

DOI:10.11937/bfyy.201510026

大蒜花序轴离体再生体系的建立

刘伟伟, 宋淑敏, 潘 静, 高 宇

(黑龙江省科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163319)

摘 要:以大蒜花序轴为试材,采用植物组织离体培养方法,研究了不同激素、蔗糖浓度及培养基的种类对花序轴分化及继代培养的影响。结果表明:以 MS 为基本培养基诱导大蒜花序轴分化的最佳培养条件为 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,30 g/L 蔗糖,pH 5.8,分化率可达 100%,增殖系数达 46.3;最佳的继代培养基为 1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L,成活率可达 100%,且长势最强。

关键词:大蒜;花序轴;再生体系

中图分类号:S 633.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)10-0108-03

大蒜(*Allium sativum* L.)属百合科葱属无性繁殖植物,由于连年进行无性繁殖,致使病毒大量积累。目前应用茎尖离体培养进行大蒜脱毒种苗的培育已有大量研究,采用大蒜茎尖为外植体直接再生试管苗,有利于保持培养材料的遗传稳定性,但这一技术仍存在繁殖系数不高的问题。繁殖系数直接关系到微繁苗的成本高低,目前大蒜茎尖直接诱导产生不定芽的增殖系数只有 3~8,近年虽逐渐有所提高,但仍是限制微繁实用化的关键因素之一^[1-2]。因此,大蒜微繁还有待研究出成功配套的高效低成本技术措施才能走向实用化。

大蒜的花序也是繁殖器官之一,其形成的气生鳞茎(珠芽)具有一定脱毒作用。Ma 等^[2]以花序轴为外植体获得的试管苗,对大蒜花叶病毒的脱毒率达到 77.16%,高于只带 1~2 个叶原基的茎尖培养的试管苗,说明以大蒜花序轴为外植体进行组织培养,脱毒效果更好^[3-4]。该试验以大蒜花序轴为外植体,通过调整激素、蔗糖浓度及培养基的种类,以期建立高效的大蒜花序轴离体培养再生体系,提高脱毒苗的繁殖倍数,为建立脱毒种苗快繁体系提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为绥棱大蒜,于 2011 年 4 月 15 日播种于黑龙江省科学院大庆分院位于林甸星火牧场的试验田中,6 月中下旬当大蒜进入生殖生长期后,采摘蒜薹,放入 4℃左右的冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的表面消毒及剥取方法 采用 75%酒精 2 min+0.1%升汞 5 min+0.5%次氯酸钠 8 min 表面消毒的方法。在超净工作台上用解剖刀将已经表面消毒的总苞外层苞叶剥去,去除花序轴上面的花丝,切取花序轴接种于诱导培养基上^[5-6]。

1.2.2 培养条件 培养条件为室温 25~28℃,光照强度 2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.3 不同激素、蔗糖浓度对比对花序轴分化的影响 以 MS 为基本培养基^[7],添加不同浓度的 6-BA、IAA、NAA,试验采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,各因素水平如表 1 所示,共设 9 个处理(表 2),每个处理接种 40 个花序轴。培养 25 d 后统计花序轴的分化率、绿苗的增殖系数。

表 1 因素与水平

Table 1 Factor and level

水平 Level	因素 Factor			
	6-BA /(mg·L ⁻¹)	IAA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	蔗糖 Sucose /(mg·L ⁻¹)
1	2.5	0.3	0.3	60
2	1.5	0.1	0.1	30
3	0.5	0	0	10

第一作者简介:刘伟伟(1982-),女,硕士,农艺师,现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail:lwv8728@126.com。

责任作者:宋淑敏(1968-),女,本科,研究员级高级农艺师,现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail:ssm68@126.com。

基金项目:黑龙江省财政厅基本业务专项基金资助项目(DJZZ2011-04)。

收稿日期:2015-01-29

表 2 正交实验设计的 9 个处理

Table 2 Nine manage of the orthogonal experiment

处理 Treatment	6-BA/(mg·L ⁻¹)	因素 Factor IAA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)
1	2.5	0.3	0
2	1.5	0.3	0.3
3	0.5	0.3	0.1
4	2.5	0.1	0.1
5	1.5	0.1	0
6	0.5	0.1	0.3
7	2.5	0	0.3
8	1.5	0	0.1
9	0.5	0	0

1.2.4 不同培养基对花序轴绿芽分化的影响 以 B₅、N₆、MS 3 种培养基(30 g/L 蔗糖,pH 5.8~6.0)为基础培养基,均附加 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,研究不同培养基对花序轴绿芽分化的影响。花序轴接种到培养基中 20 d 后统计花序轴的分化率。

1.2.5 继代培养 因花序轴诱导不定苗的分化率较高,分化出的幼苗比较细弱,因此应进行继代培养以培育壮苗^[8]。以 1/2 MS 为基本培养基,蔗糖浓度为 30 g/L,将花序轴培养 20 d 后获得的不定苗,从苗的基部切割开,将苗接种于继代培养基中。研究不同浓度的 6-BA 和 NAA 对幼苗生长影响,共设了 8 个处理,分别为:Z₁:1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L,Z₂:1/2 MS+6-BA 0.2 mg/L,Z₃:1/2 MS+6-BA 0.3 mg/L,Z₄:1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L,

Z₅:1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,Z₆:1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L,Z₇:1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.3 mg/L,Z₈:1/2 MS+NAA 0.1 mg/L,每处理均接种 60 棵苗,培养 15 d 后调查幼苗的长势。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对花序轴诱导分化的影响

由表 3 中的 R_I 可知,6-BA 对大蒜花序轴分化率的影响较大,IAA、NAA 影响较小;根据各水平总和(K_I)的数据可知,当 6-BA 为 1.5 mg/L,IAA 为 0 mg/L,NAA 为 0.1 mg/L 时,对大蒜花序轴分化率的影响较大,因此,根据试验结果诱导大蒜花序轴分化的最佳激素组合为 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

从 R_{II} 的结果可以看出,6-BA、IAA 对大蒜花序轴绿苗增殖系数影响较大,NAA 影响较小。从各水平总和(K_{II})值可以看出,6-BA 影响绿苗增殖系数的优劣顺序为:1.5、2.5、0.5 mg/L,6-BA 浓度超过 1.5 mg/L 时,玻璃苗分化较多;IAA 优劣顺序为 0、0.1、0.3 mg/L;NAA 以 0、0.1 mg/L 影响较大,0.3 mg/L 影响较小,但是 NAA 为 0.1 mg/L 的处理比 NAA 为 0 mg/L 的处理绿苗长势强壮。因此综合考虑对大蒜花序轴绿苗增殖的最佳激素组合为 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 3 不同浓度的植物生长调节剂对大蒜花序轴的分化率及绿苗增殖系数影响

Table 3 The effect of plant growth regulators on differentiation rate and proliferation ratio of rachis garlic

处理 Treatment	因素 Factor 6-BA IAA NAA			接种的花序轴数 Numbers of rachis/个	分化的花序轴数 Numbers of rachis differentiation/个	花序轴的分化率I Rate of rachis differentiation/%	绿苗增殖系数II Proliferation multiples/倍
1	1	1	3	40	33	82.5	15.8
2	2	1	1	40	33	82.5	10.3
3	3	1	2	40	28	70.0	8.5
4	1	2	2	40	36	90.0	18.6
5	2	2	3	40	38	95.0	39.5
6	3	2	1	40	25	62.5	7.5
7	1	3	1	40	34	85.0	20.5
8	2	3	2	40	40	100.0	46.3
9	3	3	3	40	31	77.5	18.1
K _{I1}	257.5	235.0	230.0				
K _{I2}	277.5	247.5	260.0				
K _{I3}	210.0	262.5	255.0				
k _{I1}	85.8	78.3	76.7				
k _{I2}	92.5	82.5	86.7				
k _{I3}	70.0	87.5	85.0				
R _I	22.5	9.2	10.0				
K _{II1}	54.9	34.6	38.3				
K _{II2}	96.1	65.6	73.4				
K _{II3}	34.1	84.9	73.4				
k _{II1}	18.3	11.5	12.8				
k _{II2}	32.0	21.9	24.5				
k _{II3}	11.4	28.3	24.5				
R _{II}	20.6	16.8	11.7				

注:I表示花序轴的分化率;II表示增殖倍数;K表示每一水平的总和;k表示每一水平总和的平均;R表示极差。

Note:I express differentiation rate;II express proliferation ratio;K express the total of every level;k express average of every level total;R express range.

2.2 不同培养基对花序轴分化的影响

表4表明,3种培养基均可诱导大蒜花序轴的幼芽分化,其中以MS培养基的效果最佳,花序轴的分化率为100.0%;B₅培养基的效果要好于N₆,N₆培养基的效果最差,不仅花序轴的分化率较低,而且分化出的幼苗颜色发白。因此,大蒜花序轴分化培养的最佳培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表4 B₅、N₆、MS对花序轴分化的影响Table 4 The effect of B₅, N₆, MS on rachis differentiation

培养基 Media	接种的花序轴数 Numbers of inoculate rachis/个	分化的花序轴 Numbers of rachis differentiation/个	花序轴的分化率 Rate of rachis differentiation /%
B ₅	50	42	84.0
N ₆	50	34	68.0
MS	50	50	100.0

2.3 继代培养基中不同浓度激素组合对幼苗长势的影响

表5表明,继代培养基中不同植物激素配比对大蒜幼苗的成活率和长势起着重要的作用。高浓度的生长

表5 不同激素对幼苗长势的影响

Table 5 Different effects of cytokinin on seedling growth

处理 Treatment	6-BA	NAA	接种的幼苗数 Numbers of inoculate seedling/株	成活的苗数 Numbers of living seedling/株	成活率 Survival rate/%	幼苗长势 Seedling growth
Z ₁	0.1	0	60	58	96.7	+
Z ₂	0.2	0	60	56	93.3	+
Z ₃	0.3	0	60	56	93.3	+
Z ₄	0.5	0	60	59	98.3	+
Z ₅	0.5	0.1	60	60	100.0	++
Z ₆	0.1	0.5	60	60	100.0	+++
Z ₇	0.1	0.3	60	60	100.0	++
Z ₈	0	0.1	60	60	100.0	++

注: +表示苗的长势弱, ++表示苗的长势中, +++表示苗的长势强。

Note: + shows seedling weak, ++ shows seedling medium, +++ shows seedling strong.

素和低浓度细胞分裂素配比有利于试管苗的生长,而较低浓度的生长素和较高浓度细胞分裂素配比抑制幼苗的生长。由花序轴分化出的不定苗在含6-BA 0.1 mg/L, NAA 0.5 mg/L继代培养基中长势最强,因此,最佳的继代培养基为Z₆: 1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

3 结论与讨论

通过该研究初步建立了黑龙江省名优大蒜花序轴离体培养再生体系,筛选出最佳的大蒜花序轴的分化培养基MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。最佳的继代培养基为1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。该试验通过大蒜花序轴诱导不定芽,增殖系数最高可达46.3倍,为脱毒种苗大面积的推广应用奠定了基础。但由于花序轴分化率较高,分化出的苗较纤细,如何调控培养基和培养技术进行壮苗培育还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 梁艳,陈典,黄晓梅,等. 大蒜试管微鳞茎形成的激素筛选研究[J]. 东北农业大学学报,2005,36(5):589.
- [2] Ma Y, Wang H L, Zhang C J, et al. High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scape-tip culture[J]. Plant Cell Reports, 1994, 14(1): 65-68.
- [3] 陈典. 大蒜脱毒种苗培育技术研究[J]. 北方园艺, 1997(2): 29-30.
- [4] 李昌华,李小川,赵美华,等. 大蒜茎尖脱毒技术及组织培养研究[J]. 华北农学报, 1995, 10(3): 20-25.
- [5] 熊正琴,李式军,刘高琼,等. 大蒜花序轴离体培养的研究[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(3): 25-28.
- [6] 周桂珍,曹鸣庆,裴季燕,等. 京郊大蒜病毒的研究及其鳞茎中病毒的脱除[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 145-149.
- [7] 林碧英,傅睿清. 植物激素配比对大蒜鳞茎盘培养体系的影响[J]. 福建农业科技, 2008(6): 71-72.
- [8] 栾非时,陈典,陈友. 脱毒大蒜花原始体培养增殖技术的研究[J]. 中国蔬菜, 1995(3): 4-6.

Establishment of Regeneration System in the Rachis of Garlic

LIU Wei-wei, SONG Shu-min, PAN Jing, GAO Yu

(Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: Taking rachis garlic as test material, using plant tissue culture method, the effect of different concentrations of cytokinin, sucrose concentration and culture medium type on rachis of garlic were studied. The results showed that induction differentiation of rachis was the best when the medium was MS containing 6-BA 1.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L and sucrose 30 g/L at pH 5.8, the differentiation rate was 100%, the proliferation ratio was 46.3. The suitable subculture conditions were 1/2 MS medium containing 6-BA 0.1 mg/L, NAA 0.5 mg/L, subculture rate was 100%, and grew strongly.

Keywords: *Allium sativum* L.; rachis; regeneration system