

大蒜体细胞胚胎发生诱导因素研究^{*}

李步勋^{1,2}, 程智慧¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 袁隆平农业高科技股份有限公司, 湖南 长沙 410125)

[摘 要] 通过研究不同质量浓度的 2, 4-D、维生素 B₁ (V_{B₁})、水解酪蛋白(CH)、腺嘌呤(ADE)和蔗糖等激素及有机物对大蒜体细胞胚胎发生的单一或组合效应, 结果表明: 0.5 mg/L 的 2, 4-D 有利于体胚的发生和发育, 梨形胚和棒状胚数目较多; V_{B₁} 质量浓度提高到 0.5~2.0 mg/L 可促进体胚高频发生, 较高质量浓度的 V_{B₁} 与 2, 4-D 有明显的互作效应; 15~30 g/kg 的蔗糖能较好地促进大蒜体胚的发生, 蔗糖含量超过 60 g/kg 则抑制体胚发生和发育。MS+2, 4-D 0.5 mg/L + CH 500 mg/L + ADE 20 mg/L 是胚性愈伤组织适宜的继代培养基。

[关键词] 大蒜; 体细胞胚胎; 诱导因素

[中图分类号] S633.403.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)05-0031-04

国内外利用组织培养技术进行大蒜 (*Allium sativum* L.) 脱毒快繁的研究和应用比较普遍, 基本上可归纳为 4 种途径: 器官发生途径、茎尖发生途径、试管鳞茎以及体细胞胚胎发生途径 (Somatic embryogenesis, 简称体胚发生途径)^[1]。通过前 3 种途径进行大蒜微繁的技术已基本成熟, 但相对体胚发生途径而言, 还存在着繁殖系数较低、染色体变异频率较高(茎尖发生途径除外)、试管苗驯化困难、成活率较低等问题。若将体胚制成丸粒化人工种子, 即可大规模进行工厂化生产, 发展前景十分广阔^[2]。

体胚发生途径已被认为是植物界的普遍现象, 但 *Allium* 属的植物较难诱导成功^[3,4]。目前, 国内外关于大蒜体胚发生的研究报道很少^[5~9], 且培养技术尚不完善。本研究拟通过改变激素和有机附加物的种类及质量浓度, 探讨大蒜胚性愈伤组织(EC)及体胚生长发育的适宜培养基, 为获取高频同步发生的大蒜体胚, 进而制作人工种子提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料的获得

供试大蒜品种为西北农林科技大学园艺学院大蒜种质资源课题组提供的襄樊二水早、彭县中熟和蔡家坡红皮蒜, 分别以 01, 02, 04 表示。

无菌操作切取 3~5 mm 高的大蒜发芽叶作为外植体, 植入 MS+2, 4-D 2.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 培养基中, 诱导得到浅黄色、结构松散的愈伤

组织, 经在 MS+2, 4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基上继代培养 3~4 代后可得到生长旺盛、质地疏松、增殖倍数约为 3~4 倍的 EC, 即供试材料。继代培养中注意剔除活力不高和褐化的愈伤组织。

1.2 方 法

1.2.1 培养条件 试验采用 MS+20~30 g/kg 蔗糖+6~7 g/kg 琼脂粉作为基本培养基。灭菌前, 培养基 pH 调至 5.8 左右, 每瓶分装约 35 mL, 灭菌压力 0.11 MPa, 持续 15~18 min。培养室温度 (25±2)℃, 日光灯作光源, 光强 1500~2500 lx, 每天光照 12~14 h。

1.2.2 2, 4-D 对大蒜体胚形成的影响 在基本培养基中添加 2, 4-D 溶液, 配制成含 2, 4-D 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 和 4.0 mg/L 5 个水平的体胚诱导培养基, 每处理接种 8 瓶, 培养 30 d 后统计体胚数目。

1.2.3 2, 4-D 与 V_{B₁} 对大蒜体胚发生的影响 采用二因子随机区组设计, 2, 4-D 质量浓度设 0.1 和 1.0 mg/L 2 个水平, V_{B₁} 质量浓度设 0.1, 0.5, 2.0, 5.0 和 10.0 mg/L 5 个水平, 每处理接种 5 瓶进行培养, 30 d 后统计体胚数目。

1.2.4 水解酪蛋白(CH)与腺嘌呤(ADE)对大蒜体胚发生的影响 采用二因子随机区组设计, CH 质量浓度为 300 和 500 mg/L, ADE 质量浓度为 20 和 40 mg/L, 每处理接种 5 瓶, 培养 30 d 后统计结果。

1.2.5 蔗糖对大蒜体胚发生的影响 试验设计了

* [收稿日期] 2001-09-03

[作者简介] 李步勋(1969-), 男, 陕西富平人, 助理研究员, 硕士, 主要从事蔬菜种子育种研究。

15, 30, 60 和 90 g/kg 4 个蔗糖水平, 每处理接种 8 瓶, 培养 30 d 后统计体胚数目。

1.2.6 体胚数目的统计 转接培养 30 d 后, 随机选取 4 瓶培养材料, 称取 0.2 g 左右, 置于 Olympus 实体显微镜下, 用解剖针将体胚剥离出来, 血球计数器记数。体胚包括观察到的球形胚、梨形胚和棒状胚等。然后计算每克鲜重培养材料的体胚产量^[10]。

采用 Duncan's 新复极差法对各处理间的体胚产量进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 2, 4-D 对大蒜体胚形成的影响

2, 4-D 对多数植物体胚的诱导具有决定性作用, 但其质量浓度过高(大于 20 mg/L)或存在时间过长, 又明显地抑制体胚的进一步发育^[3]。本试验主要研究了不同质量浓度水平的 2, 4-D 对大蒜体胚形成和发育的影响, 以期得到大蒜体胚诱导的适宜 2, 4-D 质量浓度, 结果见表 1。

表 1 2, 4-D 对大蒜体胚发生的效应

2, 4-D 质量 浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration of 2, 4-D	体胚产量/ (个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性水平 Significance level		胚的发育 Development stages of embryos
		0.05	0.01	
0.1	386.0 ± 87.93	a	A	梨形胚、棒状胚、连体胚多 More pear-shaped and rod-shaped embryos, some deformed embryos
0.5	385.0 ± 67.55	a	A	梨形胚多, 有棒状胚 More pear-shaped embryos, a few rod-shaped embryos
1.0	226.3 ± 34.33	b	B	球形胚多, 梨形胚中等 More global-shaped embryos and moderate pear-shaped embryos
2.0	181.7 ± 16.74	bc	BC	球形胚多, 少量梨形胚 More global-shaped and a few pear-shaped embryos
4.0	112.7 ± 8.62	c	C	球形胚较少, 褐化较严重 Only a few global-shaped embryos, and calli browned seriously

注: 供试品种为 01 号。Note: Tested variety is No. 01.

从表 1 可以看出, 不同质量浓度水平的 2, 4-D 对大蒜体胚的发生和发育有显著影响。随着 2, 4-D 质量浓度的升高, 单位鲜重的体胚产量和体胚发育均有不同程度的变化。0.1 和 0.5 mg/L 的 2, 4-D 处理不仅产生了大量的球形胚, 而且也出现大量的梨形胚和少量棒状胚; 1.0 mg/L 的 2, 4-D 处理体胚仅发育到梨形胚期; 而当 2, 4-D 质量浓度达 4.0 mg/L 时, EC 仅产生少量球形胚且褐化较为严重。方差分析结果表明, 0.1 和 0.5 mg/L 的 2, 4-D 处理对体胚的数量无显著性差异, 但 0.1 mg/L 2, 4-

D 处理的连体胚等畸形胚较多, EC 和体胚比较松软, 不利于体胚的进一步发育。1.0 和 2.0 mg/L 2, 4-D 处理的体胚数量也无显著差异, 但 2.0 mg/L 2, 4-D 处理的梨形胚出现较少, 主要为球形胚。所以 0.5 mg/L 2, 4-D 处理对体胚发生的效果较好, 既可以产生大量的体胚, 也可适当促进其发育, 且无畸形胚。

2.2 2, 4-D 与 V_{B1} 对体胚发生的互作效应

本试验表明, 2, 4-D 与 V_{B1} 的不同组合对大蒜体胚形成的影响具有显著差异(表 2)。

表 2 2, 4-D 与 V_{B1} 对体胚发生的互作效应

处理号 Treatment No.	2, 4-D 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of 2, 4-D	V _{B1} 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of V _{B1}	体胚产量/(个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性测验 Significance test	
				0.05	0.01
1	0.1	0.1	324.67 ± 17.01	bc	BC
2	0.1	0.5	360.67 ± 20.55	b	AB
3	0.1	2.0	348.33 ± 17.01	b	AB
4	0.1	5.0	272.00 ± 19.31	d	C
5	0.1	10.0	120.33 ± 13.43	e	D
6	1.0	0.1	316.33 ± 36.42	bcd	BC
7	1.0	0.5	466.67 ± 24.91	a	A
8	1.0	2.0	439.00 ± 20.07	a	A
9	1.0	5.0	398.00 ± 21.67	ab	A
10	1.0	10.0	350.67 ± 15.53	b	AB

注: 供试品种为 01 号。Note: Tested variety is No. 01.

由表 2 可见, 处理 7 和 8 的体胚产量显著优于其他组合, 处理 2, 3, 9, 10 的体胚产量居中, 处理 5 的体胚产量最低。同时, 方差分析结果表明, 2, 4-D 处理水平间对体胚产量的影响存在极显著差异, 1.0 mg/L 2, 4-D 处理的平均体胚数较 0.1 mg/L 2, 4-D 处理的多 110 个/g。结合单因子 2, 4-D 对大蒜体胚形成和发育的影响(表 1)可以看出, 较高质量浓度的 V_{B_1} 与 1.0 mg/L 2, 4-D 的互作效应明显。

不同质量浓度 V_{B_1} 处理间的体胚产量亦存在极

显著差异(表 3)。0.5 与 2.0 mg/L V_{B_1} 处理的体胚产量极显著地高于 5.0 和 0.1 mg/L 的 V_{B_1} 处理, 10.0 mg/L V_{B_1} 处理的体胚产量又极显著地低于其他各处理。但在 1.0 mg/L 2, 4-D 存在时, 10.0 mg/L V_{B_1} 较 0.1 mg/L V_{B_1} 对体胚发生的作用稍强一些。因此, 0.5~2.0 mg/L V_{B_1} 可显著地提高大蒜体胚的产量与体胚发生频率, 这与周思君等^[11]在大豆上的报道一致。

表 3 不同 V_{B_1} 水平对大蒜体胚发生的多重比较

Table 3 Multiple comparison of different concentrations of V_{B_1} on somatic embryogenesis in garlic			
V_{B_1} 质量浓度/(mg · L ⁻¹) Concentrations of V_{B_1}	体胚产量/(个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性测验 Significance test	
		0.05	0.01
0.5	413.67 ± 69.41	a	A
2.0	393.67 ± 64.11	a	A
5.0	335.00 ± 89.10	b	B
0.1	310.50 ± 144.49	b	B
10.0	223.83 ± 15.18	c	C

注: 供试品种为 01 号, 体胚产量为同一 V_{B_1} 质量浓度下 2 种水平 2, 4-D 处理的体胚产量的平均值。
Note: Tested variety is No. 01. The average yield of embryos comes from those treated with 2 levels of 2, 4-D at the same concentration of V_{B_1} .

2.3 CH, ADE 对大蒜 EC 生长及体胚发生的影响
很多报道^[6, 9, 11, 12]指出, CH 和 ADE 能有效地诱导体胚发生和正常发育, 但对使用的质量浓度却报道不一。本试验结果(表 4)表明, 不同质量浓度的

CH 和 ADE 对两个供试大蒜品种体胚发生的影响趋势一致, 均以 CH 500 mg/L + ADE 20 mg/L 产生的体胚数目最多, 且极显著地优于低质量浓度的 2 个组合。

表 4 CH, ADE 对大蒜体胚产量的影响

Table 4 Effect of different combinations of CH and ADE on the yield of somatic embryos in garlic							
CH 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of CH	ADE 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration of ADE	品种 02 Variety 02			品种 04 Variety 04		
		体胚产量/ (个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性水平 Significance level		体胚产量/ (个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性水平 Significance level	
			0.05	0.01		0.05	0.01
300	20	60.3 ± 8.5	c	C	141.7 ± 16.5	c	C
300	40	99.3 ± 12.9	b	BC	208.7 ± 14.9	b	B
500	20	166.3 ± 27.7	a	A	253.6 ± 15.1	a	A
500	40	149.0 ± 16.2	ab	AB	214.7 ± 16.1	b	AB

试验同时表明, ADE 有利于体胚的进一步发育, 当未添加 ADE 时, 易形成畸形胚。这与王洪隆等^[9]在大蒜发芽叶体胚诱导中的结论一致。笔者等在多次继代培养中发现, CH 500 mg/L + ADE 20 mg/L 组合既能较好地保持组织胚性, 又具有较高的增殖倍数, 是 EC 适宜的继代培养基。

2.4 蔗糖对大蒜 EC 和体胚发生的影响
蔗糖作为能源和渗透调节剂, 影响着植物体胚的发生和发育, 目前有关蔗糖影响体胚发生的最适含量存在一定的争议^[4, 11]。

本试验结果(表 5)表明, 蔗糖含量为 15 和 30 g/kg 时, EC 生长良好, 体胚数目多, 15 与 30 g/kg 的蔗糖处理对体胚产量的形成无显著影响, 但与 60 和 90 g/kg 蔗糖处理存在极显著性差异; 30, 60 和 90 g/kg 的蔗糖含量对体胚产量形成差异不显著, 但 30 g/kg 蔗糖处理较后两者的平均体胚数目稍多。因此, 蔗糖含量在 15~30 g/kg 时能较好地促进大蒜体胚的发生, 这与周思君等^[11]在大豆上的研究结果一致。

表 5 蔗糖对大蒜胚性愈伤组织及体胚发生的作用

Table 5 Effect of different sucrose concentrations on EC and somatic embryogenesis in garlic

蔗糖含量/ (g · kg ⁻¹) Concentration of sucrose	EC 色泽 Color of EC	形态特征 Morphology and character	增殖倍数 Regeneration ratio	体胚产量/ (个 · g ⁻¹) Yield of embryos	显著性测验 Significance test	
					0.05	0.01
15	淡黄 Slight yellow	疏松, 单粒性好 Loosen, well separated	4.5	398.7 ± 33.1	a	A
30	浅黄 Light yellow	疏松, 单粒性好 Loosen, well separated	4.4	315.7 ± 40.0	ab	AB
60	黄 Yellow	较软, 单粒性一般 Loosen, average separated	3.5	249.7 ± 33.3	b	B
90	暗黄 Dark yellow	软, 体胚间有粘液 Soft, there is mucilage among embryos	3.2	226.3 ± 36.7	b	B

注: 供试品种为 01 号。Note: Tested variety is No. 01.

3 讨论与结论

3.1 2, 4-D 在大蒜 EC 诱导和体胚发育中的作用

几乎所有的单子叶植物在诱导体胚发生阶段都使用 2, 4-D^[3]。笔者等检索到的国内外 5 篇大蒜体胚发生方面的报道^[5-9], 基本都是在高质量浓度 2, 4-D (2.0 mg/L 或 4.0 mg/L) 存在时诱导产生 EC, 进而使用 0.5 mg/L 左右的 2, 4-D 配合细胞分裂素诱导体胚发生。本研究中非胚性愈伤组织在 MS + 2, 4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基上连续继代 3~4 代后, 几乎同时变为 EC。2, 4-D 对大蒜体胚发生的单因子试验证明, 0.5 mg/L 的 2, 4-D 有利于体胚的发生和发育, 梨形胚和棒状胚数目较多。低质量浓度的 2, 4-D (小于 0.5 mg/L) 处理容易形成连体胚、次生胚等畸形胚, 并且连续在低质量浓度 2, 4-D 下培养将使愈伤组织由胚性转化成非胚性。高质量浓度 2, 4-D 培养下的体胚大多处于球形期, 体胚进一步发育和分化受到明显抑制, 这可能是

2, 4-D 抑制体胚贮藏物质的形成, 对体胚的发育成熟不利^[12]所致。试验亦证明, 在 2, 4-D 存在下, 添加细胞分裂素对大蒜 EC 的增殖有利, 而对体胚发生的促进作用不明显。

3.2 V_{B1} 对大蒜体胚发生的作用

用 B₅ 培养基的有机成分代替 MS 培养基中的有机成分, 有利于植物愈伤组织和体胚的生长和发育^[8], 这种替换主要是将 V_{B1} 质量浓度由 0.1 增至 10.0 mg/L, 提高了 100 倍。如此大幅度的变化是否有利于体胚发生, 试验证据尚不充足。本试验结果表明, 适当提高 V_{B1} 的质量浓度, 确能提高体胚的产量与体胚发生的频率, 但当质量浓度提高到 10.0 mg/L 时, 极显著地降低了体胚的产量和发生频率。B₅ 培养基是为大豆根细胞的生长而设计的, 高质量浓度的 V_{B1} 对根的生长有利, 所以对诱导大蒜体胚发生而言, 以采用 0.5~2.0 mg/L V_{B1} 最有效、最经济。

[参考文献]

[1] 刘高琼, 索长江. 大蒜微繁殖技术研究现状与展望[J]. 中国蔬菜, 1997, (1): 50- 53
[2] 陈德富, 陈喜文, 黄爱媛. 人工种子研究进展及其应用展望[J]. 种子, 1993, 2: 43- 45
[3] Ammirato P V. Handbook of plant cell culture I. Techniques for propagation and Breeding[A]. In: Evans D A, et al(ed). Embryogenesis [C]. New York: Macmillan Publishing Company, 1983. 82- 123
[4] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 II 影响植物胚状体发生和发育的因素[J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 91- 95
[5] Abo E L, Nil M M. Organogenesis and embryogenesis in callus culture of garlic[J]. Plant Science Letter, 1977, (9): 259- 264
[6] 薛惠民, 荒木肇, 石 岭, 等. ニンニクの底盘と花床部由来カルクにおける不定胚の形成と植物体再生[J]. 园艺学雑誌, 1991, 60(3): 627- 634
[7] 张忠新, 李仁敬. 大蒜组织培养中胚状体的发生[J]. 实验生物学报, 1983, 16(3): 241- 247
[8] 余建明, 丁犁平, 陆维忠, 等. 大蒜体细胞诱导再生植株和小鳞茎及其移栽试验[J]. 江苏农业学报, 1992, 8(4): 46- 47
[9] 王洪隆, 康玉庆, 张存金. 大蒜发芽叶培养体细胞胚胎发生[J]. 华北农学报, 1994, 9(1): 92- 94
[10] 孟玉铃, 谷祝平. 正交设计在诱导植物体胚发生中的应用[J]. 西北植物学报, 1995, 15(1): 10- 15
[11] 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 38- 43
[12] John C. Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1990, 26: 746- 753

(下转第 39 页)

Effect of TDZ on callus inducement and shoot growth in tissue culture of *Toona sinensis*

ZHANG Xiao-hong¹, ZHANG Hong-yan², WU Jun³,
MIN Dong-hong³, KANG Bing¹, LI Jun-chao¹

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Agricultural College of Shangluo, Shangzhou, Shaanxi 726000, China; 3 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The experiment was carried out upon the shoots of *Toona sinensis* which had degenerated on qualities of growth and proliferation after being subcultured 35- 38 generations. The effects of Thidiazuron (TDZ) on callus inducement, proliferation and rooting have been studied. The results show that the quality of callus inducement would be increased obviously when supplemented with TDZ and 0.2 mg/L NAA in the MS medium, and stem explants would induce callus more easily than leaves and leaf-stalks. The results revealed that TDZ improved proliferation and growth of shoots when its concentration was lower than 0.02 mg/L, proliferation and growth of the shoots have been recovered from the degeneration. But when its concentration was above 0.02 mg/L, they were restrained completely, at same time, there were more abnormal shoots with increasing concentration in medium. The rooting rate of plantlets has not been decreased by subcultured in the medium which supplemented with TDZ.

Key words: Thidiazuron; *Toona sinensis*; callus; growth and proliferation

(上接第 34 页)

Studies on the induction factors of somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum* L.)

LI Bu-xun^{1,2}, CHENG Zhi-hui¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Yuanlongping High-Tech Agriculture Co., Ltd. Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract The results obtained from the single or combination effects of different concentration levels of 2, 4-Dichlorophenoxy (2, 4-D), vitamin B₁ (V_{B₁}), casein hydrolysate (CH), adenosine (ADE) and sucrose on somatic embryogenesis (SE) in garlic indicated that 0.5 mg/L 2, 4-D was favorable for SE, and with more pear-shaped and rod-shaped embryos. Increasing the concentration of V_{B₁} to 0.5- 2.0 mg/L, the yield of embryos was promoted, and there was obvious interactive effects between higher concentration of V_{B₁} and 2, 4-D. The concentration of sucrose 15- 30 g/kg was promoted the occurrence of embryos, whereas more than 60 g/kg sucrose was inhibited the occurrence of embryos. MS + 2, 4-D 0.5 mg/L + CH 500 mg/L + ADE 20 mg/L was the suitable medium for the subculture of embryogenic callus.

Key words: garlic; somatic embryo; induction factors