

影响洋葱愈伤组织及胚性愈伤组织诱导的因素研究

代 月¹, 吴 雄², 廉美兰¹, 霍雨猛², 缪 军², 朴炫春¹

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 山东 济南 250100)

摘 要:以洋葱雄性不育系种子(10-8F)为外植体,研究了蔗糖浓度、暗处理及取材时间对洋葱愈伤组织及胚性愈伤组织诱导的影响,以期优化胚性愈伤组织的形成条件,为转基因提供良好受体并为建立高频再生体系奠定基础。结果表明:40 g/L 蔗糖及光培养最适合愈伤组织的诱导;50 g/L 蔗糖及暗培养最适合胚性愈伤组织的诱导,最适宜的取材时间为 45 d。

关键词:洋葱;愈伤组织;胚性愈伤组织;组织培养

中图分类号:S 633. 203. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2013)07—0125—03

洋葱(*Allium cepa* L.)属百合科葱属植物,是世界范围内主要的蔬菜种类之一。目前,随着生物技术的发展,利用生物技术改良洋葱品种资源越来越受到重视。

洋葱的许多组织都可作为外植体,如鳞茎盘^[1]、双鳞片^[2]、花蕾和子房^[3]、幼蕾^[4-5]、幼嫩花序^[6]、未成熟胚^[7]、种子等^[8],研究发现,这些外植体多为旺盛的分生组织,存在着分生潜力,具有脱分化及再分化的能力,但普遍存在着再生率低、体系不稳定等诸多问题,且仅有极少数的再生体系能够适用于转基因的研究。近几年,国内外关于洋葱组织培养方面的报道相对较少^[6,9-10]。一个成熟的再生体系是转基因的重要基础,一个良好的受体系统更是实现转基因的重要前提,胚性愈伤组织就是一种良好的转基因受体。因此,诱导洋葱愈伤组织并优化胚性愈伤组织的培养条件对其进行进一步进行基因转化有着重要意义。

相对于其它材料而言,种子具有保存期长、材料丰富、不受季节限制、取材方便、操作简单等优点。该试验以洋葱雄性不育系种子(10-8F)为试材,研究了不同培养条件对愈伤组织及胚性愈伤组织诱导的影响,旨在为洋葱育种寻求较好的转基因受体并建立成熟的再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

洋葱雄性不育系种子(10-8F)由山东省农业科学院

蔬菜研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体的获得 无菌条件下,将种子先用 75% 的酒精消毒 1 min,再用 2% 的次氯酸钠消毒 25 min,无菌水冲洗 3~5 次,接种于添加不同外源激素的培养基上。

1.2.2 愈伤组织的诱导 暗处理对愈伤组织诱导的影响:将消毒后的种子接种在 MS 添加 0.5 mg/L 2,4-D,蔗糖浓度为 30 g/L 的培养基中,将其中一部分培养皿放置在暗培养室,50 d 后观察愈伤组织发生率及生长情况。不同蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响:在以上试验结果的基础上,将种子接种在 MS 添加 0.5 mg/L 2,4-D 的培养基中,蔗糖浓度设置为 10、20、30、40、50 g/L,50 d 后调查出愈率及愈伤组织生长情况。

1.2.3 胚性愈伤组织的诱导 不同取材时间对胚性愈伤组织诱导的影响:分别取培养 15、30、45、60 d 的愈伤组织,接种在 MS 添加 2 mg/L BA 和 0.25 mg/L 2,4-D,蔗糖浓度为 40 g/L 的培养基中,40 d 后调查胚性愈伤组织发生率及生长情况。暗处理对胚性愈伤组织诱导的影响:在以上试验结果基础上,将其中一部分培养皿放置在暗培养室,培养 40 d 后调查胚性愈伤组织的发生率。不同蔗糖浓度对胚性愈伤组织诱导的影响:蔗糖浓度设为 10、30、50、70 g/L,共 4 个处理,培养 40 d 后调查胚性愈伤组织的发生率。

1.2.4 培养条件 培养基中加入琼脂 0.8%,pH 值调至 5.8,121℃ 高温灭菌 15 min,所用器皿为 90 mm 培养皿,每个培养皿接种 9 个外植体。培养温度为(25±1)℃,需要光照条件培养的处理将光照强度设置为 1 600 lx,光照时间设置为 16 h/d。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 11.0 软件分析,显著水平为

第一作者简介:代月(1987-),女,在读硕士,研究方向为植物组织培养。E-mail:daiyue1030@126.com

责任作者:朴炫春(1963-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为植物组织培养。E-mail:nyypxc@ybu.edu.cn

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903018)。

收稿日期:2012-12-12

$P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 洋葱愈伤组织的诱导

2.1.1 暗处理对洋葱愈伤组织发生的影响 洋葱种子接种约 10 d 以后有浅黄色的愈伤组织出现,光照条件下的愈伤组织出现较黑暗条件下的愈伤组织出现早 2 d 左右,通过对愈伤组织的诱导率调查发现,与暗处理比较,正常光照条件更利于愈伤组织的诱导(表 1),诱导率达 72.3%。

表 1 光照对洋葱愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of light on callus induction of onion

处理	愈伤组织诱导率
Treatments	Efficiency of callus induction/%
明培养	72.3
暗培养	65.5

2.1.2 不同浓度蔗糖对洋葱愈伤组织诱导的影响 在植物组织培养中,蔗糖是不可缺少的碳源,它可以为细胞提供合成新化合物的碳骨架,为细胞的呼吸和代谢提供底物与能源,而且还可以维持一定的渗透压,是培养物渗透环境的主要调节者。不同蔗糖浓度对愈伤组织诱导会产生一定的影响,如图 1 所示,当蔗糖浓度为 40 g/L 时,愈伤组织的诱导率最高,过高或过低都不利于愈伤组织的诱导。并且,由观察发现,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织的颜色也随之由浅变深,低浓度下的愈伤组织较致密且过于坚硬,30 和 40 g/L 的浓度下形成了质地比较坚实的愈伤组织,根据进一步的试验说明,这类愈伤组织更容易诱导出胚性愈伤组织,综合各方面因素,诱导愈伤组织最适宜的蔗糖浓度为 40 g/L。

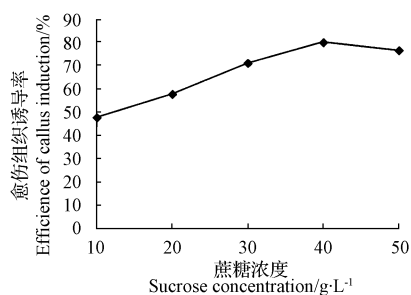


图 1 不同浓度蔗糖对洋葱愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effect of difference concentrations of sucrose on callus induction of onion

2.2 洋葱胚性愈伤组织的诱导

2.2.1 不同取材时间对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响

取接种种子后培养 15、30、45、60 d 的愈伤组织,切成约 1 mm×1 mm 的小块后转接到添加 2 mg/L BA 和 0.25 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中诱导胚性愈伤组织。由表 2 可知,取培养 45 d 的愈伤组织最适合诱导胚性愈伤组织,诱导率达 62.3%。

表 2 不同取材时间对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different sampling time on embryogenic callus induction of onion

取材时间	胚性愈伤组织诱导率
Sampling time/d	Efficiency of embryogenic callus/%
15	23.3 d
30	39.9 c
45	62.3 a
60	52.2 b

2.2.2 暗处理对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响 胚性愈伤组织即能形成体细胞胚的愈伤组织,一般胚性愈伤组织质地较坚实,颜色有乳白色或黄色,表面具球形颗粒,且生长缓慢,通过肉眼即可基本判断所获得的愈伤组织是否为胚性,与愈伤组织诱导不同的是,暗处理条件下胚性愈伤组织的发生率较高,诱导率达 68.2% (表 3)。

表 3 光照对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of light on embryogenic callus induction of onion

处理方式	愈伤组织诱导率
Treatments	Efficiency of embryogenic callus/%
明培养	61.1
暗培养	68.2

2.2.3 不同浓度蔗糖对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响

蔗糖在胚性愈伤组织的诱导过程中起着至关重要的作用,是非常重要的调节物质。由图 2 可知,当蔗糖浓度增加到 50 g/L 时,胚性愈伤组织的形成率最高,达到 84.7%,蔗糖浓度过高或过低都不利于胚性愈伤组织的形成。

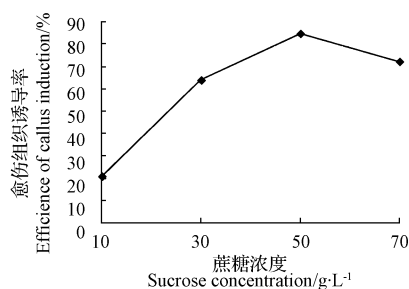


图 2 不同蔗糖浓度对洋葱胚性愈伤组织诱导的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of sucrose on embryogenic callus induction of onion

3 讨论

洋葱组织培养过程中,除了培养基、植物生长调节剂以外,碳源、光照等因素也起着非常关键的作用。目前,洋葱离体再生植株建立过程中使用的碳源均为蔗糖,Saker^[8]在以洋葱种子为外植体建立反复再生体胚的再生体系过程中,并未做蔗糖因素的细致研究;姜璐琰^[5]以洋葱幼蕾为外植体,蔗糖浓度为 30 g/L 时愈伤组织的诱导率最高,然而,外植体不同,所需要的培养条件

也不同。经研究发现,蔗糖在整个再生体系的各个环节都起着关键性的作用,培养时期不同,所需要的蔗糖浓度也不同,该试验中,40 g/L 蔗糖最适宜诱导愈伤组织,50 g/L 蔗糖最适宜诱导胚性愈伤组织。有人认为蔗糖浓度对胚的发生和成熟也有很大影响,在诱导体细胞胚发生时需要高浓度的糖,但在体细胞胚成熟时却需要相应地降低糖的浓度,这有待进一步的研究来考证。早期的学者指出愈伤组织更易在黑暗条件下培养,该试验研究表明,正常光照条件下更适合愈伤组织的诱导,而黑暗条件下更适胚性愈伤组织的诱导。取材时间对胚性愈伤组织的形成也有一定的影响,取材太早,愈伤组织不容易诱导出胚性愈伤组织,几乎没有变化;取材太晚,细胞易老化,再生能力弱,试验结果表明,取 45 d 愈伤组织诱导胚性愈伤组织的效果最好。该试验以洋葱雄性不育系种子(10-8F)为外植体,对愈伤组织及胚性愈伤组织诱导的部分影响因子进行分析,优化了胚性愈伤组织形成的条件,为洋葱育种寻求了较好的转基因受体,并为建立成熟的再生体系奠定良好的基础。

参考文献

[1] Rémi K, Michel R, Bernard T, et al. Long-term multiplication of onion

(*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*[J]. Plant Cell, 1992, 28:281-288.

[2] Hussey G. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation[J]. Scientia Horticulturae, 1978 (9): 227-236.

[3] Luthar Z, Bohanec B. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18:797-802.

[4] 杜敏霞,刘湘萍. 洋葱幼蕾离体培养与植株再生的研究[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 54-56.

[5] 姜璐璐. 洋葱胚状体诱导及再生体系的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.

[6] 王建军, 刘照坤, 侯喜临, 等. 洋葱高频离体再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2012, 39(7): 1380-1386.

[7] Eady C C, Lister C E, Suo Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18:111-116.

[8] Saker M M. *In vitro* regeneration of onion (*Allium cepa* L.) through repetitive somatic embryogenesis[J]. Biologia Plantarum, 1997, 40:499-506.

[9] 于大胜. 葱属植物改良中组织培养的研究进展[J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 10-14.

[10] 陈丽. 洋葱再生体系建立及原生质体分离条件的筛选[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.

Study on the Factors of Onion Callus and Embryonic Callus Induction

DAI Yue¹, WU Xiong², LIAN Mei-lan¹, HUO Yu-meng², MIAO Jun², PIAO Xuan-chun¹

(1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002; 2. Institute of Vegetable Research, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: Taking the male sterility line seeds of onion (*Allium cepa* L.) as explants, the effects of sucrose concentration, light and sampling time on callus tissues and embryogenic callus tissues induction were studied, in order to optimize the conditions of embryogenic callus formation, and provide a good receptor transgenic and lay the foundation for the establishment of high frequency regeneration system. The results showed that 40 g/L sucrose and light culture were the most suitable for callus induction; 50 g/L sucrose and dark culture were the most suitable for embryogenic callus induction, and the optimum sampling time was the 45th day.

Key words: onion (*Allium cepa* L.); callus; embryogenic callus; tissue culture

如何预防化肥中毒

农民在农事操作中为预防化肥中毒一定要注意以下几点:

1. 严禁赤身露体搬运运送化肥。化肥具有一定的腐蚀性,化肥袋外经常黏附有大量化肥粉粒颗粒和溶化的卤汁液体物质,赤裸着臂膀搬运化肥势必污染皮肤。因此,搬运化肥时应穿长袖衣服。

2. 化肥储存应设专用仓库,并设立标志。农家储肥时,化肥不得与瓜果、蔬菜及粮食等混放于一起,以防污染或误食中毒,更不宜用化肥袋盛装粮食等。具有较强挥发性的化肥应放置在阴凉通风安全处,以防有害气体外溢。

3. 注意安全使用化肥。使用化肥时,不可用汗手直接抓取。喷施粉雾或泼洒溶液都要站在上风口。使用粉剂还需戴口罩及防护镜。在烈日暴晒下不可进行施肥;另外施肥后要及时清洗手脸并洗澡、换衣。患有气管炎、皮肤病、眼疾和对化肥有过敏反应者不宜从事施肥操作。

(摘自中国化肥网)