

影响大葱体细胞胚胎发生因子的研究

岳桂华¹, 蒋启东²

(1. 阜新高等专科学校农职院 阜新 123004 2. 辽宁省风沙地改良利用研究所, 阜新 123000)

摘要: 采用正交试验设计方法研究了 MS 微量元素、2,4-D、萘乙酸、脯氨酸和腺嘌呤的浓度对 5 种基因型大葱未成熟子叶愈伤形成和体细胞胚胎发生的影响。结果表明: MS 微量元素的浓度对出愈率和胚胎发生率均有显著的作用; 在 MS 培养基中附加 2,4-D、萘乙酸、脯氨酸和腺嘌呤对愈伤组织的形成有明显的促进作用。微量元素浓度对大葱体细胞发生有明显的影 响, 各基因型间在胚胎发生时所需激素种类和浓度各不相同。

关键词: 大葱; 胚胎发生; 基因型; 培养基

中图分类号: S 633.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)03-0017-03

大葱组织培养与植株再生被认为是较难进行的工作, 以大葱叶片和幼叶诱导体细胞胚胎发生是大葱组织培养工作的难点, 一些实验室对此进行了有意义的研究, 多为单个因素对大葱细胞胚胎发生影响的研究, 主要在大葱基因型、激素的种类和浓度、子叶的切割方法^[1]等方面。该研究采取正交设计方法, 探讨 5 个大葱基因型对 MS 培养基的不同微量元素浓度, 附加不同浓度的 2,4-D、萘乙酸(NAA)、脯氨酸和腺嘌呤对大葱未成熟子叶体细胞胚胎发生的影响, 为提高大葱组织培养效率提供依据。

1 材料与方法

以章丘 29 系、天津 5 叶齐、掖选 1 号、华县谷葱、辽葱 1 号等 5 个山东、河北、辽宁和陕西的主栽大葱品种的未成熟子叶为外植体, 选取 3~5 mm 叶片经 75%乙醇 2 min, 0.1%HgCl₂ 10~15 min。用无菌水冲洗 2~3 次后接种在不同的培养基中, 25℃黑暗培养, 6 周调查各处理的未成熟子叶出愈数和出胚数, 计算出愈率和胚胎发生率, 经反正弦转换作方差分析和显著性测验。

培养基的配制采用 L₁₆(4⁵)正交试验设计, 设 5 个因素 4 个水平, MS 微量元素的浓度(1/2MS, MS, 2MS, 4MS); 2,4-D 浓度(0.5, 10, 20 mg/L); 脯氨酸浓度(0.50, 100, 200 mmol/L)和腺嘌呤浓度(0, 10, 20, 40 mg/L), 培养基高压灭菌 20 min。

2 结果与分析

2.1 5 个因子对大葱未成熟子叶出愈率和胚胎发生率的影响

对 5 个因子正交试验的大葱未成熟子叶出愈率和

胚胎发生率进行了方差分析, F 测验结果见表 1。

表 1 大葱未成熟子叶出愈率和胚胎发生率 F 测验

F 值	微量元素	2,4 D	萘乙酸	脯氨酸	腺嘌呤
出愈率	4.596**	108.951**	8.175**	17.672**	2.674*
胚胎发生率	5.668**	0.028	1.798	0.714	1.593

“*”、“**”分别表示 0.05、0.01 显著水平。

表 2 大葱出愈率和胚胎发生率的显著性测验

微量 元素	出愈率(%) FCF		胚胎发生率(%) FEG					
	平均值	显著性	平均值	显著性				
		0.05 0.01		0.05 0.01				
4	86.00	a A	10.37	a A				
2	85.97	a A	8.81	a A				
1	79.32	ab AB	6.77	a A				
1/2	71.73	b B	2.84	b B				
出愈率(%)FCF								
2,4 D 浓度 (mg/L)	平均值	显著性		萘乙酸浓度 (mg/L)	平均值		显著性	
		0.05	0.01			0.05	0.01	
20	95.30	a	A	20	90.87	a	A	
5	94.46	a	A	5	83.72	ab	AB	
10	93.51	a	A	10	80.20	b	B	
0	17.96	b	B	0	66.63	c	C	
出愈率(%)FCF								
脯氨酸浓度 (mmol/L)	平均值	显著性		腺嘌呤浓度 (mg/L)	平均值		显著性	
		0.05	0.01			0.05	0.01	
50	92.72	a	A	10	85.39	a	A	
100	85.51	b	AB	20	83.93	a	A	
0	80.80	b	B	40	80.49	ab	A	
200	58.21	c	C	0	72.55	b	A	

从表 1 可知, 微量元素、2,4-D、NAA、脯氨酸和腺嘌呤等 5 个因子的不同浓度对大葱未成熟子叶诱导愈伤的发生均有不同程度的影响, 以 2,4-D 影响最大, F 值达 108.951, 以腺嘌呤最小, F 值为 2.674, 仅达显著水平, 其它因子均达极显著水平。胚胎发生率只在不同浓度的微量元素处理间达极显著水平。各因子对大葱出愈率和胚胎发生率影响的显著性测验见表 2。

在 MS 培养基中增加微量元素浓度到 2MS 和 4MS

第一作者简介: 岳桂华, 女, 1962 年生, 副教授, 从事农学专业教学及管理工作。

收稿日期: 2006-11-20

与原 MS 微量元素相对未成熟子叶形成愈伤没有明显作用,但 4MS 与 1/2MS 微量元素相比较作用明显。在 MS 培养基中加入 2, 4 D(浓度为 5、10、20 mg/L)可增加愈伤组织诱导效果,但各浓度之间差异不显著。在 MS 培养基中加入 NAA(浓度为 5、10、20 mg/L),随浓度增加,出愈率提高。在 MS 培养基中加入 50 mmol 脯氨酸可提高出愈率,但浓度增加到 100 mmol 时则没有促进愈伤形成的作用,当浓度增加到 200 mmol 时,反而降低了出愈率。在基本培养基中加入腺嘌呤(浓度为 10、20、40 mg/L)对愈伤的形成有一定促进作用,但各浓度之间出愈率相似。各因子对胚胎发生率的影响仅表现在微量元素浓度变化上,当降低到 1/2MS 时,与 MS 微量元素相比胚胎发生率极显著降低;当增加到 2MS 和 4MS 时与 MS 微量元素相比三者之间胚胎发生率没有差异。

2.2 基因型对大葱未成熟子叶出愈率和胚胎发生的影响

对 5 种基因型和 16 种培养基诱导大葱愈伤和体细胞发生的影响进行了方差分析和显著性测验(表 3、表 4 和表 5)。

表 3 大葱 5 个基因型和 16 种培养基的出愈率和胚胎发生率方差分析

变异来源	自由度	出愈率(%)			胚胎发生率(%)			F _{0.05}	F _{0.01}
		S ₁ S	M ₁ S	F	S ₁ S	M ₁ S	F		
品种	4	1029.91	257.48	2.06	1787.53	446.88	8.76 **	2.52	3.65
培养基	15	5289.34	3512.62	28.10 **	1591.57	106.10	2.08 *	1.84	2.36
误差	60	7499.91	125.00		3061.13	51.02			
总和	79	61277.95			6497.74				

表 4 16 种培养基诱导大葱出愈率和胚胎发生率的显著测验

培养基	出愈率(%)	显著性		培养基	出愈率(%)	显著性	
		0.05	0.01			0.05	0.01
L ₂	100.00	a	A	L ₁₅	15.71	a	A
L ₇	99.52	a	A	L ₉	13.84	ab	A
L ₁₀	99.52	a	A	L ₁₆	10.11	ab	A
L ₁₂	98.89	ab	AB	L ₁₄	9.90	ab	A
L ₁₄	98.72	ab	AB	L ₇	9.30	ab	A
L ₁₁	98.63	ab	AB	L ₁₀	8.42	ab	A
L ₈	98.22	ab	AB	L ₁₁	7.19	ab	A
L ₁₆	97.44	ab	AB	L ₈	6.93	ab	A
L ₃	92.53	abc	ABC	L ₁₅	6.63	ab	A
L ₄	86.38	bc	BC	L ₆	6.61	ab	A
L ₅	78.89	c	C	L ₁₂	6.53	ab	A
L ₆	62.93	d	D	L ₅	5.08	abc	A
L ₁₃	55.50	d	D	L ₄	4.74	abc	A
L ₁₅	29.74	e	E	L ₂	4.36	bc	A
L ₉	9.22	f	F	L ₃	3.86	bc	A
L ₁	0.61	g	G	L ₁	0.28	c	A

方差分析(表 3)表明 除基因型间出愈率差异未达到显著外,基因型间胚胎发生率、培养基间出愈率和胚胎发生率均表现出显著或极显著差异,即表现为胚胎发生率对基因型的依赖性和培养基中附加不同激素和氨基酸对诱

导愈伤和体细胞胚胎发生的重要作用。显著性测验(表 4)可知 在 MS 基本培养基中不加任何附加成分(L₁),愈伤组织诱导率和体细胞胚胎发生率仅为 0.61%和 0.28%。当加入 2, 4 D 5 mg/L 以上时,加与不加其它成分,均可诱导产生 60%以上出愈率。但不加 2, 4 D(L₁₃、L₅、L₉)出愈率显著降低。体细胞胚胎发生主要受微量元素浓度影响,微量元素为 1/2MS(L₁、L₃、L₂、L₄)时胚胎发生率显著降低。生长素对诱导体细胞胚胎发生有促进作用,单一生长素加入一定浓度脯氨酸和腺嘌呤(L₁₃、L₉、L₁₆)效果更好。基因型间胚胎发生率以章丘 29 系和天津 5 叶齐表现较好,两者间差异达极显著水平,并且极显著或显著高于掖选一号、华县谷葱和辽葱一号。

表 5 基因型间胚胎发生率的差异显著性

基因型	胚胎发生率	差异显著性			
		X-2.34	X-4.43	X-6.96	X-9.71
章丘 29 系	14.42	12.19 **	10.11 **	7.67 **	4.91
天津 5 叶齐	9.51	7.28 **	5.20 *	2.76	
掖选 1 号	6.75	4.52	2.44		
华县谷葱	4.31	2.08			
辽葱一号	2.23				

3 讨论

3.1 MS 培养基微量元素浓度以及附加激素和氨基酸对大葱出愈率和胚胎发生率的影响

张松^[2]认为利用大葱幼叶为外植体,在 MS 附加各种激素的培养基上可以获得再生株。该项研究在诱导大葱未成熟子叶体细胞发生时,仅在减少微量元素浓度为 1/2MS 时表现为出愈率和胚胎发生率显著降低,而增加微量元素到 2MS 至 4MS 时与原来的 MS 微量元素之间未表现出差异。可见,大葱功能叶在诱导体细胞胚胎发生时不需要较高浓度的微量元素。在培养基中加入脯氨酸可提高体细胞胚胎发生率。Armstrong 等^[3]在 MS 培养基中加入脯氨酸 25 mmol/L 使玉米细胞胚胎发生率直线上升。Constance 等^[4]在诱导水稻体细胞胚状体发生和植株再生中,在 MS 培养基中加入 12 mmol/L 脯氨酸得到了很好效果。Christou^[5]以 N₆为基本培养基,附加脯氨酸 2.875 g/L 有效地从大豆成熟胚诱导体细胞胚胎发生。该研究中 50 mmol/L 脯氨酸仅对大葱未成熟子叶出愈率有明显的促进作用,对体细胞发生无影响。这可能是由于所用作物种类和外植体不同导致在诱导体细胞胚胎发生时对脯氨酸的需求量存在差异。朱徽^[6]认为,腺嘌呤能使石刁柏叶肉细胞原生质体来源的愈伤组织产生许多不同时期的胚状物。在大葱未成熟子叶组织培养中,加入腺嘌呤可促进愈伤组织的形成,但对体细胞发生无明显作用。

3.2 大葱不同基因型和不同培养基对组织培养的反应

胚胎发生率在基因型间存在极显著差异,即大葱细胞胚胎发生与基因型有很大的相关性,这一研究结果还

未见报道。

不同培养基对大葱愈伤的形成和体细胞胚胎发生的作用明显不同。在无任何附加成分的培养基中,大葱未成熟子叶也能愈伤和诱导体细胞胚胎发生,但发生率低,分别为0.61%和0.28%。在MS培养基2MS微量元素+10 mg/L NAA+200 mmol/L 脯氨酸+10 mg/L 腺嘌呤(L₉);或MS培养基4MS微量元素+20 mg/L NAA+50 mmol/L 脯氨酸+20 mg/L 腺嘌呤(L₁₃);或MS培养基4MS微量元素+20 mg/L 2,4-D+100 mmol/L 脯氨酸+10 mg/L 腺嘌呤(L₁₆)均可得到10%以上的胚胎发生率。可见,在大葱体细胞胚胎发生过程中,MS培养基中加入2,4-D或NAA,再附加一定浓度的脯氨酸和腺嘌呤均可诱导体细胞胚胎发生,各种激素和氨基酸成分间是可以相互作用、相互补充的。此外,试验还发现,不同品种在体细胞胚胎发生过程中所

需激素种类和浓度存在差异。

参考文献:

- [1] 王小佳. 蔬菜育种学(各论)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] 张松, 张启沛. 利用大葱幼叶进行组织培养微繁殖的研究[J]. 园艺学报, 1995, 22(2): 164-165.
- [3] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline[J]. Planta 1985, 164: 207-214.
- [4] Constance N, Chowdhry A K, Tagin N, Maheshwari N, et al. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. CV. Pusa 169)[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1993, 32: 357-361.
- [5] Christou P, Yang N. Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis[J]. Annals Genetica Sinica 1987, 64: 225-234.
- [6] Zhu z. Embryoids in plant tissue cultures[J]. Acta Genetica Sinica 1987, 5(1): 79-88.

Studies the Factors Affecting Somatic Embryogenesis in Chinese Onion

YUE Gui hua, JIANG Qi dong

(1. Fu Xin Higher Training College in Liaoning Province, Fuxin 123000; 2. Liao Ning Institute of Wind Sand Development and Utilization, Fuxin 123000)

Abstract: The effects of the concentration of MS micro salts, 2,4 dichlorophenoxyacetic acid(2,4 D), naphthalene acetic acid (NAA), proline and adenine on callus formation and embryogenesis were investigated using orthogonal design with immature cotyledon of Chinese onion. The results showed that the role of concentration of NAA, proline or adenine could promote callus formation. The concentration of MS macro salts possessed obvious effects on somatic embryogenesis of Chinese onion. The category and concentration of the hormone needed were different among genotypes when embryogenesis were induced.

Key words: Chinese onion; Embryogenesis; Genotype; Medium

《北方园艺》常用计量单位表示法



1. 时间: 用 a(年)、d(天)、h(小时)、min(分)、s(秒)表示。
2. 面积: 用 km²(平方千米)、hm²(公顷)、m²(平方米)、dm²(平方分米)、cm²(平方厘米), 亩已废除, 可暂用 667m² 代替。
3. 质量: 用 g(克)、kg(千克)、t(吨)表示。
4. 浓度: 可用%表示质量分数和体积分数。质量浓度用 kg·L⁻¹(千克每升), g·L⁻¹(克每升)、

mg·L⁻¹(毫克每升)、ug·L⁻¹(微克每升)。ppm 已经不使用, 可根据具体情况改写成质量分数 mg·kg⁻¹、体积分数 uL·L⁻¹ 或质量浓度 mg·L⁻¹, 数值保持不变。

5. 照射量: 用 C·kg⁻¹(库伦每千克), 不用 R(伦琴), 1R=2.58×10⁻⁴ C·kg⁻¹。

6. 组合单位

组合单位中不能加入其他信息, 如“V_C含量 25 mg/100g 鲜重”, 应为“V_C含量 250 mg·kg⁻¹(鲜样质量)”; “施肥量 140 kg N/ hm²” 应为“施 N 肥量 140 kg·hm⁻²”; 组合单位书写错误, 如“mg/kg·d” 应为“mg·kg⁻¹·d⁻¹”。