

# 嘉定白蒜脱毒微鳞茎诱导的快繁技术研究

高畅<sup>1</sup> 杨飞<sup>1</sup> 沈若刚<sup>1</sup> 赵颖雷<sup>2</sup> 李贤<sup>3</sup> 郑惠彪<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>上海蔬菜研究所, 上海 201899; <sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; <sup>3</sup>上海市农业科学院园艺研究所, 上海 201403; <sup>4</sup>上海惠和种业有限公司, 上海 201899)

**摘要:** 以嘉定白蒜为试材, 研究了不同茎尖脱毒方法与不同外植体启动培养基对嘉定白蒜无菌苗建立与脱毒率的影响、不同增殖培养基与切割方式对潜伏芽激活与增殖的影响, 以及组培苗分株等级标准与培养基配方对诱导组培微鳞茎形成的影响。结果显示: 带 1 个叶原基的茎尖, 在 MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基上成苗率高, 达 76%; 采用单株假茎去顶后, 取其基部 1.0 cm 假茎茎段, 再沿中轴线对半纵切的方式, 在 MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.10 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基上能较好地激活叶腋潜伏芽, 增殖倍数达 3.22; 1 个叶原基包裹的芽原基茎尖脱毒成效最好, 达 100%; 假茎茎粗 3 mm 的组培苗单株, 在 MS+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+糖 90 g · L<sup>-1</sup>、pH 为 7.0 的培养基中微鳞茎诱导率最高, 达 94.8%。茎尖脱毒方式、叶腋潜伏芽激活切割方式和组培微鳞茎诱导的培养基配方, 是嘉定白蒜脱毒与快繁的技术关键。

**关键词:** 大蒜; 茎尖脱毒; 组培微鳞茎; 快繁

嘉定白蒜闻名遐迩, 以其色泽白、蒜头肥大、肉质脆嫩、辛辣味浓、耐贮藏等独有特点, 曾是我国大蒜出口历史长、出口量大的重要品种之一, 为上海嘉定当地农民的增产创收发挥了重要作用。大蒜 (*Allium sativum* L.) 生产主要用鳞茎作为繁殖材

高畅, 女, 主要从事蔬果、花卉、木本等植物组培研究及生产工作,

E-mail: gao\_c@wellsseed.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 郑惠彪, 男, 高级农艺师, 总经理,

主要从事蔬菜遗传育种研究, E-mail: jia\_hb@wellsseed.com

收稿日期: 2018-07-18; 接受日期: 2018-09-27

基金项目: 上海市农委种业发展项目 [沪农科种字 (2016) 第 1-11 号],

上海市科委农业重点科技攻关项目 (17391903200)

料, 繁殖系数低, 而且繁殖器官也是产品器官, 栽培成本高。同时, 大蒜无性繁殖存在病毒感和积累的问题。病毒在植物体内争夺核酸和蛋白质等营养, 产生对植物有害的毒素, 受病毒影响的大蒜生长发育受阻, 种质退化严重, 导致大蒜生产上出现歉收甚至绝收 (周桂珍和曹鸣庆, 1989; 徐培文和杨崇良, 2000; 张威等, 2008)。受多种因素的制约, 近 30 a 来嘉定白蒜的种植和出口每况愈下。传统的留种方式已不足以抵御病毒病危害, 难以再持续发挥嘉定白蒜的品种优势, 采用现代生物技术恢复和改良嘉定白蒜的种性已刻不容缓 (周绪元等,

**Abstract:** The joint toxicity of mixing fluopyram with pyrisoxazole at different matching ratios against *B. cinerea* XSZH1 was determined by measuring mycelial growth rate test. The inhibitory activity of the mixture with the other 4 isolates of *B. cinerea* was also determined by the same method. The efficacy in controlling tomato gray mould was tested through field trials. The results showed that synergia effect against *B. cinerea* of mixing fluopyram with pyrisoxazole were found at the ratios of 2 : 1 and 1 : 4, while the ratio of 2 : 1 exhibited the most obvious synergia effects, the synergistic coefficient was 1.69. The mixture of fluopyram with pyrisoxazole, at the ratio of 2 : 1, also showed synergistic inhibition to the other 4 isolates. The control effect of this mixture (2 : 1) against tomato gray mould was 80.50%–90.13%, under the dose of 150–250 g · hm<sup>-2</sup>. The mixture of fluopyram and pyrisoxazole (2 : 1) could effectively control tomato gray mould. It is suitable to use this mixture in field application and extension.

**Key words:** Fluopyram; Pyrisoxazole; *Botrytis cinerea*; Synergia effect; Control effect

2003; 李皓和陈嘉瑞, 2006)。

本试验以嘉定白蒜为试材, 研究了组培茎尖脱毒技术、诱导组培微鳞茎技术, 旨在从根本上解决田间蒜瓣无性繁殖感染病毒后引起的种质退化问题。以组培诱导形成微鳞茎的工厂化快繁方式, 革新了普通大蒜组培苗出苗方式, 有效降低了组培苗驯化成本, 促进了组培脱毒微鳞茎至脱毒种蒜培育的长周期产业链发展, 可有效地挽救和传承嘉定白蒜地理标志声誉, 恢复嘉定白蒜的国际市场竞争力。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试嘉定白蒜取自上海市嘉定区, 2016年9月种植于上海惠和种业有限公司嘉定白蒜种蒜繁殖基地(上海市嘉定区沪宜公路5062号)。2017年5月由上海蔬菜研究所专业人员, 对采收的嘉定白蒜蒜头进行种源鉴定; 然后选取蒜瓣7~8瓣, 蒜瓣高度3~4 cm, 单瓣质量6~8 g, 色泽白、蒜头肥大、肉质脆嫩、辛辣味浓的具有嘉定白蒜典型特征的蒜头作为外植体供试材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体脱毒茎尖获取方式与无菌苗培养基设计 茎尖脱毒方式: 取大蒜鳞瓣, 剥去大蒜皮, 用自来水冲洗干净, 再用75%酒精消毒60 s, 倒出酒精后用无菌水冲洗2次, 然后再用20%的次氯酸钠溶液消毒10 min, 最后用无菌水冲洗5次(海燕等, 2010)。剥取切割获得蒜心中部的蒜芽, 高度1.0~2.0 cm(带底部基盘), 再将蒜芽外层包裹的叶片在40倍解剖镜下剥除, 最后获取3种茎尖等级, 分别是完全不带叶原基包裹的纯芽原基生长点、带1个叶原基包裹的芽原基生长点, 以及带2个叶原基包裹的芽原基生长点, 依次记为茎尖1、茎尖2和茎尖3。对照(CK)为不剥取茎尖脱毒、高度1.0 cm的蒜芽, 记为茎尖4。

无菌苗培养基设计: 茎尖接种启动培养基的基础培养基为MS, pH为5.8, 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 琼脂 $6.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养基中添加不同浓度6-BA( $0.5$ 、 $1.0$ 、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )与NAA( $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )(林碧英和傅睿清, 2008; 刘苗苗等, 2017)。

以不同茎尖脱毒方式、不同6-BA与NAA浓度作为影响因素, 套用三因素三水平正交试验表设

计试验, 试验处理编号与因素水平组合见表1。

接种及培养方法: 每个编号的处理包含10个样本, 5次重复, 10个处理共接种茎尖500个。接种材料经暗培养5~7 d后转光培养, 培养温度 $23\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 光照强度 $1\ 000\sim 2\ 000\text{ lx}$ , 光照时间 $14\sim 16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ (冯缨等, 1993; 汤青林等, 2006)。外植体接入培养基培养7 d后查除污染, 无污染茎尖经过30 d培养后统计无菌苗成活率。

1.2.2 潜伏芽激活与增殖培养基的设计 外植体在启动培养基上形成无菌苗后, 采用3种切割方式激活潜伏芽: ①切除部分顶叶, 取单株高3.0 cm; ②将单株假茎去顶, 取单株高1.5 cm; ③将单株假茎去顶, 取单株高1.0 cm, 再沿中轴线对半纵切假茎; 分别记为切割1、切割2、切割3; 对照(CK): 高5 cm的单株, 保留单株顶部, 记为切割4(图1)(王云云等, 2013)。

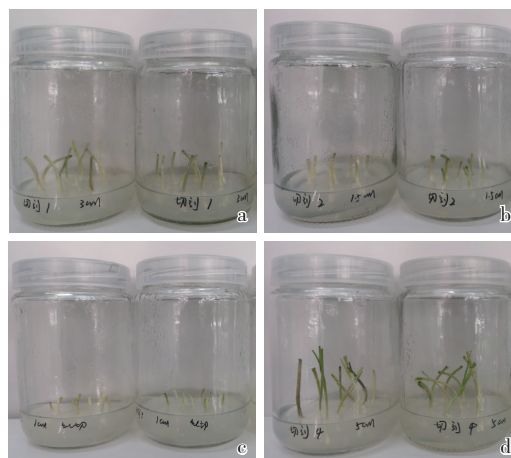


图1 潜伏芽激活切割方式

a, 切割1; b, 切割2; c, 切割3; d, 切割4。彩色图版见《中国蔬菜》网站: [www.cnveg.org](http://www.cnveg.org), 下图同。

增殖培养基设计: 基础培养基采用MS培养基, pH为5.8, 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 琼脂 $6.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 培养基中添加不同浓度6-BA( $0.5$ 、 $1.0$ 、 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )与NAA( $0.05$ 、 $0.10$ 、 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )(张素芝和李纪蓉, 2006a; 孔素萍等, 2010)。

以不同潜伏芽激活切割方式、不同6-BA与NAA浓度作为影响因素, 套用三因素三水平正交试验表设计试验, 试验处理编号与因素水平组合见表2。

接种及培养方式: 每处理接种30株, 5次重复, 10个处理共接种试管苗1500株。培养温

度 23~25 ℃, 光照强度 2 000~3 000 lx, 湿度 50%~60%, 光照时间 14~16 h·d<sup>-1</sup>, 培养 28 d 后统计无菌苗腋叶间潜伏芽的增殖倍数(董瑞等, 2013)。

增殖倍数 = 28 d 后瓶内芽总数量 / 原始接种茎段数量

1.2.3 茎尖脱毒效果的 PCR 分子检测 将 1.2.2 中获得的单株系增殖材料, 根据 1.2.1 脱毒茎尖获取方法的不同, 利用 PCR 技术进行大蒜组培茎尖脱毒效果检测(张威等, 2008)。

试验方法 1: 根据 1.2.1 中 3 种脱毒茎尖获取方法, 各取 2 个株系产生的嘉定白蒜茎尖试管苗, 分别记为茎尖 1、茎尖 2、茎尖 3, 送样至上海农业科学院进行 PCR 分子水平的病毒检测。按照反转录试剂盒的要求抽提 RNA, 并合成 cDNA, 作为 PCR 扩增的模板, 按照大蒜普通潜隐病毒(GCLV)中间保守序列设计 1 对引物(R44366=GCLV: 5'-GTGGTTTGAATGAA-3'; R44367=GCLV: 5'-CGATCCATTGAAGTTTGT-3'), 以反转录合成的大蒜 cDNA (S1, S2) 第一链为模板进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 ℃ 预热 10 min; 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 3 min, 共 35 个循环。采用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 片断(徐培文和杨崇良, 2000)。

试验方法 2: 单独检测以茎尖 2 方式获取的株系, 取 10 个株系, 重复试验方法 1 中的 PCR 分子检测程序。

1.2.4 组培微鳞茎诱导材料茎粗与不同培养基配方的设计 将 1.2.3 中病毒检测合格的株系增殖形成的芽团, 株高要求 3~4 cm, 按不同茎粗分成不同等级。以不同茎粗(1、2、3 mm), 不同 NAA(0.1、0.2、0.4 mg·L<sup>-1</sup>) 与糖(30、60、90 g·L<sup>-1</sup>) 浓度, 及不同 pH(5.8、6.3、7.0) 作为影响因素, 套用四因素三水平正交试验表设计试验, 试验处理编号与因素水平组合见表 3(张素芝和李纪蓉, 2006b)。

将不同茎粗的单株切除基部枯萎黄化老叶后接种, 每处理 50 株, 5 次重复。培养温度 16~22 ℃, 光照强度 800~1 000 lx, 湿度 50%~60%, 培养 14、35、50 d 后测定微鳞茎诱导率(赵彦杰, 2006)。

微鳞茎诱导率 = 微鳞茎形成个数 / 分株接种个数 × 100%

1.2.5 数据处理 使用 SPSS Statistics 23 软件对试验数据进行统计分析。采用单因素 ANOVA 进行多重比较, 采用 Duncan 进行差异显著性分析(P < 0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适茎尖脱毒方式与无菌苗培养基的筛选

由表 1 可以看出, 极差分析结果 R<sub>A</sub> > R<sub>B</sub> > R<sub>C</sub>, 即各因素对无菌苗成苗率的影响程度为 6-BA > NAA > 茎尖脱毒方式, 其中 6-BA (P = 9.32 × 10<sup>-10</sup>) 与 NAA (P = 1.0 × 10<sup>-6</sup>) 对成苗率的影响达极显著水平; 正交优化最佳培养条件为

表 1 不同茎尖获取方法在不同培养基上嘉定白蒜的无菌苗成苗率

处理 编号	A 6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	B NAA/mg·L <sup>-1</sup>	C 茎尖脱毒方式	无菌苗成 苗率/%	无菌苗状态
1	0.5	0.1	茎尖 1	44 ± 5.5 cd	芽点扭曲、生长滞缓
2	0.5	0.2	茎尖 2	58 ± 8.4 b	顶芽伸展缓慢、叶色浓绿
3	0.5	0.4	茎尖 3	48 ± 13.0 bcd	顶芽伸展较慢、有松散透明愈伤组织
4	1.0	0.1	茎尖 2	76 ± 5.5 a	顶芽伸展正常、叶色嫩绿
5	1.0	0.2	茎尖 3	28 ± 8.4 e	顶芽伸展快、叶色嫩绿、有 1~2 个侧芽
6	1.0	0.4	茎尖 1	52 ± 8.4 bc	顶芽伸展缓慢、叶片扭曲、基部愈伤组织膨大松散透明
7	1.5	0.1	茎尖 3	44 ± 8.9 cd	芽点扭曲、有玻璃化
8	1.5	0.2	茎尖 1	30 ± 7.1 e	顶芽膨大、有玻璃化
9	1.5	0.4	茎尖 2	8 ± 8.4 f	顶芽肥大扭曲、玻璃化严重、基部愈伤组织膨大透明
CK	0	0	茎尖 4	42 ± 19.4 de	单芽深绿瘦弱, 生长缓慢
k <sub>1</sub>	50	55	42		
k <sub>2</sub>	52	39	47		
k <sub>3</sub>	27	36	40		
R	74	56	22		

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(P < 0.05), 下表同。

A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>, 即本试验处理 4, 当培养基中 6-BA 为 1.0 mg · L<sup>-1</sup>、NAA 为 0.1 mg · L<sup>-1</sup>、采用茎尖 2 时无菌苗成苗率最高, 达 76%。从无菌苗生长状态来看, 处理 4 无菌苗的顶芽伸展正常、高度 2.5 ~ 3.5 cm, 叶色嫩绿, 无菌苗建立效果最好 (图 2-a、2-b、2-c)。在较高的 6-BA 水平下, 无菌苗容易出现玻璃化现象, 顶芽肥厚且扭曲, 在 NAA 浓度同时升高时 (处理 9) 出现膨大透明的愈伤组织, 且无菌苗高度 1.5 ~ 3.5 cm, 呈水渍状透明, 玻璃化严重, 活性差。低激素水平则无菌苗生长速度缓慢, 对照培养基激素为 0, 未脱毒单芽深绿瘦弱, 生长缓慢, 无菌苗高度 0.5 ~ 1.0 cm。

## 2.2 潜伏芽激活与增殖培养基的筛选

极差分析结果显示 (表 2), R<sub>A</sub> > R<sub>B</sub> > R<sub>C</sub>, 说明各因素对增殖倍数的影响程度为 6-BA > NAA > 切割方式, 6-BA ( $P=5.25 \times 10^{-26}$ )、NAA ( $P=5.90 \times 10^{-16}$ ) 与切割方式 ( $P=7.59 \times 10^{-19}$ ) 对增殖倍数的影响极显著; 正交优化最佳条件为

A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub> (本试验处理 5), 即当培养基中 6-BA 为 1.0 mg · L<sup>-1</sup>、NAA 为 0.10 mg · L<sup>-1</sup>、采用切割方式 3 时潜伏芽增殖倍数最高, 达 3.22, 显著高于其他处理。采用切割 3 方法进行潜伏芽激活, 彻底破坏了大蒜的生长点, 增殖芽生长势良好, 株高 6 ~ 8 cm, 茎粗 1.5 ~ 2.0 mm (图 2-d); 切割 1 和切割 2 的方法均未有效破除生长点优势, 无论激素水平如何, 只

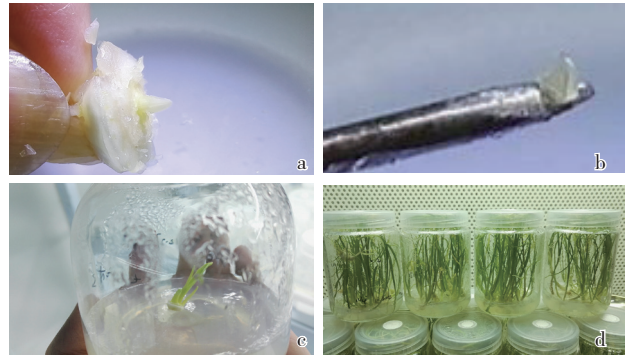


图 2 嘉定白蒜脱毒无菌苗的建立

a, 蒜芽带底部基盘; b, 茎尖 2; c, 无菌苗启动; d, 增殖芽。

表 2 不同潜伏芽激活切割方式与培养基配方组合处理下嘉定白蒜的增殖倍数

处理 编号	A 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	B NAA/mg · L <sup>-1</sup>	C 切割方式	增殖倍数	潜伏芽增殖状态
1	0.5	0.05	切割 1	0.78 ± 0.04 e	单株生长高度 4 ~ 6 cm、植株老化、无增殖
2	0.5	0.10	切割 2	0.95 ± 0.11 de	单株生长高度 4 ~ 6 cm、植株老化、无增殖
3	0.5	0.20	切割 3	0.15 ± 0.11 f	纵切假茎膨大形成透明愈伤组织、无潜伏芽激活、单株生长高度 1.0 ~ 2.0 cm、无增殖
4	1.0	0.05	切割 2	1.84 ± 0.20 b	单株生长高度 8 ~ 10 cm、较少增殖
5	1.0	0.10	切割 3	3.22 ± 0.16 a	潜伏芽激活早、生长正常、单株生长高度 6 ~ 8 cm、增殖多
6	1.0	0.20	切割 1	0.98 ± 0.11 d	单株生长高度 8 ~ 10 cm、植株基本膨大形成透明水渍状愈伤组织、无增殖
7	1.5	0.05	切割 3	0.95 ± 0.11 de	纵切假茎膨大形成透明愈伤组织、单株生长高度 1.0 ~ 2.0 cm、无增殖
8	1.5	0.10	切割 1	0.83 ± 0.19 de	单株生长高度 10 ~ 12 cm、玻璃化较多、无增殖
9	1.5	0.20	切割 2	1.31 ± 0.10 c	单株生长高度 8 ~ 10 cm、基部包裹透明无效愈伤组织, 少量增殖
CK	0	0	切割 4	0.97 ± 0.05 d	单株生长高度 8 ~ 10 cm、叶片包裹紧密, 无增殖
k <sub>1</sub>	0.63	1.19	0.86		
k <sub>2</sub>	2.01	1.66	1.36		
k <sub>3</sub>	1.03	0.81	1.44		
R	2.95	2.55	1.74		

保留原始单株生长, 无明显增殖或较少增殖。

## 2.3 茎尖脱毒效果检测

通过 3 种茎尖脱毒方式获得的 6 个株系, 病毒检测结果如图 3 所示, 茎尖 3 出现与对照一样 300 bp 的条带, 表明携带大蒜潜隐病毒 (GCLV), 其余株系均未检测出条带, 表明不携带 GCLV, 说明茎尖 1、茎尖 2 两种茎尖脱毒方式比较成功。

考虑茎尖 2 较茎尖 1 的获取方式难度小、成苗快、成本低, 有利于进行后续规模化生产, 因此抽样选取 10 个茎尖 2 方式获得的株系进行病毒检测, 结果表明全部株系茎尖脱毒成功 (图 4)。

## 2.4 微鳞茎诱导与培养基配方选择

由极差分析可知 (表 3), R<sub>D</sub> > R<sub>C</sub> > R<sub>A</sub> > R<sub>B</sub>, 表明糖对微鳞茎诱导率的影响最大, 其次

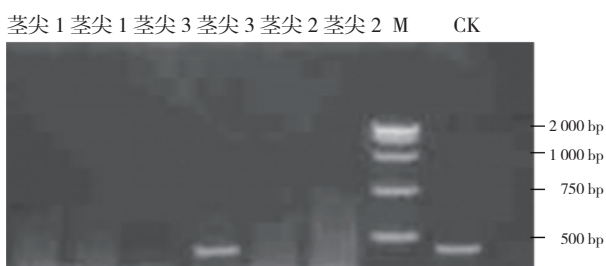


图3 3种茎尖脱毒方式的大蒜脱毒检测结果  
M, Marker; CK, 田间采集的携带 GCLV 的株系; 下同。



图4 茎尖2脱毒方式的大蒜脱毒重复检测结果

为茎粗、NAA、pH, 据差异显著性分析, 糖 ( $P=4.78 \times 10^{-19}$ )、茎粗 ( $P=5.80 \times 10^{-13}$ )、NAA ( $P=1.33 \times 10^{-11}$ )、pH ( $P=6.00 \times 10^{-6}$ ) 对微鳞茎诱导率的影响达到极显著水平。正交优化最佳条件为  $A_1B_3C_3D_3$ , 即本试验处理 3, 诱导因子为 NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 7.0、茎粗 3 mm、糖  $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时微鳞茎诱导状态最佳, 诱导率达 94.8%。据观察 (图 5), 处理 3 培养 14 d, 茎基部开始膨大, 外观可见直径 0.3~0.5 cm 的微鳞茎, 根原基形成; 培养 35 d, 植株叶片部分开始枯萎, 营养向基部输送, 微鳞茎膨大至 0.6~0.8 cm, 内部清晰可见叶片组织, 生根 3~5 条, 根长 2~4 cm; 培养 50 d, 植株叶片完全枯萎, 鳞茎内部叶片组织消失, 微鳞茎生长圆实, 直径 0.8~1.0 cm, 形成肉质大蒜, 根长

表3 不同茎粗等级与培养基配方对嘉定白蒜微鳞茎形成数量及大小的影响

处理 编号	A NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	B pH	C 茎粗/mm	D 糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	微鳞茎诱导 率/%	微鳞茎诱导状态
1	0.1	5.8	1	30	28.4 ± 8.4 ef	植株枯萎, 形成直径 0.1~0.3 cm 的不规则微鳞茎
2	0.1	6.3	2	60	44.0 ± 3.7 c	植株部分枯萎, 微鳞茎直径 0.3~0.6 cm, 内部叶片组织可见
3	0.1	7.0	3	90	94.8 ± 4.1 a	植株完全枯萎, 微鳞茎直径 0.8~1.0 cm, 圆实并休眠
4	0.2	5.8	2	90	52.0 ± 3.2 b	植株部分枯萎, 微鳞茎直径 0.8~1.0 cm, 内部叶片组织可见
5	0.2	6.3	3	30	35.6 ± 4.3 de	植株部分枯萎, 微鳞茎直径 0.8~1.2 cm, 形成空心不实的假鳞茎
6	0.2	7.0	1	60	34.0 ± 3.2 de	植株完全枯萎, 微鳞茎直径 0.1~0.3 cm, 形成空心不实的假鳞茎
7	0.4	5.8	3	60	40.8 ± 7 cd	基部愈伤组织膨大透明、微鳞茎直径 1.2~1.5 cm, 形成空心不实的假鳞茎
8	0.4	6.3	1	90	43.6 ± 10.1 c	基部愈伤组织膨大透明, 微鳞茎直径 0.1~0.3 cm, 形成空心不实的假鳞茎
9	0.4	7.0	2	30	24.0 ± 3.2 f	基部愈伤组织膨大透明, 微鳞茎直径 0.8~1.2 cm, 形成空心不实的假鳞茎
CK	0	7.0	0	0	4.4 ± 3.8 g	无微鳞茎形成
$k_1$	0.557	0.404	0.353	0.293		
$k_2$	0.405	0.411	0.400	0.396		
$k_3$	0.361	0.509	0.571	0.635		
R	0.588	0.316	0.652	1.024		

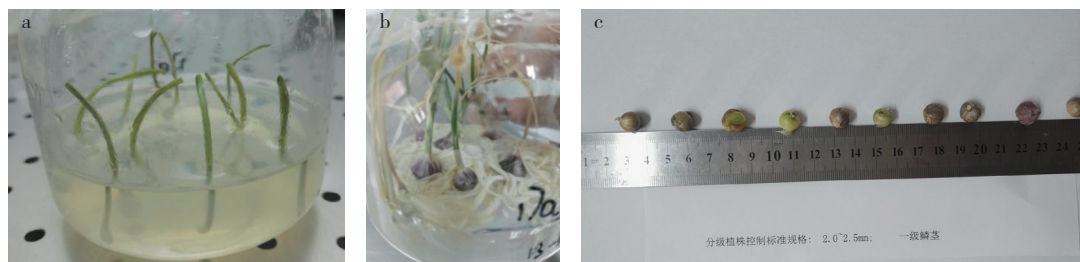


图5 嘉定白蒜组培微鳞茎的诱导

a, 单株茎粗 3 mm 接种诱导微鳞茎; b, 培养 35 d 的微鳞茎生长状态; c, 培养 50 d 生长圆实的微鳞茎。

4~6 cm。

### 3 结论与讨论

本试验通过 4 个阶段一系列的试验, 建立起一

套完整的、行之有效的嘉定白蒜脱毒微鳞茎诱导的快繁技术, 为组培脱毒微鳞茎工厂化培育至田间脱毒种蒜的应用, 提供了科技支撑。

第一阶段, 大蒜茎尖剥离方式是茎尖脱毒的

技术关键。采用3种茎尖脱毒方式及不同培养基培养,以正交试验设计,研究最适的脱毒茎尖获取方式,获得活性最好的无菌苗体系,茎尖1是无叶原基包裹的茎尖生长点,在操作过程中难度大、效率低,且培养易死亡;而包裹有2个叶原基的生长点(茎尖3),又容易在切割过程中加大带毒可能,造成脱毒失败。处理4:MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+茎尖2,可以得到成苗率76%、顶芽伸展正常、叶色嫩绿的无菌组培苗,为组培脱毒大蒜通往产业化发展建立了有效技术途径。

第二阶段,嘉定白蒜组培快繁增殖阶段,无菌苗潜伏芽的不同切割方式与培养基配方的优化是技术关键。大蒜组培的增殖系数较低,是因其保留了田间的生长特性,一个生长点只生长一株大蒜。本试验通过对无菌苗单株进行不同方式的切割,结合不同增殖培养基配方,进行正交试验设计。结果显示:采用切割方式3,纵切中轴,完全破坏大蒜唯一的茎尖生长点,是有效激活潜伏芽的切割方式(Mathew et al., 2011),结合增殖培养基MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.10 mg·L<sup>-1</sup>,增殖倍数达3.22,增殖芽生长势良好,株高6~8 cm,茎粗1.5~2.0 mm,可以满足组培规模化生产增殖技术需求。

第三阶段,结合第一阶段和第二阶段,在批量生产前需要对脱毒效果进行检测。采用PCR分子检测技术(Son et al., 2012),提取已经增殖的脱毒株系DNA进行病毒检测。结果表明,含1个叶原基包裹的芽原基生长点(茎尖2)脱毒率可以达到100%。采用此种脱毒方式,在组培规模化生产上成效性最好,可以大大缩短无菌脱毒苗建立的时间成本、有效降低生产成本。

第四阶段,假茎茎粗3 mm的组培苗单株,在MS+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>+糖90 g·L<sup>-1</sup>、pH为7.0的培养基中微鳞茎诱导率最高,达94.8%,是整体研究内容的创新之处所在。嘉定白蒜组培微鳞茎的诱导,以微鳞茎球的形式代替以往组培苗出苗的形式,可有效提高组培脱毒材料从组培恒温、恒湿、无菌等一系列的优越条件下,过渡到普通大棚穴盘育苗环境下的炼苗、驯化成活率(Nagasawa & Finer, 1988)。项目后续有必要进一步开展的研究工作:组培脱毒微鳞茎从组培室至育苗温室第1代的原原种培育、温室大棚原原种播种至第2代的原

种隔离培育、田间原种播种至生产良种第3代的快速加倍培育等关键技术。研究组培脱毒大蒜与普通田间生产大蒜之间的肥水管理技术、抗逆性差异、国际贸易出口标准品占比率等各项指标的提升与变化情况。希望嘉定白蒜组培脱毒技术的生产应用,能逐步影响全国范围的大蒜脱毒产业科技发展,实现科技创新技术服务农业产业化发展,提升产品核心竞争力,最终让农民受益。

#### 参考文献

- 董瑞,唐式敏,高杰.2013.2种脱毒方法对新疆大蒜的脱毒效果比较试验.蔬菜,(7):9-12.
- 冯纛,赵长生,卡德尔.1993.大蒜茎尖脱病毒微繁组织培养.干旱区研究,(3):72-73.
- 海燕,何宁,康明辉,赵永英,张丹,吉森.2010.大蒜茎盘离体培养影响因子分析.河南农业科学,39(10):110-111.
- 孔素萍,段乃彬,曹齐卫,徐培文.2010.大蒜鳞茎盘培养诱导簇生芽和微鳞茎.天津农业科学,16(2):152.
- 李皓,陈嘉瑞.2006.对建立大蒜脱毒种苗快繁体系的探讨.种子世界,(8):41.
- 林碧英,傅睿清.2008.植物激素配比对大蒜鳞茎盘培养体系的影响.福建农业科技,(6):71-72.
- 刘苗苗,程智慧,温艳斌,刘晓雪.2017.培养基和pH值对大蒜茎盘不定芽诱导的影响.西北农林科技大学学报:自然科学版,45(8):129-133.
- 汤青林,王志敏,宋明,王小佳,王平利,向巧彦.2006.大蒜不定芽的诱导及其增殖系数的调节.中国农学通报,22(6):224-226.
- 王云云,高宇,肖宇,孙力,徐浩然,聂迪,张兴,宋淑敏.2013.大蒜茎盘不定芽离体培养的研究.黑龙江科学,4(3):67-71.
- 徐培文,杨崇良.2000.中国主要大蒜品种和品系的病毒检测.山东农业科学,(2):27-28.
- 张素芝,李纪蓉.2006a.植物激素配比对大蒜茎盘愈伤组织再生体系的影响.种子,25(6):38-40.
- 张素芝,李纪蓉.2006b.影响大蒜试管鳞茎形成的因素分析.河南农业科学,35(11):93-96.
- 张威,张匀华,李学湛,高艳玲,白艳菊.2008.应用RT-PCR分子检测技术快速检测大蒜普通潜隐病毒.植物保护,34(1):133-137.
- 赵彦杰.2006.苍山大蒜脱毒繁殖技术的研究.作物杂志,(3):33-34.
- 周桂珍,曹鸣庆.1989.京郊大蒜病毒病的研究及其鳞茎中病毒的脱除.植物病理学报,19(3):145-149.
- 周绪元,李辉,王献杰,李晓晖.2003.脱毒苍山大蒜增产效果及应用价值研究.中国种业,(8):25.
- Mathew D, Forer Y, Rabinowitch H D, Kamenetsky R. 2011. Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic

(*Allium sativum* L.) genotypes. Environmental & Experimental Botany, 71 (2): 166–173.  
Nagasawa A, Finer J J. 1988. Development of morphogenic suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Tissue & Organ

Culture, 15 (2): 183–187.  
Son J H, Park K C, Lee S I, Kim H H, Kim J H, Kim S H, Kim N S. 2012. Isolation of cold-responsive genes from garlic, *Allium sativum*. Genes & Genomics, 34 (1): 93–101.

## Studies on Virus-free Microbulb Rapid Propagation Technology of Garlic Variety ‘Jiadingbaisuan’

GAO Chang<sup>1</sup>, YANG Fei<sup>1</sup>, SHEN Ruo-gang<sup>1</sup>, ZHAO Ying-lei<sup>2</sup>, LI Xian<sup>3</sup>, JIA Hui-biao<sup>4\*</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Vegetable Research Institute, Shanghai 201899, China; <sup>2</sup>School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; <sup>3</sup>Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; <sup>4</sup>Shanghai Wells Seed Co., LTD., Shanghai 201899, China)

**Abstract:** Taking ‘Jiadingbaisuan’ as experiment material, this paper studied the influence of different detoxication methods of stem tips and different explant initiation medium on the establishment of aseptic seedlings and virus-free seedling rate. The paper also studied the effects of different propagation medium and cutting pattern on the initiation and propagation of the potential bud. The paper also studied the grade standard of tissue culture seedlings and medium component on the formation of tissue culture microbulb. The results showed that stem tips with a single phyllopodium had the maximal survival rate at 76% in MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> medium. The single head bud cutting pattern – cutting its stem base at 1 cm by half through axis had the maximal potential bud propagation coefficient at 3.22 in MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.10 mg · L<sup>-1</sup> medium. Bud primordium wrapped by one phyllopodium had the best detoxification effect reaching 100%. One single tissue culture bud with cauloid’s diameter 3 mm had the highest tissue culture microbulb induction rate at 94.8%, in MS+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+ Sugar 90 g · L<sup>-1</sup> medium with 7.0 pH value. The stem tip detoxification pattern, cutting pattern of the potential bud, and medium component of tissue culture microbulb were the key technology for detoxification and rapid propagation of ‘Jiadingbaisuan’.

**Key words:** Garlic; Detoxification of stem tip; Tissue culture microbulb; Rapid propagation

· 信息 ·

## 农业农村部发布第十一批农业植物品种保护名录 目前受保护的蔬菜达 43 个属 (种)

农业农村部发布《中华人民共和国农业植物品种保护名录 (第十一批)》，将于 2019 年 4 月 1 日起实行。本次发布的名录共涉及 53 个植物属 (种)，目前受保护的农业植物种类已达 191 个植物属 (种)，其中蔬菜达 43 个属 (种)，包括大白菜、马铃薯、普通番茄、黄瓜、辣椒属、普通西瓜、普通结球甘蓝、食用萝卜、茄子、豌豆、菜豆、豇豆、大葱、西葫芦、花椰菜、芹菜、胡萝卜、甜瓜、草莓、大蒜、不结球白菜、芥菜、芥蓝、莴苣、苦瓜、冬瓜、菠菜、南瓜、丝瓜属、青花菜、洋葱、姜、茭白、芦笋、山药、菊芋、魔芋属、芋、芥、蕹菜 (空心菜)、芫荽 (香菜)、韭菜、紫苏等 (按保护名录发布的先后顺序)。

此次发布的保护名录涵盖中草药 11 种、观赏植物 10 种、菌类 9 种、蔬菜 7 种 [魔芋属、芋、芥、蕹菜 (空心菜)、芫荽 (香菜)、韭菜、紫苏]、牧草作物 7 种、大田作物 5 种、果树 4 种。此次保护名录的发布，将激励更多作物育种创新，加快选育推广一批特色新品种，推进绿色兴农、质量兴农、品牌强农，为实施乡村振兴战略和农业供给侧结构性改革提供源头支撑。

(本刊辑)