

大蒜鳞芽组培再生体系建立方法研究

吐尔逊娜依·迪力夏提, 刘旭新, 石强

(新疆农业职业技术学院, 新疆 昌吉 831100)

[摘要]以山东和新疆白皮大蒜栽培品种为材料,建立了大蒜鳞芽为外植体的愈伤组织诱导再生体系。采用MS培养基,通过激素配比筛选试验,比较快速诱导愈伤组织激素配比与方案,为供试大蒜品种脱病毒苗的快速繁殖奠定了基础。筛选得到愈伤组织快速诱导与生长培养基与激素配比,结果表明:快速诱导愈伤组织最佳激素组合为:NAA 0.5mg/L+2,4-D 1.25mg/L+MS,愈伤组织继代生长与幼苗分化激素组合为:6BA 5mg/L+NAA0.3mg/L,环境温度25℃,光照16小时,8小时黑暗条件;所有这些结果为大蒜脱毒再生苗提纯复壮与转基因研究体系的建立都很有帮助。

[关键词]大蒜;组织培养;再生体系

[中图分类号]S633.4 **[文献标识码]**A

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属植物蒜的鳞茎,是因其具有独特的风味和良好的药用价值而全球性食用并种植的蔬菜。我国栽培历史已达两千多年,是世界最大的大蒜种植国,全国各地都有栽培。栽培大蒜由于花器官败育,不能通过有性生殖形成种子,所以在生产中都是通过无性繁殖进行生产。大蒜在栽培过程中,常年无性繁殖过程使其出现容易染病毒、品种退化等问题,最终导致质量及产量下降,大家通常利用组织培养技术来进行大蒜组织脱毒,脱毒的分生组织再分化成无毒幼苗,这已经成为提升大蒜品质的一个手段。目前脱毒组织培养技术,已建立了以茎尖、根尖,真叶、贮藏叶、茎盘切块、花序轴顶端分生组织,花药和花原始体等为外植体的多种大蒜

组织培养再生体系。各种外植体与其分化再生效果都有差异,本实验利用大蒜鳞芽作为外植体选用不同植物激素之间优化配比,对大蒜愈伤组织诱导进行试验,研究对比提出了一种高效的大蒜组织培养体系,为进一步对大蒜进行深入研究,如大蒜脱毒愈伤组织快速诱导到再生植株的成功分化,以及建立大蒜转基因转化体系,做一些基础工作,得到了比较好的再生体系模式。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料是山东白皮大蒜(产地山东)和新疆白皮大蒜(吉

[收稿日期]2018-06-15

[基金项目]新疆农业职业技术学院基金项目(XJNZKJ2014001)资助。

[作者简介]吐尔逊娜依(1984—),女,新疆若羌人,博士,研究方向:植物生理、药理。

[通讯作者]刘旭新(1971—),男,广东人,博士后,研究方向:植物分子生物学。

[参考文献]

- [1] 段居琦,周广胜,等.中国双季稻种植区的气候适宜性研究[J].中国农业科学,2012,45(2):218-227.
- [2] 刘云涛,李铁男,李莹.林甸灌区水稻灌溉制度研究[J].现代农业科技,2012(6):257-264.
- [3] 葛旭峰,徐莉平,孙铁蕾.龙塘水库灌区水稻灌溉制度设计浅析[J].陕西水利,2017,205(2):183-184.
- [4] 叶廷平,周立华,汤英.宁夏青铜峡灌区主要农作物地面灌溉制度的分析研究[J].节水灌溉,2012(6):35-36.
- [5] 魏然,李智青.龙山灌区灌溉制度分区概述[J].水利科技与经济,2010,16(2):188-189.
- [6] 王小林,刘云涛,张勇.三江平原地区水稻灌溉制度设计综述[J].黑龙江水利科技,2004(2):81-82.
- [7] 邹俏俏.辽宁省水稻灌溉制度分析[J].东北水利水电,2013(5):55-56.
- [8] 朱德峰.双季稻高效配套栽培技术[M].北京,金盾出版社,2010.
- [9] 钟爽,何应对,等.连作年限对香蕉园土壤线虫群落结构及多样性的影响[J].中国生态农业学报,2012,20(5):604-211.
- [10] 钱银飞,刘白银,彭春瑾,等.不同耕作方式对南方红壤区双季稻周年产量及土壤性状的影响[J].应用生态学报,2004,15(7):1177-1181.
- [11] 谢晓金,申双和,李秉柏,等.抽穗期高温胁迫对水稻开花结实的影响[J].中国农业气象,2009,30(2):252-256.
- [12] 张桂莲,张顺堂,肖浪涛,等.抽穗开花期高温胁迫对水稻花药、花粉粒及柱头生理特性的影响[J].中国水稻科学,2014,28(2):155-166.
- [13] 李成德.高温导致水稻出现大量空壳分析[J].陕西农业科学,2003(5):45-47.
- [14] 张建平,赵艳霞,等.气候变化对我国南方双季稻发育和产量的影响[J].气候变化研究进展.2005,1(4):151-156.
- [15] 王斌,陈小敏,等.海南水稻生育期的时空变化特征及对气候变暖的响应[J].热带作物学报.2017,38(3):415-420.
- [16] 郑世宗,柯惠英,陈雪,等.应用彭曼法推求水稻灌溉定额的分析[J].浙江水利科技,2003(2):55-56.
- [17] 欧建锋,金兆森.基于彭曼法计算水稻作物需水量的简化方法[J].扬州大学学报(自然科学版),2006(9):57-60.
- [18] 仇锦先,华黎利,等.Excel在水稻生育期灌溉制度计算中的应用[J].节水灌溉,2005(1):28-30.

表 1 不同激素组合处理对诱导愈伤组织的影响

处理组编号	激素配比		山东大蒜			新疆大蒜			
	NO.1	NAA	2, 4-D	总外植体数 (个)	愈伤团块数 (个)	诱导率 (%)	总外植体数 (个)	愈伤团块数 (个)	诱导率 (%)
A1	0.25mg/L	1mg/L		47	16	34	41	14	34
A2	0.5mg/L	1mg/L		50	37	74	39	33	85
A3	0.75mg/L	1mg/L		43	26	60	43	28	65
A4	1mg/L	1mg/L		45	26	58	45	26	58
A5	1.25mg/L	1mg/L		48	19	40	45	17	38
A6	1.5mg/L	1mg/L		43	13	30	49	11	22
A7	1.75mg/L	1mg/L		46	12	26	47	11	23
NO.2	2, 4-D	NAA		40	4	10	43	10	23
B1	0.25mg/L	0.5mg/L		48	20	42	46	10	22
B2	0.5mg/L	0.5mg/L		48	22	46	45	17	38
B3	0.75mg/L	0.5mg/L		45	34	76	49	19	39
B4	1mg/L	0.5mg/L		38	34	89	49	34	69
B5	1.25mg/L	0.5mg/L		43	26	60	50	30	60
B6	1.5mg/L	0.5mg/L		48	11	23	46	21	46
NO.3	2, 4-D	2ip		41	6	15	38	4	11
C1	0.5mg/L	0.1mg/L		48	9	19	43	4	9
C2	1mg/L	0.1mg/L		47	13	28	41	23	56
C3	1.5mg/L	0.1mg/L		49	26	53	46	29	63
C4	2mg/L	0.1mg/L		44	17	39	39	25	64
C5	2.5mg/L	0.1mg/L		45	19	42	47	25	53
C6	3mg/L	0.1mg/L		48	14	29	47	20	43
NO.4	2ip	2, 4-D		44	7	16	39	13	33
D1	0.05mg/L	2mg/L		45	14	31	38	19	50
D2	0.1mg/L	2mg/L		45	19	42	35	29	83
D3	0.15mg/L	2mg/L		49	17	35	41	26	63
D4	0.2mg/L	2mg/L		47	31	66	44	26	59
D5	0.25mg/L	2mg/L		50	34	68	49	27	55
NO.5	6BA	IAA		31	9	29	29	10	34
E1	1mg/L	1mg/L		32	11	34	32	10	31
E2	1.5mg/L	1mg/L		37	23	62	36	19	53
E3	2mg/L	1mg/L		34	19	56	36	23	64
E4	2.5mg/L	1mg/L		32	24	75	39	29	74
E5	3mg/L	1mg/L		34	16	47	35	20	57
E6	3.5mg/L	1mg/L		33	13	39	34	6	18
NO.6	IAA	6BA		34	11	32	39	12	31
F1	0.5mg/L	3mg/L		35	12	34	37	18	49
F2	0.75mg/L	3mg/L		32	19	59	37	24	65
F3	1mg/L	3mg/L		40	28	70	33	26	79
F4	1.25mg/L	3mg/L		32	20	63	40	33	83
F5	1.5mg/L	3mg/L		35	10	29	37	14	38

木萨尔县), 从新疆昌吉市市场购买的当年新蒜。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配制及培养条件。基本培养基为 MS 固体培养基 (M&S M519, Phytotechnology 公司产品) 含蔗糖 30g/L, 琼脂 7g/L, pH 值 5.8, 在培养箱中光照培养, 培养温度 (25 ± 1) °C, 光强 4000 ~ 5000lux 培养于光照 24h/d。植物激素采用 2, 4-D, 6BA, 2IP, NAA 等 (SIGMA 公司产品)。

1.2.2 外植体准备。取无病无霉变的大蒜瓣放入清水中浸泡 10min, 然后用无菌水冲净, 在超净台上将大蒜瓣横切成 2 段, 将有鳞芽的一段放入培养皿, 切开剥出鳞芽, 切 2 ~ 3 块, 10% 的次氯酸钠溶液中浸泡 2min, 后用无菌水冲洗 3 ~ 5 次。

1.2.3 愈伤组织诱导培养。将外植体接种在添加不同浓度配比激素组合 (共 42 个处理) 的 MS 培养基上, 每瓶接种 10 个外植体, 每个处理 4 ~ 5 瓶, 接种 15d 后开始观察及统计直径超

过3mm的愈伤组织。40d后继代培养一次,使用相同的培养基,继代培养1~2次。

1.2.4 数据记录与处理。经不同配比的激素组合处理的大蒜鳞芽愈伤组织,不定芽和生根情况各在培养40d和20d后开始进行记录。通过目测法观测不同激素对比对大蒜鳞芽组织培养的影响,观察记录愈伤组织发生率来计算愈伤组织诱导率,统计方法如下式所示:

$$\text{愈伤组织诱导率} = (\text{产生愈伤组织的茎尖数} / \text{接种茎尖总数}) \times 100\%$$

(数据通过 Microsoft Excel 和 DPS 软件进行统计分析)

2 结果与分析

2.1 不同激素配比处理对大蒜鳞芽愈伤组织诱导的影响

以 MS 固体培养基为基本培养基进行生长素与细胞分裂素的不同配比组合(共42个处理,激素配比与组合见表1),研究不同组合对大蒜鳞芽愈伤组织诱导率影响的试验。大蒜愈伤组织在诱导培养20d左右开始出现,可以从外植体的一端或两端或者整个外植体上产生,25d左右达到计数水平。经观察计数得到各处理对大蒜鳞芽愈伤组织诱导率影响结果如表1。

当2,4-D浓度为1mg/L时,大蒜鳞芽诱导率随NAA浓度的增加而降低;当NAA浓度为0.5mg/L时,诱导率随2,4-D浓度的增加而增加,但2,4-D浓度超过1.25mg/L开始诱导率反而不再上涨。当2iP浓度为0.1mg/L时2,4-D浓度为1.5mg/L时的山东大蒜鳞芽愈伤组织和2,4-D浓度为2mg/L时的新疆大蒜鳞芽愈伤组织诱导率效果最好。

2.2 不同处理愈伤组织幼芽分化诱导的影响

大蒜愈伤组织成功诱导出来后,选定不同浓度配比的激素(6BA)继续进行培养,能成功诱导分化出幼芽(图1),但是大蒜愈伤组织诱导成芽需要更长时间(表2)。

表2 6BA不同浓度组合处理对愈伤组织诱导分化成芽的影响

编号 No.	6BA 浓度 Concentration of 6BA (mg/L)	发芽天数	
		Days of shoot generation (Day)	发芽个数 Number of shoots (个)
山东大蒜	0	166	2
	4	155	6
	8	142	9
	12	144	8
	16	148	12
新疆大蒜	0	170	3
	4	157	6
	8	148	12
	12	136	17
	16	144	15



A 愈伤组织诱导 B 愈伤组织诱导分化出芽

图1 愈伤组织分化幼苗

3 结论

本研究综合考虑大蒜鳞芽组织愈伤组织形成率和周期等关键因素,从控制诱导与分化的角度筛选最佳植物激素组合的培养基,有利于大蒜鳞芽组培再生技术的推广应用。单子叶植物转化体系往往采用农杆菌携带目的基因转化愈伤组织,通过抗性筛选得到转化植株,所以此实验不仅对大蒜深入进行生物工程研究打下基础,而且对大蒜转基因体系的建立都具有重要应用价值。

4 展望

随着生物技术手段的不断丰富,组织培养技术作为重要的技术手段,为人类科学的进步和发展提供了强大的支撑,而大蒜的组织培养和快繁技术的完善使蒜苔和鳞茎产量有所增加,高产量及质量的目的达到了。然而脱毒植株在实际应用中可能再度感染,加之试管繁殖系数尚低,因而规模化生产技术还需进一步研究。而将现代生物技术纳入大蒜植物的遗传改良和育种程序,将会加速培育出高品质、高抗逆性、更有应用价值的新品种,以满足人们生活水平不断提高的需求。

[参考文献]

- [1] 胡小京,耿广东,王建龙.大蒜组织培养快繁技术的研究[J].长江农业,2011(20):13-15.
- [2] 宋满坡.大蒜茎尖的组织培养[J].信阳农业高等专科学校学报,2005(15):86-87.
- [3] 王云云,高宇,肖宇.大蒜茎盘不定芽离体培养的研究[J].黑龙江科学,2013,4(3):67-71.
- [4] 张恩让,程智慧,周新民.大蒜体细胞无性系的染色体变异研究[J].西北农林科技大学(自然科学版),2004,32(9):73-76.
- [5] 罗莉斯·李,王少铭.大蒜组织培养研究进展[J].农技服务,2015,32(9):80-81.
- [6] 王旭静,王志兴·唐.以根为外植体建立大蒜的组织培养体系[J].生物技术进展,2011,1(2):140-145.
- [7] Ayabe M, Taniguchi K and Sumi S.Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (Allium sativum L.) [J].Plant Cell Rep, 1995, 15(1-2):17-21.
- [8] Nagasawa A FJJ.Development of morphogenic suspension cultures of garlic (Allium sativum L.) [J].Plant Cell Tissue and Organ culture, 1988, 15(2):183-187.
- [9] Sata S.J BSB, Thaker V S.Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (Allium sativum L.) [J].Method CellSci, 2000, 22(4):299-304.
- [10] 梁燕,陈典,黄晓梅.大蒜试管微鳞茎形成的激素筛选研究[J].东北农业大学学报,2005,36(5):589-592.
- [11] 张素芝,李纪蓉.植物激素对大蒜茎盘组织培养的影响[J].西南农业大学学报(自然科学版),2006,28(5):805-808.