

# 大蒜分生组织培养脱病毒 和快速繁殖技术

高山林<sup>1)</sup> 金雍安<sup>2)</sup> 蔡朝晖<sup>1)</sup> 刘立军<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>中国药科大学遗传育种教研室, 南京 210038; <sup>2)</sup>江苏外贸进出口集团有限公司, 南京 210001)

**摘要:** 采用茎尖分生组织培养技术, 获得了大蒜(*Allium sativum* L.)的无病毒试管苗。通过基本培养基和激素配比试验, 筛选出最佳的培养基组成, 进行脱病毒苗的快速繁殖。结果表明: 诱导愈伤组织的最适培养基为: MS+BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 月生长率达 12.70 倍; 诱导丛生芽的最适培养基为: B<sub>5</sub>+BA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L, 丛生芽繁殖系数高达 25.5 倍, 技术上达到了快速繁殖规模生产的要求。用电子显微镜反复进行了病毒检测, 其中有 5 个样品脱病毒彻底, 将作为今后提供无病毒优质种苗的原种苗。

**关键词:** 大蒜; 脱病毒; 分生组织培养

**中图分类号:** S633.4; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)03-0015-04

**Virus-free culture and rapid-propagation from shoot apex of *Allium sativum* L.** GAO Shan-lin<sup>1)</sup>, JIN Yong-an<sup>2)</sup>, CAI Zhao-hui<sup>1)</sup>, LIU Li-jun<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup> Department of Genetics & Breeding, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038; <sup>2)</sup> Import & Export (Group) Corporation of Jiangsu, Nanjing 210001), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(3): 15~18

**Abstract:** Virus-free materials of *Allium sativum* L. were obtained from *in vitro* shoot apex tissue culture. A series of optimization experiment for cultural medium composition, concentration of phytohormones were investigated with a view to accelerate the propagation of virus-free materials. The obtained results indicated that the optimized medium for inducing callus was MS + BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L. The growth rate of callus in one month was 12.70. The best medium for multiplying clumpy buds was B<sub>5</sub> + BA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L, the highest propagating ratio reached 25.5. These results could meet the technology requirements of rapid-propagation in large scale production. Virus-free materials were observed repeatedly under electron microscope, 5 virus-free samples were tested out which could be used to fast propagation for production.

**Key words:** *Allium sativum* L.; virus-free; shoot apex tissue culture

大蒜(*Allium sativum* L.)是江苏省外贸出口创汇的名特产品之一,它既可作为调味品,又是预防和治疗多种疾病的良药。大蒜主要利用鳞茎进行无性繁殖,但同时,其鳞茎又是产品<sup>[1]</sup>,因此病毒极易通过种蒜传播积累,并逐代加重,使大蒜的品质和产量下降,难以满足外商对出口大蒜的品质及规格要求。同时因种蒜感染病毒,大蒜一般减产 30%~60%,极大地影响了农民的收入。为此进行大蒜脱毒技术研究,以期进行大蒜无病毒苗的生产,从而提高出口大蒜的产量和质量,扩大创汇。

影响大蒜的病毒有大蒜花叶病毒(GMV)、大蒜潜隐病毒(GLV)及大蒜黄色条斑病毒(GYSV)。其中 GMV 是导致大蒜受害的主要病原。病毒在大蒜

鳞茎中分布不均匀,在感染植株体内,顶端分生组织一般无病毒或数量极少;在较老的组织中,病毒数量随分生组织到顶端的距离增加而增加,因此,切取种蒜长约 0.2~0.5 mm 的茎尖分生组织,经过愈伤组织诱导,胚状体分化再进行培养,则可获得无病毒苗。作者通过分生组织培养脱病毒技术,首先获得大蒜的无病毒苗,再通过培养技术的优化,进行基本培养基和激素配比试验,筛选出最佳的培养基组成,从而提高繁殖系数,大量繁殖无病毒试管苗,为今后

收稿日期: 2000-04-17

基金项目: 江苏外贸进出口集团有限公司委托和部分资助科研项目

作者简介: 高山林,男,1946年9月生,江苏江阴人,教授,长期从事药用和经济植物遗传育种、组织培养和脱病毒技术研究。

向生产上示范推广提供技术。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试大蒜 (*Allium sativum* L.) 由江苏省粮油食品进出口集团股份有限公司提供, 为江苏太仓大蒜的主栽品种。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获得 剥去蒜皮, 用洗衣粉浸泡 2 min, 再用流水冲洗 2 h 左右, 放入 2% NaClO 溶液中(加 3~5 滴吐温-20)消毒 20 min, 用灭菌蒸馏水冲洗 3 次以上。在超净工作台上, 于解剖镜下剥取大蒜鳞茎尖长约 0.2~0.5 mm, 接种到培养基上, 进行无菌茎尖培养。切取茎尖周围约 0.5cm × 0.5cm 的鳞茎块接种到不同培养基上, 作为对照, 置于 (25 ± 1) °C 暗培养。

1.2.2 基本培养基试验 将鳞茎块接种到分别附加 BA 0.5 mg/L 和 NAA 2 mg/L 的 MS、B<sub>5</sub>、Miller 和改良 White 4 种不同类型的培养基中, 培养 50 d 后收获, 计算接种量与生长率。

1.2.3 激素配比试验 在筛选出的最佳培养基上, 附加 5 种不同浓度的 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的激素组合, 每种培养基上接种大小一致(0.5cm × 0.5cm)的鳞茎块, 共接种 220 瓶, 每瓶 3 块, 2 周后观察, 50 d 后收获称重, 计算生长率, 并对外植体的愈伤组织发生、器官形成及繁殖速率进行观察记载。

1.2.4 诱导丛生芽试验 采用 B<sub>5</sub> 为基本培养基, 添加不同浓度的 NAA、IAA、6-BA。用大蒜的鳞茎或脱病毒的大蒜茎尖培养出的愈伤组织接种培养, 观察产生丛生芽的数量。

1.2.5 大蒜病毒检测 将剥离的大蒜茎尖(长约

0.2~0.5 mm)置于 MS 培养基上培养 2 个月, 长成球形胚状体或愈伤组织块, 将此材料捣碎, 研磨, 制成组织汁液, 用磷酸盐作缓冲液在 3 000 r/min 离心 20 min, 弃去残渣, 取上清液, 用 2% 磷钨酸(pH 6.8)负染色 1~2 min, 在电镜(JBM-100CXII 型)下观察, 每个样品做 3 个铜网, 每个铜网至少取 20 个以上不同视野检测病毒, 并以未脱病毒样品作对照, 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

在供试的 4 种不同类型培养基上, 鳞茎材料接种 10 d 后观察到切口处有黄白色膨松愈伤组织; 25 d 后, 大部分的膨松愈伤组织进一步分化成颗粒胚状体; 50 d 后, 对各处理进行统计, 称重, 计算生长率(见表 1), 并对生长率进行差异显著性测定。

结果表明: 以 MS 为基本培养基诱导愈伤组织的平均生长率最高, 为 5.90; B<sub>5</sub> 次之, 为 4.09。在 MS 和 B<sub>5</sub> 培养基上的愈伤组织可部分地分化成胚状体, 其中 B<sub>5</sub> 培养基上分化成胚状体的百分率最高, 达 31.3%。可见, MS 适合诱导愈伤组织, 而 B<sub>5</sub> 较适于诱导胚状体。鉴于诱导愈伤组织可以大大提高繁殖速度, 作者选用 MS 培养基为基本培养基。

### 2.2 激素和生长素的配比

以 MS 为基本培养基进行激素及生长素配比试验, 结果见表 2。由表 2 可以看出, 在添加 BA 0.2 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 组合的培养基上愈伤组织长势最好, 平均生长 12.70 倍, 经显著性测定表明与其他处理差异极显著; 凡添加 NAA 的培养基, 愈伤组织生长均比较好, 说明 NAA 具有明显促进愈伤组织生长的作用; 0.5 mg/L 的 NAA 对愈伤组织的生长有利, 浓度过高对愈伤组织的生长反而有抑制

表 1 大蒜鳞茎诱导愈伤组织的基本培养基试验

Table 1 Experiment of basic medium for inducing callus from shoot apex of *Allium sativum* L.

培养基 Media	N	接种量 Inoculated weight (g)	收获量 Harvested weight (g)	愈伤组织诱导率(%) Rate of inducing callus	诱芽率(%) Rate of inducing buds	生长率 Growth rate	显著性测验 Significant test	
							$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
MS	10	0.385 ± 0.033	1.542 ± 0.266	62.5	12.5	5.90 ± 0.087	a	A
B <sub>5</sub>	11	0.355 ± 0.045	1.040 ± 0.185	27.1	31.3	4.09 ± 0.930	b	A
Miller	11	0.346 ± 0.021	0.781 ± 0.076	18.8	0	2.20 ± 0.157	c	B
White	12	0.366 ± 0.032	0.786 ± 0.077	62.5	0	2.22 ± 0.167		B

作用;在NAA浓度较高时,BA对愈伤组织的生长影响不大;2,4-D不利于大蒜愈伤组织生长,说明2,4-D不适合用于大蒜组织培养。

#### 2.4 丛生芽的诱导和脱毒效果的对比

在诱导丛生芽试验中,设计了8种不同激素、生长素浓度配比的培养基,同时为了对比观察脱病毒

的效果,将未脱毒鳞茎块长出的愈伤组织和脱毒茎尖培养形成的愈伤组织分别接种于附加不同激素配比的B<sub>5</sub>培养基中,以比较脱毒材料与未脱毒材料在各种浓度激素、生长素培养基上诱导丛生芽的效果,培养36d或39d后统一观察记载,结果见表3。

表2 在MS培养基中添加激素配比试验

Table 2 Experiment of added different phytohormones in MS medium

处理组 No.	激素浓度 Concentration (mg/L)			接种量 Inoculated weight (g)	收获量 Harvested weight (g)	生长率 Growth rate	显著性测验 Significant test	
	BA	NAA	2,4-D				$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
1	0.2	0.5	-	0.29±0.029	3.68±0.051	12.70±0.78	a	A
2	0.2	1	-	0.27±0.045	2.28±0.070	8.45±0.91	c	B
3	0.2	2	-	0.28±0.022	2.75±0.023	9.55±0.71	b	B
4	0	2	-	0.27±0.032	2.39±0.192	9.97±0.98	b	B
5	0.5	-	2	0.25±0.021	0.55±0.093	2.22±0.66	d	C

表3 大蒜丛生芽的诱导

Table 3 Induction of clumpy buds of *Allium sativum* L.

处理组 No.	激素浓度(mg/L) Concentration of phytohormones			培养天数 Culture days	脱病毒材料 Virus-free materials		对照材料 Control materials		诱芽率 Rate of induced buds (%)
	BA	IAA	NAA		No.	芽平均数 Average no. of buds	No.	芽平均数 Average no. of buds	
1	0.5	0.2	-	39	18	25.5	21	4.9	94
2	0.5	0.5	-	39	18	21.4	21	3.3	69
3	0.5	-	0.2	39	18	18.4	21	1.6	64
4	0.5	1	-	36	15	18.1	21	0.7	61
5	1	0.5	-	39	18	11.2	21	2.3	60
6	1	1	-	36	15	6.2	21	1.3	44
7	1	-	1	36	15	5.1	21	1.0	39
8	2	2	-	36	15	3.3	21	0.2	33
平均值 Average						14.14		1.96	

从表3结果可见:(1)随着IAA和BA浓度的增加,诱导丛生芽的百分率及平均每块分化芽数均降低,说明较低浓度的IAA和BA较适宜诱导大蒜丛生芽;(2)对比处理1和处理3,BA浓度均为0.5mg/L,分别加入相同浓度的IAA、NAA,加IAA对芽的生长有利;而添加NAA,芽的生长相对较差。因此最佳激素组合应为BA0.5mg/L+IAA0.2mg/L,在这样的培养基上丛生芽繁殖系数高达25.5,为前人报道的3倍(图1和图2);(3)在本试验中观察到,凡是接种的脱毒愈伤组织材料均在半个月长丛生芽,而未脱毒大蒜基部诱导出来的愈伤组织则在25d后才有少量丛生芽长出,至收获时所有脱病毒的愈伤组织,诱导丛生芽的百分率为

100%,且平均每块长芽数为14.14,最后长成了小鳞茎;而未脱毒愈伤组织诱导丛生芽的百分率低,仅为21.4%,平均每块长芽数为1.96,前者的长芽数为后者的6.9倍。从外观上看,脱毒愈伤组织长出的芽数量多,粗壮,最长达8cm;而未脱毒的愈伤组织不仅生长慢,短小幼弱,最长不超过2cm,且有少量根部褐化。说明脱毒具有明显提高生长势,加快生长速度的效果。

#### 2.4 病毒检测结果

为了确认脱病毒效果,对大蒜鳞茎脱病毒前后的材料进行病毒检测,在未脱毒样品中,观察到大量线形病毒粒子,直径为10~13nm,长度不等,但大部分长600~800nm。对茎尖脱毒培养的16个样品



反复进行了病毒检测,其中有5个样品在所有视野中均没有观察到病毒,说明脱病毒彻底;其余11个样品的20个视野中,在1个或2个视野中有少量病

毒,予以淘汰。仅对5个脱病毒彻底的材料予以保留和繁殖,作为今后提供无病毒优质种苗的原种苗。



图1 诱导的大蒜丛生芽  
Fig. 1 Induced clumpy buds of *Allium sativum* L.



图2 脱病毒大蒜的试管苗  
Fig. 2 Growing virus-free plantlets of *Allium sativum* L.

### 3 讨论

(1) 目前,国内外对大蒜脱毒的研究较多,但由于大蒜品种不同,所用培养基、生长激素及培养条件不同,一般繁殖系数均为5~8倍,繁殖速率不高,在一定程度上限制了脱毒大蒜的大面积推广,但是利用本实验中诱导愈伤组织的最适培养基MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L和诱导丛生芽最适培养基B<sub>5</sub>+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L,繁殖系数最高达25.5倍,取得了最佳效果,为今后大面积示范推广奠定了良好的基础。

(2) 本试验用江苏地道大蒜品种——太仓大蒜作为实验材料,此品种的优点是:原种个大,蒜瓣饱满,不易干枯。据报道,这种大蒜脱病毒后再次感染较慢,可在5代内仍保持高产<sup>[2]</sup>,在本试验中观察到,接种的脱毒愈伤组织材料均在半个月内生出丛生芽,且平均每块长芽数多,粗壮并长成了小鳞茎。而未脱毒愈伤组织诱导丛生芽的百分率低,不仅生长慢,且有少量根部褐化,短小幼弱。说明脱毒具有明显提高生长势,加快生长速度的效果,预示今后生产上应用优质无病毒种蒜,必将大幅度提高产量和质量,产生明显的增产效益<sup>[2]</sup>。同时质量的提高将使出口大蒜的等级提高,达到扩大出口创汇的目的。

(3) 据周桂珍等<sup>[3]</sup>研究报告,苍山大蒜病毒的病原种类为大蒜花叶病毒(GMV)和大蒜潜隐病毒(GLV),GMV是导致大蒜受害的主要病原,而GLV则对大蒜的产量和品质无不良影响,因此今后可简化为对GMV的脱除和检测<sup>[4]</sup>。

(4) 本试验检测的病毒粒子长度600~800 nm,与法国、日本、新西兰报道的资料相一致<sup>[5,6]</sup>,为典型的大蒜花叶病毒(GMV)和黄色条斑病毒(GYSV),进一步证实了本研究检测结果的可靠性。

### 参考文献

- [1] 陈世儒,黄菊辉. 大蒜离体快繁与脱毒[J]. 园艺学报, 1991, 18(3): 245~250.
- [2] 徐培文,孙慧生,孙瑞杰,等. 大蒜茎尖培养脱毒及增产效果的研究[J]. 山东农业科学, 1991, (6): 6~10.
- [3] 周桂珍,曹鸣庆,裘季燕,等. 京郊大蒜病毒的研究及其鳞茎中病毒的脱除[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 145~149.
- [4] 刘延明,刘文英,曹鸣庆,等. 脱毒苍山大蒜原种繁育体系的建立及配套栽培技术[J]. 山东农业科学, 1991, (6): 3~5.
- [5] Conci V C, Moriconi D N, Nome S F. *In vitro* plantlet regeneration from callus in garlic (*Allium sativum* L.)[J]. Plant Physiology, 1987, 83(4): 77.
- [6] Rauber M, Grunewaldt J. *In vitro* regeneration in *Allium* species [J]. Plant Cell Report, 1988, 7: 426~429.

(责任编辑:惠红)