

文章编号:1000-2642(2006)05-0805-04

植物激素对大蒜茎盘组织培养的影响

张素芝^{1,2}, 李纪蓉²

(1. 四川农业大学 玉米研究所, 四川 雅安 625014; 2. 山东农业大学 园艺学院, 山东 泰安 271018)

摘要:大蒜愈伤组织在培养过程中容易发生变异,因此可以有目的利用这些体细胞变异创造新的种质资源。结果表明:高浓度的生长素有利于大蒜愈伤组织的诱导,但并不利于其分化。MS + NAA 2 mg/L + BA 1 mg/L 是适宜于愈伤组织增殖和分化的培养基。继代2次的愈伤组织芽分化能力最强,但继代6次后,试管苗根尖染色体的变异率达到55.5%,这种变异可能与有丝分裂异常有关。

关键词:大蒜;染色体变异;再生植株

中图分类号:S 661.1

文献标识码:A

EFFECTS OF PHYTOHORMONES ON CALLUS INDUCTION SHOOT DIFFERENTIATION AND GENETIC VARIATION IN THE TISSUE CULTURE OF STEM DISCS OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.)

ZHANG Su-zhi^{1,2}, LI Ji-rong²

(1. Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2. College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Variations tend to occur during tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.) and, therefore, these somatic variations can be exploited to create novel germplasms. In the present study, the stem disks of garlic were used as explants. Higher auxin concentrations appeared favorable for callus induction but not for callus differentiation. MS + NAA 2 mg/L + BA 1 mg/L was suitable for callus proliferation and differentiation. Calli subcultured twice showed the highest rate of shoot differentiation. The chromosomes of the root tips showed a variation rate of 55.5% when subcultured 6 times. These variations are presumed to be associated with abnormal mitosis.

Key words: garlic (*Allium sativum* L.); chromosome variation; regenerated plantlet

大蒜(*Allium sativum* L.) ($2n=16$)为百合科葱属蔬菜,在我国栽培广泛。组织培养技术的发展为大蒜等无性繁殖的蔬菜作物的快速繁殖提供了可能,目前已建立了以茎尖、根尖、真叶、贮藏叶、茎盘切块、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。大蒜的再生途径主要有愈伤组织途径和不定芽途径。其中,愈伤组织途径通过外植体的脱分化进行植株建成,容易发生变异,遗传稳定性差^[1-5]。与其他外植体相比,大蒜茎盘的愈伤组织分化能力较强。通过建立高效的大蒜茎盘愈伤组织诱导体系、继代培

养基的筛选、多次继代培养后试管苗的分化情况和变异情况分析,可以优化培养条件,减少快繁过程中的变异或有目的的利用这些体细胞无性系的变异,为创造新的大蒜种质资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用前苏联改良蒜的茎盘作外植体。

收稿日期:2006-03-07

作者简介:张素芝(1974-),女,山东潍坊人,四川农业大学讲师,从事生物技术及作物遗传育种研究。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料的灭菌

取通过自然休眠的前苏联大蒜的蒜瓣,剥去外层保护叶,去除基部褐色蒜踵,用流水冲洗 30~60 min 后,用 70% 酒精消毒 30 s,然后再用 0.1% 升汞消毒 20 min,用无菌水冲洗 5 次。接种前先用无菌滤纸轻轻吸干材料表面的水分,然后用解剖刀切取高度为 0.3~0.4 cm 蒜瓣基部茎盘,先划十字后再切割为 0.5 cm² 的小块用于接种。

1.2.2 培养基及培养条件

培养基均附加蔗糖 30 g/L、琼脂 7.5 g/L,灭菌前 pH 值调为 5.8~6.0,在 121℃、1.1 kg/cm² 高温高压灭菌 20 min 后使用。植物材料均在 25±1℃、光照度为 2000 lx(16 h/d)的条件下培养。

1.2.3 试验方法设计

愈伤组织的诱导试验采用正交设计,选用 L₉(3⁴) 正交表,重复 3 次,20 d 后统计出芽结果。

1.2.4 染色体观察

愈伤组织的继代培养在 MS+NAA 2 mg/L+BA 1 mg/L 培养基上进行,每 30 d 继代 1 次。试管苗在 2~3 片叶时,转至 MS+NAA 2 mg/L 生根培养基,15℃ 培养 7~10 d 后转至昼温 25℃、夜温 15℃ 条件下再培养 5~7 d。然后随机选取 10 株再生植株根尖,用卡氏固定液固定,卡宝品红染色,每个根尖选取 10 个细胞进行根尖染色体观察。根尖染色体的观察均在 OLYMPUS 显微镜下观察并摄影。根尖细胞染色体数目全部为 16 的统计为二倍体,全部为 32 的统计为四倍体,兼有 16、16 的整数倍或 16 的非整数倍染色体数目的 2 种或 2 种以上细胞的根尖统计为嵌合体。

2 试验结果

2.1 植物激素对诱导大蒜茎盘愈伤组织的影响

接种 2 d 后,茎盘开始膨大,7 d 后肉眼可见有细小粒状愈伤组织由茎盘基部贮藏叶和发芽叶间隙长出。以后的 5~10 d 内愈伤组织生长迅速,表层颗粒逐渐增大至小米粒大小,呈鲜黄色或淡黄色,结构致密,反光性好(图 1,a)。另外还有白色膨大雪花状愈伤组织和褐色透明愈伤组织,但这 2 种愈伤组织都不发生分化,保持原状或褐化死亡。在以上处理中,黄色致密愈伤组织占绝大多数,尤其以处理 1、4、7 和 8 为好。处理 7 的出愈率最高,与其他处理(处理 8 除外)的差异达显著水平。处理 8 次之,出愈率为

86.6%。处理 1 的出愈率最低,仅为 55.6%,与处理 4、5、6、7 和 8 的差异均达到显著水平。这表明生长素和细胞分裂素以较高浓度的组合(处理 7)时能促进愈伤组织的发生,而较高浓度的生长素和较低浓度的细胞分裂素组合(处理 6、8),或较低浓度的生长素和较高浓度的细胞分裂素组合(处理 3、5)能在一定程度上抑制愈伤组织的发生。方差分析表明, $F_{处理} = 16.77$ 大于 $F_{0.01}(2, 19) = 5.9$,说明处理间的差异达到极显著水平。其中 $F_{2,4-D} = 11.67$ 大于 $F_{0.01}(2, 19) = 5.9$,差异极显著,这说明 2,4-D 对愈伤组织的发生起关键作用,这与余建明等^[6]的报道一致。

表 1 植物激素对诱导大蒜茎盘愈伤组织的影响

Table 1 Effects of phytohormones on calli induction from garlic stem disc

处 理	植物激素/(mg·L ⁻¹)			出愈率/%
	2,4-D	NAA	KT	
1	1	0	1	55.6 e
2	1	1	2	56.1 e
3	1	2	3	64.7 de
4	2	0	2	77.1 bc
5	2	1	3	77.7 bc
6	2	2	1	71.8 cd
7	4	0	3	92.6 a
8	4	1	1	86.6 ab
9	4	2	2	61.3 e

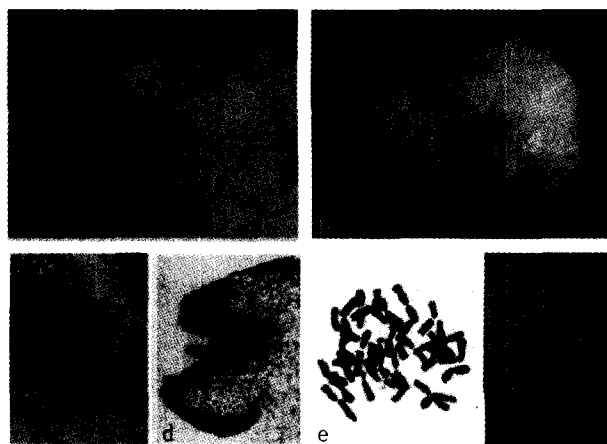


图 1 大蒜茎盘愈伤组织的诱导及继代过程中产生的变异

Fig 1 Callus induction from the stem disc of garlic and its variations during subculture

a. 茎盘诱导出的黄色致密愈伤组织(yellow compact calli induced from stem disc) ×30; b. 继代 3 次的愈伤组织(calli subcultured for 3 times) ×30; c. 愈伤组织继代 2 次后分化出的维管束(vascular bundle differentiated from calli after subcultured for 2 times) ×120; d. 愈伤组织分化出拟胚状体(pseudo embryo differentiated from calli) ×120; e. 四倍体试管苗的根尖染色体(chromosome of the tetraploid root tip) ×120; f. 愈伤组织继代过程中出现的多核细胞(cell with many nucleolus appeared during subculturing) ×120.

2.2 植物激素对大蒜愈伤组织继代培养后芽分化的影响

表 1 处理 7 中诱导出的黄色致密愈伤组织在不同植物激素配比的培养基上进行继代培养时,其生长发育情况会有所改变(表 2)。高浓度的生长素虽然有利于愈伤组织的诱导,但并不利于保持愈伤组织的增殖能力和芽的分化能力。与 2,4-D 相比,NAA 对愈伤组织继代增殖的效果更好。其中在处理 2 的 MS + NAA 2 mg/L + BA 1 mg/L + 培养基上,愈伤组织增殖最快,诱导出的黄色致密愈伤组织分化能力强,

质量最好。同时,激素的浓度及配比也影响愈伤组织的生理状态,使愈伤组织形状及色泽发生变化,并且影响其最终分化。

此外,组织切片表明,继代 2 次后,有的愈伤组织在与培养基接触的一面分化出微管组织(图 1,c),周围为薄壁细胞。继代 3 次后,愈伤组织增殖速度减慢,颗粒大且表面呈光滑的球状(图 1,b)。在继代 5~6 次后,微管组织分化较普遍,有的愈伤组织还分化出拟胚状体(图 1,d)。

表 2 植物激素对愈伤组织继代培养后芽分化的影响
Table 2 Effects of phytohormones on shoot differentiation after subculture

处 理	植物激素/(mg · L ⁻¹)			愈伤组织的芽分化率/%	愈伤组织的生长状况
	2,4-D	NAA	BA		
1	2	0	1	52.3	增殖明显,愈伤组织表面颗粒较大,白色或浅黄色,结构松散,芽分化能力差。
2	0	2	1	85.4	增殖迅速,体积膨大明显,颗粒较小,呈鲜黄色结构致密,芽分化能力最强。
3	4	0	2	34.6	增殖不明显或无增殖,表面颗粒较大,浅黄色,结构松散,芽分化能力最差。
4	0.5	0	0	73.1	增殖不明显,颗粒较小,浅黄色,结构致密,芽分化能力强。
5	0	4	0	67.5	增殖明显,颗粒较大,黄色致密,芽分化能力较强。

2.3 茎盘愈伤组织继代过程中产生的变异

组织切片研究发现,在继代培养过程中,愈伤组织细胞有多核现象(图 1, e)(双核、三核和四核),并在愈伤组织发育植株的根尖中发现有四倍体(图 1, f)和非整倍性细胞,这与前人^[3,6~7]的报道一致。

表 3 茎盘愈伤组织继代过程中产生的变异
Table 3 Variation of stem disc calli during subculture

继代次数	愈伤组织平均分化芽数	二倍体百分率/%	四倍体百分率/%	嵌合体百分率/%
1	5.8	100	0	0
2	7.5	87.5	2.8	9.7
3	6.7	77.8	4.7	17.5
4	1.5	63.0	15.3	21.7
5	1.2	61.8	14.7	23.5
6	0.2	44.5	22.2	33.3
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0

表 3 的结果表明,随着继代次数的增加,愈伤组织的分化能力逐渐下降。在第 2 代时分化能力最强,平均每块愈伤组织能分化 7.5 个芽。从第 4 代开始愈伤组织分化能力显著降低(1.5 个芽),第 7 代和第 8 代已不再分化。此外,由愈伤组织第 1 代分化的不定芽未发生变异,随着继代次数的增加,遗传变异增强,试管苗根尖二倍体细胞逐代减少,而四倍体和嵌

合体细胞逐代增加。第 6 代时,根尖四倍体细胞占 22.2%,嵌合体占 33.3%,总变异率达到 55.5%。

3 讨 论

在离体条件下,植物激素对大蒜茎盘愈伤组织的诱导、继代培养和分化起着重要作用。高浓度的生长素和细胞分裂素配比有利于愈伤组织的诱导。方差分析表明,2,4-D 对茎盘愈伤组织的发生起主要作用(表 1),这与 Nagasawa 和 Finer^[8]的报道一致。继代培养时,在 MS + NAA 2 mg/L + BA 1 mg/L 培养基上愈伤组织能长久的保持增殖能力和分化能力,而 2,4-D 却对愈伤组织的增殖和分化具有负作用。

继代次数对愈伤组织的分化能力和遗传稳定性影响很大。随着继代次数的增加,不定芽分化能力下降,其中继代 2 次后不定芽的分化能力最强(7.5 个),继代 4 次后不定芽的分化能力已显著下降。这与伊贝母的培养情况相似^[9]。

大蒜茎盘愈伤组织在长期继代培养过程中是遗传不稳定的。栾非时等^[1]在添加 2,4-D、KT 和 BA 的培养基上诱导的大蒜再生植株根尖染色体变异率达到 100%。Novak^[2]发现大蒜愈伤组织在长期培养过程中二倍体细胞数目下降,多倍体数目上升,另外还产生亚倍体和非整倍体。除大蒜以外,其他植物组织

培养再生植株中也广泛的存在变异^[3~5],刚毛鸡尾的再生植株还发生染色体倒位、易位和缺失等结构变化^[4]。本试验在继代培养过程中,随着继代次数的增加,大蒜试管苗根尖二倍体细胞逐渐减少,多倍体细胞逐渐增多,并产生非整倍性细胞。继代6次后,根尖细胞变异率达到55.5%。一般认为细胞核的变异有2个来源:①原来存在于外植体中的不同倍性的细胞经诱导后发生分裂。②培养条件引起新的变异。大蒜茎盘分生组织为二倍体起源已被许多报道证实,因此茎盘愈伤组织在继代培养过程中的变异,可能是在离体环境的诱导下,细胞核产生的不正常的有丝分裂所致。出现整倍体和非整倍体细胞可能是由于纺锤体的形成受阻或有丝分裂后期的染色体滞后。而多核细胞的出现和各个细胞核在同步分裂期间纺锤体的融合,可能是组织培养过程中多倍体细胞的另一个来源。与此相似,Novak^[2]和冯霞等^[7]认为这主要是由于有丝分裂的畸变引起的,如再组有丝分裂、滞后染色体和染色体桥。此外,大蒜愈伤组织细胞的染色体不稳定性与外植体类型、基因型和培养条件都有关系。由分生组织诱导出的愈伤组织中二倍体细胞占绝对优势,而叶片愈伤组织中多倍体细胞较多^[2]。植物激素对比对愈伤组织的变异影响也较大^[10]。等浓度的2,4-D和KT引起叶片愈伤组织的变异最小,而单独使用2,4-D时变异最大^[11]。

大蒜愈伤组织培养过程中高频率的变异,为用体细胞无性系进行诱变育种提供了广阔的前景。了解体细胞无性系变异的原因及机制,有利于选择培养程序,以获得具有最高变异率或遗传稳定性的试管苗。

参考文献:

- [1] 栾非时,陈典,崔喜波. 大蒜茎尖愈伤组织的诱导,植株分化及变异的研究[J]. 北方园艺,1993,4(91):23-25.
- [2] NOVAK F J. Chromosomal characteristics of long-term callus culture of *Allium sativum* L. [J]. Cytologia,1981,46:371-379.
- [3] 杜捷,王刚,幸亨泰,等. 兰州百合继代培养过程中的染色体变异[J]. 西北师范大学学报(自然科学版),2003,39(2):61-65.
- [4] 商校民. 植物离体培养中染色体的变异[J]. 细胞生物学杂志,1984,6(1):5-11.
- [5] JACOBSEN E. Polyploidization in leaf callus tissue and in rophos-methyl and colchicines in potato [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1981(1):77-84.
- [6] 余建明,丁犁平,陆维忠. 大蒜体细胞诱导再生植株和小鳞茎及其移栽试验[J]. 江苏农业学报,1992,8(4):46-47.
- [7] 冯霞,孙振元,刘建锋,等. 多年生黑麦草核型分析与组织培养再生植株染色体变异研究[J]. 林业科学研究,2005,18(3):321-324.
- [8] NAGASWA A, FINER J J. Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic [J]. Hortscience,1988,23(6):1068-1070.
- [9] 王仑山,丁惠宾,王亚馥. 伊贝母愈伤组织在继代培养过程中染色体变异和分化频率的研究[J]. 西北植物学报,1990,10(1):54-60.
- [10] 徐培文,马伟青. 大蒜组织培养材料染色体倍性变化的研究[J]. 山东农业科学,1998(5):30-31.
- [11] DOLEZEL J, NOVAK F J. Karyological and cytophotometric study of callus induction in *Allium sativum* L. [J]. J. Plant Physiol,1985,118:421-429.

责任编辑:陈绍兰