

大蒜茎尖脱毒培养及快繁技术研究

张寒霜¹, 赵俊丽¹, 李伟明¹, 付书平¹, 王书生²

(1. 河北省农林科学院棉花研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 石家庄市农业局, 河北 石家庄 050051)

摘要:以河北省两个名优地方品种安国大蒜和永年大蒜为试材, 用 M_s , B_5 作基本培养基, 研究了大蒜茎尖繁殖脱毒快繁技术。结果表明, 最佳诱导培养基为 $B_5 + 0.1 \text{ mg/L NAA} + 3 \text{ mg/L 6-BA}$, 但是, 激素、营养物质的添加数量以及培养时期不同品种间有差异; 剥离大蒜茎尖带一定数量的鳞片为好, 其不仅可提高脱毒苗成活率, 而且有利于扩大茎尖繁殖系数。无毒蒜大田扩繁的播种时间对产量有一定影响, 且品种间差异较大。

关键词: 大蒜; 茎尖培养; 脱毒; 快繁

中图分类号: S633.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)增刊-0117-03

Virus Elimination and Rapid Propagation of Garlic by Biotechnology

ZHANG Han-shuang¹, ZHAO Jun-li¹, LI Wei-ming¹, FU Shu-ping¹, WANG Shu-sheng²

(1. Institute of Cotton, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China;

2. Shijiazhuang Agriculture Bureau, 050051, China)

Abstract: The virus-eliminating technology with shoot-tip culture and rapid propagation of two local famous elite garlic varieties in Hebei province were studied. The results indicated that the best induce medium for bud propagation was $B_5 + 0.1 \text{ mg/L NAA} + 3 \text{ mg/L 6-BA}$. The numbers of hormone and nutritious and the period cultured were different in different varieties. The garlic shoot-tip with some bud scale is better for culturing. It can increased the survival rate of virus eliminating seedling and propagate rate. The period of virus eliminating garlic be transplanted plant effect the yield and significant different in two varieties.

Key words: Garlic; Biotechnology; Virus elimination; Rapid propagation

大蒜(*Allium sativum* L.)在我国已有 2000 多年的种植历史, 对人类具有重要的食用和医疗保健价值^[1]。我国不仅是世界最大的大蒜生产、消费和出口国, 也是大蒜品种资源最为丰富的国家之一^[2]。大蒜的花粉通常是败育的, 主要靠无性繁殖, 病毒病发生普遍, 给生产带来极大的损失。据报道, 中国、美国、法国、日本等大蒜生产国的大蒜田间自然发病率均为 100%^[3~5]。近年来, 由于病毒病的危害, 我国大蒜种性普遍退化, 单产降低, 品质变劣, 较大程度影响了大蒜产量和产品出口, 一些名优特种大蒜受病毒危害濒于绝种。虽然, 国内外专家进行多方面的努力, 但目前仍无特效药剂防治植物病毒病, 只有通过茎尖组织培养及热处理获得脱毒大蒜才是防

治大蒜病毒病的一条重要途径。1964 年 Marrou 等^[6]采用热水处理大蒜鳞茎, 但未达到脱毒的目的, 到 1972 年 Mori 等用茎尖培养的方法才得到无毒植株, 我国也有一些成功的报道。田间调查表明, 我省名优品种安国大蒜、永年大蒜均不同程度的感病, 表现为花叶、卷叶、矮化等症状, 蒜头明显变小, 并失去了原品种四、六瓣的特性, 出现多瓣现象, 品质及产量都大幅下降, 急需人工脱毒恢复其原有种性。但是, 由于不同品种遗传生理上存在较大差异, 对脱毒技术要求也各不相同。本研究旨在对安国、永年大蒜利用生物技术进行脱毒快繁, 并探索一套适宜我省名优大蒜地方品种脱毒快繁的技术。

收稿日期: 2006-05-22

基金项目: 河北省科技厅项目(03220186D); 河北省科院项目(A03-2-02-56); 安国县农业局合作项目

作者简介: 张寒霜(1965-), 女, 河北清河人, 副研究员, 主要从事生物技术研究。

1 材料和方法

1.1 试验品种

安国县农业局提供染毒安国大蒜,植株矮小,叶片花卷,蒜头多瓣,蒜瓣大小不一。永年县农业局提供的染毒永年大蒜,株型矮化,蒜薹品质变劣,产量降低,蒜瓣小且极不整齐。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获得并脱毒 剥去蒜皮,用自来水冲洗 0.5 h 左右,放入 0.1% HgCl_2 消毒灭菌 15 min,用无菌水认真冲洗 7 次。在超净工作台解剖镜下,剥取大蒜茎尖 0.2~0.5 mm,接种到培养基上,进行无菌茎尖培养。

1.2.2 培养条件 培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度 2 000~3 000 lx,光照培养 16 h,暗培养 8 h。

1.2.3 培养 将剥取的茎尖,放置在 M_5 或 B_5 附加不同激素(6-BA, 2,4-D, NAA)与浓度配比的培养基上,培养 2~3 周,长出绿色幼芽转入增殖培养基扩

大繁殖,增殖 2~3 代再转移到生根培养基上生根。

1.2.4 移栽 将生根后的脱毒苗,分期分批移栽到已灭菌的装有灭菌蛭石的营养钵内。为防治蚜虫传染病毒,营养钵应放置在防虫网室。

1.2.5 大蒜病毒检测 将剥离的大蒜茎尖置于培养基上培养 2 个月后,取部分愈伤组织或小苗,并将其捣碎,研磨,制成组织汁液,用磷酸盐做缓冲液在 3 000 r/min 离心 20 min,弃去残渣,取上清液,用 2% 磷钨酸(pH6.8)负染色 1~2 min,在电镜下观察,并以未脱毒样品做对照,确认所含病毒的基本形态和特征。

2 结果与分析

2.1 培养基筛选

分别以 M_5 和 B_5 为基本培养基,在 6-BA 和 NAA 适当浓度、配比的基础上,进行甘氨酸加倍,并选用葡萄糖或蔗糖 2 种处理,观察培养茎尖的多芽分化率变化,结果发现在不同培养基上多芽分化率及状态有很大不同。

表 1 培养基对茎尖幼苗状态的影响

Tab.1 Effect of medium on the state of tip-shoot

基本培养基 + (0.1 mg/L NAA + 3 mg/L 6-BA) Basic medium + (0.1 mg/L NAA + 3 mg/L 6-BA)	出愈率(%) Percentage of callus	正常苗率(%) Percentage of normal seedling	玻璃化率 Percentage of vitrification	分蘖率 Percentage of tillering
M_5 + 葡萄糖	65	35	严重	26
M_5 + 葡萄糖 + 甘氨酸加倍	81	19	严重	20
M_5 + 蔗糖	38	62	少	80
M_5 + 蔗糖 + 甘氨酸加倍	51	49	少	65
B_5 + 葡萄糖	5	95	少	85

由表 1 看出,大蒜茎尖在以 B_5 为基础的培养基上生长比 M_5 为基础的培养基好,出愈率低,玻璃化较轻。在 M_5 培养基上加葡萄糖茎尖生长很差,愈伤率高,且生长畸形苗多,玻璃化严重。在以 M_5 为基础的培养基上甘氨酸加倍与否,都会减少正常苗率,增加玻璃化程度,降低分蘖率。因此,大蒜茎尖培养在 B_5 + 葡萄糖和 M_5 + 蔗糖这两个培养基上较好。此外,经观察发现有部分茎尖生长到 80 d 左右时,基部变褐,有一些根形成。

2.2 不同浓度激素配比分析

以 B_5 为基本培养基进行不同激素浓度配比试验,统计诱导芽率及生长情况(表 2)。从诱导芽率方面来看,两个激素浓度配比(6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L)出芽率均较高。结合生长发育情况分析,6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 浓度配比最好,不但成苗率高,而且生长状态较好。任何添加 2,4-D 的配比诱导芽率均不高,而且芽点愈伤化严重,生长状态不理想,所以

在诱导茎尖的过程中不要添加 2,4-D。

2.3 高分蘖率培养基的确立

研究还发现,改良培养基(M_5 -4 + 6-BA + NAA + 1/2 甘氨酸)有利于大蒜茎尖生长、分化分蘖,出芽率 100%,平均分蘖芽数 6.0 个,最高可达 9 个,愈伤化比例较低。

2.4 不同大蒜品种间休眠期差异分析

不同大蒜品种对培养基的反应差异不大,但休眠时间差异较大,同时打破休眠的时间差异也较大。安国大蒜休眠时间长(6 个月以上),因此,打破休眠冷藏处理时间长些,以 4 $^\circ\text{C}$ 、30 d 较好;而永年大蒜冷藏 4 $^\circ\text{C}$ 、20 d 即可得到理想的效果。

2.5 剥离茎尖大小对脱毒效果及成活率的影响

以剥离大蒜茎尖不带叶原基、一个叶原基、两个叶原基、三个以上叶原基进行优化培养,分析其脱毒效果。结果发现,大蒜剥离茎尖的大小影响小芽分化率,茎尖越小,出愈率越高,愈伤化越厉害,成苗率越低。因此在保证一定脱毒率的情况下,带有一定

数量的苞叶对扩大茎尖繁殖系数较为有利,组织培养获得的脱毒苗成活率高,效果最好(表3)。

表2 不同浓度激素对比对芽诱导和生长的影响

Tab.2 Effect of hormone on inducement and growth of shoot

浓度(mg/L) Concentration	接种外植体数 Number of explant	出芽个数 Number of bud	诱导率(%) Percentage of inducement	生长情况 Speed of growth
6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	26	52	+
6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	30	60	+
6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	39	78	++
6-BA 3.0mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	50	100	+++
6-BA 4.0mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	50	100	++
2,4-D 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	25	50	-
2,4-D 0.5mg/L + NAA 0.1 mg/L	50	20	40	-
2,4-D 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L	50	10	20	-
2,4-D 2.0mg/L + NAA 0.1mg/L	50	5	10	-

表3 茎尖大小对成活率及脱毒率的影响

Tab.3 Effect of size of tip-shoot on percentage of survival and virus elimination

茎尖大小 Size of tip-shoot	启动时间(d) Time of initiation	出愈率(%) Percentage of callus	存活率(%) Percentage of survival	茎尖分化率(个) Percentage of differentiation	脱毒率(%) Percentage of virus elimination
无苞叶	20	60	30	1~2	100
1个苞叶	15	20	60	3~4	93
2~3个苞叶	7	15	80	5~6	88

2.6 病毒检测结果

随机取再生大蒜幼苗50份,用未经脱毒的大蒜幼苗做对照,进行检测,检测结果按照病毒含量不同分为三级。对照100%含病毒,且病毒含量较高;有61%再生植株基本不含病毒,即脱去了病毒;有29%含毒量降低,也就是脱去了部分病毒;另外10%的植株,含毒量仍较高,但与对照比,含毒量仍有降低。所以,茎端组织培养在不同程度上都有降低病毒含量的效果。

2.7 大田扩繁

脱毒一代及二代原种的繁殖工作均要在保护地进行,土壤事先要消毒,而且脱毒效果的检测工作一直跟踪进行。将已获得大蒜脱毒微型蒜种,种植在无病保护地,并定期观察记载生长情况。剔除病株及生长不正常的变异植株,标记符合品种特性的健壮植株,并对不同脱毒条件下获得的微型蒜种生长状态进行观察,选择较优脱毒体系。从试验调查结果看,脱毒后大蒜长势较好,苗病很轻,植株长势正常,且蒜头生长比较整齐,克服了脱毒前大蒜头多瓣现象,恢复了原品种4~6瓣的特性,提高了利用价值。永年大蒜蒜薹、蒜头品质、产量均有了较大提高,增产100%左右。

3 讨论

B₅ + 葡萄糖培养基可作为大蒜茎尖培养主要培养基,但是由于品种遗传生理之间的差异,其他激素

和营养物质需要依据品种特性另行测试调配。用于培养的大蒜茎尖,最好要带有一定数量的苞叶,其不仅可提高脱毒苗成活率,而且有利于扩大茎尖繁殖系数。从脱毒大蒜的病毒检测结果可以看出,虽然经过茎尖培养,脱毒效果十分明显,但仍有10%左右的材料携毒量很高,因此,必须进一步加强脱毒方法的研究与改进,以更大程度的提高脱毒效果。无毒蒜大田扩繁的播种时间,对产量有一定影响,且品种间差异较大,应根据具体品种特点,建立与之相应的配套栽培技术,特别提出的是,安国大蒜秋季播种抽薹不良,容易产生气生鳞茎二次生长,产量影响较大,以春天播种为好。

参考文献:

- [1] 陆帼一.大蒜高产栽培[M].金盾出版社,2000.
- [2] 徐培文.脱毒大蒜速繁途径探讨和良繁体系的建立[J].中国蔬菜,1993,(5):9-13.
- [3] Walkey D G A, Webb M J W, Bolland C J *et al.* Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem culture[J]. Journal of Horticulture Science, 1987, 62 (2): 211-220.
- [4] 栾非时.脱毒大蒜花原始体培养增殖技术的研究[J].中国蔬菜,1995,(3):4-6.
- [5] 李昌华,李小川,赵美华,等.大蒜茎尖脱毒技术及组织培养研究[J].华北农学报,1995,10(3):20-25.
- [6] 王纪方.蔬菜组织培养[M].上海:上海科学技术出版社,1983.