

韭菜组织培养高频植株再生体系的研究

张松 达克东 曹辰兴 曹淑荣 黄金丽

(山东农业大学园艺学院, 泰安 271018)

摘要:通过对韭菜组织培养过程中激素配比、外植体、基因型、苗龄及生根条件的研究,建立了一次性诱导成芽的高频植株再生体系。适于愈伤组织和不定芽分化的最佳培养基为MS+NAA 1 mg/L+BA 2 mg/L,在此分化培养基上9F1、9F8、保定红根、寿光马蔺韭和兰州小韭根尖培养的芽分化频率分别为78.7%、83.7%、81.9%、76.7%和73.3%,平均出芽数分别为40.1、46.7、36.3、35.4和44.5个,苗龄为7~10 d的根尖最适于组织培养。随苗龄增加,芽的分化频率呈下降趋势。无任何激素的MS0培养基最适于不定芽的生根,生根率达100%,平均根数14.5条。卡那霉素(Km)对植株再生有很强的抑制作用,在Km为20 mg/L时就完全抑制愈伤组织和不定芽的发生;羧苄青霉素(Carb)和噻孢霉素(Cef)也抑制韭菜根尖培养的植株再生,Cef的抑制作用更加显著,Carb 500 mg/L或Cef 300 mg/L完全抑制不定芽的再生;Timinentin对愈伤组织和芽的分化影响不大,抑制性主要表现在出芽数随浓度升高而降低。当Timinentin浓度为500 mg/L时,平均出芽数仍可达到23.8个,为对照的49.4%。

关键词: 韭菜; 根尖; 组织培养; 植株再生; 抗生素

中图分类号: S 633.3; **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0141-04

韭菜(*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng.)的组织培养研究较少,植株再生频率较低^[1],制约了基因工程技术在韭菜遗传改良上的应用。作者研究了影响韭菜组织培养植株再生的主要因素,建立了高频植株再生体系,为今后进行基因转移奠定基础。

1 材料与方法

除基因型试验外,其它均以9F8为试材。韭菜种子先用70%酒精浸泡5 min,再用0.1%升汞溶液消毒10 min,然后用无菌水冲洗3遍,置于MS基本培养基^[2]上。培养基中蔗糖30 g/L,琼脂7 g/L,pH 5.8。种子萌发后取0.5~1 mm的根尖为外植体,每个处理接种30个左右,3次重复。诱导培养基为MS附加不同浓度的NAA和BA。所有材料先在(25±1)℃的黑暗条件下培养至出芽,再移入光照培养箱内,光照16 h/d,光照强度3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对9F8韭菜根尖培养不定芽分化的影响

种子萌发10 d后取0.5~1 cm根尖接种于附加不同浓度NAA和BA的MS培养基上,7 d后根尖切段开始伸长,10 d左右产生白色颗粒状愈伤组织(见插页3图版,1)。接种20 d后从愈伤组织上再生不定芽(插页3图版,2)。30 d后调查不定芽的分化情况(表1),结果显示NAA和BA对韭菜组织培养作用显著,在MS+NAA 1 mg/L+BA 2 mg/L培养基上,不定芽诱导频率最高,为80.6%,平均出芽数也最多,达46.5个;MS+NAA 2 mg/L+BA 1 mg/L和MS+NAA 2 mg/L+BA 2 mg/L次之。试验结果还表明易产生愈伤组织的外植体芽分化频率和出芽率均较高。

2.2 韭菜不同基因型不定芽分化的差异

在MS+NAA 1 mg/L+BA 2 mg/L培养基上接种不同品种的根尖外植体,30 d后调查不定芽的分

化情况, 结果列入表2。

接种10 d后91-1、9F8、保定红根、寿光马蔺韭和兰州小韭的外植体上有颗粒状愈伤组织产生, 20 d后, 开始分化不定芽。其余品种愈伤组织和芽分化较之晚3~5 d。供试14份材料均能产生愈伤组织和分化不定芽, 产生愈伤组织的外植体多能再分化形成不定芽, 芽的分化数目也较多(插页3图版, 3), 愈伤组织分化频率较低的品种出芽率也较低。由表1可见, 9F8愈伤组织和芽的分化频率最高, 均达到83.7%, 出芽数也最多, 平均为46.7个, 保定红根次之, 芽的分化频率为81.9%, 91-1、寿光马蔺和兰州小韭愈伤组织和芽的分化频率也较高, 均在70%以上, 且平均出芽数多。

表1 不同激素配比对9F8韭菜根尖培养不定芽分化的影响

Table 1 Effects of hormones on adventitious shoot differentiation via root tip culture

激素配比		愈伤组织诱导率	不定芽诱导率	平均出芽数
Hormone combination (mg/L)		Callus induction rate (%)	Shoot induction rate (%)	No. of shoots per explant
NAA	BA			
1	0	0	0	0
1	1	31.0±1.8	26.8±1.2	25.9±1.5
1	2	80.6±2.8	80.6±2.8	46.5±3.1
2	0	0	0	0
2	1	53.3±1.2	48.2±1.2	27.4±1.2
2	2	46.9±1.3	42.9±0.8	34.1±1.7

注: 3次重复的平均值±标准差。Note: Average±standard deviation of 3 measurements.

表2 韭菜不同基因型愈伤组织不定芽分化的比较

Table 2 Effects of genotypes on adventitious shoot differentiation

基因型	愈伤组织诱导率	不定芽诱导率	平均出芽数
Genotype	Callus induction rate (%)	Shoot induction rate (%)	No. of shoots per explant
9F1	78.7±5.0	78.7±5.0	40.1±3.4
9F8	83.7±3.7	83.7±3.7	46.7±5.7
791	60.8±5.8	58.3±5.8	13.2±2.7
汉中冬韭 Hanzhong Dongjiu	56.8±1.9	50.8±1.4	20.0±3.2
宽叶韭 Kuanyejiu	65.4±4.1	65.4±4.1	43.3±3.7
天津大黄苗 Tianjin Da Huangmiao	58.7±3.7	53.3±5.8	23.5±6.7
天津大青苗 Tianjin Da Qingmiao	63.3±4.3	60.0±5.8	25.1±4.4
寿光马蔺韭 Shouguang Malinjiu	73.3±3.7	76.7±3.7	35.4±3.7
沈阳马蔺韭 Shenyang Malinjiu	46.4±3.3	39.3±3.3	10.1±1.7
保定红根 Baoding Honggen	81.9±2.5	81.9±2.5	36.3±3.3
兰州小韭 Lanzhou Xiaojiu	76.6±5.4	73.3±6.4	44.5±4.6
甘肃马蔺韭 Gansu Malinjiu	63.3±3.2	56.3±4.4	13.5±4.5
浙江雪韭 Zhejiang Xuejiu	53.4±4.9	49.6±3.7	11.4±3.7
北京铁丝苗 Beijing Tiesimiao	58.9±2.2	58.9±2.2	11.6±3.4

注: 3次重复的平均值±标准差。Note: Average±standard deviation of 3 measurements.

2.3 苗龄对9F8韭菜不定芽分化的影响

种子萌发后7、10、13、16、19 d分别取根尖培养, 30 d后调查芽的分化情况。由图1可见, 随苗龄增加, 芽分化频率和平均出芽数呈下降趋势, 7~10日苗龄的根尖外植体最适于脱分化和再分化, 芽分化频率达83.7%~86.4%, 平均出芽数达42.2~46.7个, 是最适宜的取材苗龄。

2.4 9F8韭菜不定芽的生根培养

由表3可见, 在MS+NAA 0~1 mg/L的培养基上均能生根, 但生根数和根的生长速度却有很大差异。在MS0培养基上生根数最多, 生长速度最快, 在MS+NAA 1 mg/L上生根数虽然也较高, 但生长速度慢; 在MS+NAA 0.5 mg/L上根少且短。因此, 以MS0为最佳生根培养基。

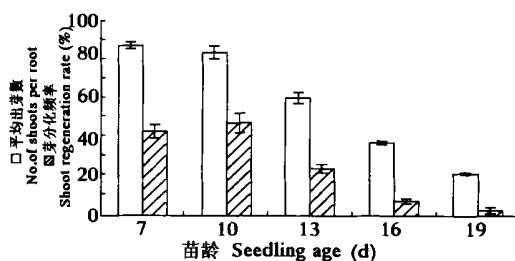


图 1 苗龄对 91-8 韭菜不定芽分化的影响

Fig. 1 Effects of seedling age on shoot differentiation

表 3 91-8 韭菜在不同生根培养基上的生根情况

培养基 Medium	NAA (mg/L)	生根率 differentiation rate (%)	Root number	根长 Root length (cm)
MS	0	100	14.5 ± 1.4	4.2 ± 1.1
MS	0.5	100	3.8 ± 0.7	3.0 ± 1.0
MS	1.0	100	12.8 ± 1.7	2.7 ± 1.2

注: 3 次重复的平均值±标准差。

Note: Average ± standard deviation of 3 measurements.

2.5 抗生素对 91-8 韭菜植株再生的影响

由图 2 可见, 卡那霉素 (Km) 对韭菜根尖培养有抑制作用。随 Km 浓度升高, 根尖培养愈伤组织和芽的分化频率以及平均出芽数逐渐降低。Km 对芽的分化影响更大, 当 Km 为 5 mg/L 时, 芽的分化率由对照的 89.9 % 降低到 55.8 %, 平均出芽数由 48.2 个降低到 23.6 个; 当浓度达到 10 mg/L 时, 出愈率迅速降低至 33.5 %, 芽的分化和出芽数也大幅度减少; 当 Km 为 15 mg/L 时, 根尖很少分化愈伤组织, 愈伤组织上几乎没有芽产生; 当 Km >20 mg/L 时, 完全抑制根尖脱分化和再分化。羧苄青霉素 (Carb) 和噻孢霉素 (Cef) 对韭菜的植株再生也有很大的抑制作用, 表现为随着抗生素浓度的提高, 愈伤组织和芽的分化频率逐渐降低, Cef 的抑制作用更加显著, 当 Carb 为 500 mg/L 时, 虽然能够产生少量愈伤组织, 但是愈伤组织不能脱分化形成芽; 当 Cef 为 300 mg/L 时, 完全抑制不定芽的再生。结果表明在所取浓度范围 (100~500 mg/L) 内, Timinentin 对韭菜根尖培养中愈伤组织的诱导和芽分化影响不大, 但是出芽数量随 Timinentin 浓度的升高而有所下降。当 Timinentin 为 500 mg/L 时, 平均出芽数仍可达到 23.8 个, 为对照的 49.4 %。所以可以选择 Timinentin 作为农杆菌的生长抑制剂。

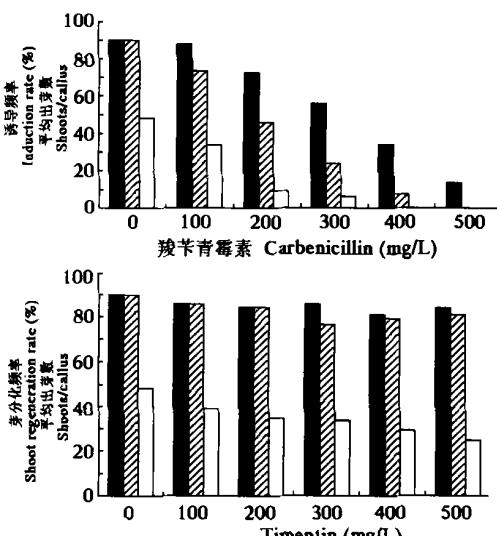
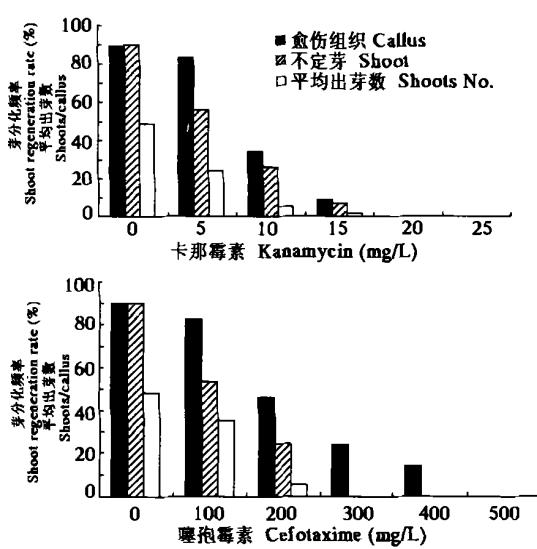


图 2 抗生素对韭菜根尖培养植株再生的影响

Fig. 2 Effects of antibiotics on plant regeneration

2.6 91-8 韭菜再生植株的驯化移栽

当根长至 3~4 mm 时可进行再生植株的驯化移栽 (插页 3 图版, 4)。先在培养室内揭开封口膜驯化培养 2~3 d, 再用镊子将植株从三角瓶中取出, 洗去根部附着的培养基, 移栽于盛有消毒蛭石的培养钵中, 每天浇灌少量 1/2MS 营养液, 保湿培养 7 d 后, 即可移入土壤中进行正常栽培管理。

3 讨论

本研究证明韭菜根尖是培养植株再生的优良外植体，在MS+ NAA 1 mg/L+ BA 2 mg/L培养基上可一次成芽，芽分化频率高达65.4%~83.7%，出芽数达40.1~46.7个，在2~3个月的时间内可以获得大量的再生植株。Km对韭菜根尖培养植株再生具有很强的抑制作用，Km为20 mg/L完全抑制再分化，不能诱导产生不定芽。抑菌性抗生素中，Carb和Cef对植株再生具有抑制作用，主要表现为抑制愈伤组织和芽的发生，特别是出芽数随Carb和Cef浓度升高而迅速减少，当Carb 500 mg/L或Cef 300 mg/L时不能诱导成芽。Timentin对韭菜根尖培养愈伤组织和芽的分化频率的影响较小，抑制作用主要表现在出芽数降低上，当Timentin为500 mg/L时，出芽数达23.8个，为对照的49.4%。

Dommise等^[3]认为与韭菜同属的洋葱是农杆菌的天然寄主，酚类物质，如乙酰丁香酮在农杆菌侵染中的作用被发现后，利用农杆菌介导法将外源基因导入单子叶植物成为可能^[4]，Barandiaran等^[5]则用粒子轰击法将uidA基因导入大蒜中。本研究建立的韭菜高频植株再生体系可作为基因转移的受体系统，转基因工作正在进行中。

参考文献：

- Shuto h, Abe T, Yamagata T. *In vitro* propagation of plants from root apex derived calli in Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl) and garlic (*A. sativum* L.). Japan J. Breeding, 1993, 43: 349~ 355
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 1962, 15: 473~ 497
- Dommise E M, Leung D W M, Conner A J. Onion is a monocotyledonous host for *Agrobacterium*. Plant Sci., 1990, 69: 249~ 252
- 杨剑波, 许志宏, 卫志明, 等. 影响根癌农杆菌附着禾谷类作物培养细胞的因素. 实验生物学报, 1993, 26 (1): 1~ 6
- Barandiaran X, Di Pietro A, Martin J. Biolistic transfer and expression of a uidA reporter gene in different tissues of *Allium sativum* L. Plant Cell Rep., 1998, 17: 737~ 741

Efficient Plant Regeneration Via Root Tip Culture of *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng.

Zhang Song, Da Kedong, Cao Chenxing, Cao Shurong, and Huang Jinli

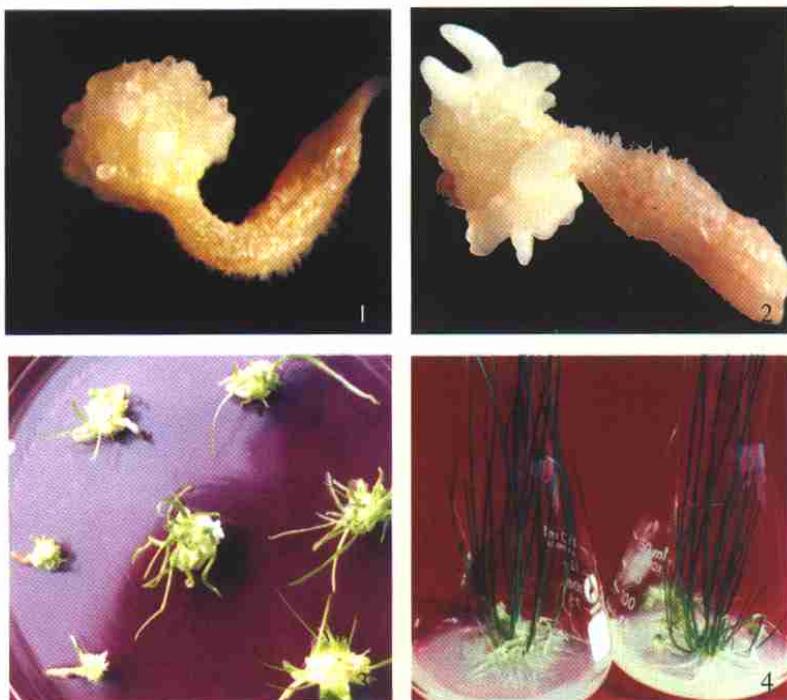
(College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: An efficient plant regeneration system was established through optimization of hormone combination, genotype, seedling age and root induction medium in root tip culture of Chinese chive. Data showed that the best medium for callus and adventitious shoot differentiation was MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2 mg/L BA. Shoot induction rate of 91·1, 91·8, Baoding Honggen, Shouguang Malinjiu and Lanzhou Xiaojiu were 78.7%, 83.7%, 81.9%, 76.7% and 73.3%, while the average shoot number per explant were 40.1, 46.7, 36.3, 35.4 and 44.5 respectively. Root tips taken from plantlets 7 to 10 day-old seedlings showed the highest regeneration ability. MS medium without growth regulators was optimum for root formation of regenerated shoots with 100% root induction rate and 14.5 roots per shoot. Kanamycin inhibited callus and shoot induction definitely at 20 mg/L. Carbenicillin and Cefotaxime had inhibiting effects on callus induction and shoot regeneration at Carbenicillin 500 mg/L and Cefotaxime 300 mg/L respectively. The effect of Timentin was not obviously, with the inhibition effect only lying in the reduction of shoot number induced from callus.

Key words: Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng.); Root tip; Tissue culture; Plant regeneration; Antibiotics

张松等：韭菜组织培养高频植株再生体系的研究

Zhang Song, et al. Efficient Plant Regeneration Via Root Tip Culture of *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng.

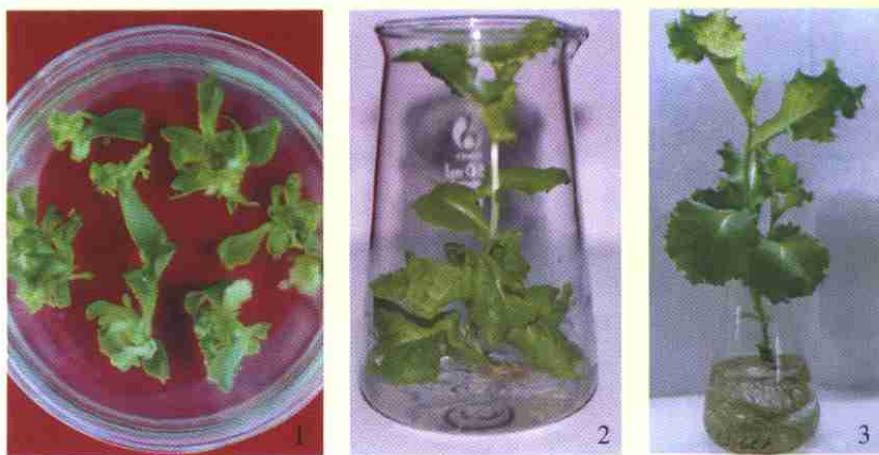


图版说明：1. 根尖愈伤组织的产生；2. 从愈伤组织上分化不定芽；3. 芽的分化和生长；4. 再生植株。

Explanation of plates: 1. Formation of callus from root tip; 2. Adventitious shoots differentiated from callus; 3. Differentiation and growth of shoots; 4. Regenerated plantlets.

朱路英等：叶用莴苣离体培养和植株再生

Zhu Luying, et al. In Vitro Shoot Differentiation from Cotyledon Explants of Lettuce



图版说明：1. 莴苣子叶在分化培养基中分化；2. 再生小苗不定根的诱导；3. 移植前在1/8MS培养液中预培养。

Explanation of plates: 1. Differentiation of lettuce cotyledon in the differentiation medium; 2. Induction of roots on differentiated shoots; 3. Preculture in 1/8MS medium before transplantation.