

野韭菜花器官脱分化影响因素研究

王茜¹, 龙骊丰², 韦鹏霄¹, 岑秀芬¹, 万正林^{1,3}, 龙明华^{1*}

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2. 广西大学行健文理学院理工学部, 广西南宁 530005; 3. 广西现代农业科技示范园, 广西南宁 530007)

摘要 [目的] 研究影响野韭菜花器官脱分化的诱导因子。[方法] 将野韭菜花器官进行离体培养, 探讨培养基种类、外源激素种类和浓度及配比、花器官不同发育时期及不同部位对愈伤组织诱导的影响。[结果] MS 基本培养基最适合花蕾愈伤组织的诱导; NAA 比其他生长素更有利于提高花蕾的出愈率; 花苞未开状态的花蕾愈伤组织诱导率最高; 愈伤组织发生具有明显的部位效应, 最好是花盘, 其次是花蕾, 较差是花柄, 而花茎无愈伤组织发生。[结论] 为建立野韭菜组织培养快繁体系奠定基础。

关键词 野韭菜; 愈伤组织诱导; 花器官

中图分类号 S633.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)31-10861-03

Research on Factors of the Dedifferentiation of Floral Organ in *Allium hookeri* Thwaites

WANG Xi¹, LONG Li-feng², WEI Peng-xiao¹, LONG Ming-hua^{1*} et al (1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004; 2. College of Science and Technology, Guangxi University Xingjian College of Science and Liberal Arts, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The aim was to study factors of the differentiation of floral organ in *Allium hookeri* Thwaites. [Method] Using flower organ of *Allium hookeri* Thwaites as explants, the influence of different factors, including medium variety, the concentration and ingredient of exogenous hormones and the different growth stages of flower organ were investigated. [Result] The results revealed that MS basic medium was optimum for callus induction. Among those auxins, NAA was the best to improve the induction rate of flower buds, and the callus induction showed the highest rate in the unopened flower buds. The study also demonstrated that the callus induction was obvious distinguishing in different flower positions. The callus of flower disc was better than bud, while pedicel showed the lower rate in callus induction and the floral axis had no dedifferentiation. [Conclusion] The study laid technology foundation for establishing tissue culture rapid propagation system of *Allium hookeri* Thwaites.

Key words *Allium hookeri* Thwaites; Callus induction; Flower organ

野韭菜 (*Allium hookeri* Thwaites) 为百合科葱属多年生草本植物, 原称为宽叶韭, 又称为大叶韭、观音菜、岩葱等, 我国各地均有分布^[1]。野韭菜和普通韭菜很相似, 多以其嫩叶和成长叶食用。其叶片较宽, 纤维含量稍多, 具有葱香味, 富含碳水化合物、维生素 C 及硫、铁、磷等矿物质元素, 尤其含丰富的胡萝卜素和纤维素, 还含有辛香的挥发性物质——硫化丙烯, 有增进食欲和杀菌的作用^[2]。此外, 野韭菜还有温中行气、散血解毒、健胃整肠等功效^[1]。由于野韭菜的保健功能和人们崇尚回归自然的消费理念, 目前市场上对包括野韭菜在内的野生蔬菜的需求与日俱增, 供不应求。但野韭菜只开花而不能结籽, 其繁殖方式以分株繁殖为主, 繁殖周期长, 繁殖率低, 极大影响了野韭菜的大面积推广种植, 因此研究野韭菜的组培快繁技术显得尤为重要。目前有关野韭菜的组织培养方面的研究较少, 笔者研究了影响野韭菜花器官脱分化的诱导因子, 旨在为建立野韭菜组织培养快繁体系奠定技术基础, 也为野韭菜种质资源的保存和开发利用探索生物技术上的方法和途径。

1 材料与方

1.1 材料 以采自广西金秀县圣堂山上的野韭菜花器官 (花茎、花盘、花柄、花蕾) 为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制。 以 MS、Miller、White 培养基为基本培养基, 并添加不同的植物生长调节剂, 附加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L, pH 调至 5.8。

1.2.2 外植体灭菌。 于晴天上午采取健壮且无病虫害的花器官。按照花苞开放状态 (未开、半开、全开), 将花器官材料分为 3 组。分别将 3 组材料置于洗洁精溶液中, 用软毛刷轻轻刷表面尘埃后用清水冲洗 30 min; 在超净工作台上将洗净的材料置于无菌烧杯中, 用 75% 乙醇精漂洗 30 s; 再用 0.1% 升汞浸泡灭菌 10 min, 并不断晃动; 灭菌完毕用无菌水清洗 5 次, 备用。

1.2.3 外植体接种。 将灭过菌的花蕾、花柄、花盘、距花盘 5 cm 内的花茎等外植体分别接入添加不同激素的诱导培养基中。每组处理接 30 瓶, 每瓶接种 3 个外植体, 设 3 次重复。

1.2.4 培养条件。 将接种好的试验材料置于培养室中培养, 培养温度为 (25 ± 2) °C, 暗培养 15 d 后转入光下培养, 光照强度 1 000 ~ 1 500 lx, 光照时间 12 h/d。

1.3 数据分析 接种后定期观察各种外植体、各试验处理的愈伤组织发生情况, 观察愈伤组织的质量、出愈时间并统计出愈率。

$$\text{出愈率}(\%) = \frac{\text{出愈外植体数}}{\text{接种外植体数} - \text{污染外植体数}} \times 100$$

运用电子表格软件 (Excel2003)、方差分析软件 (SPSS18.0) 对数据进行整理及差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 培养基种类对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导的影响 由于不同基本培养基所含的矿物质种类和配比差异较大, 因此对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导的效果也存在差异。

基金项目 国家现代农业产业技术体系广西大宗蔬菜创新团队专项基金项目 (nycytxgxcxd-03-10-1); 广西自然科学基金项目 (2011GXNSFB018033); 广西科技攻关项目 (桂科攻 0323001-1); 广西农业科学院科技发展基金项目 (201001); 广西南宁科技局项目 (201102057B)。

作者简介 王茜 (1987 -), 女, 河南安阳人, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种与生物技术、植物组织培养与快速繁殖技术。
* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事蔬菜栽培育种的教学与科研工作。

收稿日期 2014-09-24

从表1可以看出,在MS、Miller、White 3种基本培养基中加入相同的激素组合,MS培养基对花苞未开花蕾的愈伤组织诱导率最高,愈伤组织的质量也最好。这可能是由于MS基本培养基的矿物质种类及比例较适合野韭菜花蕾愈伤组织的发生。花蕾的愈伤组织诱导率由高到低的基本培养基顺序为MS > Miller > White。各个处理的差异均达极显著水平。这表明选择合适的基本培养基可以提高愈伤组织的诱导率,MS基本培养基最适合野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织的诱导。

表1 培养基种类对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导的影响

培养基种类及激素组合//mg/L	愈伤组织诱导率//%	愈伤组织质量
MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	56.67 aA	愈伤组织呈淡黄色,结构紧密,体积较大
Miller + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	43.33 bB	愈伤组织呈淡黄色,结构较为紧密,体积较小
White + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	30.00 cC	愈伤组织呈淡黄色,结构较疏松,体积小

注:同列数据不同大写字母表示处理组之间差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母表示处理组差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同种类生长素与6-BA组合对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导的影响 生长素是植物组织培养中不可缺少的物质之一,不同生长素对植物愈伤组织的形成影响不同。从表2可以看出,在相同浓度的NAA、IAA、IBA、2,4-D与同一浓度的6-BA组合处理中,以NAA与6-BA组合的处理对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导率最高,其次是2,4-D,再次是IBA,最低是IAA,4种生长素处理之间的差异达极显著水平。这表明选择合适的生长素可以提高花苞未开花蕾愈

伤组织的诱导率,在4种生长素中NAA最适合野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织的诱导。

表2 不同种类生长素与6-BA组合对野韭菜花苞未开花蕾愈伤组织诱导的影响

培养基种类及激素组合//mg/L	愈伤组织诱导率//%	愈伤组织质量
MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	56.67 aA	愈伤组织呈淡黄色,结构紧密,体积较大
MS + 6-BA 1.0 + IAA 0.5	23.33 dD	愈伤组织呈浅绿色,结构较疏松,体积小。
MS + 6-BA 1.0 + IBA 0.5	30.00 cC	愈伤组织呈浅绿色,结构疏松,体积小。
MS + 6-BA 1.0 + 2,4-D 0.5	43.33 bB	愈伤组织呈淡黄色,结构较为紧密,体积较大。

注:同列数据不同大写字母表示处理组之间差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母表示处理组差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同浓度NAA与6-BA组合对野韭菜不同发育时期花蕾愈伤组织诱导的影响 不同浓度的NAA与6-BA组合对野韭菜不同发育时期花蕾愈伤组织的诱导影响不同。从表3可以看出,在相同的花苞开放状态下,当NAA的浓度在0~1.5 mg/L时,对野韭菜花蕾的愈伤组织诱导率呈低高低的趋势。其中浓度在1.0 mg/L时最高。各处理之间差异达极显著水平。在相同的培养基及激素处理中,花苞不同开放状态下的花蕾出愈率由高到低为未开状态 > 半开状态 > 全开状态。这表明1.0 mg/L 6-BA与1.0 mg/L NAA组合较适合野韭菜花蕾愈伤组织的诱导,而选择花苞未开的花蕾作为外植体可以提高愈伤组织的诱导率。

表3 不同浓度NAA与6-BA组合对野韭菜不同发育时期花蕾愈伤组织诱导的影响

激素组合 mg/L	愈伤组织诱导率//%			愈伤组织质量
	花苞未开	花苞半开	花苞全开	
MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.0	26.67 dD	20.00 dD	13.33 dD	愈伤组织呈淡白色,结构疏松,体积小
MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5	56.67 bB	43.33 bB	30.00 bB	愈伤组织呈淡黄色,结构紧密,体积较大
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0	70.00 aA	60.00 aA	43.33 aA	愈伤组织呈淡黄色,结构较紧密,团状,体积大
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.5	53.33 cC	36.67 cC	20.00 cC	愈伤组织呈浅绿色,结构较紧密,体积小

注:同列数据不同大写字母表示处理组之间差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示处理组差异显著($P < 0.05$)。

2.4 不同激素组合对野韭菜花苞未开花器官不同部位愈伤组织诱导的影响 以MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L培养基为对照并分别添加0.5 mg/L 2,4-D、KT和CPPU对花苞未开放状态下的花器官不同部位的愈伤组织诱导进行对比。结果表明,同一激素组合对花蕾、花柄、花盘和花茎的愈伤组织诱导效果不同。按愈伤组织诱导率高低排序为花盘 > 花

蕾 > 花柄 > 花茎;按激素诱导愈伤组织的生理功效排序为2,4-D > CPPU > KT。3种激素处理愈伤组织诱导率的差异均达到极显著水平。这表明花器官不同部位的愈伤组织诱导效果存在明显的部位效应,花盘的愈伤组织诱导率达100%,其次是花蕾,最差的是花柄,而花茎无愈伤组织发生。

表4 不同激素组合对野韭菜花苞未开花器官不同部位愈伤组织诱导的影响

激素组合 mg/L	愈伤组织诱导率//%			
	花蕾	花柄	花盘	花茎
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0	70.00 cC	36.67 cC	100.00 aA	0.00 aA
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0 + 2,4-D 0.5	80.00 aA	53.33 aA	100.00 aA	0.00 aA
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0 + KT 0.5	56.67 dD	30.00 dD	100.00 aA	0.00 aA
MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0 + CPPU 0.5	73.33 bB	46.67 bB	100.00 aA	0.00 aA

注:CPPU是细胞分裂素类的一种植物生长调节剂。其生理活性高于一般嘌呤型细胞分裂素,且合成简便,成本低廉,被认为是玉米素的廉价替代品^[3]。同列数据不同大写字母表示处理组之间差异极显著($P < 0.01$);不同小写字母表示处理组差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 基本培养基的影响 器官发生是生物学中的基本问题之一,受到各种内外因子的影响及调控。培养基能为植物的生长提供营养,是组织培养过程中必不可少的物质基础。不同植物的遗传特性、生物学特性、生态学特性不同,这使得植物对各种营养元素的吸收量不同,最适培养基的成分也存在差异。饶月辉等^[4]通过试验比较了 MS、WH、LS、N6 和 SH 5 种培养基对韭菜栽培品种茎尖培养的影响,结果表明,MS 是韭菜栽培品种茎尖组织培养最适基本培养基。李勇等^[5]、王明耀等^[6]、王桂英^[7]分别通过花托、花器官、根尖在 MS 培养基上添加不同的激素成功地诱导出韭菜栽培品种的愈伤组织,只是未做不同培养基的对比试验。结果表明,在 MS、Miller、White 3 种培养基中,MS 培养基对野韭菜花蕾愈伤组织诱导的效果最好。原因可能是 MS 培养基属于富集元素平衡培养基,大量元素和微量元素的含量齐全且丰富,具有较好的诱导性能;而 Miller 和 White 分别是中等无机盐培养基和低无机盐培养基^[8-9],它们的组成或含量并未达到诱导野韭菜花蕾出愈的最佳要求。

3.2 植物生长调节剂的影响 在组织培养过程中添加一定种类和浓度的生长调节剂是植物脱分化和再分化的重要手段^[10]。植物生长内源调节物质对植物组织和细胞的增殖、分化起着关键作用;培养基中的外源植物调节剂主要是通过细胞的基因表达与活性调控影响细胞的脱分化,其适宜的种类和配比水平,反映了植物组织和器官的内源激素水平的差异与其在脱分化过程中对这些物质的要求^[11-12]。植物生长调节剂在一定的范围内能促进生长,但过高或过低都会影响其生长^[13]。该试验结果表明,在 NAA 0~1.5 mg/L 时,当浓度为 1.0 mg/L 时愈组诱导率最高,为 NAA 的最佳浓度。王明耀等^[6]通过试验证明花器官的出愈率主要与生长素和细胞分裂素的种类和配比有关,在其处理中添加 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + KT 1.0 mg/L 2 组激素组合的 MS 培养基对韭菜栽培品种花蕾愈伤组织诱导效果明显,与该研究较一致。该研究进一步进行了生长素种类及浓度的筛选试验,使试验进一步细化,发现在愈伤组织诱导阶段,2,4-D 的效果优于 CPPU,更优于 KT。

3.3 植物生理状态的影响 已分化的植物细胞具有全能性。一般而言,细胞全能性的高低与细胞的分化程度有关,分化程度越高,细胞全能性越低,全能性的表达就越困难。对于野韭菜而言,花器官是其生长发育最旺盛的部位之一。在形态发生的研究中,将外源激素与物种的遗传性及器官和

组织的生理状态联系起来的工作很有限,且外源激素对器官发生的作用机理也不十分清楚^[14]。因此建立一个较好的试验材料体系是必须且重要的。

该研究证明野韭菜花苞开放状态是影响花器官出愈率的主要影响因子。花苞未开花器官是培养野韭菜植株再生的优良外植体,其中花盘出愈率最高,为 100%。花茎在所研究的花苞各种开放状态下及各种激素组合下无分化能力,不推荐其作为野韭菜快繁的外植体材料。说明植物的遗传性及生理状态在形态发生过程中所起的作用可能比激素本身更加关键。此结论与王明耀^[6]、郝建平^[15]的试验结果一致。因此,通过脱分化途径来进行野韭菜组培快繁时,应注意在外植体材料本身的遗传性及生理状态方面进行筛选。

4 结论

综上所述,MS 培养基最适合野韭菜花蕾愈伤组织诱导;2 种激素组合中以 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 对花苞未开花蕾愈组诱导效果最好;3 种激素组合中以 2,4-D、6-BA 与 NAA 的组合对野韭菜花器官愈伤组织诱导效果最好;出愈率高低按照花器官部位排序为花盘 > 花蕾 > 花柄 > 花茎;出愈率高低按照花器官发育时期即花苞开放状态排序为未开状态 > 半开状态 > 全开状态。

对野韭菜花器官脱分化得到的愈伤组织进行继代增殖,再分化获取完整植株等后续试验研究正在进行之中。

参考文献

- [1] 刘朝安,曾文丹,武鹏,等.野韭菜的植物学特性及其栽培技术[J].北方园艺,2013(3):211.
- [2] 屈二军,张现青,赵祯,等.韭菜愈伤组织诱导条件优化的研究[J].种子世界,2008(6):24-25.
- [3] 侯勇,马国瑞,夏中梅,等.CPPU 研究进展[J].植物营养与肥料学报,1999,5(2):106-114.
- [4] 饶月辉,游党呈,周仙祥.韭菜组织培养及快速繁殖技术研究[J].江西农业学报,2007,19(5):64-65.
- [5] 李勇,杨桦,龙蔚,等.韭菜组织培养及快速繁殖技术研究[J].江西农业学报,2006,18(4):37-38.
- [6] 王明耀,王桂英,田金玉,等.韭菜花器官的组织培养[J].河北农业大学学报,2005,28(2):40-43.
- [7] 王桂英.韭菜根尖培养及植株再生[J].北方园艺,2007(12):199-200.
- [8] 杨秀平,刘莉丽.植物组织培养常用基本培养基的数量分析[J].西北林学院学报,2010,25(1):97-100.
- [9] 李好.植物组织培养简介[J].考试周刊,2011(26):200-201.
- [10] 徐士清,杨世湖,倪丹,等.非洲菊试管苗叶片的组织快繁[J].园艺学报,2002,29(5):493-494.
- [11] CHRISTIN H, VENDRING J C, CNCKLEN H V. The accumulation and metabolism on plant growth regulators during organogenesis in cultures of thin cellax of *Nicotiana glauca* [J]. Physiol Plant, 1991, 83:578-584.
- [12] CHEVRE A M. In vitro vegetative multiplication of chestnut [J]. J of Hort Sic, 1983, 58(1):23-29.
- [13] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1999:118-119.
- [14] 刘涤,迟静芬,刘桂芸.烟草愈伤组织器官发生过程中外源激素的作用[J].植物生理学报,1986,12(1):104-108.
- [15] 郝建平,周小梅,李绍清.韭菜花序培养与植株再生[J].山西大学学报:自然科学版,1995,18(1):59-62.

(上接第 10860 页)

- [8] BRESEGHIELLO F, SORRELLS M E. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars [J]. Genetics, 2006, 172:1165-1177.
- [9] MACCAFERRI M, SANGUINETI M C, MANTOVANI P, et al. Association mapping of leaf rust response in durum wheat [J]. Molecular Breeding, 2010, 26:189-228.
- [10] 张学勇,童依平,游光霞,等.选择牵连效应分析:发掘重要基因的新思路[J].中国农业科学,2006,39(8):1526-1535.
- [11] CROSSA J, BURGUENO J, DREISIGACKER S, et al. Association analysis of historical wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure [J]. Genetics, 2007, 177:1889-1913.
- [12] HAO C Y, WANG Y Q, HOU J, et al. Association mapping and haplotype analysis of a 3.1-Mb genomic region involved in Fusarium head blight resistance on wheat chromosome 3BS [J]. PLOS ONE, 2012, 7(10):46444.