

# 多倍体大蒜胚状体诱导条件研究初报

武 延 生

(邢台学院 生物化学系,河北 邢台 054001)

**摘 要:**以大蒜根尖为试材,采用 0.05%秋水仙素溶液诱导多倍体,研究了愈伤组织的诱导和培养方法,以及胚状体的诱导方法,以期为大蒜胚状体诱导提供依据。结果表明:在 MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 培养基上,大蒜根尖可形成疏松型和致密型 2 种愈伤组织结构;将致密型愈伤组织培养在 MS+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上,将形成胚状体。

**关键词:**大蒜;多倍体;愈伤组织;胚状体

**中图分类号:**S 335.1;S 633.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0110-03

多倍体细胞内染色质增加,细胞体积相应增大,植株整体外形一般表现为巨大,且次生代谢成分增加、抗逆性提高<sup>[1]</sup>。由于多倍体细胞内同源染色体数目异常,导致染色体配对和分离发生错误,难以进行有性生殖,故探索无性繁殖方法具有一定的现实性。无性繁殖包括诱导芽或胚状体,相对而言,后者具有结构完整、速度

快、数量多的优点。迄今为止,在大蒜的作物育种中,有关胚状体的研究报道相对较少。张忠新等<sup>[2]</sup>采用新疆伊宁大蒜蒜瓣在国内首先获得大蒜胚状体并再生植株,之后王洪隆等<sup>[3]</sup>和郑海柔等<sup>[4]</sup>分别采用不同的外植体诱导得到了大蒜的体细胞胚再生植株,并获得了较高的幼苗再生率。但是,多倍体大蒜胚状体的诱导条件探索鲜见报道。前期试验采用秋水仙素诱导得到了大蒜多倍体根尖<sup>[5]</sup>,在该试验中继续探索诱导愈伤组织以及在此基础上诱导胚状体的条件,以期为大蒜胚状体诱导提供依据。

**作者简介:**武延生(1977-),男,河北临西人,硕士,讲师,现主要从事作物育种及植物信号转导等研究工作。

**基金项目:**邢台市科技计划资助项目(2011ZC017)。

**收稿日期:**2013-01-16

[15] 易朝辉,任传忠,王宇,等. 水杨酸对菊花花瓣生理和花期的影响[J].

安徽农业科学,2006,34(17):4225-4226.

[16] 范美华,董芳琴. 水杨酸对玫瑰切花保鲜的效应[J]. 江苏农业科学,

2008(2):193-195.

[17] 李淑英,何文华,董丽,等. 保鲜液对桃切花采后生理变化及保鲜效果的影响[J]. 北方园艺,2009(12):232-235.

## Effect of Cephalosporins on Plasmalemma Permeability in Cut Rose

LIU Shu-wei<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, HUANG Mian-jia<sup>2</sup>, YUAN Xue-jun<sup>1</sup>, ZENG Ling-yun<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, Qiongzhou University, Sanya, Hainan 572200; 2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

**Abstract:** Taking cut roses 'Carola' as materials, the effect of plasmalemma permeability using different concentrations and generations of cephalosporins were studied, the purpose was to explore the sensitive situation of cut roses' incision fungi to the cephalosporin antibiotics, looking for a new fungicide and preservation. The results showed that the fungi of cut roses' incision was sensitive to the cephalosporins, and low concentrations of cephalosporin treatment could delay or inhibit the increase in plasmalemma permeability of cut rose's leaves and petals, high concentrations of cephalosporins killed the fungi of cut roses' incision and also interfered with cell wall synthesis of cut roses, leading to cut flowers withered in advance; the third-generation cephalosporin was better than the second-generation cephalosporins in promoting leaves and petals' plasmalemma system stability of cut roses, and the second generation cephalosporins was better than the first-generation, especially the mass percentage of 0.01%'s ceftriaxone sodium of third-generation cephalosporins, not only to promote the stability of plasmalemma system and extend the vase life of cut flowers for three days.

**Key words:** cephalosporins; cut rose; plasmalemma permeability; relative electric conductivity

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试大蒜来自邢台当地。LRH-250-G 光照培养箱, 广东省医疗器械厂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 多倍体大蒜的诱导方法参考吴延生<sup>[5]</sup>的方法进行,即将紫皮蒜去除外皮后,冲洗干净,先用 70% 的乙醇浸泡 30 s,再用 0.1% 的氯化汞浸泡 8 min,最后用无菌水冲洗 3 遍,将蒜瓣浸泡于无菌的 0.05% 的秋水仙素溶液中,放置在 25℃ 的光照培养箱中遮光培养,诱导得到多倍体大蒜细胞。

1.2.2 培养基配制 参照张忠新等<sup>[2]</sup>方法配制培养基,即在 MS 培养基的基础上添加不同物质形成 3 种培养基,分别为诱导愈伤组织培养基:MS+3% 蔗糖+0.7% 琼脂+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L,pH 6.0;继代培养基:MS+3% 蔗糖+0.7% 琼脂+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L,pH 6.0;细胞分化培养基:MS+3% 蔗糖+0.7% 琼脂+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,pH 6.0。

1.2.3 愈伤组织的诱导和继代培养及胚状体的诱导 大蒜在 0.05% 的秋水仙素水溶液浸泡 3 d 后长出嫩根,用无菌水将秋水仙素溶液冲净,切取根尖约 2~5 mm 长,在根尖上划若干伤口后接种于诱导愈伤组织培养基,置于光照培养箱中培养(温度 25℃,光照 12 h/d)。及时观察记录根尖的形态变化并清除被污染的组织块,25 d 后统计愈伤组织诱导情况。在长出的愈伤组织块上划若干伤口后转移至继代培养基中,继代培养 2~3 代,每代间隔 25 d。切取愈伤组织约 1 cm<sup>3</sup>,转接于细胞

分化培养基中培养。继代培养和分化培养条件与愈伤组织诱导条件相同。

1.2.4 切片镜检 染色液包括卡诺固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1),解离液(95%乙醇:浓盐酸=3:1),以石炭酸品红为染色剂,需现用现配。配制石炭酸品红染色剂的步骤为:配制母液 A(将 0.15 g 碱性品红溶解于 5 mL 70%乙醇中)和 B(将 5 mL 母液 A 加入 45 mL 5%石炭酸水溶液中),之后取母液 B 45 mL 加入 6 mL 冰醋酸和 6 mL 37%甲醛<sup>[6]</sup>即可得到石炭酸品红染色剂。切取胚状体,在蒸馏水中漂洗 2~3 次,之后在卡诺固定液中固定 24 h,固定好后转入解离液解离 15~20 min,解离后在蒸馏水中漂洗,再用染色剂染色 3~4 min,用水再洗 2~3 次,按常规方法压片、镜检。

## 2 结果与分析

### 2.1 大蒜根尖多倍体诱导

水培的大蒜根形态正常、粗细均匀(图 1),用秋水仙素溶液处理的大蒜根尖明显膨大(图 2),这是由于秋水仙素抑制细胞进行分裂,导致复制后的 2 份染色体无法正常地分配到 2 个子细胞中,从而使细胞的染色体数目加倍,遗传物质增多,细胞的体积也相应增大所致。

### 2.2 愈伤组织诱导

秋水仙素诱导的根尖培养 5~7 d 后,在切口处呈微隆起状,体视镜下可观察到该处细胞团表层下的细胞大而透亮(图 3),这是愈伤组织初始形成阶段的一般形态。之后,外观特征逐渐分明,大致可以分成 2 种类型:白色雪花状的质地松散愈伤组织(图 4)和有瘤状突起的浅黄色致密愈伤组织(图 5)。

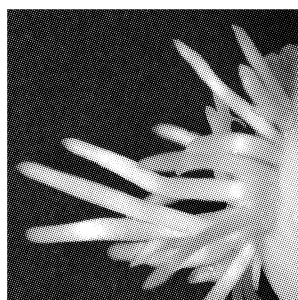


图 1 水处理的大蒜根尖  
Fig. 1 Garlic roots treated with water

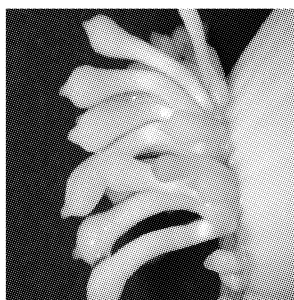


图 2 0.05% 的秋水仙素处理的大蒜根尖  
Fig. 2 Garlic roots treated with 0.05% colchicine

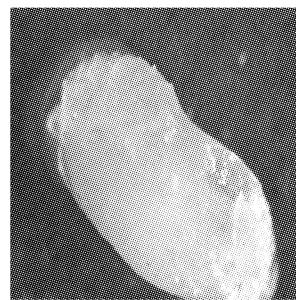


图 3 体视镜下观察到的大蒜根尖在形成愈伤组织初期的细胞表层  
Fig. 3 Cell surface of early callus of garlic root under stereo microscope

### 2.3 继代培养

愈伤组织经 2~3 代培养后,体积明显增大,且大量疏松型愈伤组织逐渐生长为致密型愈伤组织。分析原因可能是由于愈伤组织增殖较快,在适宜的营养条件下,能大量吸收营养物质而迅速增殖,在外观上表现出

体积的明显增大。

### 2.4 胚状体诱导

在细胞分化培养基中将愈伤组织进行诱导培养,形成的愈伤组织质地紧密,并在表面形成许多小突起(图 6),小突起扩大伸长,最后形成胚状体(图 7)。



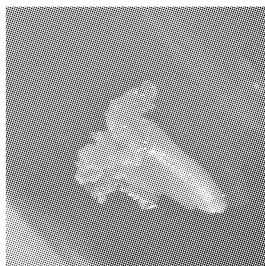


图4 疏松型愈伤组织

Fig. 4 Soft callus

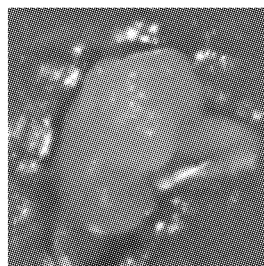


图5 致密型愈伤组织

Fig. 5 Dense callus

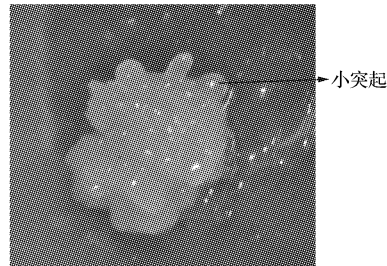


图6 愈伤组织上长有许多小突起

Fig. 6 Small projections on the callus

### 2.5 切片镜检

显微镜下观察到,用秋水仙素处理得到的胚状体细胞核比二倍体大蒜细胞的细胞核要大(图8、9),说明得

到的胚状体为多倍体大蒜胚状体,其核内染色体条数增加了。其主要原因是早期秋水仙素的诱导,使得遗传物质不稳定,染色体数目增多。

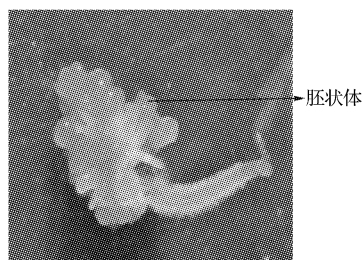


图7 愈伤组织上分化出胚状体

Fig. 7 Embryoid differentiated from callus

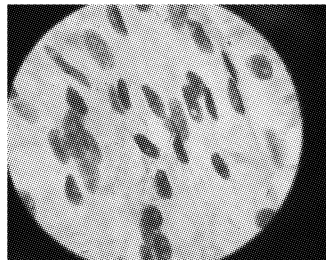


图8 正常倍性的大蒜细胞核(100×)

Fig. 8 Nucleus of normal diploid

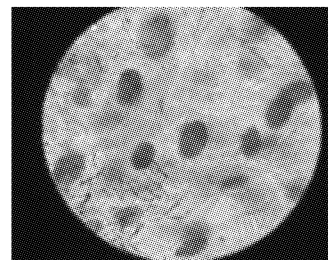


图9 多倍体大蒜胚状体细胞核(100×)

Fig. 9 Nucleus of normal polyploid

### 3 讨论

大蒜根尖用秋水仙素处理后,染色体数目增加,形成多倍体或亚多倍体,从该试验结果来看,所形成的多倍体或亚多倍体不妨碍细胞的脱分化和再分化,这为该研究的顺利开展提供了重要的前提。

在诱导愈伤组织中形成了质地松散和质地致密2种类型的愈伤组织,经过2~3代的培养后,质地疏松的愈伤组织逐渐转变为质地致密组织,且形成的致密愈伤组织与在分化培养基中形成的愈伤组织类似,表明在诱导愈伤组织培养基和继代培养基的培养中,细胞团内的细胞已出现分化,并向胚状体方向发展。在形成胚状体的过程中的关键因素是培养基中生长调节物质的种类、浓度及比例,其中,细胞分裂素在促使细胞分裂和调节细胞分化中发挥重要作用,一般在此阶段其含量增加,该试验使用的细胞分裂素为激动素,浓度由0.5 mg/L增加至3 mg/L,获得了较好的效果。

所获得胚状体的细胞核较大,表明染色体数量较二倍体增多,但由于试验仪器的限制未能准确计算出其染色体数目。此外,对获得的多倍体大蒜胚状体的活性鉴定和再生幼苗能力需要进一步鉴定。

#### 参考文献

- [1] 杨寅桂,庄勇,陈龙正. 蔬菜多倍体育种及其应用[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 534-538.
- [2] 张忠新,李仁敬. 大蒜组织培养中胚状体的发生[J]. 实验生物学报, 1983, 16(3): 241-247.
- [3] 王洪隆,康玉庆,张存金. 大蒜发芽叶培养体细胞发生[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 92-94.
- [4] 郑海柔,沈敏健. 大蒜球状体形态发生中的细胞组织学研究[J]. 上海农业学报, 1998, 14(1): 33-38.
- [5] 武延生. 秋水仙素诱导大蒜根尖多倍体的研究[J]. 北方园艺, 2012(23): 36-38.
- [6] 刘祖洞,江绍慧. 遗传学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1987: 208-211.

## Study on the Induction Conditions of Polyploid Garlic Embryoid

WU Yan-sheng

(Department of Biochemistry, Xingtai University, Xingtai, Hebei 054001)

**Abstract:** Taking the root tip of garlic as material, the induction and culturing methods of callus and induction methods of embryo were investigated after treated with colchicine, in order to provide basis for enduction of garlic embryo. The results indicated that on the medium MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L, the root tip of garlic could form soft and dense callus; on the medium MS+KT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, embryo could be gotten from dense callus.

**Key words:** garlic; polyploid; callus; embryo