

洋葱胚芽再生体系的研究

谭武平^{1,2,3}, 梁毅¹, 张洪伟¹, 汪李平², 张晓东³

(1. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097; 2. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070;

3. 北京农林科学院 农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要:以洋葱胚芽为外植体材料, MS为基本培养基, 研究了不同洋葱品种及不同激素组合对再生过程中洋葱愈伤组织诱导率的影响, 建立洋葱胚芽再生体系。结果表明:“凤凰金球”洋葱品种愈伤诱导率最高;在4 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA的MS培养基上愈伤诱导率最高, 为72.1%;在含1.0 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA的MS分化培养基上, 愈伤分化率最高, 为78.3%;在1/2MS+0.01 mg/L NAA培养基上可诱导生根, 生根率100%;再生苗驯化移栽成活率达到95%。

关键词:洋葱;愈伤组织;组织培养

中图分类号:S 633.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0093-04

洋葱属葱属2年生草本植物, 是葱属作物中重要的经济作物之一, 作为蔬菜及药用植物被广泛栽培。其肉质鳞茎营养成分丰富, 除含有蛋白质、碳水化合物外, 还含有钙、磷、铁、硒、维生素、胡萝卜素、硫胺素和尼克酸等, 具有保健功能;此外, 洋葱还具有抗病毒、降血脂、降血糖作用, 可降低胆固醇, 预防血栓形成, 并有提高免疫力和抗癌功效。

基因工程育种技术是把新的目的基因导入植株, 在很多经济作物上已经成功实现。但是对洋葱的研究报道很少。前人报道了利用洋葱未成熟胚和成熟胚做外植体, 进行离体培养和植株再生的方法^[1-4]。洋葱外植体的选择还有用花蕾^[5-7]、成熟种子及茎尖^[8]等, 这些外植体都诱导出愈伤, 并获得再生植株。该研究以洋葱胚芽为外植体, 探究再生过程中最佳激素组合, 建立洋葱胚芽再生体系, 以期对洋葱转基因育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试洋葱品种“凤凰金球”、“凤凰白皮”、“旧山白皮”、“黄金7号”, 由北京农林科学院蔬菜研究中心洋葱

课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体获得 成熟的洋葱种子用75%酒精浸泡消毒1 min。再用0.1%的升汞滴入2滴吐温20, 摇晃消毒12 min。然后用无菌水冲洗4~6次, 将种子放滤纸上晾干种子表面水分。再将种子放入含1 mg/L 2,4-D的MS固体培养基上, 5~7 d萌发。待根长至1 cm时, 取芽尖0.1~0.2 cm作外植体。

1.2.2 不同洋葱品种愈伤组织诱导 以4个不同品种洋葱胚芽为试材, 接种至2 mg/L 2,4-D+2 mg/L 6-BA培养基中, 比较不同品种愈伤诱导。

1.2.3 不同激素处理愈伤诱导 选取“凤凰金球”为试验材料, 取其胚芽接种到含蔗糖30 g/L, 琼脂8 g/L的MS基本培养基上, 分别加入不同浓度的2,4-D(1、2、4、6 mg/L)和6-BA(1、2 mg/L), 具体组合见表2, 培养基pH 5.8~6.0, 121℃高压灭菌15 min, 愈伤诱导培养在28℃下黑暗培养。30 d后统计愈伤诱导率, 15 d换1次培养基。愈伤诱导率(%)=(形成愈伤组织外植体数/接种外植体数)×100%。

1.2.4 不同激素处理愈伤分化 把得到的胚性愈伤转移到含蔗糖30 g/L, 琼脂7 g/L的MS基本培养基上, 添加不同浓度激素组合(表3), pH 5.8~6.0, 培养条件为28℃, 光周期16 h/8 h, 30 d后统计分化率。分化率(%)=(分化愈伤数/总愈伤数)×100%。

1.2.5 诱导生根 待绿芽长至5 cm时, 将其转入含蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L的1/2MS培养基, 含NAA 0.01 g/L。培养条件为28℃, 光周期16 h/8 h培养。

1.2.6 驯化移栽 人工气候温室开瓶驯化3 d, 培养基

第一作者简介:谭武平(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为洋葱分子育种技术。E-mail:tanwuping1989@126.com。

责任作者:梁毅(1969-), 男, 河南信阳人, 硕士, 副研究员, 研究方向为洋葱遗传育种。E-mail:liangyi@nrcv.org。

基金项目:国家公益性行业科技资助项目(20093018);国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2012BAD02B00; 2011BAD35B07; 2012BAD50G01);北京市科委育种平台三期资助项目(DI11100001311002);北京市常规育种财政专项资金资助项目(2013-509)。

收稿日期:2014-03-27

中取出植株,放入清水中漂洗根部,洗去粘附的培养基,移栽到营养钵(蛭石:草炭:泥土=1:1:2)。

1.3 数据分析

试验数据采用 SAS 软件进行分析,显著水平为 $P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同洋葱品种对愈伤组织诱导率的影响

由表 1 可知,试验所用的 4 个不同品种的洋葱胚芽接种到 2 mg/L 2,4-D+2 mg/L 6-BA 培养基上,愈伤诱导率有显著差异,愈伤诱导率最高为 61.0%,最低为 30.7%。说明不同品种对洋葱愈伤的形成也有一定影响,其中“凤凰金球”洋葱品种愈伤诱导率最高。

2.2 不同激素处理对愈伤组织诱导率的影响

选取“凤凰金球”胚芽(图 1 a)接种到 MS 培养基上 1 周后开始膨大,2 周后膨大的部分开始变黄,之后继续

表 1 不同洋葱品种对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different onion cultivars on callus

品种 Cultivar	外植体数 No. of explants	愈伤数 No. of callus	愈伤诱导率 Callus induction rate/%
“凤凰金球”	187	114	61.0±1.1a
“凤凰白皮”	116	67	57.8±1.5b
“旧山白皮”	121	56	46.3±1.4c
“黄金 7 号”	75	23	30.7±2.3d

注:愈伤诱导率为平均值±标准差,下同。

膨大,突破愈伤表层白色包裹,形成黄色愈伤(图 1 b,c)。随着培养时间的延长,接种的胚芽出现 3 种状态:黄色愈伤、玻璃化胚芽、未萌动胚芽。在含不同激素组合的 MS 培养基中,愈伤诱导率最低为 33.3%,最高的组合 4 mg/L 2,4-D+1 mg/L 6-BA 愈伤诱导率为 72.1%。6-BA 为 1 mg/L 时,2,4-D 在 4 mg/L 以下随着浓度升高,愈伤诱导率也升高。2,4-D 在低浓度范围内,适当提高 6-BA 的浓度可以提高洋葱胚芽的愈伤诱导率。

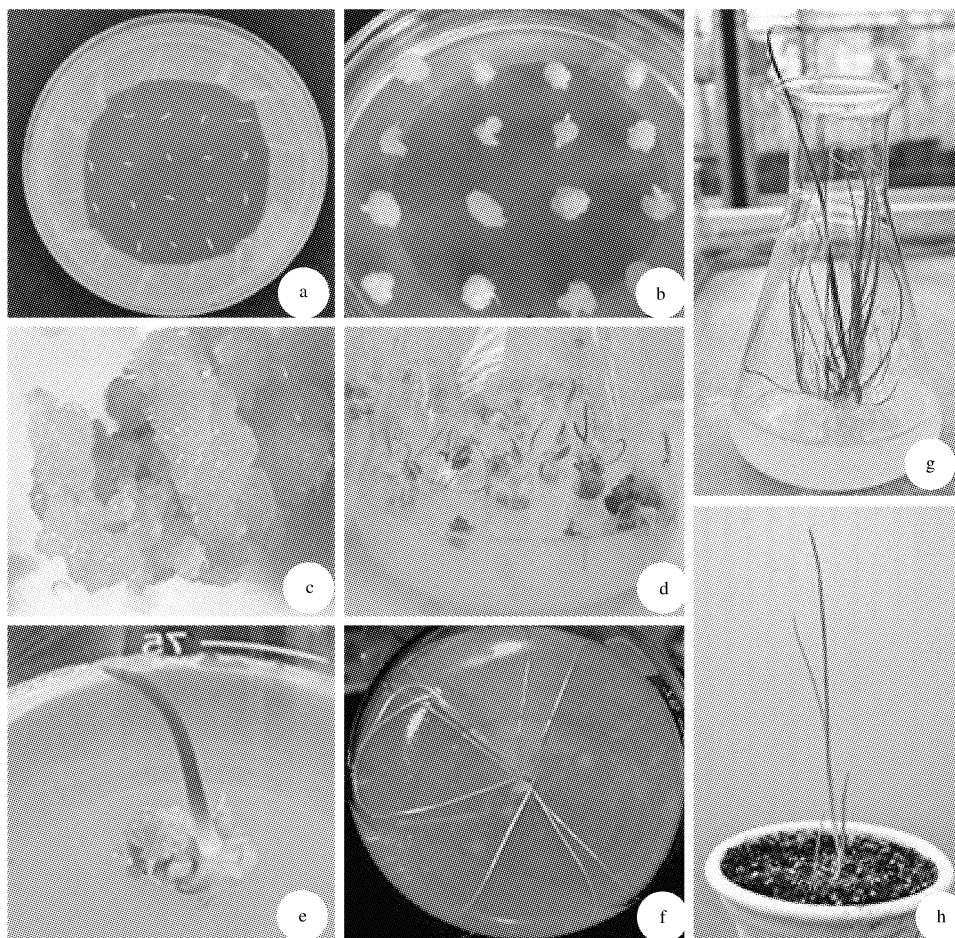


图 1 洋葱胚芽再生体系研究

注:a. 胚芽外植体接种在愈伤诱导培养基上;b. 胚芽在诱导培养基上诱导 30 d 后的愈伤;c. 继续诱导 30 d 后的愈伤;d. e. 愈伤组织在分化培养基上分化出芽;f. 分化出的芽转到生根培养基上 1 个月后根的生长;g. 再生苗在温室驯化;h. 驯化后移栽的洋葱再生苗。

Fig. 1 Research on regeneration system of onion germ

Note:a. Embryo explants cultured on different callus induction media;b. Primary callus from embryo explants after 30 d of induction;c. Embryogenic callus from primary callus 30 d of induction;d. e. Shoot regeneration from embryogenic callus;f. Root induction;g. Plant hardening in greenhouse;h. Plant transplanted in soil after hardening.

表 2 不同激素处理对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different plant growth regulators group on callus induction

激素浓度 Hormone concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		外植体数 No. of expants	愈伤数 No. of callus	愈伤诱导率 Callus induction rate/%
2,4-D	6-BA			
1	1	147	49	33.3±0.7e
1	2	265	108	40.8±1.1d
2	1	113	48	42.5±0.4d
2	2	187	114	61.0±1.2b
4	1	294	212	72.1±1.2a
4	2	268	138	51.5±1.3c
6	1	96	68	70.9±2.1a
6	2	107	68	63.5±3.4b

2.3 不同激素浓度对洋葱愈伤分化的影响

胚性愈伤接种到分化培养基上,10 d后开始出现绿色,随着时间延长,再生芽出现(图1 d,e)。接种后45 d统计分化率。在3种不同激素分化培养基上,愈伤分化率从18.3%到78.3%不等。从表3可以看出,最佳分化培养基为含1.0 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA的MS培养基,其愈伤分化率达78.3%。

2.4 生根和驯化移栽

生根培养后10 d可见到白色根,1个月后根长达到6~10 cm(图1 f),生根率100%。

生根培养1个月后形成的长势健壮再生植株,放到人工气候温室开瓶驯化3 d后(图1 g),取出植株,用自来水漂洗根部粘附的培养基,转移到营养钵(蛭石:草炭:泥土=1:1:2),浇定根水(图1 h)。

表 3 不同激素浓度对洋葱愈伤分化的影响

Table 3 Effect of plant growth regulators on callus regeneration

激素浓度 Hormone concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			愈伤数 Number of callus	分化的愈伤数 No. of callus response	愈伤分化率 Callus response/%
TDZ	BA	NAA			
0.01	0	0.5	60	11	18.3
0.1	0	0.5	96	49	51.0
1.0	0	0.5	60	47	78.3
0	0.5	0.5	60	20	33.3
0	1	0.5	60	32	53.3
0	2	0.5	78	33	42.3

3 讨论

利用不同品种的洋葱为外植体均可成功的诱导产生愈伤组织,并获得再生植株,但是这些外植体的取材和处理却不可避免的存在各种问题。未成熟胚的获得受到取材时节的限制,并且未成熟胚组织体积小,需要在立体显微镜下取材,操作繁琐^[1];诱导洋葱幼蕾产生

愈伤组织同样也受到时节的限制,取材时间极短^[9]。同时,洋葱外植体的消毒困难,组织培养污染严重。洋葱种子取材方便,不受季节限制,消毒后使其发芽,取前端胚芽芽尖作为外植体,操作简便,且大大降低了外植体的污染率,提高了组织培养效率。

胚芽在培养基上培养1周,开始膨大,呈白色球状,继续培养3周后,可以看到黄色愈伤突破白色包裹,愈伤进一步膨大。在这过程中,有少数胚芽会伸长生长,可能是由于取材的原因,取到了胚芽的伸长区部位,可能会影响到愈伤的形成。Eady等^[1]的研究中提到的3种形态的愈伤组织(表面有球状颗粒胚性愈伤、无球状颗粒的紧实型愈伤、水渍化愈伤)在该试验中都能观察到,且分化能力明显不同,胚性愈伤能很好的分化出绿芽。紧实的愈伤表面光滑,很难分化。水渍化愈伤也基本不分化。

在分化过程中,较高浓度的激素不利于芽的正常发育。在1.0 mg/L TDZ的分化培养基上,分化出的绿芽,有部分芽出现畸形,导致不能形成正常的植株。而在0.01 mg/L TDZ的分化培养基上,生长出的绿芽长势较好,芽簇较多,较少出现畸形。在分化出绿芽后,应该转移到低浓度激素的分化培养基。这与王建军等^[6]研究的结果相似。

参考文献

- [1] Eady C C, Butler R C, Suo Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 111-116.
- [2] Eady C C, Weld R J, Lister C E. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and transgenic plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 376-381.
- [3] Zheng S J, Henken B, Sofiari E, et al. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53: 99-105.
- [4] Zheng S J, Henken B, Sofiari E, et al. Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures of *Allium cepa* L. [J]. Euphytica, 1999, 108: 83-90.
- [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] 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(4): 54-56.
- [7] 姜璐璐. 洋葱胚状体诱导及再生体系的建立[D]. 济南: 山东农业大学, 2003.
- [8] 陈典, 徐启江. 分蘖洋葱愈伤组织诱导及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 359-360.
- [9] 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 Embryo Regeneration System of Onion

TAN Wu-ping^{1,2,3}, LIANG Yi¹, ZHANG Hong-wei¹, WANG Li-ping², ZHANG Xiao-dong³

苦豆子愈伤组织的诱导及去褐化处理

陈亚萍, 高 媛, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以苦豆子为试材,采用组织培养的方法,研究了外植体种类、激素水平、水解酪蛋白浓度等不同因子对愈伤组织生长状态的影响,同时对愈伤组织进行了去褐化处理。结果表明:苦豆子子叶为诱导愈伤组织的最佳外植体;最佳诱导培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;最佳继代培养基为 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+CH 1 000 mg/L;添加 3%蔗糖的条件下快速继代是较好的去褐化措施。

关键词:苦豆子;愈伤组织;继代培养;去褐化处理

中图分类号:Q 946.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0096-04

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)属豆科槐属多年生半灌木或小灌木植物,别名苦甘草、苦豆根、西豆根、欧苦参、苦豆草等,其根系发达,耐干旱盐碱^[1],抗严寒风沙,在荒漠和沙性土壤上具有极强的防风抗蚀能力,主要分布在我国西北、华北地区以及中亚一带^[2],是我国西北荒漠化地区广泛分布的一种防风固沙和改良盐碱地的重要野生植物^[3]。苦豆子植株和种子中富含 20 多种生物碱,还包括黄酮类物质、有机酸、氨基酸、蛋白质和多糖等^[4],具有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫、增强免疫等多种生理活性^[5],是克泻灵、止痢宁、妇炎栓、苦生素注射液等多种药物的主要原料,其需求量很大^[4]。

第一作者简介:陈亚萍(1990-),女,宁夏固原人,本科,研究方向为植物保护。E-mail:1248577621@qq.com

责任作者:顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学等教学与科研工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260452)。

收稿日期:2014-03-13

目前,国内主要是通过刈割苦豆子植株直接提取活性物质,但是苦豆子野生资源有限,滥采滥用将导致其枯竭,使大量野生草场沙化,影响生态平衡^[2]。与此同时,苦豆子生长缓慢,不利于人工栽培。因此,合理开发利用苦豆子资源是其长足发展的重要途径。生物技术的快速发展为解决这一问题带来曙光,通过植物细胞培养可以生产天然的植物成分并提高其含量,这一技术在红豆杉^[6]、杜仲^[7]、人参^[8]等植物中应用较为成熟。

李晓莺等^[9]率先进行苦豆子再生植株的培养研究,但出愈率较低且不系统;2008年,王立强等^[5]对苦豆子愈伤组织诱导及继代培养进行了研究,得到诱导愈伤组织及继代培养的最佳培养基,但愈伤组织容易褐化;曹有龙等^[6]对苦豆子的组织培养及植株再生进行了研究,愈伤组织出愈率高达 100%,但褐化提前。该试验在已有研究基础上,开展苦豆子愈伤组织培养试验,得到生长状态良好且褐化率低的愈伤组织,以期为建立大规模细胞培养提供重要的技术手段和理论依据,为生产苦豆子生物碱提供优质原料和必要的技术依据。

(1. Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Agricultural Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Taking the onion embryo as explants, the tillered-onion regeneration system was established with MS as the basic culture induction, the effect factors, such as different onion varieties and different combination of hormone treatment on the regeneration process was analiped. The results showed that 'Fenhuang Jingiu' onion varieties was suitable for culture induction with the highest callus induction rate; MS+4 mg/L 2-4, D+1 mg/L 6-BA was the most suitable for callus induction, the rate of callus induction reached 72.1%. Different varieties had the highest rate of callus with 72.1%; addition of 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA to the MS medium promoted a the highest frequency of regeneration (78.3%); the medium which contained 1/2MS+0.01 mg/L NAA induced white strong roots, rooting rate reached 100%; the regenerated plantlets were domesticated and transplanted in greenhouse; the survival rate was 95%.

Key words: onion; callus; tissue culture