

大蒜花梗组织培养再生植株

王洪隆

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

康玉庆 张存金 马 筠 王焘宽

(天津师范大学生物系, 天津 300074)

摘 要 取生殖期大蒜花梗, 在 $N_6 + 2,4-D$ 2mg/L + KT 1mg/L培养基上暗培养30天后, 得到微黄色愈伤组织。将愈伤组织转到 $N_6 + 2,4-D$ 0.5mg/L + KT 1mg/L培养基上继代二次, 然后于 $N_6 + BA$ 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L, MS (1/2大量元素) + BA 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L 和 MS + BA 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L 培养基上光照培养。3周后愈伤组织上出现绿色丛生芽, 将小芽转到MS(1/2大量元素) + NAA 0.01mg/L培养基上, 一周后发生白色根并形成完整植株。2,4-D和KT对大蒜花梗愈伤组织发生是必要的, 高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素有利于芽分化, 高浓度 NH_4^+ 有利于根分化, 低浓度 NH_4^+ 有利于芽分化。愈伤组织低温处理对芽的分化是必要的。另外, 对花梗愈伤组织发生进行了细胞学观察。

关键词 大蒜 花梗 再生植株 植物激素

大蒜是无性繁殖植物, 传统的耕作是以鳞茎为母种栽培。大蒜病毒(GMV)通过亲代传递积累, 造成大蒜退化减产^[1]。目前通过组织培养建立大蒜脱毒苗工厂化生产的研究相当活跃^[2, 8], 但茎尖培养所得到的脱毒苗不多。因此, 建立组织培养快繁体系是脱毒苗扩大繁殖的重要环节。至今, 已能从大蒜的贮藏叶、发芽叶等外植体再生植株^[4, 5, 9, 10]。

本文选取大蒜花梗为外植体, 对愈伤组织发生及植株分化进行了探讨, 并对愈伤组织发生的细胞学变化做了动态观察。

材料和方法

供试品种为天津宝坻大蒜(*Allium stipitum* L.)。基本培养基为修改的MS和 N_6 培养基, 附加成份不同, 琼脂0.7%, pH调至5.8。

在大蒜生殖期, 切取大蒜小花梗, 先用70%乙醇浸泡15秒钟, 再用0.5%的次氯酸钠处理15分钟, 无菌水冲洗3次。将小花梗切成1mm长的小段, 接到培养基上。愈伤组织诱导阶段, 暗培养, 愈伤组织继代及分化时期, 进行光照培养, 光强为1500Lx, 每日光照14小时左右, 室温 $26 \pm 1^\circ C$ 。

取培养不同天数的小花梗及其形成的愈伤组织,用FAA固定液固定,石蜡包埋,切片厚度为 $8\mu\text{m}$ 左右,番红固绿对染,加拿大树胶封片。

结果与讨论

一、愈伤组织发生

1. 不同植物激素对花梗愈伤组织发生的影响 由表1可知,当试验的三种激素(2,4-D, NAA, KT)的含量为零时(1号培养基),外植体无愈伤组织发生。这一结果表明大蒜小花梗细胞脱分化明显地受不同种类的外源激素控制。当2,4-D的浓度为 2mg/L , KT的浓度为 1mg/L (5号培养基),外植体经过大约30天的培养,形成微黄色、结构致密、表面光滑滋润的愈伤组织。当2,4-D的浓度小于 1mg/L 时(2、3号培养基),没有愈伤组织形成;2,4-D浓度为 1mg/L 时(4号培养基),愈伤组织发生缓慢且很少;2,4-D的浓度大于 2mg/L (11、12号培养基)愈伤组织发生率稍有降低,且愈伤组织结构松散易碎。这表明2,4-D在大蒜花梗愈伤组织发生过程中起着重要的作用。2,4-D浓度低于 0.5mg/L 时不能引起细胞脱分化,可能是它进入植物细胞后,立即遇到细胞内许多酶的攻击,使其一部分或全部失活,从而不能发生效应;而高浓度的抑制作用可能是由于2,4-D导致花梗各部分之间发生同化产物重新分配,从而影响机体的核酸蛋白质等物质发生变化的结果[6]。另外,KT在大蒜花梗愈伤组织发生过程中也起着重要的作用,培养基仅有2,4-D一种激素时(2号、6号)无愈伤组织发生,当KT浓度为 1mg/L 时,效果较好,而随着KT浓度的增加(9、10号),则对愈伤组织的发生影响不大。NAA在花梗愈伤组织发生中的影响不太明显,NAA的增减有无(7、8、9、10),愈伤组织的发生率无明显变化。

表1 不同种类激素对愈伤组织发生的影响

激 素 (mg/L)	培 养 基											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2,4-D	0	0.5	0.5	1	2	2	2	2	2	2	4	4
NAA	0	0	0	0	0	0	0.5	1	2	0	0	0
KT	0	0	1	1	1	0	1	1	2	2	1	2
愈伤组织发生率(%)	0	0	0	21	80	0	77	81	79	81	44	38

注:基本培养基 N_6 +5%蔗糖。

2. 不同培养基对大蒜花梗愈伤组织发生的影响 由表2可知,在MS培养基上培养

表2 不同培养基对愈伤组织发生的影响

培养基种类	MS	MS (1/2大量元素)	N_6
愈伤组织发生率(%)	1	74	80

注:附加激素2,4-D 2mg/L +KT 1mg/L 。

时,愈伤组织发生率极低,而在MS (1/2大量元素)及 N_6 培养基上培养时,可得到较高的愈伤组织发生率。MS培养基中无机盐浓度较高,而MS (1/2大量元素)及 N_6 培养基中无机盐浓度相对较低,这表明对于大蒜花梗愈伤组织诱导来说,较低的离子环境是比较合适的,而高浓度的离子环境抑制愈伤组织的发生。

3. 大蒜花梗愈伤组织发生过程的细胞学观察 有关大蒜花梗愈伤组织发生过程中的细胞学动态观察,目前国内外尚未见报道。本实验首次对这一过程中的细胞学动态变化进行了跟踪观察,发现在未培养的大蒜花梗组织中,靠近维管束和表皮的薄壁细胞体积较大,核相对地小,并被一个大液泡挤到细胞边缘(图A)。随着培养时间的推移,发现这部分细胞的细胞核明显增大,且细胞核由细胞边缘向中央移动(图B、C)。通过细胞的不断分裂(图D)形成愈伤组织。在愈伤组织细胞中有一个巨大的核,几乎占据了整个细胞,而细胞内的液泡变得很小,甚至完全消失(图E)。这与大蒜发芽叶愈伤组织发生过程中的细胞学变化过程基本相似^[3]。

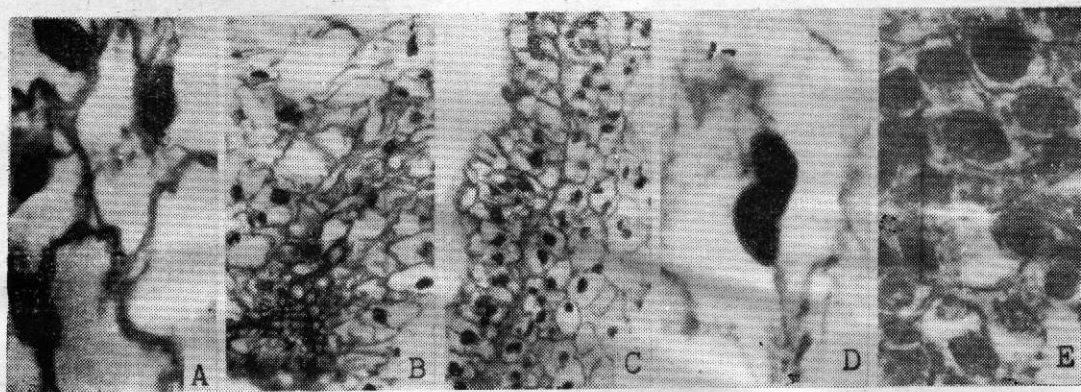


图 大蒜小花梗愈伤组织发生过程的细胞学观察

A.未培养的小花梗组织细胞(200 \times); B.维管束周围的薄壁细胞(50 \times); C.表皮细胞附近的薄壁细胞(50 \times); D.细胞分裂(200 \times); E.愈伤组织细胞(200 \times)

二、大蒜花梗愈伤组织分化及植株再生

愈伤组织转到 $N_6+2,4-D$ 0.5mg/L+KT 0.5mg/L培养基上,继代二次,每次20天。挑取表面光滑润洁、结构紧密的浅黄色愈伤组织,切成1mm³的小块,转入分化培养基,先在4 $^{\circ}C$ 下处理15天再转到光下培养3周后,出现绿色丛生芽。愈伤组织若未经低温处理,培养后仅分化出毛状根,而不分化芽。低温处理可能影响到愈伤组织细胞胞质分布和核分裂及内源激素的分布变化,从而影响愈伤组织的分化方向。另外,大蒜花梗愈伤组织极易向根的方向分化,未经继代或仅继代一次的愈伤组织,当培养在分化培养基上时,仅有毛状根分化,而不能分化芽。继代愈伤组织有利于脱去对芽分化具有抑制作用的高浓度的2,4-D。

1. 不同培养基对愈伤组织分化的影响 由表3可知,在MS(KNO_3 2525mg/L+ $(NH_4)_2SO_4$ 1650mg/L无 NH_4NO_3)培养基上,愈伤组织仅向根的方向分化。而在其它

三种培养基上培养时,则有不同程度的向芽的方向分化。比较这四种培养基组份,发现MS, MS (1/2大量元素)和 N_6 这三种培养基中的 NH_4^+ 浓度较低。 NH_4^+ 可能是控制大蒜花梗愈伤组织分化方向的一个重要因素,当 NH_4^+ 浓度较低时,有利于芽的分化;当 NH_4^+ 浓度高时,则有利于根的分化。

表3 不同培养基对愈伤组织分化的影响

培养基	分化方向	分化率 (%)
MS (KNO_3 2525mg/L+ (NH_4) ₂ SO_4 1650mg/L无 NH_4NO_3)	毛状根	100
MS	小绿芽	43
MS (1/2大量元素)	小绿芽	58
N_6	小绿芽	65

注:附加激素 BA 5mg/L+KT 1mg/L+IAA 0.01mg/L。

2. 外源激素对愈伤组织分化的影响 由表4可知,在促进愈伤组织向芽方向分化方面,KT浓度在1mg/L, BA的浓度在3~5 mg/L范围内, IAA的浓度在0.01~1.5mg/L范围内是比较适宜的(e、f、g培养基)。当IAA的浓度 ≥ 2 mg/L时会抑制芽分化并导致根的发生(h培养基)。比较a、b和e、f两组培养基,发现KT和IAA之间可能存在着某种拮抗作用,当培养基中加入1mg/L的KT(e、f培养基)后会促使愈伤组织向芽的方向分化。NAA在一定程度上可以消除KT和IAA之间的拮抗作用,当在培养基中加入0.05mg/L(i、j培养基),结果会导致愈伤组织向根的方向分化。

3. 植株再生及移栽成活 将小绿芽转移到MS (1/2大量元素)+NAA 0.01mg/L培养基上,一周之后发生白色根。将小苗的根用无菌水洗净,移到泥炭土中,温室培养,每天早晚各喷水一次,保持培养湿度在80%左右,一个月后,将小苗移入大田。

总之,在大蒜花梗组织培养中,其愈伤组织诱导需要较高浓度的2,4-D和低浓度的无机盐。在植株再生过程中,高比值的细胞分裂素/生长素和低浓度的 NH_4^+ 是比较适宜的,这与大蒜其它器官的组织培养情况相似^[7]。提高花梗培养的分化率则有待进一步的研究,以便更好地与脱毒苗工厂化生产相配合。

表4 不同激素对愈伤组织分化的影响

激素	培养基									
(mg/L)	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
KT	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
BA	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5
IAA	0.01	0.01	0	0	0.01	0.5	1.5	2	0.01	0.5
NAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.05
分化方向	毛状根	毛状根	毛状根	毛状根	小芽	小芽	小芽	毛状根	毛状根	毛状根
分化率 (%)	52.0	45.5	37.8	46.0	64.5	76.0	58.2	54.0	32.3	47.9

注:基本培养基 N_6 +3%蔗糖。

参 考 文 献

- 1 马筠等.宝坻大蒜病毒病原的初步研究.天津师大学报(自然版), 1991(1): 70~75
- 2 王洪隆等.检测植物组培苗脱毒的酶联免疫技术.生物学杂志, 1991(2): 29
- 3 王洪隆等.大蒜发芽叶愈伤组织细胞超微结构观察与过氧化物酶同工酶的变化.华北农学报, 1991, 6(1): 74~80
- 4 何俊英等.大蒜发芽叶组织培养再生植株.天津农林科技, 1991(1): 17~20
- 5 曾淑水.从蒜瓣再生完整植株.植物生理学通讯, 1981(4): 45
- 6 倪德祥.植物生长物质在组织培养中的调控作用.自然杂志, 1986, 10(1): 35~33
- 7 Abo El-Nil. Organogenesis and embryogenesis in callus culture of garlic. Plant Science Letter, 1977(9): 259~264
- 8 Bhojwani SS. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plant. Scientia Horticulture, 1983(18): 37~43
- 9 Havranek P et al. The bud formation in the callus culture of *Allium Sativum* L. Z Pflanzenphysiol, 1973(68): 308~318
- 10 Kehr AE et al. Tissue culture and differentiation of garlic. Hortscience, 1976(11): 422~423

Plant Regeneration via Tissue Culture of Garlic Pedicel

Wang Honglong

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Kang Yuqing Zhang Cunjin Ma Yun Wang Taokuan

(Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074)

Abstract Calli appeared from pedicels of garlic cultured on $N_0 + 2,4-D$ 2mg/L + KT 1mg/L for 30 days. These calli survived two subcultures on $N_0 + 2,4-D$ 0.5mg/L + KT 0.5mg/L. Organogenesis occurred on $N_0 + BA$ 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L MS ($\frac{1}{2}$ Macroelements) + BA 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L and MS + BA 5mg/L + KT 1mg/L + IAA 0.01mg/L. Roots appeared one week after the shoot was transferred onto the MS ($\frac{1}{2}$ Macroelements) + NAA 0.01mg/L medium. 2,4-D and KT were essential to the induction of calli from garlic pedicels. Higher concentrations of plant growth regulators, i.e. cytokinin/auxin, lower concentration of NH_4^+ and cold treatment to calli were all essential to shoot formation. Cellular observation on the process of callus induction from garlic pedicel is also discussed.

Key words: Garlic, Pedicel, Plant regeneration, Plant growth regulators