

太仓大蒜根尖离体培养直接诱导不定芽及其试管鳞茎的形成

张昌伟 侯喜林* 袁建玉 李海莲

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

提要 用正交设计法研究 6-BA 和 NAA 及根尖长度对太仓大蒜根尖不定芽直接诱导的影响, 结果表明, 三者都有极显著影响, 6-BA 影响最大, NAA 次之, 根尖长度最小; 筛选出的最佳生长调节物质组合为 6-BA 3~5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹, 切取的最佳根尖长度为 1.2 mm。并用得到的试管苗成功诱导形成了试管鳞茎, 质量在 60~320 mg 之间, 破除休眠后, 播种在蛭石和珍珠岩(3:1)混合的基质上, 出苗率为 91.3%, 长势良好。

关键词 太仓大蒜; 不定芽; 直接诱导; 试管鳞茎

Direct Induction of the Adventitious Bud from the Root Tips of 'Taicang' Garlic and Formation of Its Bulblet *in vitro*

ZHANG Chang-Wei, HOU Xi-Lin*, YUAN Jian-Yu, LI Hai-Lian

National Key Laboratory for Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract The experimental results showed that 6-BA was the most important for the adventitious bud direct induction, followed by NAA then the length of root tips. The best combination of exogenous hormones for the adventitious bud induction was 6-BA 3~5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, the best length of root tips was 1.2 mm. The plantlets were induced to bulblets *in vitro* with the weight from 60 mg to 320 mg. Then bulblets *in vitro* were broken dormancy and transferred to the medium contained vermiculite: perlite=3:1 at the rate of 91.3% with well-growing.

Key words 'Taicang' garlic; adventitious bud; direct induction; bulblet *in vitro*

大蒜的多数品种花粉败育, 主要靠鳞茎无性繁殖, 病毒在营养器官中不断增殖, 致使品种退化, 商品性状降低, 造成生产上大蒜鳞茎的产量与品质下降。应用脱毒苗对提高大蒜鳞茎的产量与品质效果显著^[1,2], 但脱毒大蒜在大田中种植, 增殖系数低, 容易再感染病毒, 因此, 离体微繁技术对解决此问题可能有一定的意义。大蒜的离体繁殖主要有两条途径: 一是通过愈伤组织培养再生植株; 二是由外植体直接诱导形成试管苗。大蒜经愈伤组织培养可在短时间内获得大量试管苗, 但再生植株的染色体变异率较高^[3,4]。由外植体直接诱导形成试管苗则虽具有较好的遗传稳定性^[3], 但增殖系数低, 脱毒苗的生产成本较高^[1]。因此, 大蒜微繁中的这些问题是大蒜脱毒苗产业化生产中需要解决的。

Haque 等^[5,6]研究了培养基类型、6-BA、NAA、生根时间等对大蒜根尖直接诱导不定芽的影响, 认为以大蒜根尖为外植体进行离体培养获

得试管苗, 具有繁殖系数高、变异率低等优点, 但国内尚未见报道。本文在 Haque 等研究的基础上, 以江苏省地方优良品种太仓大蒜为材料, 采用正交设计法研究了 6-BA 和 NAA 以及根尖长度不同组合对大蒜根尖直接诱导不定芽的影响, 并用获得的试管苗诱导形成试管鳞茎, 以期建立一种繁殖系数高、变异率低、移栽成活率高的大蒜根尖离体微繁技术。

材料与amp;方法

大蒜(*Allium sativum*)栽培品种太仓大蒜, 由太仓农业局提供。

将蒜瓣置水中浸泡, 流水冲洗后, 剥去外膜, 然后置 75% 酒精中浸 3 min, 之后再用 0.1%

收稿 2003-06-04 修定 2003-11-24

资助 上海市科技兴农攻关项目[农科攻字(2000)第1~4号]。

* 通讯作者(E-mail:hxl@njau.edu.cn, Tel:025-84395262)。

的 HgCl_2 消毒 20 min, 无菌水冲洗 3 次后, 接种于琼脂 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的固体培养基上, 在光照 $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、温度 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下进行培养。待根长到 $3\sim 5 \text{ cm}$ 后, 切取一定长度 ($0.2\sim 1.2 \text{ mm}$) 的根尖进行接种。

试验设计参照文献 6 和 7, 选取 6-BA、NAA 和根尖长度为试验因素, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验设计, 得到试验方案 (表 1), 2 次重复, 按随机区组排列^[8,9]。不定芽诱导以 B_5 固体培养基为基本培养基, 蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.2。每瓶 20 mL, 接种 2 个根尖, 每个处理接种 15 瓶。培养条件为光照 $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照度 1400 lx , 温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

诱导试管鳞茎时, 取不定芽 (不分割), 在含 6-BA $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上生长 20 d 后, 接种在含蔗糖 $120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和乙烯利 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基^[10] 上诱导试管鳞茎的形成。

实验结果

1 不同浓度 6-BA 和 NAA 以及根尖长度对太仓大蒜根尖不定芽直接诱导的影响

根尖接种 15 d 左右开始膨大并出现绿色的芽点, 随后不定芽不断增殖和生长, 大部分生长健壮、正常 (图 1-a)。在接种 5 周后, 统计不定芽的数量, 计算平均每个根尖分化的不定芽数 (表

表1 不同试验方案直接诱导大蒜根尖不定芽的效应
Table 1 Direct induction of adventitious bud from root tips of garlic in different experimental designs

处理	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	根尖长度/ mm	每根平均 芽数
1	1.0	1.0	0.2	0
2	1.0	0.5	2.2	0.285
3	1.0	1.5	1.2	0
4	3.0	1.0	2.2	1.785
5	3.0	0.5	1.2	1.385
6	3.0	1.5	0.2	0.115
7	5.0	1.0	1.2	2.3
8	5.0	0.5	0.2	1.15
9	5.0	1.5	2.2	0.35
F 值	43.58**	40.69**	17.63**	

**表示差异极显著。

1)。参照文献 7 和 8 对表 1 的结果进行方差分析, 结果显示, 6-BA、NAA、根尖长度这 3 个因素对太仓大蒜不定芽直接诱导有极显著的影响, 其影响大小依次为: 6-BA > NAA > 根尖长度。

为了确定各因素对太仓大蒜根尖不定芽直接诱导的影响和最佳水平, 分别对三因素的不同水平进行最小显著极差 (LSR) 多重比较。表 2 表明, 每个根尖不定芽的分化数随着 6-BA 浓度的增加而增加, 第 3 水平诱导效果最好, 第 3 水平比第 1 水平、第 2 比第 1 水平均有极显著差异, 但第 3 水平和第 2 水平间差异不显著, 说明 6-BA 的最佳浓度为 $3\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 每个根尖不定芽的分化数随着 NAA 浓度的上升而增加, 达到一定浓度后又开始下降, 第 1 水平诱导效果最好, 第 1 水平比第 2 水平有显著差异, 第 3 水平比第 1 和第 2 水平存在极显著差异, 所以 NAA 的最佳浓度为第 1 水平 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); 根尖长度对不定芽分化的影响与 NAA 趋势相同, 第 3 水平效果最好, 第 3 水平与第 2 和第 1 水平相比, 有极显著差异, 第 1 水平和第 2 水平之间有显著差异, 说明根尖的最适长度为第 3 水平 (1.2 mm)。由此, 我们得到的太仓大蒜不定芽直接诱导的最佳生长调节物质组合为: 6-BA $3\sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 切取的最佳根尖长度为 1.2 mm 。

2 试管鳞茎的形成和萌发

不定芽 (不分割) 接种在生长培养基上, 长势良好 (图 1-b)。20 d 后, 接种在试管鳞茎诱导培养

表2 不同浓度 6-BA 和 NAA 以及根尖长度对太仓大蒜根尖不定芽直接诱导影响的比较

Table 2 Differences of direct induction of adventitious bud from root tips of 'Taicang' garlic at levels of 6-BA, NAA and length of root tips

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均数*	NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均数*	根尖长度/ mm	平均数*
5.0(3)	1.27Aa	1.0(1)	1.36Aa	1.2(3)	1.29Aa
3.0(2)	1.095Aa	0.5(2)	0.94Ab	2.2(2)	0.81Bb
1.0(1)	0.095Bb	1.5(3)	0.155Bc	0.2(1)	0.42Bc

*分别表示每个因素不同水平结果总和的平均数, 不同大写 (或小写) 字母代表在 0.01 (或 0.05) 水平差异显著, 括号中数字为不同水平。

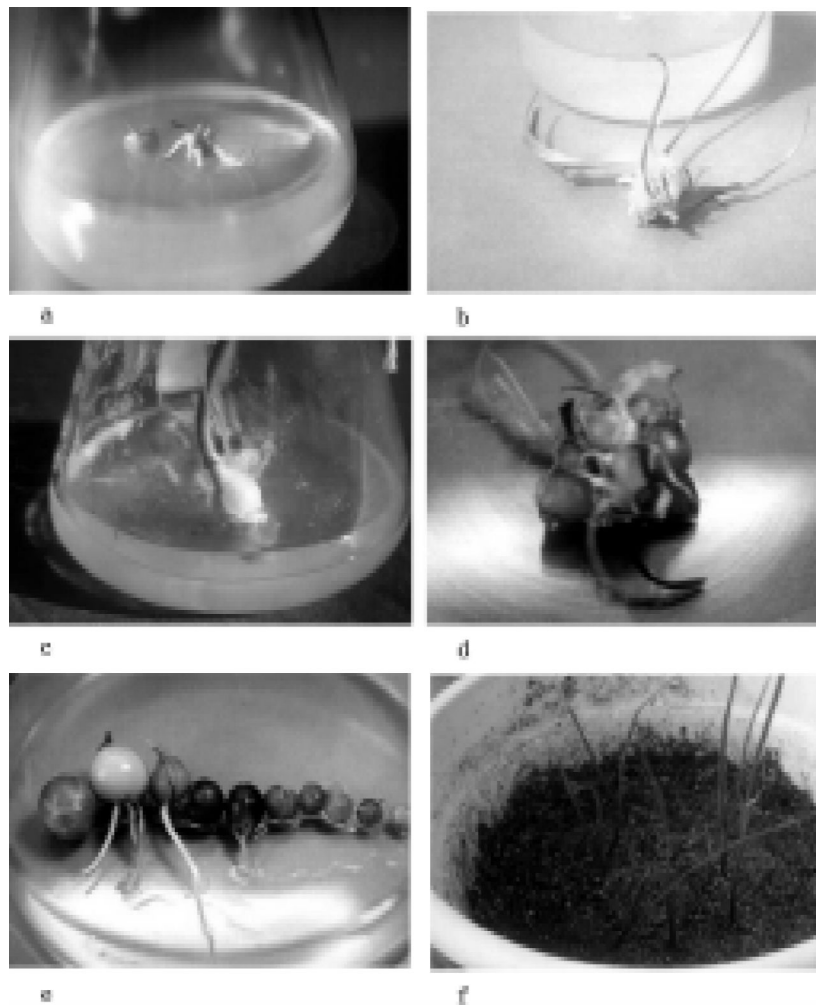


图1 不定芽的直接诱导和生长及试管鳞茎的形成

Fig. 1 Direct induction and growth of adventitious bud and formation of its bulblets *in vitro*

a. 诱导形成的不定芽 b. 不定芽的生长 c. 由单个不定芽诱导形成的试管鳞茎 d. 由丛生芽诱导形成的试管鳞茎 e. 试管鳞茎的大小; f. 试管鳞茎萌发形成的再生植株。

基上诱导试管鳞茎形成的结果表明: 单个不定芽形成单个试管鳞茎(图1-c), 多个不定芽形成丛生鳞茎(图1-d), 试管鳞茎的诱导率为80%以上, 试管鳞茎的质量不同, 大致在60~320 mg之间(图1-e)。试管鳞茎经过一段时间的低温处理破除休眠后, 播种在蛭石和珍珠岩(3:1)混合的基质上, 出苗率为91.3%, 长势良好(图1-f)。

讨 论

大蒜根尖直接诱导不定芽受多种因子影响, 植物激素是影响不定芽诱导的主要因子^[6]。本文筛选出的最佳生长调节物质组合为6-BA 3~5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹, 6-BA与NAA的比值过高

(10:1)或过低(1:1)均不利于不定芽的诱导和分化, 过低更不利, 甚至不分化, 这与Haque等的结论^[6]相同, 但本文的最佳6-BA/NAA比值为3~5:1, 这可能是大蒜基因型有异所致。大蒜根尖的长度对大蒜根尖直接诱导不定芽也很重要, 根尖过小或过大都不利于芽的诱导。这可能是根尖过小受外界环境影响比较大, 接种时容易干燥死亡或培养基上不易存活; 根尖过大, 根尖对外源生长调节物质不敏感, 分化频率较低。

采用本文方法有以下几个优点: (1)以1个蒜瓣生成20条根, 平均每条根分化2.25个不定芽计算, 1个蒜瓣可获得45棵再生植株, 也就是说, 仅通过蒜瓣根尖进行微繁殖, 不用蒜瓣的茎尖

和茎盘,就可获得比传统的外植体材料(3~8倍)^[1]高6~15倍的增殖率;(2)大蒜根尖取材方便、操作简单,直接诱导的试管苗具有良好的遗传稳定性^[3,11],试管苗再生根通过以上途径于离体条件下循环增殖,不受季节和环境条件的限制^[5],可周年生产;(3)不定芽诱导试管鳞茎所得到的试管鳞茎质量与已有报道^[7,12]相似,对不定芽不作分割,这样可以减少分割对不定芽的伤害,提高工作效率^[5]; (4)试管鳞茎毋须驯化就可直接播种,并且比试管苗驯化移栽(成活率53%)成活率高^[13]。因此可以认为,我们的大蒜根尖离体微繁技术繁殖系数高、变异率低、移栽成活率高。另外,周桂珍等^[14]和Pierik^[15]认为,以大蒜根尖得到的试管苗有可能是脱毒的,所以我们认为本文结果对想以大蒜根尖培养快速获得脱毒苗也可能有一定的参考价值。

参考文献

- 1 刘高琼,索长江. 大蒜微繁技术研究现状与展望. 中国蔬菜, 1997, (1):50~53
- 2 赵心爱,薛庆中. 检测大蒜病毒和产生脱毒的方法. 植物生理学通讯, 2002, 38(6):603~606
- 3 徐培文,马伟青. 大蒜组织培养材料染色体倍性变化研究. 山东农业科学, 1998, (5):30~31
- 4 Maggioni L, Marches G. Plantlets of garlic (*Allium sativum* L.) obtained *in vitro*. Sementi Elettelle, 1984, 30(5):29~31
- 5 Haque MS, Wada T, Hattori K. Novel method of rapid micropropagation using cyclic bulblet formation from root tip explants in garlic. Breed Sci, 1998, 48(3):293~299
- 6 Haque MS, Wada T, Hattori K. High frequency shoot regeneration and formation from root tip of garlic. Plant Cell Tiss Org Cult, 1997, 50:83~89
- 7 孙晓波. 大蒜微繁的一种新技术体系构建(硕士论文). 南京: 南京农业大学, 2002. 13~22
- 8 冷寿慈. 生物统计与田间试验设计. 北京: 中国广播电视出版社, 1992. 156~176
- 9 盖均镒. 试验统计方法. 北京: 中国农业出版社, 1999. 248~294
- 10 熊正琴,李式军,刘高琼等. 一种大蒜脱毒苗快速繁殖的方法. 国家发明专利, 99114259
- 11 Novake FJ. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. ZPflanzenzucht, 1980, 84:250~260
- 12 刘高琼,李式军,张学平. 大蒜试管鳞茎微繁技术研究. 南京农业大学学报, 1996, 19(3):31~36
- 13 薛万新,陆帼一,杨竹莹. 大蒜蒜瓣离体繁殖研究. 西北农业大学学报, 1994, 3(3):62~66
- 14 周桂珍,曹鸣庆,裘季燕. 京郊大蒜病毒病的研究及其鳞茎中病毒脱除. 植物病理学报, 1989, 19(3):145~148
- 15 Pierik RLM. *In vitro* Culture of Higher Plants. Dordercht: Martinus Nijhoff Pub, 1987