

## 大蒜愈伤组织诱导条件初报

李志勇<sup>1</sup>、郭勇<sup>1</sup>、罗焕亮<sup>2</sup>

S 633 403.5

(1 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东广州 510641; 2 广州市林业科学研究所, 广东广州 510515)

**摘要:** 以白皮大蒜和大头蒜为材料, 报道了大蒜品系、外植体的低温前处理、外植体大小及取材种类不同对愈伤组织诱导的影响。结果表明: (1) 无论是 4℃ 低温保藏或室温保存前处理, 大头蒜的消毒效果均优于白皮大蒜, 4℃ 低温前处理可降低外植体出愈污染; (2) 只有带表皮的外植体才可诱导愈伤组织, 外植体较大 (0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm), 继代期愈伤组织产生量较多; 外植体偏小 (0.2 cm × 0.1 cm × 0.1 cm), 极少产生愈伤组织; (3) 4℃ 冷藏 18 d 对大头蒜愈伤组织诱导有一定影响, 但对白皮大蒜影响不大。冷藏可推迟出愈 1~2 d。

**关键词:** 大蒜; 愈伤组织; 外植体; 低温处理

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A

## A preliminary study on callus induction of Garlic

LI Zhi-yong<sup>1</sup>, GUO Yong<sup>1</sup>, LUO Huan-liang<sup>2</sup>

(1. College of food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

2. Forestry Science and Research Institute of Guangzhou, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Plant cell and tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.) is a potential alternative approach to produce SOD for the demand of medical uses. Used the garlic strain of white peel and big head as materials, the influence of garlic species, explants as well as cold pre-treatment at 4℃ for 18 days on the induction of callus were studied and the results were obtained as follow: (1) The sterilized effectiveness of big head explant were higher than that of white peel either for cold pre-treatment at 4℃ for 18 days or keeping at normal temperature and the low temperature pre-treatment could reduce callus pollution in callus induction; (2) No callus was induced other than the explants with epidermis and the quantity of the callus was relate to the size of explant, more callus could be induced from the bigger explants (0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm) than from the smaller ones (0.2 cm × 0.1 cm × 0.1 cm); (3) 4℃ cold treatment for 18 days had some influence on the induction of callus for the big head garlic while few influence for the white peel garlic, on the other

收稿日期: 1998-12-14

作者简介: 李志勇 (1972-), 男, 现为华南理工大学食品与生物工程学院发酵工程专业博士生。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29676017)

hand, the callus could be deferred to appear for 1 to 2 days for both garlic species.

**Key words:** *Allium sativum* L.; callus; explant; treatment of low temperature

大蒜, 古称胡蒜, 是百合科葱属植物蒜 (*Allium sativum* L.) 的鳞茎, 在我国南北广泛栽培。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<sup>(2)</sup>。现已明确知道, SOD 在抗辐射损伤、抗炎症、预防衰老和治疗癌肿瘤等方面具有积极作用<sup>(2)</sup>。有关大蒜愈伤组织的诱导, 研究报道有鳞茎微繁殖技术<sup>(3)</sup>, 茎尖脱毒技术<sup>(4)</sup>, 体细胞胚发生<sup>(5)</sup>, 离体苗繁殖和植株再生<sup>(6~7)</sup>, 也有使用根段进行诱导再生的<sup>(8)</sup>。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, 华南理工大学食品与生物工程学院进行了系列的研究<sup>(1,9,10)</sup>。本试验是在已有的研究基础上, 进行了大蒜愈伤组织诱导条件的补充研究, 以期为进一步的试验打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

为大蒜 (*Allium sativum* L.) 的两个品系, 白皮大蒜 (*A. sativum* L. var. Taihe garlic) 和大头蒜 (*A. ampeloparsum* L.)。

### 1.2 外植体前处理及培养条件

外植体前处理以 4℃ 冷藏 18 d 为低温处理, 室温 25℃ 保存 18 d 为对照。按张毅<sup>(1)</sup>方法进行表面消毒, 然后将蒜瓣切成不同大小的小块, 接入愈伤组织的诱导培养基, 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。

### 1.3 培养基

诱导培养基与继代培养基配方见文献<sup>(1)</sup>。

每 2d 观察 1 次愈伤组织诱导出现时间, 污染情况以及诱导过程。

## 2 结果与讨论

表 1 不同品系大蒜不同温度处理的表面消毒效果  
Table 1 Surface sterilize effect of different garlic species by different temperature treatment

### 2.1 外植体的表面消毒效果

诱导及继代过程中, 外植体的污染情况如表 1。

从以上外植体表面消毒效果可见, 不管冷藏还是室温保存, 大头蒜的污染率均低于白皮大蒜, 且其肉眼可见的污染物只出

品 系 Species	前处理 Pre-treatment	外植体污染情况 Pollution of explants	
		污染率(%) Percentage of pollutinn	Time of pollution appear
白皮大蒜	室温保存(CK)	35	诱导和继代阶段
<i>A. sativum</i> var. Taihe garlic	4℃ 冷藏 18 d	20	继代阶段
大头蒜	室温保存(CK)	12	继代阶段
<i>A. ampeloparsum</i>	4℃ 冷藏 18 d	0	——

现在继代阶段, 以此可推出, 大头蒜对污染物具有一定的抑制能力, 且较白皮大蒜强, 在培养物转入继代培养基后, 由于继代培养基中加入酪蛋白水解物成分, 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表现。

另一方面, 从以上结果可知, 4℃ 冷藏有利于抑菌, 减少污染率, 对相同的材料, 冷藏处理均可减少 12% 以上的污染率。其原因可能是冷藏使组织携带的微生物生命力减弱, 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 开始外植体表皮中间部位干裂, 组织外翻, 随着细胞的进一步分裂, 蒜瓣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。

对白皮大蒜, 其形成基本不变的的生长前期相对较长, 约为 7 d, 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绿色逐渐变浅消失, 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, 与大头蒜作比较如表 2。

## 2.3 外植体大小、取材部位对愈伤组织产生的影响

除种胚外, 外植体所取部位均为大蒜蒜瓣顶部近生长点处, 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, 18d (1 次继代期) 后统计愈伤组织的产生情况, 对其结果作比较如表 3。

表 2 不同品系大蒜产生愈伤组织过程比较  
Table 2 A contrast of callus induction in different garlic species

品系 Species	出愈时间(d) Time of callus appear	颜色 Callus color	产生部位 Place of callus appear	外观 Appearance of callus
白皮大蒜 <i>A. sativum</i> var. Taihe garlic	18	淡黄, 浅绿偶有 红褐色	组织表皮的中间部位	致密
大头蒜 <i>A. ampeloparsum</i>	6	浅黄, 红褐色	从组织与培养基接触处开始, 整个组织膨大形成	松脆

表 3 外植体大小、取材部位对愈伤组织产生的影响  
Table 3 Callus induction of different explants and different explant size in two garlic species

品系 Species	外植体种类 Kind of explant	外植体大小 (cm) Size of explant			
		0.5 × 0.3 × 0.2	0.4 × 0.2 × 0.1	0.3 × 0.2 × 0.1	0.2 × 0.2 × 0.1
白皮大蒜 <i>A. sativum</i> var. Taihe garlic	带表皮	+++	++	++	
	不带表皮	—	—	—	—
大头蒜 <i>A. ampeloparsum</i>	带表皮	+++	++	+	—
	不带表皮	—	—	—	—
	种胚	—	+++	—	—

注: +++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。

Note: +++ a large number callus appear; ++ some callus grow; +only a little callus grow; —No callus or very little, only epidermis split vertically.

从表 3 可见, 外植体的取材部位对 large number callus appear; ++ some callus grow; +only a little callus grow; —No callus or very little, only epidermis split vertically.

从表 3 可见, 外植体的取材部位对愈对组织产生的影响极大, 不管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, 任何情况均不产生愈伤组织; 另一方面, 愈伤组织的产生与与外植体的大小有关, 对以上 4 种不同规格大小的外植体, 愈伤组织在一个继代期产生的量随外植体的增大而增多, 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。

此外, 在试验中还发现, 大头蒜外植体愈伤组织的产生与该外植体的来源蒜瓣状态有关, 从较大且颜色较白的蒜瓣取材的外植体产生的愈伤组织量较少且在培养过程中容易褐变, 外观较为松脆。

## 2.4 冷藏处理与愈伤组织的产生

将大蒜置 4℃ 冷藏 18 d, 室温放置对照, 以同样的方法进行表面消毒, 置 600 lx 光照下进行愈

伤组织诱导, 18 d 后调查愈伤组织诱导效果, 结果如表 4。

如表 4 所示, 冷藏处理对愈伤组织产生有一定作用, 可使两种大蒜的愈伤组织出现时间略为推迟约 1~2 d。低温处理对白皮大蒜外植体产生愈伤组织的颜色、外观和生长量的影响均不明显, 但对大头蒜的上述诸特征却有一定影响, 可使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 4 冷藏处理对大蒜愈伤组织产生的影响  
Table 4 Effect on garlic callus induction by different temperature pre-treatment

品系 Species	前处理 Pre-treatment	愈伤组织出现时间(d) Time of callus appear	颜色 Callus color	外观 Callus appearance	愈伤组织生长量 Quantity of callus growth
白皮大蒜 <i>A. sativum</i> var. Taihe garlic	4℃ 冷藏 18 d	8~10	白至浅绿、淡黄	隆起, 致密	++
	室温保存(CK)	6~8	白至浅绿、淡黄	隆起, 致密	++
大头蒜 <i>A. ampeloprasum</i>	4℃ 冷藏 18 d	7~9	黄棕色或黄褐色	皱缩, 不规则	+
	室温保存(CK)	6~8	淡黄	平滑, 堆积生长	++

注: ++愈伤组织多; +愈伤组织较多 Note ++Many callus grow; +some callus grow

### 3 结论

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。本试验中, 不论大蒜前处理为 4℃ 低温冷藏还是室温条件, 大头蒜的诱导污染率均低于白皮大蒜, 而且 4℃ 低温冷藏 18 d 有一定抑菌作用, 可减少外植体出愈污染, 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, 当外植体较大 (0.5 cm × 0.3 cm × 0.2 cm) 时, 继代时期愈伤组织产生最较多; 随着外植体变小, 愈伤组织产生量也变少, 而当外植体偏小 (0.2 cm × 0.1 cm × 0.1 cm) 时, 极少产生愈伤组织。低温冷藏对愈伤组织诱导的影响也因品种而导。低温冷藏对大头蒜愈伤组织诱导有一定影响, 但对白皮大蒜影响不大。冷藏可推迟出愈 1~2 d。同时, 由于外植体的差异, 所形成的愈伤组织也会出现生长、形成发育的差异, 部分愈伤组织在一定的培养条件下生长快速, 部分则生长缓慢; 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小细胞团。本实验室需要这种愈伤组织来开展进一步研究。

### 参考文献:

- (1) 张毅. 大蒜细胞培养及其超氧化物歧化酶SOD积累的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1993
- (2) 翁清清, 俞建瑛, 陶宗晋. 人血红细胞的超氧化物歧化酶纯化及其稳定性的研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20(4): 357~363
- (3) 刘高琼, 李式军. 大蒜试管茎微繁殖技术研究[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 31~36
- (4) 李昌华, 李式军. 大蒜茎尖脱毒技术及组织培养研究[J]. 华北农学院学报, 1995, 10(3): 20~25
- (5) Schavemaker C M, Jacobsen E. Development of a cyclic somatic embryogenesis regeneration system for leek (*Allium ampeloprasum* L.) using zygotic embryos[J]. *Plant Cell Rep.*, 1995, 14(4): 227~231
- (6) Mohamed-Yasseen Y, Sheryl A, Barringer *et al.* In vitro shoot proliferation and plant regeneration from kurrat (*Allium ampeloprasum* var. kurrat) Seedlings[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 40(2): 195~196
- (7) Koch M, Tanami Z, Salomon R. Improved Regeneration of Shoots From Garlic Callus[J]. *Hotscience*, 1995, 30(2): 378
- (8) Myers J M. Induction and regeneration of callus in suspension culture of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. *In Vitro.*, 1995, 31(3): 2~54A
- (9) 王霖. 大蒜细胞培养及产超氧化物歧化酶的动力学规律研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1997
- (10) 刘叔文. 大蒜细胞SOD的诱导及分离纯化的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1996