

洋葱组培快繁技术研究

赵丽华

(西昌学院 农业科学学院, 四川 西昌 615000)

摘 要:以“玉黄”洋葱鳞茎盘为外植体,以 MS 为基本培养基,采用 $L_{16}(2^4)$ 正交实验设计,研究了 6-BA、NAA 及 IBA 不同浓度及组合对洋葱组培快繁的影响。结果表明:6-BA 及 NAA 在诱导洋葱愈伤组织、不定芽时交互作用显著;洋葱最适愈伤组织诱导培养基为 MS+NAA 0.10 mg/L+6-BA 2.00 mg/L;最适不定芽诱导培养基为 MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.50 mg/L+多效唑(MET)0.25 mg/L;最适不定根诱导培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L。

关键词:洋葱;鳞茎盘;组培;植物激素

中图分类号:S 633.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0086-03

洋葱(*Allium cepa* L.)属百合科葱属植物,起源于中亚地区,分布广泛,是世界第四大蔬菜作物。洋葱为 2 a 生植物,育种上存在育种周期长、育种效率低等问题^[1-2]。采用组培快繁技术,可增大扩繁系数,大大缩短再生时间,获得大量规格统一、高质量的洋葱幼苗,并为洋葱分子研究建立必要基础。自 1997 年 Dunstan 首次用洋葱获得离体植株后,国内外学者相继做了大量的工作,以茎尖、鳞茎、雄核、花蕾、胚珠等为外植体,获得大量的再生植株^[3-7],为洋葱的组培快繁奠定了基础。根据前人组培研究结果,影响植株再生体系建立的因素很多,如受试品种的基因型、外植体类型、培养基营养成分、生长调节剂配比等^[8-10]。目前应用黄皮洋葱鳞茎盘进行组培快繁尚鲜有报道,该研究旨在通过对“玉黄”洋葱鳞茎盘组培快繁技术进行研究,建立高效离体再生体系,以期能为洋葱快速繁殖及遗传研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为黄皮洋葱“玉黄”。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 选取成熟无病的洋葱“玉黄”,将鳞茎外皮剥除至直径为 4 cm,用自来水冲洗干净后切除顶部 2/3,于 70℃温箱中热处理 10 min,用 10%次氯酸钠溶液浸泡 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,用无菌滤纸吸干水分。剥除鳞茎得到带叶基部鳞茎盘,置于超净工作台上,用 75%的酒精浸泡 50 s,无菌水冲洗 2~3 次,再用

0.1%升汞(加 2~3 滴吐温 20)浸泡 7 min,无菌水冲洗 5~6 次。

1.2.2 愈伤组织诱导 切取 0.5 cm×0.5 cm 鳞茎盘,接种于不同浓度生长素(NAA)与细胞分裂素(6-BA)组合的 MS 培养基中,每瓶接种 3 块,每个处理接种 7 瓶,重复 3 次。培养温度为(25±2)℃,培养 25 d 后统计愈伤组织诱导情况。

1.2.3 不定芽诱导 以洋葱初代培养获得的愈伤组织为培养原材料,切割后接种到含有不同浓度生长素(NAA)和细胞分裂素(6-BA)组合的 MS 培养基上,培养基添加 0.25 mg/L 多效唑(MET)^[11],每瓶接种 3 个芽,每个处理接种 7 瓶,重复 3 次。培养温度为(25±2)℃,光照时间 12~14 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx。培养 30 d 后统计芽诱导率和平均增殖系数。

1.2.4 不定根诱导 当不定芽长到 2~3 cm 时,转接到含有不同浓度生长素(IBA)的 1/2MS 培养基上,每瓶接种 3 个芽,每个处理接种 10 瓶,重复 3 次。培养温度为(25±2)℃,光照时间 12~14 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx。培养 25 d 后统计平均生根率及平均生根数等情况。

1.3 数据分析

愈伤组织诱导率=(诱导愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100%;诱芽率=(诱导出不定芽的愈伤组织块数/接种愈伤组织块数)×100%;增殖系数(倍)=(诱导出不定芽的芽总数/接种愈伤组织块数)×100%;生根率(%)=(形成不定根的芽数/接种芽数)×100%;平均根数=形成的不定根总数/生根苗数。试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 NAA 与 6-BA 对愈伤组织诱导的影响

将洋葱鳞茎盘接种到加不同浓度的 NAA、6-BA 初

作者简介:赵丽华(1972-),女,博士,副教授,现主要从事园艺植物分子生物学及遗传育种的教学与科研工作。E-mail:1973zlh@163.com.

基金项目:四川省教育厅青年基金资助项目(OZB056)。

收稿日期:2013-04-15

代培养基上,培养 7 d 左右,鳞茎盘开始膨大,15 d 后出现瘤状突起。由表 1 可知,NAA 与 6-BA 不同浓度配比的处理间愈伤组织诱导率差异较大,其中处理 A7 的平均诱导率最高。对 NAA 与 6-BA 不同浓度配比组合的处理进行多重比较发现,处理 A7 除与 A11 之间无显著差异外,与其余处理间平均诱导率均达显著差异。表 2 方差分析结果显示,NAA 与 6-BA 交互作用平均诱导率的 $F=5.744$, $\text{Sig.}=0.000<0.05$,表明 NAA 与 6-BA 交互作用显著。由此可知,改良 MS 培养基 A7(MS+NAA 0.10 mg/L+6-BA 2.00 mg/L)为“玉黄”洋葱最佳鳞茎盘愈伤组织诱导培养基。

表 1 NAA 与 6-BA 不同浓度组合对洋葱愈伤组织诱导的影响

处理	NAA /mg·L ⁻¹	6-BA /mg·L ⁻¹	接种数 /块	平均诱导愈伤 组织数/块	愈伤组织 诱导率/%
A1	0.05	0.50	21	10.0	47.6defg
A2	0.05	1.00	21	14.0	65.1bcd
A3	0.05	2.00	21	13.0	60.3bcd
A4	0.05	3.00	21	14.0	66.7bc
A5	0.10	0.50	21	8.0	38.1fg
A6	0.10	1.00	21	14.0	68.3bc
A7	0.10	2.00	21	19.0	84.4a
A8	0.10	3.00	21	13.3	66.7bcd
A9	0.15	0.50	21	6.7	31.7gh
A10	0.15	1.00	21	11.0	52.4cdef
A11	0.15	1.50	21	16.0	73.0ab
A12	0.15	2.00	21	12.3	58.7bcde
A13	0.20	0.50	21	3.7	17.5h
A14	0.20	1.00	21	8.7	41.3efg
A15	0.20	2.00	21	13.0	55.6bcd
A16	0.20	3.00	21	7.3	34.9fgh

注:同一列中不同小写字母表示在 $P\leq 0.05$ 水平上差异显著。下同。

表 2 洋葱愈伤组织诱导结果方差分析

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	显著性指标 Sig.
NAA	4 630.742	3	1 543.581	44.292	0.000
6-BA	9 365.160	3	3 121.720	89.575	0.000
NAA×6-BA	1 801.504	9	200.167	5.744	0.000
误差	1 115.210	32	34.850		
总计	16 912.615	47			

2.2 NAA 和 6-BA 对不定芽诱导的影响

从表 3 可知,各处理均能诱导产生不定芽,但不同处理间的增殖系数有差异。对 NAA 与 6-BA 各水平组合的处理进行多重比较可知,处理 B6 除与 B7 之间没有显著差异外,与其余处理间平均增殖系数均达差异显著,即 B6、B7 均可作为增殖培养基。表 4 方差分析表明,NAA 与 6-BA 交互作用平均增殖系数的 $F=31.724$, $\text{Sig.}=0.000<0.05$,表明 NAA 与 6-BA 交互作用差异显著。由于处理 B6 的平均增殖系数略高于 B7,筛选出 B6(MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.50 mg/L+多效唑 0.25 mg/L)为“玉黄”洋葱最佳不定芽诱导培养基。

2.3 IBA 对不定根诱导的影响

从表 5 可知,除 C1 外,各处理基本都能诱导形成不

表 3 NAA 和 6-BA 不同浓度组合对洋葱不定芽诱导的影响

处理	NAA /mg·L ⁻¹	6-BA /mg·L ⁻¹	接种数 /块	诱芽率 /%	平均增殖 系数
B1	0	1.00	21	98	3.1i
B2	0	1.50	21	100	5.5de
B3	0	2.00	21	100	6.3c
B4	0	2.50	21	100	5.6de
B5	0.05	1.00	21	100	5.9cd
B6	0.05	1.50	21	100	8.0a
B7	0.05	2.00	21	100	7.6ab
B8	0.05	2.50	21	100	6.3c
B9	0.10	1.00	21	100	3.8h
B10	0.10	1.50	21	100	7.1b
B11	0.10	2.00	21	100	6.0cd
B12	0.10	2.50	21	100	5.3ef
B13	0.15	1.00	21	100	2.8ij
B14	0.15	1.50	21	100	4.9fg
B15	0.15	2.00	21	100	4.6g
B16	0.15	2.50	21	100	2.4j

表 4 洋葱不定芽诱导结果方差分析

变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	显著性指标 Sig.
NAA	65.112	3	21.704	612.822	0.000
6-BA	47.087	3	15.696	443.175	0.000
NAA×6-BA	10.112	9	1.124	31.724	0.000
误差	1.133	32	0.035		
总计	1 483.450	48			

定根。对 IBA 各水平进行多重比较表明,加 IBA 的各处理与不加 IBA 处理平均生根率达差异显著,含 IBA 的各水平间差异不显著,表明 IBA 浓度为 0.5~2.0 mg/L 均能较好诱导洋葱形成不定根;处理 C3 和 C4 平均根数没有差异,但与其它处理间平均根数差异显著,表明 C3 和 C4 作为洋葱不定根的诱导培养基更有利于根数增加;处理 C3 的根为白色,生长良好,而处理 C4 的根为浅黄色,生长状况较差。表 6 方差分析表明,平均生根率的 $F=6.605$, $\text{Sig.}=0.007<0.05$,平均生根数的 $F=173.472$, $\text{Sig.}=0.000<0.05$,表明 IBA 不同水平间生根率及生根数差异均达显著。因此,以 C3(1/2MS+IBA 1.0 mg/L)为“玉黄”洋葱不定根的最佳诱导培养基。

表 5 不同浓度 IBA 对洋葱不定根诱导的影响

处理	IBA /mg·L ⁻¹	接种数 /块	平均生根率 /%	平均生根数 /条	根系状态
C1	0	30	89b	2.1c	白色,生长良好
C2	0.5	30	97a	4.4b	白色,生长良好
C3	1.0	30	100a	6.1a	白色,生长良好
C4	1.5	30	97a	6.1a	黄白色,长势一般
C5	2.0	30	98a	4.8b	黄绿色,长势一般

表 6 洋葱不定根诱导结果方差分析

指标	变异来源	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F	显著性指标 Sig.
平均生根率	IBA	209.600	4	52.400	6.605	0.007
	误差	79.333	10	7.933		
	总计	138 721.000	15			
平均根数	IBA	32.844	4	8.211	173.472	0.000
	误差	0.473	10	0.047		
	总计	362.790	15			

3 讨论与结论

生长素可促进芽的伸长生长和根的分化,细胞分裂素可促进细胞分裂,促进非分化组织分化及侧芽增殖,其种类和浓度配比调节着植株的再生方式和器官分化类型。由于植物组织或细胞在离体培养条件下缺乏合成植物生长调节剂的能力,因而在植物组织培养过程中,添加植物生长调节剂是提高离体再生频率的重要因素^[10-12]。该研究以细胞分裂素(6-BA)与生长素(NAA)不同浓度组合进行洋葱愈伤组织诱导,结果表明,愈伤组织诱导率不定芽增殖系数均随2种激素浓度的升高,表现出低浓度促进,高浓度抑制的双重作用。器官发生过程中,激素之间的相互作用很复杂,其浓度配比在器官分化中起着重要的作用,适当配比能够高效的诱导细胞分裂启动、愈伤组织的生长以及根芽的分化等^[10-11,13]。该研究结果表明,在进行“玉黄”洋葱愈伤组织及不定芽诱导时,NAA与6-BA之间表现出交互作用显著,在苹果^[8]、非洲菊^[13]等进行组培时也获得相同的结果,因此,在组培诱导愈伤组织及不定芽时,激素配比是必须考虑的一个重要因素。

生根培养最主要是把不定芽从增殖改成不增殖,而分化不定根,这个阶段必须创造一个适于根的发生和生长的条件,主要措施是降低培养基中无机离子的浓度及加入生长素^[14]。该研究以1/2MS培养基加生长素(IBA)进行不定根的诱导,结果表明,没有加生长素的1/2MS培养基仍有不定根形成,可能是因为已形成的不定芽能产生一定的生长素,刺激不定根的形成;加IBA培养基的平均生根率及平均生根数都优于不加生长素的培养基,因而适当提高生长素浓度可以促进不定根的诱导;平均根数以IBA浓度为1.0、1.5 mg/L时最高,这是因为适当浓度的生长素可以促进侧根的生长^[15]。

该研究结果表明,“玉黄”洋葱最佳组培快繁体系为:愈伤组织诱导培养基为MS+NAA 0.10 mg/L+6-BA 2.00 mg/L;不定芽诱导培养基为MS+NAA

0.05 mg/L+6-BA 1.50 mg/L+多效唑 0.25 mg/L;生根培养基为1/2MS+IBA 1.0 mg/L,该研究结果可为“玉黄”洋葱组培育苗及遗传转化提供了科学的理论依据。

参考文献

- [1] 陈沁滨,王建军,薛萍,等. 洋葱种质资源与遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2008(1):37-42.
- [2] 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.
- [3] 徐启江,吴姝菊,徐鑫成,等. 脱毒分蘖洋葱高产优质栽培技术[J]. 北方园艺,2003(1):21-22.
- [4] 姜璐琰,杨建平,张松,等. 洋葱组织培养研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2003,34(2):299-300.
- [5] 王建军,刘照坤,侯喜林,等. 洋葱高频离体再生体系的建立[J]. 园艺学报,2012,39(7):1380-1386.
- [6] Martínez L E, Agüero C B, López M E, et al. Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines[J]. Plant Sci, 2000, 156(2):221-226.
- [7] Luthar Z, Bohane B. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture[J]. Plant Cell Rep, 1999, 18(10):797-802.
- [8] 陈秀孔,张计育,章镇,等. 长富6号富士苹果离体高效不定芽再生技术的建立[J]. 江苏农业学报,2011,27(2):451-455.
- [9] 王振磊,闫芬芬,王静,等. 草莓组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2012(11):130-132.
- [10] 何林. 切花百合离体繁殖与多倍体育育的研究[D]. 重庆:西南大学,2007.
- [11] 王小敏,李海燕,李维林,等. 黑莓树莓杂交品种 Boysen 的组培快繁体系建立[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(2):222-226.
- [12] 陈典. 徐启江分蘖洋葱茎尖愈伤组织诱导及植株再生[J]. 园艺学报,2001,28(4):359-360.
- [13] 曹荣祥,高年春,张晓燕,等. 7种大量养分对非洲菊组培苗生长和繁殖的影响[J]. 江苏农业科学,2007(6):171-174.
- [14] 徐启江,陈典,张云修. 分蘖洋葱茎尖培养脱毒苗技术研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(2):101-105.
- [15] Pandey V P, Cherian E, Patani G. Effect of growth regulators and culture conditions on direct root induction of *Rauwolfia serpentina* L. (Apocynaceae) Benth by leaf explants[J]. Trop J Pharm Res, 2010, 9(1):27-34.

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation Technology of *Allium cepa* L.

ZHAO Li-hua

(College of Agriculture Sciences, Xichang College, Xichang, Sichuan 615000)

Abstract: Taking the basal plates of *Allium cepa* ‘Huangyu’ as explants, the effect of different types and concentrations of growth hormone on callus induction, adventitious bud germination and plantlets rooting were studied through $L_{16}(2^4)$ orthogonal experiments, with MS as the basic medium. The results showed the best culture medium of callus induction of *Allium cepa* basal plate was MS+NAA 0.10 mg/L+6-BA 2.00 mg/L; the best culture medium of adventitious bud germination was MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.50 mg/L+MET 0.25 mg/L; the best culture medium of plantlets rooting was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L.

Key words: *Allium cepa*; basal plates; tissue culture; plant growth regulator