

以鳞茎片为外植体构建 大蒜微繁技术体系

任春雪, 王 珍, 范宝莉, 刘晓颖, 王振英, 彭永康

(天津师范大学 生命科学学院, 天津 300387)

摘 要:以大蒜鳞茎片为外植体,利用植物组织培养技术,构建了一个新的大蒜微繁技术体系。结果表明:以 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT 为愈伤组织诱导和继代培养基,以 MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 为诱导不定芽分化培养基,增加以 MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 为壮芽培养基的壮芽培养过程,以基础 MS 培养基为生根培养基的试管苗培养体系;试管苗经过室内和田间拱棚中 2 次练苗,越冬前移栽到土壤中。翌年在 T0 代收获分蘖率高达 94% 再生地下鳞茎。该技术体系为脱毒蒜种扩繁提供重要保障。

关键词:大蒜微繁技术体系;愈伤组织;壮芽培养

中图分类号:S 633.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0101-06

大蒜品种资源丰富,但由于长期的取向性选择,使得大蒜的繁殖主要靠营养体,极少数的品种能够开花结

籽,多以无性繁殖为主。大蒜无性繁殖主要是用头年收获的大蒜蒜瓣作为种蒜进行种植,这样有 2 个问题困扰生产者:一是蒜种投资大,繁殖系数低,生产成本低;二是长期的无性繁殖造成品种退化,病毒积累严重,使大蒜减产,品质变差。研究者用生物技术手段在大蒜的脱毒、快繁、遗传改良等方面进行了大量的探索性工作,用大蒜幼叶^[1]、全展叶^[2]、根尖^[3-4]、茎尖^[5]、花序轴^[6]等为外植体构建大蒜组织培养体系;张昌伟等^[7]通过大蒜根

第一作者简介:任春雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向为细胞遗传学。E-mail:skywangzy@mail.tjnu.edu.cn.

责任作者:王振英(1965-),女,博士,教授,研究方向为植物抗性分子生物学。E-mail:skywangzy@mail.tjnu.edu.cn.

基金项目:天津市农委重点资助项目(201302030);天津师范大学应用开发研究基金资助项目(52XK1210)。

收稿日期:2015-03-15

Preliminary Study on Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration of *Cassia angustifolia*

HUANG Hao, WEI Ying, MENG Aidong

(Guangxi Botanical Garden of Medicine Plant, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: Adventitious bud differentiation, bud seedling multiplication, root induction from mature brunch of *Cassia angustifolia*, and transplanting substrate of tissue culture-raised plantlets transplantation were studied by tissue culture method. The results showed that the efficient adventitious bud differentiation was cultured on MS media supplemented with 2.0 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA. The highest number of adventitious buds (12.6 ± 0.64) per explant were observed in MS media supplemented with 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA. The highest rooting percentage (58.5%) and survival were achieved using 1/2MS media with 2.0 mg/L IBA and 1% (w/v) active carbon. The 73.7% plantlets survived acclimatization in the greenhouse, and producing healthy plants on the field. The current investigation showed efficient *in vitro* regeneration capabilities of *Cassia angustifolia* from brunch explants.

Keywords: medicinal plants; *Cassia angustifolia*; tissue culture; plant regeneration

尖诱导不定芽得到试管苗并成功的得到了试管鳞茎; LUCIANI 等^[8]以大蒜茎尖为外植体诱导出再生能力较强的愈伤组织; 张素芝等^[9]利用大蒜茎盘进行愈伤组织的诱导, 并获得了适宜于愈伤组织增殖分化的培养基。上述大蒜快繁技术体系主要集中在获得高效再生苗, 但对由这些再生植株从苗期到大蒜成熟期的完整培养体系报道的较少, 尤其未见在 T₀ 代获得高分辨率大蒜的报道。该研究以鳞茎片为外植体, 构建了从愈伤组织诱导、不定芽分化、根分化、试管苗练苗、移栽、田间种植管理到收获分瓣大蒜的完整的快繁技术体系, 以期为大蒜的生产和遗传改良提供重要的技术资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为天津宝坻六瓣红大蒜 (*Allium sativum* L.)。

1.2 试验方法

1.2.1 大蒜外植体的选择 选取生长健壮、无病虫害、自然结束休眠后的大蒜蒜头, 剥去外面鳞叶, 选取个大、饱满、无病斑的大蒜蒜瓣, 用自来水冲洗 20 min, 用滤纸吸干大蒜瓣表面的水分, 用 0.1% 升汞浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 用滤纸将大蒜表面的水分擦干, 再在 75% 酒精中浸泡 5 min, 杀灭表面细菌, 无菌水冲洗 3 次, 再用滤纸吸干备用。

1.2.2 大蒜愈伤组织诱导与继代培养 在超净台上将大蒜鳞茎切 2 mm 厚薄片, 接种到愈伤组织诱导培养基 (MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT) 中, 置人工气候箱中培养: 日温 25℃, 夜温 20℃, 光照强度为 1 500 lx, 光照时间 14 h/d。观察、统计愈伤组织诱导率。大约 4 周左右诱导出愈伤组织, 将愈伤组织接入到新鲜的继代培养基 (同愈伤组织诱导培养基) 中, 继代培养 2 次后转入诱导不定芽分化培养基中。

1.2.3 不定芽和根的诱导分化 诱导不定芽分化的培养基为 MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA; 为了提高不定芽的利用率, 该研究增加了壮芽培养阶段: 将带绿点的愈伤组织和诱导出的嫩芽一起移栽到壮芽培养基中 (MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA) 进行不定芽培养。4 周后将健壮、浓绿的不定芽转移到生根培养基 (基础 MS 培养基) 中诱导生根, 约 4 周后不定芽长出数条实生根, 形成完整的试管苗。

1.2.4 不同激素对比对试管苗生根的影响 设 3 套生根培养基: 培养基 1 为 MS; 培养基 2 为 MS+2.0 mg/L NAA; 培养基 3 为 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA。记录培养情况。

1.2.5 分化的试管苗练苗与大田移栽 生根后的试管苗, 待其长到 3 片真叶、生根 3~4 条时, 室温开瓶练苗, 7~10 d 后将小植株从试管中取出, 洗去根部培养基, 剪掉枯黄的叶子, 将其移栽至灭菌的珍珠岩、蛭石和泥炭土 (1:3:6) 的培养钵中, 在 10 月初放置田间小拱棚中, 晴好天气揭开小拱棚的薄膜通风, 约 30 d 后, 试管苗再次长出新根数条, 之后移栽到大田土壤中。

1.2.6 试管苗的田间管理及地下鳞茎的收获 10 月底练苗结束, 将试管苗移栽到地里小拱棚中, 浇足水, 将拱棚的双层塑料膜用土封严, 保温保墒。第 2 年 3 月中旬浇返青水, 逐渐掀起拱棚薄膜通风练苗并除草, 3 月底撤掉拱棚。随时观察苗生长状况, 待组培苗植株外周 2~3 片生长叶枯萎时进行收获。

1.2.7 田间数据评估 随机选取田间以蒜瓣种植的大蒜植株和再生植株各 30 株, 将大蒜挖起, 进行数据评估及理化指标测定。每 10 株为一组, 重复 3 次, 取平均值。株高: 植株基部到最高叶片的距离; 叶夹角: 植株倒 3 叶与茎的锐角角度; 叶间距: 植株倒 2 叶与倒 3 叶之间的距离; 鳞茎直径: 用游标卡尺测量植株鳞茎直径; 叶绿素含量: 田间栽培 16 周后, 对栽培大蒜、再生植株分别进行取材, 用打孔器在第 3 片叶子的 4~6、6~8、8~10 cm 叶段分别进行打孔, 将打下来的小圆片叶子分别装入管中, 向每管中加入浸提液 (丙酮: 乙醇=1:1) 10 mL, 放置在黑暗条件下 72 h, 分别测量每管在 663、645 nm 处的光度值, 计算叶绿素含量。

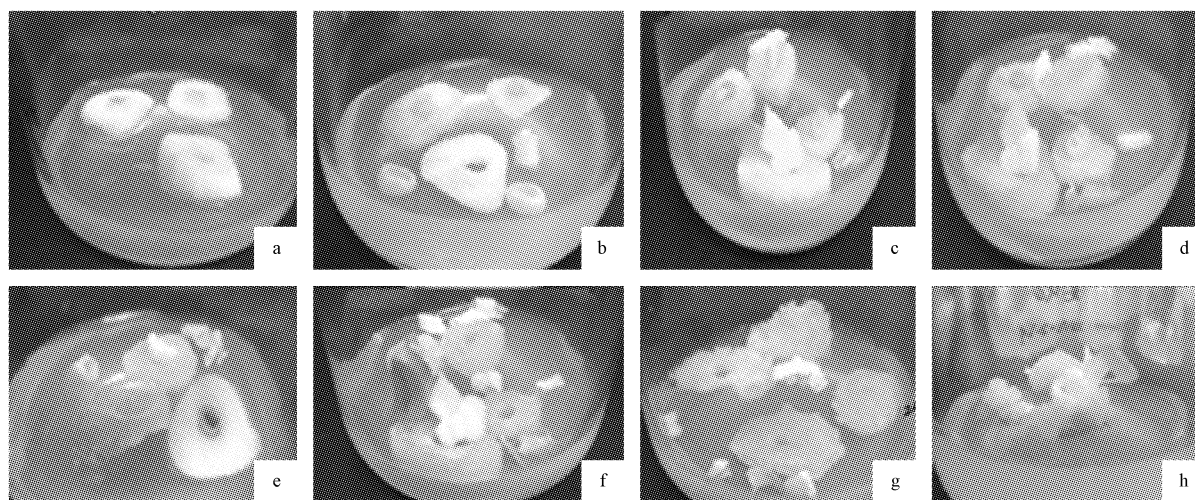
2 结果与分析

2.1 大蒜鳞茎片愈伤组织诱导

将大蒜鳞茎横切成 2 mm 的薄片接种到愈伤组织诱导培养基上 (MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT), 6 d 后外植体表面结构变得疏松, 四周组织逐渐变得水润且呈现浅黄色。接种 14 d 后在外植体上形成微小的愈伤组织颗粒, 接种 25~30 d 后外植体上已经形成大量的愈伤组织颗粒 (图 1)。

2.2 鳞茎愈伤组织的继代及不定芽的分化

将生长旺盛的浅黄色愈伤组织 (图 2a) 切下, 接种到新鲜的继代培养基 (同愈伤组织诱导培养基) 中进行继代培养 (图 2b), 25 d 后愈伤组织增殖明显, 颗粒饱满有光泽 (图 2c), 在同样培养基上再继代 1 次。挑选生长状况良好的愈伤组织颗粒转移到不定芽分化的培养基 (MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA) 上进行分化培养 (图 2d), 经过 10 d 左右的分化培养, 在愈伤组织表面长出许多绿点和小绿芽 (图 2e), 随后逐渐分化出一定数目、生长健壮、颜色浓绿的不定芽 (图 2f~i)。

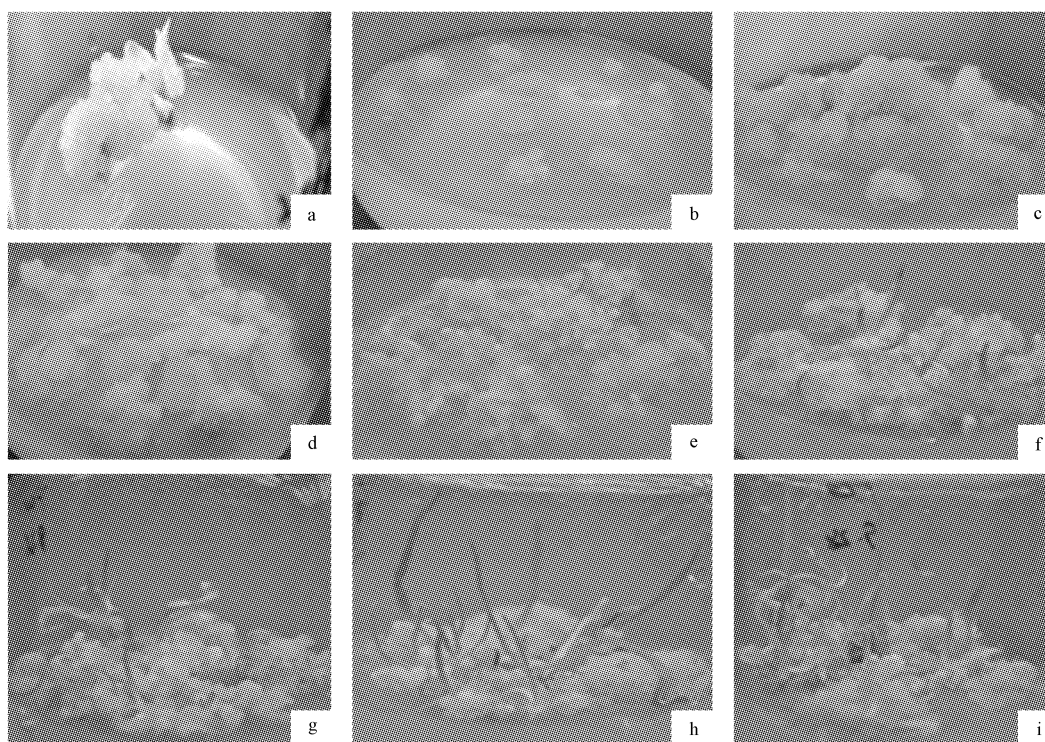


注:大蒜鳞茎片在愈伤组织诱导培养基上培养 0 d(a)、4 d(b)、6 d(c)、10 d(d)、14 d(e)、21 d(f)、25 d(g)和 30 d(h)。

Note: Garlic slices in the callus induction medium on 0 days(a), 4 days(b), 6 days(c), 10 days(d), 14 days(e), 21 days(f), 25 days(g) and 30 days(h).

图 1 愈伤组织诱导

Fig. 1 The process of callus induction



注:a. 生长 30 d 的愈伤组织;b. 继代一次的愈伤组织;c. 继代 2 次的愈伤组织;d. 接到分化培养基上的愈伤组织;e. 开始分化的愈伤组织;f~i. 分化 15、18、25、30 d 的幼芽。

Note:a. the callus at 30 days;b. the subculture callus for one generation;c. the subculture callus for two generations;d. the callus on the differentiation culture medium;e. the differentiation callus;f-i. the differentiation buds of 15, 18, 25 and 30 days.

图 2 愈伤组织的继代及不定芽的分化

Fig. 2 The subculture of callus and the differentiation of buds of subculture

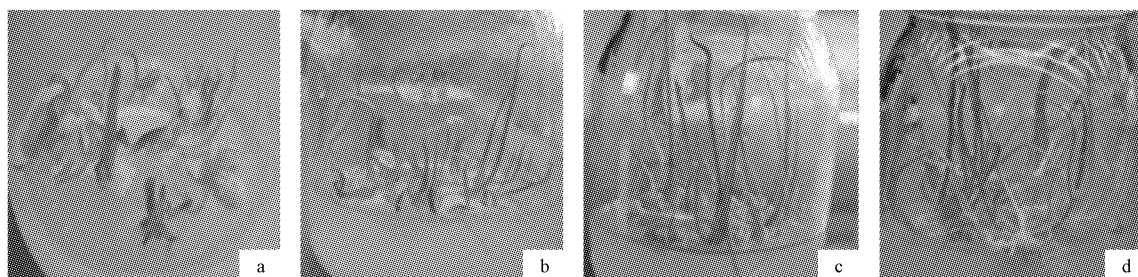
2.3 壮芽培养

为了提高分化培养基分化出来的不定芽的利用率,该研究中增加了壮芽培养阶段。将分化培养基中诱导

出来的带绿点愈伤组织和嫩芽一起转移到壮芽培养基 (MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA) 中进行壮芽培养(图 3 a),经过一段时间

培养,绿点也逐渐长成不定芽,原有的不定芽变健壮(图3 b、c),经过 30 d 左右的培养,不定芽已经生长成健壮、

浓绿的组培苗,可以用于生根培养,提高了试管苗的诱导率。



注:在壮芽培养基上培养 10 d(a)、15 d(b)、20 d(c)、30 d(d)不定芽。

Note: The buds in culture medium for 10 days(a), 15 days(b), 20 days(c) and 30 days(d).

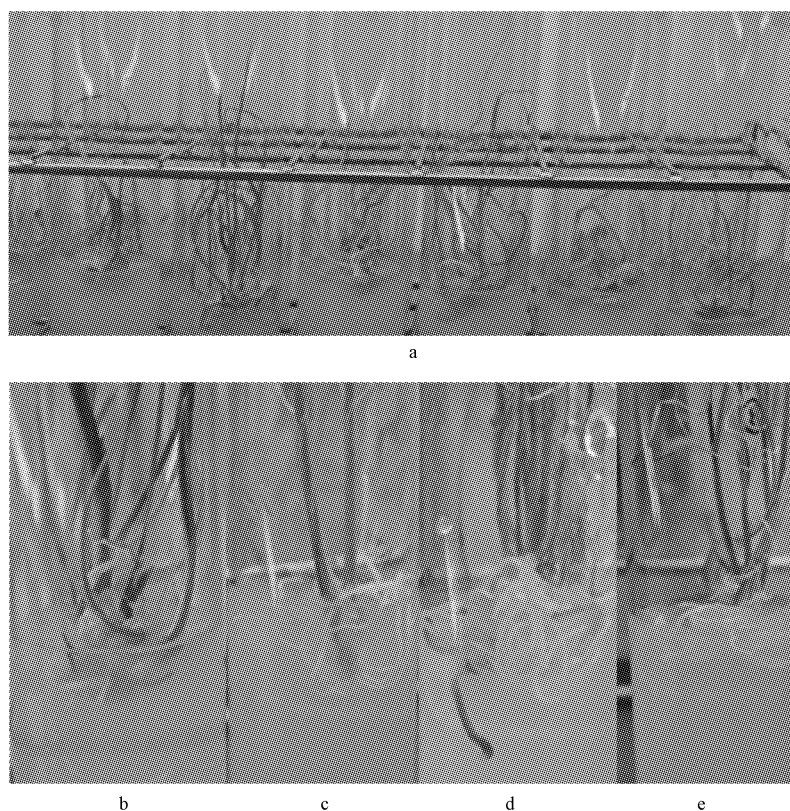
图3 壮芽培养

Fig. 3 Strong buds culture

2.4 不同激素对比对试管苗生根的影响

实生根的诱导对不定芽是否能形成完整植株起着至关重要的作用。从图4可以看出,将试管苗接种到3种生根培养基中,8 d左右均可以长出2~3条实生根,20 d左右能长出8~10 d实生根,当培养天数达到30 d左右时,实生根的条数明显增多,根系变得

粗壮。不同的是当试管苗在生根培养基培养40 d约6周后,培养基1的生根率可达90%以上;生根培养基2的生根率为63.3%,但有小鳞茎形成(另文报道);而生根培养基3的生根率仅为30%左右。因此,基础MS培养基是高效、经济且快速诱导生根培养基。



注:a, 刚刚移栽到生根培养基中的试管苗;b. 在生根培养基中生长8 d的试管苗;c. 在生根培养基中生长20 d的试管苗;d、e. 在生根培养基中生长30 d的试管苗。

Note: The plantlets were transplanted to rooting culture medium for 0 days(a), 8 days(b), 20 days(c) and 30 days(d, e).

图4 试管苗生根培养

Fig. 4 The root culture of the plantlets

2.5 试管苗的练苗及移栽

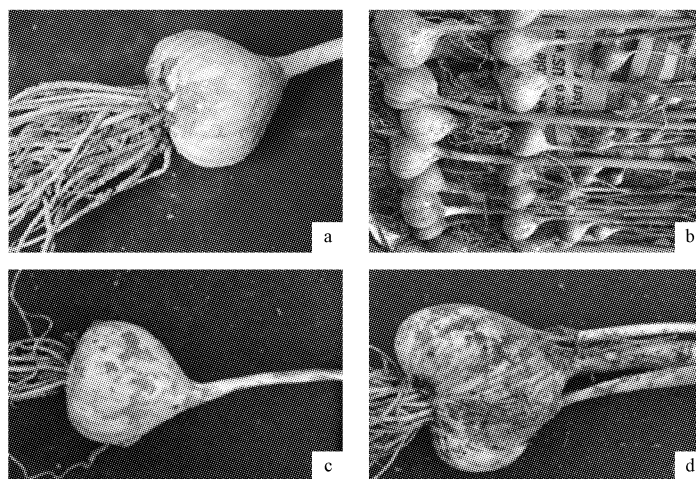
组培苗虽然具有一定的光合能力,处于高湿、弱光、低 CO_2 、恒温、异养条件下生长,其组织分化不完善,光合自养能力弱,适应性差,气孔多而且不易关闭、叶绿素少、根毛少,练苗过程为逐步改变其生长条件、逐步促使其组织发育完全,以适应外界环境生活,使其叶绿素增多,改善气孔的调节功能使蒸腾下降,使根毛发育完善等,提高其对环境的适应能力。生根的试管苗,待其长到3片真叶、有3~4条实生根时,室温开瓶练苗,7~10 d后从试管中取出,洗去根部培养基,剪掉枯黄的叶子,移栽至装有灭菌的珍珠岩、蛭石和泥炭土(1:3:6)的培养钵中,在10月初放置田间小拱棚中,晴天天气揭开小拱棚的薄膜通风,约30 d后,试管苗再次长出新根数条,移栽到大田土壤中。

2.6 组培苗田间管理、生理指标分析及鳞茎收获

10月底移栽到土壤中的试管苗在小拱棚中可以自行越冬,第2年3月中旬浇返青水并逐渐掀起拱棚薄膜

通风练苗、除草,3月底撤掉拱棚。5月中旬,待大蒜长到第8~9片叶子时,测定以蒜瓣种植的大蒜植株(对照株,以下同)和再生植株的株高、叶夹角、叶间距、鳞茎直径和叶绿素含量等。结果发现,对照株与再生株株高相差不大,均在59 cm左右;对照株倒二叶和倒三叶间的叶间距平均约为1.7 cm,叶互生明显,而再生植株倒二叶和倒三叶之间的叶间距平均约为1 cm,叶接近于轮生;对照株倒三叶与主茎之间夹角的平均值为 20° ,而再生植株倒三叶与主茎之间夹角平均为 11° ;对照株叶绿素含量平均为0.527 7,再生株比对照株略高,为0.887 8。

图5为对照株和再生株收获的地下鳞茎,再生株鳞茎平均直径为2.2 cm,比对照株低0.6 cm;再生鳞茎的根须不如对照株发达,蒜瓣也较对照的小;再生鳞茎分瓣率达94%左右,其中2瓣的鳞茎约为18%,4~6瓣的约为75%,7瓣的有1颗,约占0.8%,其余为独头蒜,约为6%。



注:a为对照株鳞茎;b,c,d为再生株鳞茎。

Note:a is the control garlic bulb;b,c,d are regenerated garlic bulb.

图5 收获的T₀代大蒜鳞茎

Fig. 5 The T₀ generation garlic bulb obtained

3 讨论与结论

大蒜作为无性繁殖作物,生产上多以大蒜瓣为种子进行种植,生产成本高、繁殖系数低、病毒积累、种性退化等问题严重影响大蒜生产^[10]。寻找大蒜快繁、脱毒以及种质遗传改良技术迫在眉睫。前人工作中构建了多种大蒜快繁脱毒技术体系,但多以获得高效试管苗为主要目标。实践证明,大蒜从组培苗到获得地下鳞茎需要时间较长,栽培条件要求高,更大的问题是一般T₀代组培苗,种植一个季节多收获独头蒜^[4],在某种程度上影响着脱毒大蒜的进一步扩繁。该研究通过优化愈伤组织诱导、再分化的培养条件,增加壮芽培养、组培苗越冬

前移栽以及改善栽培过程管理的改进等措施,成功构建了能够在T₀代收获分瓣率高达94%大蒜鳞茎的技术体系。

3.1 壮芽培养的提高试管苗诱导率

利用愈伤组织途径进行快繁,可以再短时间内获得大量的不定芽,但这些不定芽在后期的试管苗诱导及移栽过程中会出现大量的死苗现象,严重降低繁殖系数。与前人工作不同的是,该试验在诱导出不定芽后增加了壮芽培养阶段。优化出壮苗培养基:MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA,与诱导不定芽培养基(MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA)相比,降低了6-BA和NAA的浓度,添加了2种

激素 KT 和 GA,加速了带绿点的愈伤组织分化不定芽,已分化的不定芽生长速度快,苗壮,颜色浓绿,为组培苗生根打下基础,提高了试管苗的诱导率。

3.2 再生植株入冬前移栽是获得分瓣地下再生鳞茎的重要保障

北方一般在“九里”种蒜,主要是大蒜可以在较低的低温下完成春化过程,利于大蒜抽薹和地下鳞茎膨大。组培苗细小苗弱,如果在“九里”移栽,虽然能够完成纯化过程,但缓苗慢,苗期长,到气温 30℃ 以上时,还没有完成地下鳞茎膨大,因此 T0 代多收获小独头蒜,即使有少量分瓣蒜,但多不够成熟,晾晒后干瘪,无法作为蒜种进一步种植(数据未列出)。该研究在大蒜自然结束休眠后开始诱导愈伤组织,通过不定芽诱导、多种激素参与的壮芽培养和根诱导形成试管苗,试管苗经过温室内短暂练苗后,10 月初移栽到培养介质中进行大田小拱棚中练苗培养,入冬前移栽到土壤中,加双层拱棚膜保湿,植株通过充足时间缓苗、春化后,翌年 3 月撤掉拱棚,其它的田间管理与地下鳞茎收获与对照株相同,在 T0 代便可获得大量分瓣的再生地下鳞茎,这些分瓣的再生地下鳞茎可以作为蒜种进行种植。

该研究以鳞茎片为外植体,构建了一个新的大蒜快繁技术体系:愈伤组织诱导和继代培养基为 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT;诱导不定芽分化的培养基为 MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA;壮芽培养基为 MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L

NAA+2.0 mg/L 6-BA;生根培养基为:基础 MS 培养基。再生植株入冬前移栽到土壤中,加拱棚膜保湿,株通缓苗时间充足、春化充分、生长期长,在 T0 代收获分瓣的再生地下鳞茎。

参考文献

- [1] HAVRANEK P,NOVAK F J. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. [J]. Pflanzenphysiol,1973,68:308-318.
- [2] 杨乃博. 大蒜全展叶愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1981,5(6):47-48.
- [3] 唐巧玲,王旭静,王志兴. 以根尖为外植体建立大蒜的组织培养体系[J]. 生物技术进展,2011,1(2):140-145.
- [4] TUBIĆ L,ANAČKOV C,MILOJEVIĆ J,et al. High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimization of the regeneration procedure[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2014,118:101-110.
- [5] 陈世儒,黄菊辉. 大蒜离体快繁及脱毒[J]. 园艺学报,1991,3(3):133-137.
- [6] 汪盛松,邓晓辉,邱正明,等. 兴山紫皮蒜的组培快繁技术研究[J]. 湖北农业科学,2013,52(7):1689-1691.
- [7] 张昌伟,候喜林,袁建玉,等. 太仓大蒜根尖离体培养直接诱导不定芽及试管鳞茎的形成[J]. 植物生理学通讯,2004,40(2):167-170.
- [8] LUCIANI G F,MARY A K,PELLEGRINI C,et al. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2006,87:139-143.
- [9] 张素芝,李继蓉. 秋水仙素诱导大蒜四倍体的研究[J]. 核农学报,2006,20(4):303-308.
- [10] 徐培文,刘冰江,孔素萍,等. 大蒜种质创新和育种研究进展[J]. 中国蔬菜,2006(6):31-33.

Establishment of a Novel Micropropagation System Using Garlic Slice as the Explants

REN Chunxue,WANG Zhen,FAN Baoli,LIU Xiaoying,WANG Zhenying,PENG Yongkang

(College of Life Science,Tianjin Normal University,Tianjin 300387)

Abstract: Developed a novel micropropagation technology system using garlic slice as the explants by the plant tissue culture technology. The results showed that the callus induction and subculture medium were the same as MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT;the differentiation culture medium was MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA;the strong buds culture medium was MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA and the rooting culture medium were the basis MS. The plantlets was trained through indoor and field for two times and transplanted to soil later under the plastic film before winter. In the T0 generation,we harvested more than 94% garlic which had two or more cloves. The technical system provided an important safeguard for the propagation of virus-free garlic.

Keywords: garlic micropropagation system;callus;strong buds culture