

分蘖洋葱离体培养过程中超度含水态苗的控制

徐启江^{1,*}, 吴妹菊², 陈典³

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ²哈尔滨师范大学阿城学院生命科学系, 黑龙江阿城 150301; ³东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030

摘要: 探讨培养基成分和容器通气性影响脱毒苗超度含水态苗率的结果表明: MS培养基组成减半(1/2MS培养基)可改善芽体超度含水态分蘖洋葱苗的形成, MS基本培养基中添加 0.4 mg·L⁻¹ BA 后, 培养 30 d 的每个外植体可获得 3.2 个芽体, 超度含水态苗率仅为 9.7%, 优于加激动素(Kin)的。培养基中琼脂(8 g·L⁻¹)或蔗糖浓度(40 g·L⁻¹)的提高和容器通透性的改善均可减少超度含水态苗的发生。

关键词: 分蘖洋葱; 离体培养; 超度含水态试管苗

Control of Hyperhydric Seeding in *in vitro* Culture of Potato Onion (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* G. Don)

XU Qi-Jiang^{1,*}, WU Shu-Ju², CHEN Dian³

¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Department of Life Sciences, Acheng College, Harbin Normal University, Acheng, Heilongjiang 150301, China; ³College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: This study was made to clarify the effects of component and vessel aeration on hyperhydric seeding in *in vitro* potato onion virus-free shoots. A medium with half-strength MS basal salts was beneficial to overcome the hyperhydric disorder in shoots cultures. For shoot multiplication and control hyperhydric seeding, the best concentrations of BA (0.1, 0.4, 1.0 mg·L⁻¹) and kinetin (0.1, 0.4, 1.0 mg·L⁻¹) was tested and the highest shoot multiplication (3.2 shoots per explant) was achieved in the medium containing 0.4 mg·L⁻¹ BA after 30 days of culture along with a 9.7% hyperhydric seeding. Use of more agar (8 g·L⁻¹) and sugar (40 g·L⁻¹) in the medium or improving vessel aeration individually helped in reducing hyperhydric seeding to some extent.

Key words: potato onion (*Allium cepa* L. var. *aggregatum* G. Don); *in vitro* culture; hyperhydric tube seeding

分蘖洋葱俗称毛葱, 是洋葱种的一个变种, 一般用蘖生小鳞茎进行无性繁殖(Hanelt 1990)。由于它具有改善食物风味以及抗菌、抗肿瘤、降血压、抗血栓及动脉硬化等生理功能, 而与普通洋葱(*Allium cepa* L.)一样成为重要的蔬菜作物之一。由于长期采用无性繁殖, 以致病毒病发生严重(徐启江等 2003)。虽然有人已建立了分蘖洋葱脱毒苗的离体微繁殖体系(陈典和徐启江 2001; 徐启江等 2002), 但在茎尖脱毒苗培养过程中, 超度含水态苗的发生频率高也是分蘖洋葱脱毒种苗产业化生产和种质离体保存的制约因素之一, 引发分蘖洋葱超度含水态苗现象的因素包括大量元素浓度、6-苄基腺嘌呤(BA)或激动素(Kin)的水平、蔗糖质量分数、琼脂用量及培养容器的通气性。所谓超

度含水态苗(hyperhydric shoot)即玻璃化苗(vitrified shoot), 是指植物组织培养过程中常见的一种在形态学、解剖学、生理学方面均发生畸变并呈半透明水浸状或似玻璃状的畸形植株(Pâques 和 Boxus 1987), 叶绿素缺乏、细胞壁发育不全、木质化程度低、含水量高、脆弱易破碎、难以诱导生根和驯化移栽成活。超度含水态苗的产生与水分利用率、培养基的微量元素和(或)激素平衡、较高离子强度、富含氮素养分以及培养器中的微环境等因素有关(Kataeva 等 1991; Kevers 等

收稿 2008-01-14 修定 2008-02-02

资助 黑龙江省教育厅课题(10511004)。

* E-mail: qijiangxu@126.com; Tel: 0451-82191783

2004)。有关分蘖洋葱超度含水态试管苗成因和控制措施还未见报告, 本文在前期分蘖洋葱脱毒离体再生研究的基础上, 探讨不同浓度6-BA和激动素(Kin)、蔗糖和琼脂以及不同封口材料对超度含水态试管苗形成的影响, 以期建立较完善的分蘖洋葱脱毒试管苗再生体系, 从而有效控制超度含水态苗的发生, 为脱毒种苗的工厂化生产提供参考。

材料与amp;方法

按照我们于2002年建立的分蘖洋葱(*Allium cepa* L. var. *aggregatum* G. Don)鳞茎茎尖培养脱毒苗技术程序, 将栽培品种‘阿城紫皮’的鳞茎茎尖接种于MS+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上, 添加3% (W/V)蔗糖和0.8% (W/V)的琼脂, 于培养温度为(22±1) °C、光照强度为36 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间为13 h·d⁻¹的条件下培养15 d, 以茎尖脱毒试管苗基部约2 cm的切段作外植体, 设以下几种实验:

(1) 改变MS培养基组成浓度的实验。设1/4MS、1/2MS和MS 3种基本培养基, 附加0.1 mg·L⁻¹ NAA、0.4 mg·L⁻¹ 6-BA、30.0 g·L⁻¹ 蔗糖和8.0 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8。

(2) 6-BA和Kin浓度实验。以MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30.0 g·L⁻¹ 蔗糖+8.0 g·L⁻¹ 琼脂为基本培养基(pH 5.8), 6-BA和Kin的浓度分别为0.1、0.4、1.0 mg·L⁻¹。

(3) 蔗糖浓度实验。以MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.4

mg·L⁻¹ 6-BA+8.0 g·L⁻¹ 琼脂为基本培养基(pH 5.8), 蔗糖浓度设20、30、40、50 g·L⁻¹。

(4) 琼脂浓度实验。以MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+30.0 g·L⁻¹蔗糖为基本培养基(pH 5.8), 设6、8、10 g·L⁻¹ 3个琼脂浓度。

(5) 不同封口材料实验。培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.4 mg·L⁻¹ BA+30.0 g·L⁻¹ 蔗糖+8.0 g·L⁻¹ 琼脂, pH 5.8。分别用铝箔纸、聚乙烯膜、无菌培养容器封口膜(振泰公司生产)封口。

以上培养基均经121 °C高温高压灭菌14 min。除不同封口材料实验外, 其他各实验的封口材料均用无菌培养容器封口膜。每处理5瓶, 每瓶接种4株, 重复3次。接种后, 在培养温度为(22±1) °C、光照强度为36 μmol·m⁻²·s⁻¹和光照时间为16 h·d⁻¹的条件下培养30 d后, 调查试管苗增殖和超度含水态情况。

结果与amp;讨论

1 降低MS组成物的浓度对分蘖洋葱脱毒苗超度含水态苗发生的影响

MS、1/2MS和1/4MS培养的正常试管苗生长势较强, 但均有超度含水态苗的发生。1/4MS和1/2MS的发生率差异不显著, 而两者与MS之间的差异显著(表1), 说明降低MS培养基中组成物的浓度对防止和降低超度含水态苗的发生有一定的作用。这与Makunga等(2006)的1/2MS可降低*Thapsia garganica* L.的超度含水态苗发生的结果是一致的。

表1 改变MS组成物浓度对分蘖洋葱试管苗增殖和超度含水态苗发生率的影响

Table 1 Influence of concentration of MS medium on proliferation and hyperhydric seeding of plantlets of potato onion

培养基	增殖系数	超度含水态苗发生率/%	正常苗生长状况
1/4MS	1.0±0.09 ^b	7.1±0.62 ^b	深绿, 较粗壮
1/2MS	1.1±0.05 ^b	7.4±0.70 ^b	绿色, 较粗壮
MS	1.5±0.12 ^a	13.1±2.40 ^a	绿色, 生长势中等

数据为3次重复的平均值, 同列内不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。下表同此。

2 不同浓度6-BA和Kin对分蘖洋葱脱毒苗超度含水态苗发生的影响

如表2所示, 随着6-BA和Kin浓度的升高, 试管苗的增殖系数也随之增大, 但超度含水态苗

发生频率也高。这与Vandemoortele(1999)的降低细胞分裂素浓度会使花椰菜繁殖系数减少以及丁小维等(2006)和周俊辉等(2006)的相同浓度的6-BA和Kin中, 前者比后者更易使康乃馨和鸡冠花试管苗

表2 不同浓度 6-BA 和 Kin 对分蘖洋葱试管苗增殖和超度含水态苗发生率的影响

Table 2 Influence of concentration of 6-BA and kinetin on proliferation and hyperhydric seeding of plantlets of potato onion

浓度 /mg·L ⁻¹	增殖系数	超度含水态苗发生率 /%	正常苗生长状况	
6-BA	0.1	1.3±0.21 ^d	7.9±1.26 ^d	较纤细, 浅绿色
	0.4	3.2±0.34 ^a	9.7±0.37 ^{cd}	粗壮, 生长势强
	1.0	3.4±0.12 ^a	27.4±2.96 ^a	纤细, 较脆, 浅绿色
Kin	0.1	1.1±0.08 ^d	8.4±1.55 ^{cd}	较纤细, 浅绿色
	0.4	2.1±0.08 ^c	11.6±0.91 ^c	较粗壮, 生长势适中
	1.0	2.6±0.29 ^b	20.0±1.04 ^b	纤细, 较脆, 浅绿色

超度含水态苗产生的结果是一致的。

3 不同浓度蔗糖对分蘖洋葱脱毒苗超度含水态苗发生的影响

表3显示,随着蔗糖浓度的提高,超度含水态苗发生的频率明显降低,20 g·L⁻¹蔗糖的超度含水态苗率为16.9%,较其他蔗糖浓度的高,50 g·L⁻¹蔗糖的超度含水态苗率则降低为2.7%,但会抑制试管苗地上部的增殖与生长,植株矮化,叶色深绿,增殖系数低。从增殖和超度含水态苗发生率来说,蔗糖浓度为30 g·L⁻¹和40 g·L⁻¹的效果

好一些,增殖系数分别为3.3和3.1,超度含水态苗率分别为8.3%和5.6%。这与王小敏等(2006)和曹善东(2006)的结果基本上类似。

4 不同浓度琼脂对分蘖洋葱脱毒苗超度含水态苗发生的影响

从表4可以看出,随着琼脂浓度的增加,超度含水态苗的发生呈下降趋势,但过高的琼脂浓度对试管苗的增殖与生长不利,在本文采用的浓度范围内,低浓度琼脂有利于试管苗的增殖和伸长生长,高浓度琼脂抑制。这与Yadav等(2003)

表3 蔗糖浓度对分蘖洋葱试管苗增殖和超度含水态苗发生率的影响

Table 3 Influences of different concentration of sugar on shoot proliferation and hyperhydricity of *in vitro* potato onion

蔗糖浓度 /g·L ⁻¹	增殖系数	超度含水态苗发生率 /%	正常苗生长状况
20	1.4±0.17 ^b	16.9±2.94 ^a	叶色浅绿, 植株较细长
30	3.3±0.39 ^a	8.3±0.62 ^b	叶色深绿, 植株健壮
40	3.1±0.42 ^a	5.6±0.52 ^{bc}	叶色浓绿, 植株粗壮
50	1.0±0 ^b	2.7±0.28 ^c	叶色深绿, 植株矮化, 基部膨大

表4 琼脂浓度对分蘖洋葱试管苗增殖和超度含水态苗发生率的影响

Table 4 Influences of concentration of agar on shoot proliferation and hyperhydricity of plantlets *in vitro* potato onion

琼脂浓度 /g·L ⁻¹	增殖系数	超度含水态苗发生率 /%	正常苗生长状况
6	3.8±0.33 ^a	19.4±0.69 ^a	色浅绿, 植株矮小、细弱
8	2.6±0.12 ^b	9.2±1.77 ^b	叶色深绿, 植株健壮, 生长势强
10	1.6±0.60 ^c	7.2±0.86 ^b	叶色浓绿, 生长势中等

的结果一致。

5 不同封口材料对分蘖洋葱脱毒苗超度含水态苗发生的影响

试管苗的生长和发育会受到容器内气体环境的影响(Park等2004),密封的容器内易积累水蒸气、CO₂、乙烯、乙醇、乙醛等,促进容器内

外气体交换可有效防止超度含水态苗的产生(Lai等2005)。表5显示,试管苗的增殖系数以无菌培养容器封口膜处理为最佳,铝箔纸和聚乙烯膜次之。就超度含水态苗的形成率而言,铝箔纸和聚乙烯膜处理的有超过20%的试管苗呈超度含水态,而无菌培养容器封口膜处理的超度含水态

表5 不同封口材料对分蘖洋葱试管苗增殖和超度含水态苗发生率的影响

Table 5 Influences of different types of container closure on shoot proliferation and hyperhydricity of plantlets *in vitro* potato onion

封口材料类别	增殖系数	超度含水态发生率/%	正常苗生长状况
无菌培养容器封口膜	4.4±0.37 ^a	5.9±1.66 ^a	叶粗深绿, 生长势较强
铝箔纸	3.3±0.26 ^b	22.7±0.78 ^b	叶色较绿, 生长势中等
聚乙烯膜	2.7±0.34 ^b	28.8±1.48 ^c	叶色浅绿, 植株较细弱

苗率仅为 5.9%。

参考文献

- 曹善东(2006). 组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 37 (2): 172~174
- 陈典, 徐启江(2001). 分蘖洋葱愈伤组织诱导及植株再生的研究. 园艺学报, 28 (4): 359~360
- 丁小维, 梁雪妮, 桂敏, 侯思名, 刘开辉, 刘飞虎(2006). 不同激素配比对康乃馨芽增殖及玻璃化的影响. 中国农学通报, 22 (4): 269~271
- 王小敏, 李维林, 赵志强, 梁呈元, 房海灵(2006). 不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响. 植物资源与环境学报, 15 (3): 51~54
- 徐启江, 陈典, 张云修(2002). 分蘖洋葱茎尖培养脱毒苗技术研究. 西北农林科技大学学报, 30 (2): 101~106
- 徐启江, 丁国华, 陈典(2003). 黑龙江省分蘖洋葱病毒病原的初步鉴定. 西北农林科技大学学报, 31 (2): 55~58
- 周俊辉, 陈志强, 余卓玲, 卢俊图(2006). 鸡冠花离体培养中的玻璃化现象及其控制的初步研究. 江西农业学报, 18 (4): 88~90
- Hanelt P (1990). Taxonomy, evolution, and history. In: Rabinowitch HD, Brewster JL (eds). Onions and Allied Crops. Vol 1. Botany, Physiology and Genetics. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1~26
- Kataeva NV, Alexandrova IG, Butenko RG, Dragavtceva EV (1991). Effect of applied and internal hormones on vitri-
fication and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult, 27: 149~154
- Kevers C, Franck, Strasser RJ, Dommes J, Gaspar T (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tiss Org Cult, 77: 181~191
- Lai CC, Lin HM, Manohar Nalawade S, Fang W, Tsay HS (2005). Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. J Plant Physiol, 162: 355~361
- Makunga NP, Jäger AK, van Staden J (2006). Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. Plant Cell Tiss Org Cult, 86: 77~86
- Pâques M, Boxus P (1987). Vitrification: review of literature. Acta Hort, 212: 155~166
- Park SW, Jeon JH, Kim HS, Park YM, Aswath C, Joung H (2004). Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. Sci Hort, 99: 199~205
- Vandemoortele JL (1999). A procedure to prevent hyperhydricity in cauliflower axillary shoots. Plant Cell Tiss Org Cult, 56: 85~88
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell Tiss Org Cult, 72: 153~156