

麻江红蒜茎尖愈伤组织诱导及植株再生研究

郑晓峰, 黄刚

(黔东南民族职业技术学院, 贵州 凯里 556000)

摘要: 采用不同激素配比对麻江红蒜茎尖愈伤组织诱导及植株再生进行研究。结果表明: 茎尖愈伤组织诱导的适宜培养基为: B₅+2, 4-D 2.0 mg/L; 不定芽诱导的适宜培养基为: B₅+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L; 不定芽增殖的适宜培养基为: B₅+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 适宜的生根培养基配方为 B₅+6-BA 0.01 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

关键词: 麻江红蒜; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: S 633.403.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)07-0059-03

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属蔬菜, 多年生宿根草本。在我国已有 2 000 多年的种植历史, 对人类具有重要的食用和医疗保健价值^[1]。大蒜具有杀菌、抑菌、抗毒等医疗、保健功能。对高血脂、高胆固醇、糖尿病、心脏病及胃、肠、肝、肺、乳腺等癌症有减轻症状及治疗作用。黔东南州麻江县种蒜历史悠久, 产品质量优良, 有较高的知名度。通过多年选种选育, 培育出了外型美观, 香辣浓郁, 内容物丰富, 独具特色的麻江红蒜。

第一作者简介: 郑晓峰(1965-), 女, 副教授, 现主要从事植物组织培养教学及研究工作。E-mail: zxf5678@126.com。
基金项目: 贵州省黔东南州科技局 2006 年度州级科技三项费专项经费资助项目。
收稿日期: 2009-02-20

因其外皮多为紫红色而得名。其营养成分和品质居全国同类产品之首。2003 年荣获“中国红蒜之乡”和首届贵州省农特产品“优质农产品”称誉。近年来, 由于多年的无性繁殖, 病毒普遍发生, 导致种性严重退化, 单产降低, 品质变劣, 影响大蒜产量的进一步提高^[2]。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^[3]。通过愈伤组织获得的再生植株, 容易产生变异, 遗传稳定性差^[3-9]。关于大蒜愈伤组织诱导体细胞再生植株的报道较多^[3-9]。而以茎尖诱导愈伤组织的报道不多^[5], 仅有几例。现以茎尖作为外植体, 研究不同激素组合对麻江红蒜茎尖愈伤组织的诱导及植株再生的影响, 为建立麻江红蒜组培快繁体系和丰富麻江红蒜的种质资源提供一定的理论依据。

Ertility of Different Tomato to Leaves Tissue Culture Differences

MAO Xiujie, SUN Zhong-feng, WU Yan-li

(Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600 China)

Abstract: The male sterile varieties of tomato and Jidong 216 were used as materials in this paper, took leaves as explants, with different hormones, different concentrations of formulations, induced by different fertility of tomato leaves. Callus, adventitious buds and rooting, selected medium organizations of efficient and renewable tomato. The results showed that: MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L (pH 5.86) expressed the best results of the callus induction on Jidong 216, the induction rate was 81.0%. MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 7.5 g/L (pH 5.86) expressed the best results of the leaves on the male sterile varieties, the rate was 66.7%. the stem and bud on Jidong 216 was expressed well induced by MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L+sucrose 40 g/L+agar 7.5 g/L, the rate was 64.3%. the adventitious buds on the male sterile varieties was expressed well by MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+sucrose 40 g/L+agar 7.5 g/L, the rate was 58.3%. MS+6-BA 3.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L+sucrose 40 g/L+agar 7.5 g/L expressed the best results of the roots on Jidong 216.

Key words: Tomato; Male sterile lines; Jindong 216; Tissue culture

1 材料与方法

1.1 供试材料

贵州省麻江县主栽品种麻江红蒜。由麻江县农业局提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基及培养条件 愈伤组织诱导培养基: 以 B₅为基础培养基, 添加不同的植物激素 6-BA、2, 4-D、KT, 不同激素的浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/L, 附加蔗糖 20 mg/L; 不定芽诱导培养基: 以 B₅为基础培养基, 附加 6-BA (0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L), NAA (0.01、0.05 mg/L), 附加蔗糖 30 mg/L; 不定芽继代增殖培养基: 以 B₅为基础培养基, 附加 6-BA (1.0、2.0 mg/L), NAA (0.01 mg/L), 蔗糖 30 mg/L; 上述培养基用 4 mg/L 的琼脂粉固化, pH 5.8~6.0, 分装于瓶中, 在 121℃湿热灭菌 12 min, 冷却备用。培养温度 (25±1)℃, 光照强度 1 500~2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.2.2 愈伤组织的诱导 取红蒜鳞茎, 剥去蒜皮, 先用洗涤剂浸泡 10 min 后洗净, 再用自来水冲洗 1 h, 后用 70% 的酒精浸泡 1 min, 再用 0.1% 的升汞消毒 5~8 min, 然后用无菌水反复冲洗数次, 直至干净为止。在超净工作台上剥取 2~3 mm 长的茎尖, 接种在愈伤组织诱导培养基上 (表 1), 每个处理接种 20 瓶, 每瓶接种 1 个茎尖, 观察记录试验过程, 30 d 后统计分析试验结果。

1.2.3 不定芽的诱导 将诱导产生的愈伤组织接种在 不定芽诱导培养基上 (表 2), 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种愈伤组织 2 块, 观察记录试验过程, 30 d 后统计分析试验结果。

1.2.4 不定芽的增殖 将诱导产生的不定芽转入附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的增殖培养基中。每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 2 苗, 观察记录试验过程, 25 d 后统计分析试验结果 (表 3)。

1.2.5 生根培养 将继代增殖培养 2~3 代后形成的试管苗转入生根培养基中, 培养 30 d 后统计分析试验结果 (表 4)。

2 结果与分析

2.1 植物激素对麻江红蒜茎尖愈伤组织诱导的影响 接种 3 d 后, 茎尖基部开始膨大, 7 d 后肉眼可见有米粒状愈伤组织出现, 12 d 后愈伤组织生长迅速, 25~26 d 后形成洁白透明的、淡黄色的、结构致密的、反光性好的愈伤组织。而且 [1]~[9] 处理中, 只有 [4]~[6] 3 个配方的培养基形成愈伤组织 (见表 1)。而在 [4]~[6] 3 个配方中, 随着 2, 4-D 浓度的增加, 愈伤组织诱导率也在增加, 而以处理 [6] 愈伤组织诱导率最高, 愈伤组织淡黄色的、结构致密的、反光性好。由此可见, 2, 4-D 对红蒜愈伤组织诱导起决定性作用。6-BA、KT 对红蒜愈伤组织诱导无影响。这与张素芝、余建明^[3, 9]等的报道一致。

表 1 植物激素对麻江红蒜茎尖愈伤组织诱导的影响
Table 1 The effect of phytohormone on shoot tip callus induction of Majiang red garlic

| 处理号 No. | 培养基配方 Medium formula/mg · L ⁻¹ | 外植体接种块数 No. of explants | 出愈块数 No. of callus | 出愈率 Rate of callus/% | 愈伤组织分化状况 Status of callus differentiation |
|------------|--|----------------------------|-----------------------|-------------------------|--|
| [1] | B ₅ +6-BA 0.5 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |
| [2] | B ₅ +6-BA 1.0 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |
| [3] | B ₅ +6-BA 2.0 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |
| [4] | B ₅ +2, 4-D 0.5 | 20 | 8.00 | 40.00 | 愈伤组织体积膨大, 白色, 结构较松散 |
| [5] | B ₅ +2, 4-D 1.0 | 20 | 15.00 | 75.00 | 愈伤组织体积膨大, 淡黄色, 结构较致密 |
| [6] | B ₅ +2, 4-D 2.0 | 20 | 17.00 | 85.00 | 愈伤组织膨大明显, 淡黄色, 结构致密。 |
| [7] | B ₅ +KT 0.5 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |
| [8] | B ₅ +KT 1.0 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |
| [9] | B ₅ +KT 2.0 | 20 | 0.00 | 0.00 | 没有愈伤组织的分化 |

2.2 植物激素对红蒜愈伤组织芽分化的影响

在表 2 所转移的愈伤组织诱导芽的培养中, 15 d 后在 (2)、(5)、(6) 号培养基中有白色突起, 再过 10 d, 首先在 (2) 号培养基上分化形成 6~7 个绿色小芽, 接着在 (4)、(6) 号培养基中的愈伤组织也分化出少量芽和根, 除 (2) 号培养基能较稳定地形成小苗和 (4)、(6) 号培养基中, 只有少数几块愈伤组织能够形成绿色小苗外, 其他培养基的愈伤组织膨大后, 大部分形成根状物, 不久后, 形成玻璃化苗, 最后死亡。这显然与所接种的愈伤组织的质地和不定芽诱导的激素组合有极大的关系。由此可见, 该试验愈伤组织诱导不定芽的适宜培养基为 B₅+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L。

2.3 植物激素对不定芽增殖的影响

将诱导出的不定芽接种在表 3 培养基中。每个处理都有芽的分化增殖, 但不同的激素组合分化芽的增殖倍数不一样, 以 (2) 号培养基配方不定芽增殖倍数最高, 可达 5.6 倍。因此可以确定该组合也即 B₅+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为不定芽增殖的适宜培养基。该配方继代 2~3 次后, 试管苗生长正常, 但继续继代 4 次以上, 逐渐形成试管小鳞茎, 不再增殖。这可能是植物激素在红蒜继代增殖过程中, 改变了内源激素所致。

2.4 植物激素对生根诱导的影响

将继代 2~3 次后的无根小苗, 转移到不同激素配比的生根培养基中。由表 4 可见, 4 个配方均能诱导根

系的产生, 但不同激素组合对根系的诱导影响较大, 以 6-BA 0. 01 mg/L、NAA 0. 1 mg/L 的配比, 可使生根诱导

率达 85. 7%。即处理④号 B₅+6-BA 0. 01 mg/L+NAA 0. 1 mg/L 为适宜的生根培养基配方。

表 2

植物激素对红蒜愈伤组织芽分化的影响

| Table 2 The effect of phytohormone on shoot differentiation of callus | | | | | |
|---|----------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|
| 处理号 | 激素组合 Na Phytohormone | | 接种的愈伤组织块数 | 愈伤组织的芽分化数 No. of | 愈伤组织的芽分化率/ %Rate of |
| No. | 6-BA/ mg ° L ⁻¹ | NAA/ mg ° L ⁻¹ | No. of callus | shoot differentiation | shoot differentiation |
| (1) | 0. 50 | 0. 01 | 20 | 0. 00 | 0. 00 |
| (2) | 1. 00 | 0. 01 | 20 | 13. 70 | 68. 50 |
| (3) | 2. 00 | 0. 01 | 20 | 0. 00 | 0. 00 |
| (4) | 2. 00 | 0. 05 | 20 | 9. 52 | 47. 60 |
| (5) | 3. 00 | 0. 05 | 20 | 0. 00 | 0. 00 |
| (6) | 3. 00 | 0. 50 | 20 | 10. 44 | 52. 20 |

表 3

植物激素对红蒜继代增殖的影响

Table 3 The effect of phytohormone on subculture multiplication of red garlic

| 培养基 | 激素组合 Phytoho mone | | 接种的芽数 | 分化芽数 | 增殖倍数 |
|-------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| 编号 Na | 6-BA / mg ° L ⁻¹ | NAA / mg ° L ⁻¹ | No. of inocula- tive shoot/ 个 | No. of differ- tiation shoot/ 个 | P roliferation times |
| (1) | 0. 1 | 0. 1 | 20 | 64 | 3. 2 |
| (2) | 0. 3 | 0. 1 | 20 | 112 | 5. 6 |
| (3) | 0. 5 | 0. 1 | 20 | 102 | 5. 1 |
| (4) | 0. 1 | 0. 2 | 20 | 56 | 2. 8 |
| (5) | 0. 3 | 0. 2 | 20 | 98 | 4. 9 |
| (6) | 0. 5 | 0. 2 | 20 | 84 | 4. 2 |

2. 5 试管苗移栽

将生根后的试管苗, 移栽到已消毒过的腐殖质盆土中繁殖小鳞茎。据观察, 试管苗根系过长> 4 cm, 根少于 3 条的移栽成活率低。以根长< 2 cm, 3 条根以上移栽成活率高, 可达 85%以上。因此, 试管苗要及时转入生根培养, 并及时移栽。

表 4

植物激素对红蒜生根诱导的影响

| Table 4 The effect of phytohormone on root induction of red garlic | | | | | |
|--|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 培养基 | 激素组合 Phytoho mone | | 接种的苗数 | 生根株数 | 诱根率 |
| 编号 Na | 6-BA / mg ° L ⁻¹ | NAA / mg ° L ⁻¹ | Na of inoculative plantlets/ 株 | No. of rooting plantlets/ 株 | Rate of rooting/ % |
| ① | 0. 00 | 0. 05 | 23 | 15. 00 | 65. 22 |
| ② | 0. 00 | 0. 10 | 20 | 12. 00 | 60. 00 |
| ③ | 0. 01 | 0. 05 | 20 | 13. 00 | 65. 00 |
| ④ | 0. 01 | 0. 10 | 14 | 12. 00 | 85. 70 |

3 小结与讨论

在离体条件下, 植物激素对红蒜愈伤组织的诱导、

芽的分化和增殖起着重要作用。结果表明 高浓度的 2, 4-D 有利于愈伤组织的诱导, 在 B₅+2, 4-D 2. 0 mg/ L 培养基中能形成分化能力强的愈伤组织。不同激素组合对愈伤组织芽诱导的影响十分显著, 不同质地的愈伤组织块也影响着不定芽的分化。该试验中以淡黄色的、结构致密的、反光性好的愈伤组织诱导不定芽分化率高, 以 B₅+6-BA 1. 0 mg/L+NAA 0. 01 mg/L 为不定芽诱导的适宜培养基。由愈伤组织形成的小植株体细胞无性系变异的原因和机制, 有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 张寒霜 赵俊丽, 李伟明, 等. 大蒜茎尖脱毒培养及快繁技术研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(增刊): 117-119.
[2] 徐培文, 孙慧生, 孙瑞杰, 等. 大蒜茎尖培养脱毒及增产效果的研究[J]. 山东农业科学, 1991(6): 6-10.
[3] 张素芝, 李纪容. 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, 2006 28(5): 805-808.
[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] 梁非时, 陈典, 崔喜波. 大蒜茎尖愈伤组织诱导、植株分化及变异的研 究[J]. 北方园艺, 1993(4): 23-25.
[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] 王洪隆, 康玉庆, 张存金. 大蒜发芽叶培养体细胞胚发生[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 92-94.
[8] 杨乃博. 大蒜全展叶愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1981(6): 47-48.
[9] 吕启愚, 周维燕, 董雅一. 从大蒜嫩叶诱导愈伤组织及植株再生[J]. 园艺学报, 1982(2): 67-69.

Induction of Callus and Plant Regeneration of Shoot Tips of *Allium sativum* L. of Majiang

ZHENG Xiao-feng , HUANG Gang
(Qiandongnan National Vocational Technical College, Kaili, Guizhou 556000, China)

Abstract: Adopt different hormone to match ratio the more hurting organization guidance and establishing regeneration on studying to *Allium sativum* L. of Majiang, the result showed that: The appropriate medium for different culture stages was: B₅+2, 4-D 2. 0 mg/L; Guide of proper culture medium of indeterminate bud was: B₅+6-BA 1. 0 mg/L+NAA 0. 01 mg/ L; optimal for bud multiplication was: B₅+6-BA 0. 3 mg/L+NAA 0. 1 mg/ L; better for rooting was: B₅+6-BA 0. 01 mg/ L+NAA 0. 1 mg/L.

Key words: *Allium sativum* L. of Majiang; Callus; Tissue culture