维普资讯 http://www.cqvip.com

第23卷 第4期
2008年 7月
云南农业大学学报
Journal of Yunnan Agricultural University
Vol. 23 No. 4
Jul. 2008

章丘大葱再生体系的建立及组培外植体的选择

杨俊杰，谭 伟，彭金环，于元杰*
（山东农业大学农学院，作物生物学国家重点实验室，山东 泰安 271018）

摘要：为了建立适合章丘大葱遗传转化的再生体系，对其叶片、根和种子进行离体培养。结果表明：最佳外植体为切口处理的种子，愈伤诱导率最高为90.28%；最佳继代培养基为MS+1.0 mg/L 2，4-D+2.0 mg/L BA，继代培养的间隔时间以15 d为好；最佳分化培养基为MS+2.0 mg/L BA，最佳生根培养基为不添加任何激素的MS培养基。

关键词：章丘大葱；外植体；切口处理；分化
中图分类号：S 633.1.035.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1004-390X（2008）04-0571-05

Establishment of the Regeneration System of Zhangqiu Welsh Onion and Tissue Culture with Different Organs

YANG Jun-jie, TAN Wei, PENG Jin-huan, YU Yuan-jie
(State Key Laboratory of Crop Biology, College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The seeds, immature leaves and roots of Zhangqiu welsh onion, *Allium fistulosum* L. var. *gigantum*, were used as explants to induce callus and regeneration. It was indicated that the seeds with the treatment of kerf were the best, callus reduction rate could reach up to 90.28%; MS+1.0 mg/L 2, 4-D+2.0 mg/L BA was the optimal subculture medium, the best interval of subculture time was 15 days; MS+2.0 mg/L BA was the optimal shoot regeneration medium, and MS medium without supplement of any hormone was the best for shoot-extension induction.

Key words: Zhangqiu welsh onion; plantlets; treatment of kerf; differentiation

章丘大葱（*Allium fistulosum* L. var. *gigantum* cv. Zhangqiu Welsh Onion）属百合科葱属（*Allium*）植物，是深受人们喜爱的香辛类蔬菜，也是山东地方特产之一，其特点是棵大白长，细腻脆嫩，汁多味甘，营养丰富而驰名中外[1]。近年来，大葱病害频发，严重影响其品质[2,3]。目前章丘大葱的育种工作还仅局限于常规的提纯复壮方式[4]，新兴的转基因技术以及体细胞无性系变异与突变体筛选等育种方式仍然没有在该作物上得到开发和利用，其中一个关键限制因素就是章丘大葱的离体再生技术还不成熟，相对难度比较大。因此，建立一套高效的大葱离体再生体系成为目前大葱组织培养工作中重点解决的关键问题之一。国内外已有利用大葱的种子，叶片、花蕾、鳞茎，根等作为外植体诱导愈伤组织的成功报道[1,5,6]，但愈伤率相对较低，影响该技术的广泛应用。本研究旨在建立高愈伤率的组培体系，建立适合章丘大葱遗传转化的受体体系。

1 材料与方法

1.1 材料

章丘大葱种子由山东省章丘市古城大葱研究所提供，氯化汞以及其他配制培养基所需的常用化学试剂均为分析纯。

收稿日期：2007-04-20 修回日期：2007-06-22
作者简介：杨俊杰（1983-），女，在读硕士研究生，主要从事植物遗传与生物技术的研究工作。
E-mail：hy927@sdau.edu.cn *通讯作者 E-mail：yuanjy@sdau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 灭菌方法

将大葱种子用70%的酒精漂洗30 s，再用0.1%的$HgCl_2$消毒12 min，然后用无菌水冲洗3次，接种到MS固体培养基上。培养温度为25 ℃，光照约为3 000 lx，每天照光12 h。

1.2.1 不同外植体的获得

（1）幼叶和根

将灭菌的大葱种子接种到不添加任何激素的MS_0固体培养基的三角瓶中培养无菌苗，待苗子长到10 cm左右时，分别切取其叶片和根进行离体培养。其中每一部分长为1 cm左右，分别接种到愈伤组织诱导培养基上。统计出愈伤率，重复3次，并纪录出愈伤数和接种的叶片（根）数。

（2）未经过处理的种子

直接将灭菌的大葱种子接种到愈伤组织诱导培养基上，30 d继代1次。统计出愈伤率，重复3次，并纪录出愈伤数和接种的种子数。

（3）经过切口处理的种子

将灭菌的大葱种子转移到无菌滤纸上，吸干种子上面的水分，然后用组培刀将大葱种子切开一个小口（注意不要切到胚），最后接种到愈伤组织诱导培养基上。统计出愈伤率，重复3次，并纪录出愈伤数和接种的切口种子数。

1.2.2 愈伤组织的分化

将继代3次的愈伤组织转移到不同的分化培养基上，15 d以后统计分化率。

1.2.3 再生苗的生根

将分化出绿芽的愈伤组织转移到生根培养基上，15 d后统计生根率。

1.3 培养条件

MS+2.5 mg/L 2，4-D+0.5 mg/L BA[6]，pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂8 g/L为愈伤组织诱导培养基。

MS+2.5 mg/L 2，4-D+0.5 mg/L KT（或者BA）[1]，pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂9 g/L；MS+1.0 mg/L 2，4-D+2.0 mg/L BA[5]，pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂8 g/L和9 g/L[6]为继代培养基。

MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA[5]，pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂9 g/L和MS+2.0 mg/L BA[6]，pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂9 g/L为分化培养基。

MS培养基不添加激素（记为MS_0），pH值为5.8，蔗糖30 g/L，琼脂9 g/L为生根培养基[6]。

2 结果与分析

2.1 不同外植体在愈伤组织诱导培养基上的愈伤诱导情况

以MS+2.5 mg/L 2，4-D+0.5 mg/L BA为愈伤组织诱导培养基，用幼叶、根、种子和切口处理的种子为外植体，愈伤诱导结果见表1。

表1 不同外植体在愈伤组织诱导培养基上的愈伤诱导情况

Tab. 1 Callus inducted from different explants under callus induction medium

外植体 explant	接种数 mumber of inoculated explants	生成愈伤数 number of induced callus	出愈率/% callus induction rate	愈伤长势 growth state of callus
幼叶 immature leaves	60	4	6.67	长势弱 weak
根 roots	50	0	0.00	—
种子 seeds	90	25	27.78	长势好 good
切口种子 seeds with kerf	360	325	90.28	长势好 good

由表1看出，经过15 d，在添加2.5 mg/L 2，4-D+0.5 mg/L BA的MS固体培养基上，愈伤诱导率最高的是切口处理的种子，高达90.28%（图1）。由图1看出，切口种子不但出愈率高，且出愈时间较一致；其次是种子，愈伤诱导率是27.78%（图2）。由图2看出，种子出愈时间不一，愈伤的大小差异很大；幼叶的愈伤率只有6.67%（图3），由图3看出，愈伤组织长势弱，有玻璃化的趋势；根的愈伤率是0。以上结果表明，在该试验条件下，切口种子是最佳的外植体。

2.2 琼脂浓度对愈伤组织玻璃化的影响

将种子刚刚诱导产生的愈伤组织接种到继代

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养基 MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA[5] 上，观察在不同的琼脂浓度下，愈伤组织的玻璃化状况，结果见表2。

由表2看出，培养基中的琼脂浓度影响培养基中可利用水分及容器内的相对湿度，对其玻璃化有明显的影响。当用 MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA 琼脂浓度 8 g/L 为继代培养基时，玻璃化率为 28.75% 较严重，增加琼脂浓度到 9 g/L 时，愈伤组织玻璃化率为 9%，玻璃化现象明显下降。其原因可能是培养基中琼脂浓度含量不同影响到可利用水分的多少，进而影响到玻璃化率。

表2　琼脂浓度对愈伤组织的玻璃化影响

Tab. 2　Effect of agar concentration on callus vitrification

琼脂浓度/(g·L⁻¹) agar concentration	接种愈伤数 number of inoculated callus	玻璃化愈伤数 number of callus virtrification	愈伤玻璃化率 virtrification rate/%
8	160	46	28.75
9	100	9	9.00

图1　切口处理的种子生成的愈伤组织
Fig. 1　Callus inducted from the seeds with kerf treatment

图2　种子形成的愈伤组织
Fig. 2　Callus inducted from seeds without any treatment

图3　幼叶形成的愈伤组织
Fig. 3　Callus inducted from immature leaves

2.3　培养条件对愈伤组织褐化的影响

2.3.1　激素配比对愈伤褐化的影响

为确定最佳的继代培养基，参照前人的研究结果，分别以 MS + 2.5 mg/L 2，4 - D + 0.5 mg/L KT（或者 BA）[1]，MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA[5] 为继代培养基，其结果见表3。

表3　不同激素配比对愈伤褐化的影响

Tab. 3　Effect of hormones combination on callus browning

激素配比 hormones combination	接种愈伤数 number of inoculated callus	愈伤褐化数 number of callus browning	愈伤褐化率 browning rate/%
MS + 2.5 mg/L 2，4 -D + 0.5 mg/L KT	140	53	37.86
MS + 2.5 mg/L 2，4 -D + 0.5 mg/L BA	139	45	32.37
MS + 1.0 mg/L 2，4 -D + 2.0 mg/L BA	108	11	10.19

注：供试愈伤为种子诱导产生的未经过继代的愈伤组织。

Note: the callus used were induced from kerf seeds without subculture

由表3看出，以 MS + 2.5 mg/L 2，4 - D + 0.5 mg/L KT 为继代培养基，愈伤褐化率很高，达到 37.86%，以 MS + 2.5 mg/L 2，4 - D + 0.5 mg/L BA 为继代培养基，愈伤褐化率也很高，达到 32.37%，但是用 BA 代替 KT 后，愈伤褐化率有所降低，用 MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA 为继代培养基时，愈伤褐化明显降低，愈伤褐化率为 10.19%，因此认为较高浓度的 2，4 - D 对于愈伤组织的褐化有一定的作用，BA 在大葱组织培养上的作用优于 KT，MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA 为最佳继代培养基。

2.3.2　继代时间周期对愈伤褐化的影响

以 MS + 1.0 mg/L 2，4 - D + 2.0 mg/L BA，琼脂 9 g/L 为继代培养基，观察不同的继代时间周期对愈伤组织的褐化情况，结果见表4。

表4　继代间隔时间愈伤组织的褐化情况

Tab. 4　Effects of propagation interval on callus browning

继代时间 subculture times/d	接种愈伤数 number of inoculated callus	愈伤褐化数 number of callus browning	愈伤褐化率 browning rate/%
7	160	11	6.88
15	108	11	10.19
20	160	30	18.75

注：供试愈伤为种子诱导产生的未经过继代的愈伤组织。

Note: the callus were induced from the seeds with kerf treatment, but without subculture.

维普资讯 http://www.cqvip.com

由表4看出，继代间隔为7 d时，愈伤褐化率为6.88%，间隔15 d时愈伤褐化率为10.19%，间隔20 d时愈伤褐化率为18.75%，随着继代培养时间的延长，愈伤组织的褐化率具有明显增加的趋势，其中在7～15 d的范围内，愈伤褐化率增加较缓慢，超过15 d后则急速增长。故大葱继代培养间隔时间不要超过15 d为宜。继代培养3次后的愈伤组织生长健壮（图4），为下一步的分化做好准备。

2.4 分化培养基对愈伤组织分化的影响

分别以MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA[5]和MS+2.0 mg/L BA[6]为分化培养基，愈伤分化率见表5。

由表5看出，以MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA和MS+2.0 mg/L BA为分化培养基，愈伤组织的分化率都比较高，但相对而言，MS+2.0 mg/L BA为分化培养基时，分化率较高，为70.00%，而以MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA为分化培养基时为63.33%，分化率略有降低。以MS+2.0mg/L BA为分化培养基，分化出芽较多且整齐（图5），只需要添加一种激素，可以简化试验操作，因此认为MS+2.0 mg/L BA为最佳分化培养基。

表5 激素配比对愈伤组织分化率的影响

Tab. 5 Effect of hormone combination on the differentiation rate

激素配比 hormone combination	接种愈伤数 number of inoculated callus	愈伤分化数 number of callus differentiation	愈伤分化率 Callus differentiation rate/%
MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA	30	19	63.33
MS+2.0 mg/L BA	30	21	70.00

2.5 愈伤组织在生根培养基上的生根情况

参考前人的研究[6]，以不添加任何激素的MS培养基为生根培养基，设10次重复，观察愈伤组织的生根情况，1周左右愈伤组织周围有根产生，之后与培养基接触的愈伤组织下端根逐渐增多，且迅速伸长，愈伤组织的生根率为100%（图6）。

图4 继代培养的愈伤组织
Fig. 4 Subculture of callus

图5 愈伤组织的分化
Fig. 5 Differentiation of callus

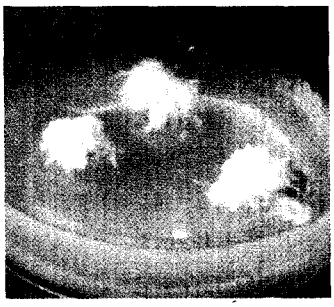

图6 愈伤组织的生根
Fig. 6 Radication of callus

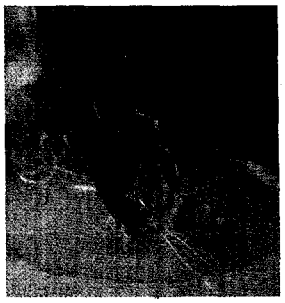

图7 大葱苗
Fig. 7 Seedling of welsh onion

3 讨论

3.1 外植体与愈伤率

组培过程中用到的外植体有芽[7]、茎段[8]、幼小花蕾[9]、叶柄[10]、嫩叶[11]、茎尖[12]、下胚轴[13]和成熟种子胚[14]等，不同材料、不同外植体对其愈伤率影响很大。本试验在同样条件下分别用幼叶、根、正常种子和切口处理的种子为外植体诱导生成愈伤组织，结果发现不同外植体间的愈伤率差异很大，其中切口的种子愈伤率高达90.28%，愈伤生成快且较整齐；用种子诱导愈伤率为27.78%，且不整齐；幼叶和根的愈伤诱导率更低。造成这种差异的原因：一是外植体的分生能力可能与愈伤形成有关系。即分生力强的外植体愈伤率高，反之则低。因种胚组织的分生能力远高于其他组织的分生能力所致；二是不同外植体愈伤化过程可能对其环境条件要求不同，本试验条件可能较适合种胚的愈伤化而不适合幼叶和根，结果导致了愈伤率的差异；三是切口种子与种子愈伤率反映其愈伤化进程。切口后的种子愈伤率高的可能原因一是破坏了种皮的完整性，便于其对水分和激素的吸收，促进其细胞代谢和组织分化；二是切口过程可能对种胚造成损伤，有利于愈伤的形成和分化。成熟的种子作为外植体，有其完整的种皮，影响到其对水分和激素的吸收，而这种影响因其饱满度和成熟度不同存在

维普资讯 http://www.cqvip.com

较大差异，这可能是其出愈慢且不整齐的根本原因。种子作为外植体诱导愈伤组织的传统作法是经过催芽[5]，与切口种子为外植体相比增加了操作环节，延长了组培周期。因此，切口种子作为外植体具有取材方便、操作简便、缩短时间、提高效率的特点，值得一试。

3.2 培养条件与褐化

组培过程中的褐化是一种常见现象。一般认为，褐化是由于多酚氧化酶（PPO）被氧化成醌类物质，并抑制多种酶的活性从而影响培养材料的正常生长，甚至导致培养物死亡[15]。在继代培养基的试验中，用BA替代KT或改变2，4－D与BA的比例，均可降低其褐化率。虽BA和KT均属于细胞分裂素，但其对细胞代谢过程中的基因表达作用可能存在明显不同。即BA可能有利于促进细胞增殖相关基因的表达，KT可能有利于促进细胞相关衰老基因的表达（褐化），导致其褐化率的差异。2，4－D在细胞生长和分裂过程中可能具有双重作用。即在适当的浓度条件下促进细胞生长，过高浓度则抑制细胞生长促进其衰老（褐化）。说明植物生长调节物质对大葱愈伤组织的影响是很大的，尤其是生长素和细胞分裂素的比值对愈伤组织的生长和细胞次生代谢物质的合成有重大影响。适当缩短继代间隔时间，有利于防止酚类物质和其他有害代谢物质积累，可以有效的降低愈伤褐化率。笔者认为MS＋1.0 mg/L 2，4－D＋2.0 mg/L BA是本试验条件下最适合章丘大葱的继代培养基。

[参考文献]

[1] 穆春华. 大葱组织培养与种质亲缘关系分析［D］. 山东泰安：山东农业大学，2002.

[2] AKINORI SHINMURA. Studies on the Ecology and Control of Welsh Onion Root Rot Caused by *Fusarium redolens*［J］. J. Gen. Plant Pathol.，2002，68：265.

[3] IKUO KADOTA，KATSUE UEHARA，Hirosuke SHINOHARA et al.. Bacterial Blight of Welsh Onion：A New Disease Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. Nov［J］. J. Gen. Plant Pathol.，2000，66：310－315.

[4] 盖树鹏，孟祥栋，徐丽娟. 大葱雄性不育分子标记辅助选择的研究［J］. 分子植物育种，2004，2（2）：223－228.

[5] 盛艳萍，杨建平，齐宪磊，等. 大葱成熟胚离体培养植株再生［J］. 生物技术，2004，14（3）：54－55.

[6] 谢芝馨，张玉喜，于元杰. 大葱组织培养中玻璃苗特性研究［J］. 西北植物学报，2004，24（11）：2146－2149.

[7] 徐忠传，何俊蓉，周静亚，等. 6－BA浓度对离体多花黄精不定芽增殖的影响［J］. 安徽农业大学学报，2006，33（1）：105－107.

[8] 董倩，李凤玉. 驱蚊草组织培养及其再生体系的建立与优化［J］. 福建师范大学学报（自然科学版），2006，22（1）：72－76.

[9] 向太和. 菊花组织培养植株再生及其后代的变异［J］. 杭州师范学院学报（自然科学版），2006，5（1）：42－45.

[10] 耿明. 丽格海棠组织培养的影响因素研究［J］. 安徽农学通报，2006，12（1）：65，35.

[11] 杨雪芹，曾庆平. 马兜铃的组织培养与植株再生［J］. 广州中医药大学学报，2006，23（1）：65－68.

[12] 郭海滨，代汉萍，雷家军. 叶子花组织培养技术研究［J］. 安徽农业科学，2006，34（1）：13－14.

[13] 耿新丽，赵一鹏，秦勇. 植物激素对观赏南瓜下胚轴愈伤组织形成的影响［J］. 安徽农业科学，2006，34（3）：448，576.

[14] 李根英，黄承彦，隋新霞，等. 小麦不同外植体的组织培养效果研究［J］. 麦类作物学报，2006，26（1）：21－25.

[15] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施［J］. 安徽农业科学，2004，32（5）：1034－1036.