

大蒜愈伤组织诱导条件的优化*

李志勇¹ 罗焕亮² 郭勇¹

(1 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州, 510641; 2 广州市林业科学研究所)

摘要 对大蒜愈伤组织诱导条件进行了优化, 结果表明: 采用带表皮, 外植体大小为 0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm 的广州白皮大蒜蒜瓣, 在 MS + 3.0 mg/L 2,4-D + 2.2 mg/L IBA 培养基中可促使大蒜愈伤组织大量发生. 广州白皮大蒜与大头蒜品种对愈伤组织诱导无显著差异. 大蒜外植体 4℃ 低温保藏 18 d 可降低出愈污染, 但对愈伤组织诱导影响不大.

关键词 大蒜; 愈伤组织; 培养基; 外植体; 低温处理

中图分类号 Q 945.51

大蒜, 又名胡蒜, 是百合科葱属植物蒜 (*Allium sativaum* L.) 的鳞茎, 是香辛类蔬菜之一, 在我国南北广泛栽培. 该植物不仅可作为蔬菜鲜食或加工, 还可作为香辛调料, 并且具有很高的药用价值. 在植物界中, 大蒜是含超氧化物歧化酶(SOD)量最高的植物之一, 完全可作为 SOD 的天然植物来源(张毅, 1993). 现已明确知道, SOD 在抗辐射损伤、抗炎症、预防衰老和治疗癌症肿瘤等方面具有积极作用(翁清清等, 1988). 有关大蒜愈伤组织的诱导, 研究报道有鳞茎微繁殖技术(刘高琼等, 1996), 茎尖脱毒技术(李昌华等, 1995), 体细胞胚发生(Schavemaker, 1995)、离体苗繁殖和植株再生(Mohamed-Yasseen et al, 1995; Koch et al, 1995), 也有使用根段进行诱导再生的(Myers, 1995). 但在运用大蒜细胞大量培养生产代谢药物超氧化物歧化酶方面, 国内郭勇教授领导的试验小组进行了报道(张毅, 1993; 刘叔文, 1996; 王霜, 1997), 本试验在已初步探明诱导基本培养基的基础上, 进行了大蒜愈伤组织诱导条件优化的补充研究, 以期为进一步的试验打下基础.

1 材料与方法

1.1 供试材料

为大蒜 (*Allium sativaum* L.) 的 2 个品种, 广州白皮大蒜 (*A. sativaum* L. var. Taihe garlic) 和大头蒜 (*A. ampeloparsum* L.).

1.2 外植体处理及培养条件调优

大蒜在 4℃ 下冷藏 18 d, 以室温保存为对照. 蒜瓣剥去保护膜, 进行表面消毒, 然后切成不同大小的小块, 接入愈伤组织的诱导培养基(张毅, 1993), 25℃, 600 lx 光照, 每天循环光照 12 h 条件下进行愈伤组织的诱导培养, 18 d 后继代, 转入继代培养基至稳定生长. 每 2 d 观察 1 次愈伤组织诱导出现时间、污染情况以及诱导过程.

1.3 培养基调优

以带表皮, 大小为 0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm 广州白皮大蒜蒜瓣作外植体, 采用均匀设计的

1998-10-05 收稿 李志勇, 男, 27 岁, 现为华南理工大学博士生

* 国家自然科学基金(29676017)资助项目

方法(栾军,1995)对诱导培养基进行添加激素配比调优.

2 结果与分析

2.1 外植体的表面消毒效果

诱导及继代过程中,外植体的污染情况为:广州白皮大蒜室温保存(CK)及 4 ℃ 冷藏 18 d 处理外植体污染率分别为 35% 和 20%;对应大头蒜为 12% 及 0. 由此可见,大头蒜较白皮大蒜对污染物具有一定的抑制能力,且其肉眼可见的污染物只出现在继代阶段,这可能是由于继代培养基中存在酪蛋白水解物成分,有利于污染微生物生长,使在诱导阶段受抑制的微生物得以繁殖. 另一方面,从以上结果可知,4 ℃ 冷藏有利于抑菌,减少污染率,其原因可能是冷藏使组织携带微生物生命力减弱,在外植体组织表面消毒过程中可被杀灭所致.

2.2 愈伤组织的诱导过程

对大头蒜,前 5 d 愈伤组织生长缓慢,形态基本不变,6 d 开始外植体表皮组织细胞分裂加快,在外植体表皮中间部位开裂,组织外翻,随着细胞的进一步分裂,表面开始出现淡黄色的小颗粒,随培养条件或处理条件的不同,进一步形成不同形状的愈伤组织,有的呈皱缩状,有的呈堆积生长并向四周扩展,外观较为松脆,但经多次继代后,愈伤组织由松脆渐转致密;对广州白皮大蒜,其生长前期约为 7 d,形态基本不变,此后,从组织切口部位与培养基接触周缘开始肿大,然后整个组织由下向上膨大隆起,起初在组织的顶端(即芽分生组织处)出现绿色,后随培养时间的延长而逐渐变浅消失,愈伤组织多呈淡黄色,在组织与培养基的交界处最早产生的愈伤组织,偶呈红褐色且随培养时间的延长而加深,外观较致密,经多次继代后,愈伤组织由致密渐转松脆. 总的来说,广州白皮大蒜与大头蒜品种对愈伤组织诱导无显著差异,考虑到大蒜细胞培养需要松脆的愈伤组织,宜选用广州白皮大蒜作为外植体材料.

2.3 外植体大小、取材部位对愈伤组织产生的影响

将大蒜取不同部位(分带表皮与不带表皮)切成 4 种不同规格大小,接入愈伤组织诱导培养基进行愈伤组织的诱导,18 d(1 次继代期)后统计愈伤组织的产生情况,其结果见如表 1.

表 1 大蒜不同部位不同大小的外植体的愈伤组织诱导情况¹⁾

大蒜种类	取材部位	外植体大小			
		0.5 cm×0.3 cm	0.4 cm×0.2 cm	0.3 cm×0.2 cm	0.2 cm×0.2 cm
		×0.2 cm	×0.1 cm	×0.1 cm	×0.1 cm
广 州	带表皮	+++	++	++	-
白皮大蒜	不带表皮	-	-	-	-
大 头 蒜	带表皮	+++	++	+	-
	不带表皮	-	-	-	-

1) +++ 愈伤组织产生多; ++ 愈伤组织产生较多; + 可见愈伤组织; - 不见愈伤组织或产生极少,只有表皮纵形开裂

从表 1 可见,外植体的取材部位对愈伤组织产生有显著影响,不论是白皮大蒜还是大头蒜,只有带表皮的外植体才可产生愈伤组织,而不带表皮的外植体均不产生愈伤组织;另一方面,愈伤组织的产生也与外植体的大小有关,对以上 4 种不同规格大小的外植体,外植体的大小在 0.5 cm×0.3 cm×0.2 cm 时,愈伤组织产生较多;当外植体的大小在 0.2 cm×0.2 cm×

0.1 cm 以下时,极少或不产生愈伤组织.

2.4 冷藏处理与愈伤组织的产生

如表2所示,冷藏处理对愈伤组织产生有一定作用,可使2种大蒜的愈伤组织出现时间略为推迟1~2 d,但对广州白皮大蒜愈伤组织的颜色、外观和生长量的影响均不明显.冷藏处理可使大头蒜愈伤组织的颜色加深,外观不规则,呈皱缩状且愈伤组织的增长速度较慢.

表2 冷藏处理对大蒜愈伤组织产生的影响

大蒜种类	处理	愈伤组织出现时间 t (接种后天数)/d	颜色	外观	愈伤组织 ¹⁾ 生长量
广州白皮大蒜	冷藏	8~10	白至浅绿、淡黄	隆起、致密	++
	CK	6~8	同上	同上	++
大头蒜	冷藏	7~9	黄棕色或黄褐色	皱缩、不规则	+
	CK	6~8	淡黄	平滑、堆积生长	++

1) + 愈伤组织较多; ++ 愈伤组织多

2.5 诱导培养基的调优

采用MS基本培养基,寻找最佳添加激素配比.选取BA(X_1)、KT(X_2)、2,4-D(X_3)和IBA(X_4)4个因素,它们的变化范围为: X_1 :1.0~2.2; X_2 :0.6~1.4; X_3 :1.9~3.1; X_4 :1.0~2.2,单位为mg/L,各取5个水平.选取均匀设计表 $U_5(5^4)$,均匀设计的试验方案 $U_5(5^4)$ 及结果见表3.

表3 试验方案 $U_5(5^4)$ 及结果¹⁾

试验号	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ BA	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ KT	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 2,4-D	$X_4/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ IBA	Y(愈伤组织 生长量)
1	1.0(1)	0.8(2)	2.5(3)	1.9(4)	1.06
2	1.3(2)	1.2(4)	1.9(1)	1.6(3)	0.53
3	1.6(3)	0.6(1)	2.8(4)	1.3(2)	0.75
4	1.9(4)	1.0(3)	2.2(2)	1.0(1)	0.63
5	2.2(5)	1.4(5)	3.1(5)	2.2(5)	0.75

1)表中圆括号号为水平标号;愈伤组织生长量计算标准:0为不长出愈伤组织;1为可见愈伤组织生长,但仅有少量;2为愈伤组织在外植体接触培养基处布满整圈;3为愈伤组织布满外植体且厚度较大.每一试验号10个重复

试验结果经二次回归计算,得回归方程为: $Y = 0.394 + 0.122 X_1^2 - 0.463 X_1 X_4 + 0.294 X_3 X_4$,其显著性检测 $F = 8.32$,在显著水平 $\alpha = 0.05$ 下是可信的.回归模型在试验范围内成立,即 X_1 、 X_3 和 X_4 的取值范围分别为0~2.2、0~3.0及0~2.2,单位为mg/L.在给定范围内对回归方程微积分求极值,当 $X_1 = 0$, $X_3 = 3.0$, $X_4 = 2.2$ 时, $Y_{\max} = 2.16$.获得的调优培养基配方为MS+3.0 mg/L 2,4-D+2.2 mg/L IBA.

为了验证培养基调优配方,进行比较试验,结果见表4,表中CK培养基配方见张毅(1993).

表4 调优培养基的验证试验

试验号	Y(愈伤组织生长量)
CK培养基	1.42
调优培养基	2.08
理论调优值	2.16

从试验结果来看,在调优培养基下可得到与理论调优值相近的结果,且明显优于 CK 培养基。

3 讨论

大蒜是一种适应性强、病虫害少的植物,同时也是药用价值较高的蔬菜作物之一。近年来人们在寻找新的、可靠的、低成本的 SOD 来源的过程中发现大蒜中含有丰富的 SOD 及其它抗氧化剂成分,大蒜的抗癌、杀菌和抑病毒的作用无不与此相关。利用大蒜细胞大量培养生产高附加值产品 SOD,国内郭勇领导的研究小组进行了系列研究(张毅,1993;刘叔文,1996;王霜,1997),建立了继代稳定的大蒜培养细胞系。但在大蒜细胞愈伤组织诱导方面,仅对培养基配方进行了初步的探索,并未对大蒜愈伤组织诱导条件进一步深入优化,本研究正是在已有基础上进行的补充研究。

大蒜愈伤组织的诱导所需时间及效果一般随外植体来源、取材部位、大小以及预处理的不同而表现较大差异。带表皮的外植体由于具有生活力旺盛的分生组织,有利于愈伤组织诱导,当大蒜外植体大小为 $0.5\text{ cm} \times 0.3\text{ cm} \times 0.2\text{ cm}$ 时,继代时期愈伤组织产生量较多;随着外植体变小,愈伤组织产生量也变少。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保藏 18 d 有一定抑菌作用,可减少外植体出愈污染。冷藏可推迟出愈 1~2 d,但对大蒜愈伤组织诱导影响不大。另外,由于外植体的差异,所形成的愈伤组织也会出现形态发育的差异,部分愈伤组织致密,而部分愈伤组织疏松。实践表明,松脆的愈伤组织有利于大蒜细胞悬浮培养,只要稍经机械振荡,即可使组织分散成单细胞或细胞团。故宜选用广州白皮大蒜作为外植体材料。

均匀设计法是一种成熟的试验设计方法,突出优点是用较少的试验获得较多的信息,适用于多因素多水平的设计,可在科学试验上推广应用(张国权等,1998)。作者采用此设计方法,得到广州白皮大蒜优化诱导培养基配方为 $\text{MS} + 3.0\text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 2.2\text{ mg/L IBA}$,经试验证明可取得良好的诱导效果。

参 考 文 献

- 王 霜.1997.大蒜细胞培养及产超氧化物歧化酶的动力学规律研究:[学位论文].广州:华南理工大学
- 刘叔文.1996.大蒜细胞 SOD 的诱导及分离纯化的研究:[学位论文].广州:华南理工大学
- 刘高琼,李式军.1996.大蒜试管鳞茎微繁殖技术研究.南京农业大学学报,19(3):31~36
- 李昌华,李小川.1995.大蒜茎尖脱毒技术及组织培养研究.华北农学院学报,10(3):20~25
- 张国权,吕小欢,罗志刚.1998.均匀设计的方法与应用.华南农业大学学报,19(2):91~96
- 张 毅.1993.大蒜细胞培养及其超氧化物歧化酶 SOD 积累的研究:[学位论文].广州:华南理工大学
- 栾 军.1995.现代试验设计优化方法.上海:上海交通大学出版社,161~174
- 翁清清,俞建瑛,陶宗晋.1988.人血红细胞的超氧化物歧化酶纯化及其稳定性的研究.生物化学与生物物理学报,20(4):357~363
- Koch M, Tanami Z, Salomon R. 1995. Improved regeneration of shoots from garlic callus. Hortscience, 30 (2): 378
- Mohamed - Yasseen Y, Sheryl A Barringer, Walter E S. 1995. In vitro shoot proliferation and plant regeneration from kurrat (*Allium ampeloprasum* var. *kurrat*) seedlings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40(2): 195~196
- Myers J M. 1995. Induction and regeneration of callus in suspension culture of garlic (*Allium sativum* L.). In Vitro, 31(3): 2~54A
- Schavemaker C M, Jacobsen E. 1995. Development of a cyclic somatic embryogenesis regeneration system for leek (*Al-*

lium ampeloprasum L.) using zygotic embryos. Plant Cell Rep, 14 (4): 227 ~ 231

Optimization of Callus Induction of Garlic

Li Zhiyong¹ Luo Huanliang² Guo Yong¹

(1 College of Food and Bioengineering, South China Univ. of Technol. Guangzhou 510641;

2 Forestry Science and Research Institute of Guangzhou)

Abstract Plant cell and tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.) was a potential alternative approach to produce SOD for the demand of medical uses. This paper deal with the optimization of callus induction of garlic, the results were obtained as follow: When the explant size with epidermis was 0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm, more callus could be induced from the Guangzhou white peel garlic in the culture medium of MS + 3.0 mg/L 2,4-D + 2.2 mg/L IBA. There was no distinct difference between the varieties of Guangzhou white peel garlic and big head garlic in callus inducement. Under cold treatment of both garlic's explants at 4℃ for 18 days the inducing contamination would be reduced but it had no significantly influence on the induction of callus.

Key words garlic(*Allium sativum* L.); callus; culture medium; explant; treatment of low temperature

【责任编辑 李玲】

·简讯·

本刊获教育部期刊评比二等奖

据国家教育部发布的通知(教技[1999]1号). 教育部开展的1999年度全国优秀高校自然科学学报及教育部优秀科技期刊评比活动, 经组织有关专家进行评审, 共评出获奖期刊200种, 其中一等奖50种, 二等奖80种, 三等奖70种. 《华南农业大学学报》荣获二等奖, 并排名第三. 通知还指出: 该项奖励可等同于教育部科技进步奖.

华南农业大学学报编辑部