | 生长状况 |
|-------|------------------------|-------|-------------|
| 1/2MS | 0 | 75 | 生根较晚,根短,细弱 |
| 1/2MS | 0.1 | 100 | 生根晚,根较长,根较壮 |
| 1/2MS | 0.2 | 100 | 生根早,根长,粗壮 |
| 1/2MS | 0.3 | 100 | 生根较早,根较长,细弱 |
| 1/2MS | 0.5 | 100 | 生根较早,根较长,细弱 |

3 结论与讨论

外植体消毒的关键是选择合适的消毒剂组合和消毒时间,在确定了适宜的消毒剂组合的情况下,掌握适

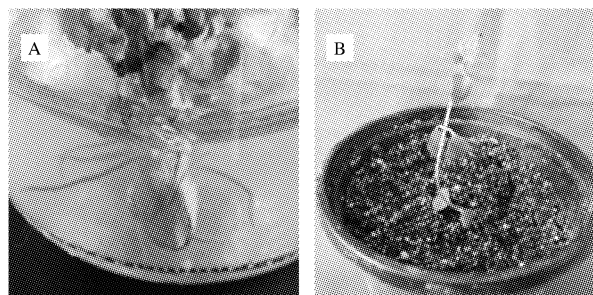


图 3 再生苗的生根(A)和移栽(B)

Fig. 3 Rooting induction and transplanting of regeneration seedling

宜的消毒时间对获得无菌快繁体系有着重要的作用。外植体灭菌时间的长短直接影响着外植体的污染率、存活率以及褐化率^[11]。适宜的消毒时间能有效降低外植体的污染率和褐化率。黄苏珍等^[3]认为先用自来水冲洗干净,再用 10%的洗衣粉溶液浸泡 5 min 后,经 70%的酒精表面消毒 2 min,用 0.1%的升汞溶液消毒 5 min,然后用无菌水冲洗 3~5 次,消毒效果较好。在该研究中,选取幼嫩的叶片为外植体,选择表面消毒效果最好的 0.1%升汞溶液,消毒时加入 2 滴灭菌的吐温-80,得到了最佳的消毒时间。选用升汞是因为 0.1%升汞具有较好的灭菌作用,但是升汞会加大外植体的褐化率。在给外植体消毒时加入灭菌的吐温-80,这是因为吐温-80 是非离子表面活性剂,由于其毒性低、用量小等特点,能够起到增溶、乳化、润湿的作用^[12],相应的能够缩短升汞消毒时间,降低褐化率。

在甜叶菊无菌体系的建立中,选择不同的外植体,使得外源激素的种类与浓度以及培养的过程都有所不同,以致试验的结果也各不相同。姜玉霞等^[13]以甜叶菊叶片为外植体,以附加 300 mg/L 水解酪蛋白的 MS 为基本培养基,在添加 6-BA 和 NAA 均为 0.5 mg/L 的培养基上诱导形成愈伤组织,在 6-BA 0.5 mg/L 和 NAA 0.05 mg/L 的培养基上可诱导愈伤组织分化成不定芽。董振红等^[8]采用甜叶菊的幼嫩茎尖为外植体,在添加 6-BA 为 1.0 mg/L 的诱导培养基上进行丛生芽的诱导,诱导出芽率可达 100%。这些报道一般都是外植体通过愈伤组织的诱导再进行丛生芽的分化,或者是通过芽尖的增殖来建立甜叶菊的再生体系。该研究是以甜叶菊的幼叶为外植体,直接通过外植体再生的方式,获得再生率较高的不定芽,缩短了组培周期。

植物生长调节剂的浓度、种类以及其组合对于植物组织培养一直是关键性问题。不仅相同物种的不同品种间的所需的植物生长调节剂有所不同,同一植物的不同组织器官也不同,甚至相同组织器官的不同培养阶段也有所不同。崔广荣等^[7]研究表明,MS 培养基中添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA(0.1~0.2)mg/L 适合试管苗增殖,增殖系数可达 7.4。袁学军等^[10]加入一定浓度的

KT 与 GA_3 时获得了最佳壮苗培养基,克服了因为大量的丛生芽没有及时分从而产生的玻璃化。该研究使用的最佳不定芽继代的培养基不仅可以进一步提高丛生芽的增殖效率,而且同样克服了在增殖过程中的芽的玻璃化,同时提高了再生苗的直径、高度和叶片质量。但在不定芽诱导过程中,6-BA 的浓度过高时,叶片不但不生成不定芽,反而其增厚的叶片边缘会逐渐的褐化,有的褐化的程度高达 100%。可见,6-BA 对甜叶菊不定芽分化有一定的影响。

甜叶菊不定芽在直接插入到含有 0.2 mg/L NAA 的 1/2MS 培养基后生根率为 79.2%^[14]。但 Bondarev 等^[15]则认为,NAA 对甜叶菊根的形成无影响。张子学等^[16]研究表明,适宜甜叶菊生根培养基为 MS+IBA 0.25 mg/L,生根率达 85.7%。在前人的研究中有通过加入一定量的活性炭来提高甜叶菊的生根率也可以达到 100%的生根率的报道。活性炭能够吸附培养基中的毒副成分,营造了类似于自然生长条件下的黑暗环境,促进了不定芽生根的生长。用 IAA 处理再生苗可以促进不定根的形成,加快营养繁殖速度,该研究将再生苗接种到浓度为 0.2 mg/L IAA 的 1/2MS 培养基中,在短期内不仅能获得 100%的生根率而且生根健壮。生根时要把丛生芽切成单个的芽,这样不仅提高了生根率,而且还能获得更多的再生苗。

该试验在前人研究的基础上,对甜叶菊再生体系的条件加以摸索,建立了叶片高效直接再生体系。据大量文献表明,甜叶菊离体再生外植体的选择依次为顶芽>腋芽>叶片,而且叶片诱导不定芽在分化率与数量上都不理想,不能为下一步试验作材料基础,所以一般都不用叶片。该研究克服了外植体的局限性,得到了叶片较高的分化率,而且在芽生长培养基中,可以进一步提高苗的生长能力,从而克服了因为材料问题影响进一步试验的困境,为今后的遗传转化奠定了基础。

参考文献

- [1] 王贵民,董振红,郝再彬. 甜叶菊糖苷的应用和安全性的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2007(6):24-25.
- [2] 何毓娟,李元彬. 发展甜菊生产大有可为[J]. 中国糖料,1997(1):52-56.
- [3] 黄苏珍,韩玉林,谢明云,等. 甜叶菊“中山一号”快速繁殖的研究[J]. 特产研究,1999(4):48-49.
- [4] Sehar I, Kaul A, Bani S, et al. Immune up regulatory response of a Non-calorie natural sweetener, stevioside[J]. Chemico - Biological Interactions, 2008,173:115-121.
- [5] Teo C C, Tan S N, Yong J W, et al. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. Sep Sci, 2009,32(4):613-622.
- [6] Curry L L, Roberts A. Subchronic toxicity of rebaudioside[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008,46:11-20.
- [7] 崔广荣,何克勤,胡能兵,等. 甜叶菊的组织培养[J]. 安徽科技学院学报,2011,25(5):23-28.
- [8] 董振红,王贵民,王彦超,等. 甜叶菊茎尖组培苗生根及移栽的研究[J]. 中国糖料,2008(2):28-39.
- [9] 张子学,杨久峰,檀赞芳. 植物生长调节剂对甜叶菊增殖和生根的影响[J]. 中国林副特产,2008,93(2):13-15.
- [10] 袁学军,陈光宙,李艳丽. 甜叶菊种子丛生芽诱导和植株再生[J]. 草原与草坪,2010,33(6):55-56.
- [11] 罗成华,闫洁,祝建波. 橡胶草高频再生体系的建立[J]. 北方园艺,2012(7):115-119.
- [12] 张明令,张海燕,从英,等. 吐温-80 在水溶液中的表面活性研究[J]. 中成药,2010,32(1):55-58.
- [13] 娄玉霞,宋磊,李心国,等. 甜叶菊叶片离体培养及试管无性系的建立[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2000,29(4):74-77.
- [14] 尚宏芹. 甜叶菊组培苗生根培养的研究[J]. 北方园艺,2010(6):170-172.
- [15] Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides[J]. Plant Science, 2003,165(4):845-850.
- [16] 张子学,杨久峰,檀赞芳. 植物生长调节剂对甜叶菊增殖和生根的影响[J]. 中国林副特产,2008,93(2):13-15.

Establishment of High Frequency Regeneration System of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf

CAI Yong-zhi, WANG Ai-ying, SHEN Hai-tao, ZHU Jian-bo
(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: Taking young leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni as explants, the effects of disinfection time and exogenous hormones on the survival rate, induction of *in vitro* shoot, growth and root formation were studied. The results showed that the optimum disinfection method was treated with 0.1% $HgCl_2$ for 3 min; the optimum adventitious buds induction medium from leaves was MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L IAA+300 mg/L CH (Casein Acid Hydrolysate) and the average induction rate was 80%; the optimum shoot growth medium was MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L GA_3 +4.0 mg/L KT; the optimum rooting medium was 1/2MS+0.2 mg/L IAA with rooting rate 100%. The tissue cultured plants obtained grew well and had high survival rate after transplanting, the optimum regeneration system of *Stevia rebaudiana* Bertoni was found finally.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni; leaf; regeneration system