

大葱组织培养及其再生体系的建立与优化

杨俊杰, 谭伟, 彭金环, 于元杰*

(山东农业大学 农学院作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘要: 分别以大葱种子、幼叶、根为外植体, 进行了愈伤组织的诱导和植株再生试验。结果表明: 切口处理的种子为最佳外植体, 愈伤诱导率最高为 90.28%; 以 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 为继代培养基、琼脂浓度为 9 g/L、继代培养的间隔时间 15 d 时, 都可以有效地减少愈伤玻璃化; MS + 2.0 mg/L BA 为最佳分化培养基, 不添加任何激素的 MS 培养基为最佳生根培养基。

关键词: 大葱; 组织培养; 愈伤组织; 玻璃化

中图分类号: S 633

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2008)02-0207-06

THE ESTABLISHMENT AND OPTIMIZATION OF THE REGENERATION SYSTEM OF WELSH ONION IN VITRO

YANG Jun-jie, TAN Wei, PENG Jin-huan, YU Yuan-jie

(State Key Laboratory of Crop Biology, Collage of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The different organs of welsh onion - seeds, immature leaves and roots were taken as explants to induce callus and regeneration. It was indicated that the seeds were the best, callus induction rate can reach to 90.28%; MS + 1.0mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA is the subculture medium, ager concentration is 9 g/L, the interval of subculture time is 15 days, all can reduce callus vitrification effectively; MS + 2.0 mg/L BA is the optimal shoot regeneration medium, and MS medium without any hormone comniation is best for shoot - extension induction.

Key words: Welsh onion; tissue culture; callus; vitrification

大葱 (*A. fistulosum* L. var. *gigantum*) 属百合科葱属 (*Allium*) 植物, 是山东地方特产之一, 以棵大白长, 细腻脆嫩, 汁多味甘, 营养丰富而驰名中外^[3]。近年来, 大葱病害频发, 严重影响其品质^[1,2], 因此利用细胞工程技术改良章丘大葱显得十分重要。国内外已有利用大葱的种子、叶片、花蕾、鳞茎、根等作为外植体诱导愈伤组织的成功报道^[3-10], 但愈伤率相对较低, 影响该技术的广泛应用。本研究旨在建立以大葱种子为外植体通过组织培养获得再生植株的再生体系提供技术资料。

1 材料与方法

1.1 材料和药品

章丘大葱种子由山东省章丘市古城大葱研究所提供, 氯化汞以及其他配制培养基所需的常用化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大葱种子表面灭菌 将大葱种子用 70% 的酒精漂洗 30 s, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 12 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 接种到 MS 固体培养基上。培养器皿为 100 mL 的三角瓶, 封口膜封口, 培养温度为 25 ℃, 光照约为 3000 Lx, 每天照光 12 h。

收稿日期: 2007-04-08

作者简介: 杨俊杰 (1983-), 女, 在读硕士, 主要从事植物遗传与生物技术的研究工作。

* 通讯作者: Author for correspondence. E-mail: guanjq@sdau.edu.cn

1.2.1 不同外植体的获得 ①幼叶和根。将灭菌的大葱种子接种到不添加任何激素的 MS 固体培养基的三角瓶中培养无菌苗,待苗子长到 10 cm 左右时,分别切取其幼叶和根进行离体培养。其中每一部分长为 1 cm 左右,分别接种到愈伤组织诱导培养基上。统计出愈伤率,重复三次,并记录出愈伤数和接种的叶片(根)数。②未经处理的种子。直接将灭菌的大葱种子接种到愈伤组织诱导培养基上,30 d 继代一次。统计出愈伤率,重复 3 次,并记录出愈伤数和接种的种子数。③经过切口处理的种子。将灭菌的大葱种子转移到无菌滤纸上,吸干种子上的水分,然后用组培刀将大葱种子切开一个小口(注意不要切到胚),最后接种到愈伤组织诱导培养基上。统计出愈伤率,重复 3 次,并记录出愈伤数和接种的切口种子数。

1.2.2 愈伤组织的分化 将继代 3 次的愈伤组织转移到不同的分化培养基上,15 d 以后统计分化率。

1.2.3 再生苗的生根 将分化出绿芽的愈伤组织转移到生根培养基上,15 d 后统计生根率。

1.3 培养条件

MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA^[5], pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L 为愈伤组织诱导培养基。

MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/LKT 或者 MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA^[3], pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L; MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA^[4], pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L,9 g/L 和 10 g/L^[5] 为继代培养基;

MS + 0.5 mg/L NAA, pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L; MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA^[4], pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L 和 MS + 2.0 mg/L BA^[5], pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L 为分化培养基。

MS 培养基不添加激素(记为 MS₀), pH 值为 5.8,蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L 为生根培养基^[5]。

2 结果与分析

2.1 不同外植体在愈伤组织诱导培养基上的愈伤诱导情况

以 MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA 为愈伤组织诱导培养基,用幼叶、根、种子和切口处理的种子为外植体,愈伤诱导结果见表 1。

表 1 不同外植体在愈伤组织诱导培养基上的愈伤诱导情况

Table 1 Callus inducing from different explants under callus induction medium

外植体 Explant	接种数 Explants inoculated	生成愈伤数 Callus induced	出愈率(%) Callus induction rate(%)	愈伤长势 Growth state of callus
幼叶 Immature leaves	60	4	6.67	愈伤长势弱 Growth state weak
根 Roots	50	0	0.00	—
种子 Seeds	90	25	27.78	愈伤长势好 Growth state good
切口种子 Kerf seeds	360	325	90.28	愈伤长势好 Growth state good

由表 1 看出,经过 15 d,在添加 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA 的 MS 固体培养基上,愈伤诱导率最高的是切口处理的种子,高达 90.28% (图 1)。由图 1 看出,切口种子不但出愈率高,且出愈时间较一致;其次是种子,愈伤诱导率是 27.78% (图 2)。由图 2 看出,种子出愈时间不一,愈伤的大小差异很大;幼叶的愈伤率只有 6.67% (图 3),由图 3 看出,愈伤组织长势弱,有玻璃化的趋势;根的愈伤率是 0。以上结果表明,在该试验条件下,切口种子是最佳的外植体。

2.2 琼脂浓度对愈伤组织玻璃化的影响

将种子刚刚诱导产生的愈伤组织接种到继代培养基 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA^[4] 上,观察在不同的琼脂浓度下,愈伤组织的玻璃化状况,结果见表 2。

表 2 琼脂浓度对愈伤组织的玻璃化影响

Table 2 Effect of agar concentration on vitrification

琼脂浓度(g/L)	接种愈伤数	玻璃化愈伤数	愈伤玻璃化率(%)
Agar concentration	Callus inoculated	Callus Vitrified	Vitrification rate(%)
8	160	46	28.75
9	100	9	9.00
10	132	8	6.06

由表 2 看出,培养基中的琼脂浓度影响培养基中可利用水分及容器内的相对湿度,对其玻璃化有明显的影响。当用 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 琼脂浓度 8 g/L 为继代培养基时,玻璃化率为 28.75% 较严重,增加琼脂浓度到 9 g/L 时,愈伤组织玻璃化率为 9%,玻璃化现象明显下降,继续增加琼脂浓度到 10 g/L 时,玻璃化状态降低到 6.06%,但这时培养基变得很硬,营养物质和激素难以被培养的组织吸收,愈伤生长缓慢。综合上述情况,本实验选用琼脂浓度为 9 g/L。

2.3 培养条件对愈伤组织玻璃化的影响

2.3.1 激素比对愈伤玻璃化的影响 为确定最佳的继代培养基,参照前人的研究结果,分别以 MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/LKT(或者 BA),MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 为继代培养基,其结果见表 3。

表 3 不同激素比对愈伤玻璃化的影响

Table 3 Effect of hormones combination on callus vitrification

激素配比	接种愈伤数	愈伤玻璃化数	愈伤玻璃化率(%)
Hormones combination	Callus inoculated	Numbers of vitreous callus	Callus vitrification rate(%)
MS + 2.5mg/L 2,4-D + 0.5mg/LKT	103	26	25.24
MS + 2.5mg/L 2,4-D + 0.5mg/LBA	101	21	20.79
MS + 1.0mg/L 2,4-D + 2.0mg/L BA	104	9	8.65

注:供试愈伤为种子诱导产生的未经过继代的愈伤组织

Note: Callus for experiment are induced from seeds without propagation

由表 3 看出,以 MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/LKT 为继代培养基,愈伤玻璃化率很高,达到 25.24%,以 MS + 2.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/LBA 为继代培养基,愈伤玻璃化率比较高,达到 20.79%,可见用 BA 代替 KT 后,愈伤玻璃化率有所降低,用 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 为继代培养基时,愈伤玻璃化明显减轻,愈伤玻璃化率为 8.65%,三者相比,初步认为较高浓度的 2,4-D 对于愈伤组织的玻璃化有一定的作用,BA 在大葱组织培养上的作用优于 KT,MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 为最佳继代培养基。

2.3.2 继代时间周期对愈伤玻璃化的影响 以 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA,琼脂 9 g/L 为继代培养基,观察不同的继代时间周期对愈伤组织的玻璃化情况,结果见表 4。

表 4 继代间隔时间愈伤组织的玻璃化情况

Table 4 Effects of propagation interval on callus vitrification

继代时间(天)	接种愈伤数	愈伤玻璃化数	愈伤玻璃化率(%)
Subculture times(day)	Callus inoculated	Numbers of vitreous callus	Callus vitrification rate(%)
7	104	5	4.81
15	101	9	8.91
20	102	15	14.71

注:供试愈伤为种子诱导产生的未经过继代的愈伤组织

Note: Callus for experiment are induced from seeds without propagation

由表 4 看出,继代间隔为 7 d 时,愈伤玻璃化率为 4.81%,间隔 15 d 时愈伤玻璃化率为 8.91%,间隔 20 d 时愈伤玻璃化率为 14.71%,随着继代培养时间的延长,愈伤组织的玻璃化率具有明显增加的趋势,其中在 7~15 d 的范围内,愈伤玻璃化率增加较缓慢,超过 15 d 后则急速增长。故大葱继代培养间隔时间不要超过 15 d 为宜。继代培养 3 次后的愈伤组织生长健壮(图 4),为下一步的分化做好准备。

2.4 分化培养基对愈伤组织分化的影响

分别以 MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA, MS + 0.5 mg/L NAA 和 MS + 2.0 mg/L BA 为分化培养基,愈伤分化率见表 5。

表 5 激素对比对愈伤组织分化率的影响

Table 5 Effect of hormone combination on the differentiation ration

激素配比 Hormone combination	接种愈伤数 Callus inoculated	愈伤分化数 Callus differentiation	愈伤分化率(%) Callus differentiation rate(%)
MS + 0.5mg/L NAA + 1.0mg/L BA	30	19	63.33
MS + 0.5mg/L NAA	32	18	56.25
MS + 2.0mg/L BA	30	21	70.00

由表 5 看出,以 MS + 0.5 mg/L NAA 为分化培养基,愈伤组织的分化率较低,为 56.25%,而以 MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA 和 MS + 2.0 mg/L BA 为分化培养基,愈伤组织的分化率都比较高,但相对而言,MS + 2.0 mg/L BA 为分化培养基时,分化率更高,为 70.00%,而以 MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA 为分化培养基时为 63.33%,分化率略有降低。以 MS + 2.0 mg/L BA 为分化培养基,分化出芽较多且整齐(图 5),只需要添加一种激素,可以简化试验操作,因此认为 MS + 2.0 mg/L BA 为最佳分化培养基。

2.5 愈伤组织在生根培养基上的生根情况

以不添加任何激素的 MS(MS₀)培养基为生根培养基,设 3 次重复,观察愈伤组织的生根情况,一周左右愈伤组织周围有根产生,之后与培养基接触的愈伤组织下端根逐渐增多,且迅速伸长,愈伤组织的生根率为 100%(图 5)。

2.6 试管苗的驯化移栽

再生植株在生根培养基上培养一个月左右,选取生长健壮、叶色浓绿、根系在培养基上生长较好的试管苗驯化移栽。首先是将三角瓶从培养箱中拿到室温下放置 3 d,然后将幼苗小心的用镊子连带基部培养基一块取出,用清水洗净培养基,移栽后,及时浇灌稀释 10 倍的大量元素母液,直至幼苗成活。(如图 6)

3 讨论

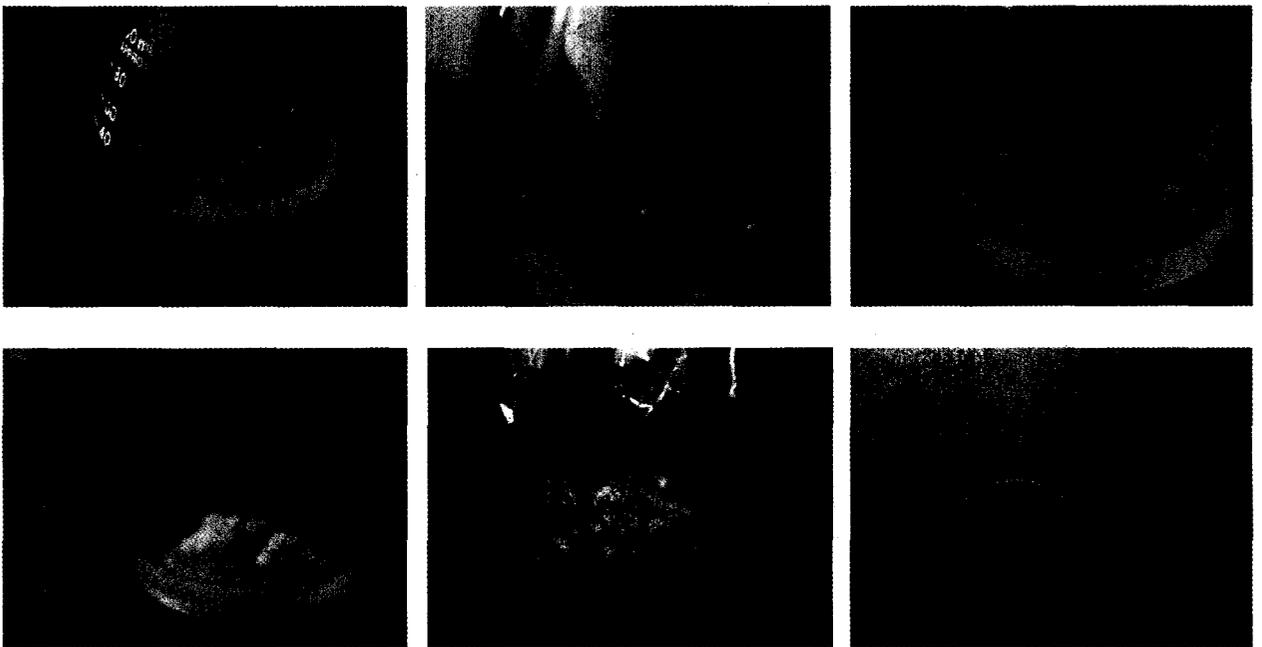
3.1 外植体与愈伤率

组培过程中用到的外植体有芽^[11]、茎段^[12]、幼小花蕾^[13]、叶柄^[14]、嫩叶^[15]、茎尖^[16]、下胚轴^[17]和成熟种子胚^[18]等。本试验在同样条件下分别用幼叶、根、正常种子和切口处理的种子为外植体诱导生成愈伤组织,结果发现不同外植体间的愈伤率差异很大,其中切口的种子愈伤率高达 90.28%,愈伤生成快且较整齐;用种子诱导愈伤率为 27.78%,且不整齐;幼叶和根愈伤诱导率更低。造成这种差异的原因:一是外植体的分生能力可能与愈伤形成有关系。即分生力强的外植体愈伤率高,反之则低。因种胚组织的分生能力远高于其他组织的分生能力所致;二是不同外植体愈伤化过程可能对其环境条件要求不同,本试验条件可能较适合种胚的愈伤化而不适合幼叶和根,结果导致了愈伤率的差异;三是切口种子与种子愈伤率反映其愈伤化进程。切口后的种子愈伤率高的可能原因一是破坏了种皮的完整性,便于其对水分和激素的吸收,促进其细胞代谢和组织分化;二是切口过程可能对种胚造成损伤,有利于愈伤的形成和分化。成熟的种子作为外植体,有其完整的种皮,影响到其对水分和激素的吸收,而这种影响因其饱满度和成熟度不同存在较大差异,这可能是其出愈慢且不整齐的根本原因。种子作为外植体诱导愈伤组织的传统作法是经过催芽^[4],与切口种子为外植体相比增加了操作环节,延长了组培周期。同时,以大葱的幼叶和根

作为外植体进行接种,取材受时间限制,而且由于消毒剂的配合使用与表面灭菌的时间难以掌握,极易造成污染,给大葱组织培养工作带来困难。因此,切口种子作为外植体具有操作简便、缩短时间、提高效率的特点,可以根据试验需要随时接种,从而促进了试验的顺利进行。

3.2 培养条件与玻璃化

玻璃化是植物组织培养中特有的现象,在自然环境中的陆生植物未见有玻璃化现象的存在^[19]。从目前有关玻璃化的研究中发现,导致玻璃化产生的因素很多,如无机盐类、碳水化合物、琼脂、生长调节剂、光照、培养温度和湿度等^[20,21]。但影响不同植物的主导因素可能不同,如毛白杨是相对湿度太高^[22];石竹是琼脂、蔗糖浓度过低,且适当添加一定浓度的 KNO_3 可以完全控制玻璃芽的发生^[23]。本研究表明,2,4-D 浓度过高、培养湿度过大、继代培养间隔过长都容易导致大葱组织培养过程中愈伤组织出现玻璃化状态。这一方面可能是由于加快了细胞分裂速度,新的细胞没有足够的时间合成所需要的细胞内各种物质便进入细胞分裂;另一方面可能是细胞的快速生长加剧了瓶中气体组成的改变,使得培养环境湿度过大,从而影响了愈伤组织的正常生长。因此,本研究认为添加一定浓度的植物生长调节剂和凝固剂、适当缩短继代的间隔时间都可以有效的防止玻璃化。



图版说明 1. 切口处理的种子生成的愈伤组织 2. 种子形成的愈伤组织
3. 幼叶形成的愈伤组织 4. 继代培养的愈伤组织
5. 愈伤组织的分化和生根 6. 大葱苗

Explanation of plates 1. Callus induction from kerf treated seeds; 2. Callus induction from seeds without treated;
3. Callus induction from immature leaves 4. The subculture of callus;
5. The differentiation and radication of callus; 6. Plantlet

参考文献

- [1] Akinori SHINMURA. Studies on the ecology and control of welsh onion root rot caused by fusarium redolensv[J]. J. Gen. Plant Pathol, 2002, 68: 265
- [2] Ikuo KADOTA, Katsue UEHARA, Hirosuke SHINOHARA, et al. Bacterial blight of welsh onion: A new disease caused by xanthomonas campestris pv. allii pv. nov[J]. Gen. Plant Pathol, 2000, 66: 310-315
- [3] 穆春华. 大葱组织培养与种质亲缘关系分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2002
- [4] 盛艳萍, 杨建平, 齐宪磊, 等. 大葱成熟胚离体培养植株再生[J]. 生物技术, 2004, 14(3): 54-55
- [5] 谢芝馨, 张玉喜, 于元杰. 大葱组织培养中玻璃苗特性研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2146-2149

- [6]林忠平,崔庆玲.从葱的愈伤组织诱导再生植株[J].植物学报,1982,24(6):586-587
- [7]张松,张启沛.利用大葱幼叶进行组织培养微繁的研究[J].园艺学报,1995,22(2):161-165
- [8]张松,张启沛.大葱花蕾培养再生植株的研究[J].山东农业大学学报,1994,25(3):277-282
- [9]Phillips G C, Hubstenberger J F. Plant regeneration in vitro of selected Allium species and interspecific hybrids[J]. Hort Sci, 1987, 22(1):124-125
- [10]Shahin E A, Kaneko K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of nonbulbing onions[J]. Hort Sci, 1986,21(2):294-295
- [11]徐忠传,何俊蓉,周静亚,等.6-BA浓度对离体多花黄精不定芽增殖的影响[J].安徽农业大学学报,2006,33(1):105-107
- [12]董倩,李凤玉.驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化[J].福建师范大学学报(自然科学版),2006,22(1):72-76
- [13]向太和.菊花组织培养植株再生及其后代的变异[J].杭州师范学院学报(自然科学版),2006,5(1):42-45
- [14]耿明.丽格海棠组织培养的影响因素研究[J].安徽农学通报,2006,12(1):35-65
- [15]杨雪芹,曾庆平.马兜铃的组织培养与植株再生[J].广州中医药大学学报,2006,23(1):65-68
- [16]郭海滨,代汉萍,雷家军.叶子花组织培养技术研究[J].安徽农业科学,2006,34(1):13-14
- [17]耿新丽,赵一鹏,秦勇.植物激素对观赏南瓜下胚轴愈伤组织形成的影响[J].安徽农业科学,2006,34(3):448-576
- [18]李根英,黄承彦,隋新霞,等.小麦不同外植体的组织培养效果研究[J].麦类作物学报,2006,26(1):21-25
- [19]陶铭.组织培养中畸形胚状体及超度含水苗的研究[J].西北植物学报,2001,21(5):1048-1058
- [20]邢世岩.木本植物组织培养玻璃化的原因和控制[J].植物学报,1989,24:88-94
- [21]Thomas P. Explant, medium and vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon[J]. J. Hort Sci Bio., 2000, 75(1):19-25
- [22]郝霞霞,朱祯.毛白杨叶片组培再生芽的玻璃化问题探讨[J].北京林业大学学报,1999,21(1):68-71
- [23]刘非燕,郭达初.重瓣丝石竹试管苗玻璃化发生原因初探[J].杭州大学学报,1996,23(4):282-287

(上接第 206 页)

POD 是生物体清除氧自由基的重要酶。POD 活性下降,引起膜质过氧化加速,脂膜流动性降低,膜透性增加,最后导致细胞和组织解体死亡,外观表现为花瓣枯萎、脱落。本试验结果表明,牡丹切花瓶插保鲜过程中,从花始开至盛花期,虽然外观看不出衰老迹象,但细胞内已产生了衰老信号,导致 POD 发生很大的变化(图 5)。6-BA 处理使牡丹切花瓶插期间花瓣中 POD 活性比对照下降缓慢。这也是延缓牡丹切花衰老,延长瓶插寿命的主要原因之一。

总之,通过本试验结果表明,瓶插液中添加 6-BA,可以提高牡丹切花在瓶插过程中的吸水能力,降低 MDA 含量和膜相对透性,增加 POD 活性,并能延长瓶插寿命。

参考文献

- [1]王荣花,刘雅莉,李嘉瑞.不同发育阶段牡丹和芍药切花开花生理特性的研究[J].北方园艺,2005,32(5):861-865
- [2]史国安,杨正中.温度和化学药剂对牡丹切花乙烯释放及贮藏品质的影响[J].北方园艺,1997,(6):62-63
- [3]魏文辉,王力军.牡丹切花衰老过程中内源激素水平变化的研究[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2000,18(4):1-6
- [4]刘亚丽,王力军,刘雷.STS、PP₃₃₃对牡丹切花保鲜剂某些生理特性的影响[J].吉林农业大学学报,2005,27(3):276-279
- [5]薛秋华,林香.切花衰老过程中内源激素变化研究进展[J].江西农业大学学报,2005,27(5):792-795
- [6]陈蔚辉.6-BA对月季切花衰老的影响[J].植物生理通讯,1996,32(4):260-192
- [7]郭闻文,陈瑞修,董丽,等.几个牡丹切花品种的采后衰老特征与水分平衡研究[J].林业科学,2004,40(4):89-93
- [8]李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2005
- [9]张圣旺,郑荣生,孟丽,等.牡丹花衰老过程中的生理生化变化[J].山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(2):166-169
- [10]高勇.月季切花衰老期游离氨基酸变化动态初探[J].园艺学报,1991,18(4):369-370
- [11]史国安,郭香凤.牡丹开花和衰老期间乙烯及脂质过氧化的研究[J].西北农业大学学报,1999,(5):50-53
- [12]黄绵佳.PPOH 延缓月季切花开放和衰老的研究[J].园艺学报,1998,25(1):70-74