

洋葱幼蕾离体培养与植株再生的研究

杜敏霞, 刘湘萍

(内蒙古农科院 蔬菜研究所, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要: 通过对洋葱幼蕾的离体培养试验, 探讨了影响洋葱幼蕾愈伤组织诱导和植株再生的影响因素, 即激素浓度和配比、基因型、低温预处理、花蕾大小和移栽条件, 基本掌握了影响洋葱幼蕾愈伤组织诱导和植株再生的关键技术, 建立起一套高频率的再生体系, 为进一步利用洋葱组织培养技术奠定了基础。

关键词: 洋葱; 离体培养; 再生体系

中图分类号: S633.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)04-0054-03

Study on the *in Vitro* Culture and Plant Regeneration of Onion

DU Min-xia, LIU Xiang-ping

(Vegetable Institute of Innermongolia Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: The factors affecting callus inducement and plant regeneration of onion, that are hormone concentration and proportion, genotype, low temperature pretreatment, bud size and condition of transplant, were studied through *in vitro* culture. The key technology that affects callus inducement and plant regeneration of onion was obtained, and the high-frequency regeneration system was set up, which lay the foundation for further utilization of onion tissue culture technology.

Key words: Onion; *In vitro* culture; Regeneration system

洋葱是世界范围内普遍栽培的重要蔬菜之一, 它的肉质鳞茎营养含量丰富, 除含有蛋白质、碳水化合物外, 还含有钙、磷、铁、维生素、胡萝卜素、硫胺素和尼克酸等, 是重要的营养保健型蔬菜, 并且具有降低血压和预防血栓形成的药用功能, 而且洋葱耐贮藏运输、易加工脱水, 因此在世界各地广泛种植, 栽培面积仅次于番茄。近年来, 我国洋葱的种植面积迅速扩大, 洋葱及其加工制品已出口到欧美、日本及东南亚许多国家。目前我国洋葱生产上使用的品种多数为国外品种, 国内育成品种寥寥无几, 这主要因为洋葱为两年生植物, 它的花器结构小, 单株结籽少, 自交2~3代后易发生退化, 育种上存在育种周期长, 育种效率低等问题。而采用组织培养的方式, 可有效的解决上述问题^[1,2]。

据 Borut Bohanec 等研究报道^[3~5], 洋葱的雄性体培养(花药培养)不易获得成功, 而雌性体, 如子房、胚珠、胎座等进行离体培养, 容易获得再生植株,

且再生植株中有单倍体、二倍体和混倍体存在, 但再生频率较低。姜璐琰等^[6]用洋葱幼蕾培养, 通过诱导愈伤组织能获得较高频率的再生植株。

本试验也采用洋葱幼蕾为外植体, 对影响愈伤组织形成和植株再生的因素进行了研究, 旨在探讨洋葱幼蕾离体培养的最佳培养条件, 建立高效率的培养体系。

1 材料和方法

1.1 无菌材料的获得

将总苞未开裂时的洋葱花苞摘下, 剥去总苞皮, 先用70%的酒精消毒30s, 再用0.1%升汞消毒10min, 然后用无菌水冲洗3次, 得到无菌花蕾, 最后将无菌小花蕾接种于90mm培养皿中。

1.2 培养条件

将接种后的培养皿置于温度为(25±1)℃, 光照时间为16h/d, 光照强度为2000lx的条件下进行培养。

收稿日期: 2004-10-21

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助(200208020312)

作者简介: 杜敏霞(1963-), 女, 呼和浩特人, 副研究员, 硕士, 主要从事蔬菜遗传育种研究工作。

1.3 愈伤组织诱导试验

1.3.1 激素浓度及配比 以 MS 为基础培养基, 6-BA 浓度为 1.0~ 3.0 mg/L, 2, 4-D 浓度为 0.5~ 2.0 mg/L, 供试品种为 01-1。采用 L₁₆(4⁵) 正交表进行试验设计(表 1), 共 16 个处理, 3 次重复。

表 1 不同激素浓度及配比对洋葱愈伤组织诱导的影响

Tab 1 Effect of medium supplemented with different concentration and ratio hormone on callus tissues induction in onion

处理 Treatment	2, 4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	接种花蕾数(个) No. of flower bud cultured	出愈数(个) No. of callus produced	出愈率(%) Efficiency of callus induction
1	0.5	1.0	20	14	70.0
2	0.5	1.5	28	10	35.7
3	0.5	2.0	21	12	57.1
4	0.5	3.0	22	14	63.6
5	1.0	1.0	20	8	40.0
6	1.0	1.5	20	10	50.0
7	1.0	2.0	23	13	56.6
8	1.0	3.0	26	20	76.9
9	1.5	1.0	22	17	77.3
10	1.5	1.5	20	11	55.0
11	1.5	2.0	20	9	45.0
12	1.5	3.0	21	18	85.7
13	2.0	1.0	22	15	68.2
14	2.0	1.5	18	6	33.3
15	2.0	2.0	20	7	35.0
16	2.0	3.0	20	14	70.0
T ₁	226.4				
T ₂	223.5				
T ₃	263.0				
T ₄	206.5				
T ₁		255.5			
T ₂		174.0			
T ₃		193.7			
T ₄		296.2			
R	56.6	122.2			

1.3.2 基因型 供试基因型共 8 个(表 2), 均为本所 2001 年从国内、外引进的品种。培养基为 MS+ 2, 4-D 1.5 mg/L+ 6-BA 3.0 mg/L+ 蔗糖 30 g/L, pH 为 5.7。

1.3.3 低温预处理 将采摘下的花蕾在 4 ℃ 冰箱中分别放置 15, 30, 40 h 后接种, 以不进行温度处理为对照, 供试品种为 01-14, 培养基为 MS+ 2, 4-D 1.5 mg/L+ 6-BA 3.0 mg/L+ 蔗糖 30 g/L, pH 为 5.7。

1.3.4 花蕾大小 以花蕾直径 ≤ 0.3 mm、0.3~ 0.5 mm、 ≥ 0.5 mm 为接种材料, 供试品种为 1-14, 培养基为 MS+ 2, 4-D 1.5 mg/L+ 6-BA 3.0 mg/L+ 蔗糖 30 g/L, pH 为 5.7。

1.4 植株再生试验

1.4.1 芽诱导 以 MS 为基础培养基, NAA 浓度为

0.5, 1.0 mg/L, 6-BA 浓度为 0.5, 1.0, 1.5 mg/L, 共 6 种配比。

1.4.2 根诱导 以 MS 为基础培养基, NAA 浓度为 0.5, 1.0 mg/L。

1.5 移栽试验

以蛭石为基质, 移栽前 2~ 3 d 打开培养瓶口进行炼苗, 然后将再生植株根部培养基洗净移入培养钵中并浇透水, 最后用塑料薄膜和遮阳网覆盖以遮阴保湿。移栽期间注意保持基质和空气湿度。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度及配比对洋葱愈伤组织诱导的影响

不同种类植物的愈伤组织诱导对激素种类和浓度配比要求不同。试验结果表明: 2, 4-D 1.5 mg/L 和 6-BA 3.0 mg/L 为洋葱愈伤组织的最佳诱导浓度, 平均出愈率分别为 65.75% 和 74.05%, 而且 6-BA 对洋葱愈伤组织诱导的作用大于 2, 4-D 的诱导作用, 这与前人的研究结果一致^[3]。在添加 2, 4-D 1.5 mg/L+ 6-BA 3.0 mg/L 的 MS 培养基上, 愈伤组织的出愈率高达 85.7%, 是洋葱幼蕾愈伤组织诱导的最佳激素浓度配比(表 1)。

2.2 供试基因型对洋葱愈伤组织诱导的影响

试验所采用的 8 个不同基因型的最高出愈率为 84.0%, 最低为 42.8%, 基因型间的差异明显(表 2), 说明基因型对洋葱愈伤组织的萌发影响较大, 这与在其他作物上的研究结果一致^[7]。

表 2 不同基因型对愈伤组织诱导的影响

Tab 2 Effect of genotypes on callus tissues induction in onion

基因型 Genotypes	接种花蕾数(个) No. of flower bud cultured	出愈数(个) No. of callus tissues produced	出愈率(%) Efficiency of callus induction
01- 2	14	6	42.8
01- 3	13	8	61.5
01- 5	20	10	50.0
01- 6	20	10	50.0
01- 8	21	14	66.7
01- 10	20	11	55.5
引 4- 2	25	21	84.0
引 6- 1	25	18	72.0

2.3 低温预处理对洋葱愈伤组织诱导的影响

经低温预处理后, 洋葱幼蕾的愈伤组织萌发较快, 比未经低温处理的提早萌发 3~ 5 d, 而愈伤组织出愈率没有明显差别, 各低温处理间也没有差异。

2.4 花蕾大小对洋葱愈伤组织诱导的影响

花蕾大小试验表明: 直径为 0.3~0.5 mm 的花蕾愈伤组织生长最好, 在略微膨大的子房基部愈伤组织生长旺盛, 呈黄绿色, 而 ≤ 0.3 mm 的花蕾接种后易萎缩, ≥ 0.5 mm 的花蕾接种后子房膨大过快, 愈伤组织几乎不生长。因此, 洋葱接种花蕾以直径 0.3~0.5 mm 为宜。

2.5 不同激素浓度及配比对植株再生的影响

在愈伤组织生长到一定大小时, 将愈伤组织接种到添加 NAA 和 6-BA 不同浓度配比的 MS 培养基上, 结果表明: 在添加高浓度 NAA (1.5 mg/L) 的培养基上, 愈伤组织生成大量根, 不产生芽, 而在 NAA 低浓度培养基上 (0.5 mg/L), 芽大量发生, 基本不生成根, MS+ NAA 0.5 mg/L+ 6-BA 1.0 mg/L 的出芽率达 65.4%, 是植株再生的最佳培养条件。

2.6 激素浓度对根形成的影响

当再生苗生长到一定大小时, 分别添加 0.5, 1.0 mg/L 的 NAA 进行根诱导试验, 结果: 添加 NAA 1.0 mg/L 的培养基, 根发生的频率较高, 可作为洋葱再生苗的根诱导条件。

2.7 再生苗移栽试验

在本试验条件下, 再生苗的育苗钵移栽成活率为 50.5%, 大田移栽成活率为 95% 以上。遮阴、保湿和适宜的温度是洋葱再生苗成活的关键因素。

3 结论与讨论

本试验通过对影响洋葱幼蕾愈伤组织形成和再生苗生长因素的研究, 基本掌握了洋葱离体花蕾愈

伤组织诱导和再生苗形成的关键技术, 建立起一套洋葱幼蕾高频率再生体系, 为进一步开展洋葱单倍体育种奠定了基础。

洋葱幼蕾基部产生的愈伤组织可能是子房基部产生的, 也可能是子房内部胚囊细胞直接产生的, 因此, 本试验产生的再生植株需进一步进行倍性鉴定, 为进一步利用提供依据。

参考文献

- [1] 郑海柔. 洋葱的组织培养[J]. 上海蔬菜, 1999, (2): 32-33.
- [2] 中岛寿龟. 利用洋葱的胚状体大量增殖种苗[J]. 农业新技术新方法译丛, 1989, 27(4): 40-43.
- [3] Borut Bohanec, Marijana Jakse, Alojz Ihan, *et al.* Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and analysis of regenerants[J]. Plant Science, 1995, (104): 215-224.
- [4] Barbara Michalik, Adela Adamus, Ew Nowak. Gynogenesis in Polish Onion Cultivars[J]. Journal of Plant Physiology, 2000, (156): 211-216.
- [5] Bohanec B, Jakse M. Variations in gynogenic response among long-day onion[J]. Plant Cell Reports, 1999, (18): 737-742.
- [6] 姜璐璐, 张松, 张起沛. 洋葱体细胞胚胎发生研究[A]. 葱蒜类蔬菜学术讨论会论文汇编[C]. 北京: 中国园艺学会, 2002.
- [7] 蒋武生, 原玉香, 张晓伟, 等. 提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[A]. 全国蔬菜遗传育种学术讨论会[C]. 北京: 中国园艺学会, 2002. 67-70.