

大蒜气生鳞茎脱毒快繁

董玉惠, 顾启玉, 苑磊, 王立霞, 孙秀东, 刘世琦*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点试验室, 山东省大蒜工程技术研究中心, 山东泰安271000

摘要: 长期的无性繁殖使大蒜(*Allium sativum*)产业发展面临病毒积累和繁殖系数低等严峻问题, 而大蒜离体微繁技术能有效解决上述问题。气生鳞茎是离体诱导脱毒苗的首选材料, 但其具有休眠特性, 因此高效人工破眠技术是彻底解决这些问题的基础。本研究以蒜薹为外植体诱导形成气生鳞茎, 通过物理及生长调节剂的方法打破气生鳞茎休眠, 然后以气生鳞茎为外植体直接诱导试管苗, 并对气生鳞茎试管苗的脱毒效果进行检测。结果表明, 以长度为15 cm的带花苞蒜薹为外植体诱导形成气生鳞茎, 最适培养基为液体MS+(0.2~0.3 mg·L⁻¹)萘乙酸(NAA)+(0.3~0.5 mg·L⁻¹) 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA), 气生鳞茎诱导率可达100%, 且数量高达147粒; 通过比较机械伤害、低温(4℃)、赤霉素(GA₃)、乙烯(ETH)等几种不同方式打破气生鳞茎休眠的效果, 得出最佳破眠方式为低温14 d+100 mg·L⁻¹ GA₃+20 μL·L⁻¹ ETH, 处理后20 d气生鳞茎的萌芽率可达50%; 气生鳞茎试管苗可完全脱除大蒜普通潜隐病毒(GarCLV), 对洋葱黄矮病毒(OYDV)的脱除率可达94.87%, 脱毒苗叶片组织细胞排列紧密且规则。

关键词: 大蒜; 气生鳞茎; 脱毒; 快繁; 破眠

大蒜(*Allium sativum*)为百合科葱属一、二年生草本植物, 原产于欧洲南部和中亚。大蒜营养丰富, 具有很好的食疗作用以及药用价值, 能够杀菌、抑菌、抗癌、抗衰老等。大蒜的鳞茎、幼苗和花薹皆可食用, 是人们生活中不可缺少的蔬菜和调味品(高山林等2000)。近年来, 大蒜制品作为保健品受到大众的推崇, 大蒜产业的发展越来越受到重视。但大蒜长期进行无性繁殖, 使得病毒逐代积累, 导致种性退化, 产量和品质降低, 且无性繁殖的繁殖系数低, 而大蒜离体微繁技术能够有效解决上述问题(马雯等2011)。目前, 研究如何快速获得大蒜脱毒试管苗, 增加繁殖系数, 缩短生产周期, 降低脱毒大蒜种苗生产成本等方面的问题, 是推动大蒜脱毒产业化生产的关键。气生鳞茎由蒜薹顶端花苞内的鳞芽长成, 含毒量低, 遗传稳定, 且数量多, 体积小, 萌芽率高, 操作简单, 是离体条件下进行大蒜脱毒育苗的首选外植体材料。利用气生鳞茎可快速获得大量脱毒试管苗, 缩短生产周期, 提高大蒜繁殖系数。但是, 气生鳞茎同大蒜鳞茎一样具有休眠特性, 需先解除其休眠, 因此开发高效人工破眠技术是彻底解决这些问题的基础。目前研究较多的气生鳞茎人工破眠方法主要有物理破眠和生长调节剂破眠。Rahman

等(2003)的研究表明, 低温能打破大蒜休眠。生产中赤霉素(gibberellin, GA)常被用来解除种子、芽、块根和块茎的休眠。屈海泳等(2008)试验得出GA可解除洋葱种子的休眠。

本研究利用离体蒜薹诱导形成气生鳞茎, 再诱导气生鳞茎形成试管苗, 研究不同激素对大蒜气生鳞茎形成和萌发的影响以及不同破眠方式对气生鳞茎休眠解除的效果和试管苗的脱毒效果, 旨在为大蒜脱毒种苗的繁育提供有效的技术支持和理论依据, 从而推动大蒜产业的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试外植体材料为‘金乡’大蒜(*Allium sativum* L.)。

1.2 材料培养及处理

1.2.1 蒜薹的培养和处理

蒜薹长度设置5、10、15 cm 3种不同处理; 蒜薹诱导培养基中激素种类及浓度设置为: 萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、

收稿 2019-07-08 修定 2019-08-30

资助 国家自然科学基金(31772323)和山东省自然科学基金(2R2016CM33)。

* 通讯作者(liusq99@sdau.edu.cn)。

0.5 mg·L⁻¹, 6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg·L⁻¹。

1.2.2 气生鳞茎的培养及处理

打破气生鳞茎休眠的方式采用以下6种, 并分别设置不同的处理:

(1)机械伤害: 切伤(轻伤-不过芽孔、重伤-过芽孔)、切除(1/3、1/2)。

(2)低温(4℃): 0、7、14、21、28、42、56 d。

(3) GA₃: 浓度50、100、150、200 mg·L⁻¹; 时间12、24、36 h。

(4)乙烯(ethylene, ETH): 浓度5、10、15、20 μL·L⁻¹; 时间2 h。

(5) GA₃+ETH: GA₃ (50、100、150、200 mg·L⁻¹), ETH (5、10、15、20 μL·L⁻¹)。

(6)低温+GA₃+ETH: 低温(7、14、21、28、42、56 d)+(5)中最适浓度。

芽诱导培养基中激素种类及浓度设置: NAA (0.05、0.10、0.15 mg·L⁻¹), 6-BA (0.10、0.20、0.30 mg·L⁻¹), 以不添加任何激素的处理为对照。破眠处理后的气生鳞茎接种后, 定期观察萌芽情况, 并记录诱导率。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基的配制

(1)气生鳞茎诱导培养基: 以MS培养基为基本培养基, 蔗糖浓度30 g·L⁻¹, pH值5.8, 分装到大试管中, 每管30 mL培养基, 封口, 121℃高温高压灭菌20 min, 备用。

(2)芽诱导培养基: 以MS培养基为基本培养基, 蔗糖浓度30 g·L⁻¹, 琼脂7.0 g·L⁻¹, pH值5.8, 分装到组培瓶中, 每瓶30 mL培养基, 封口, 121℃高温高压灭菌20 min, 备用。

1.3.2 蒜薹的消毒与接种

切取蒜薹带花苞段, 流水冲洗1~2 h, 医用酒精消毒30 s, 无菌水冲洗2~3次, 0.1%的HgCl₂浸泡10 min, 无菌水冲洗3~5次(林树燕等2015), 切去最末端后接种到气生鳞茎诱导培养基中, 于光照32.5 μmol·m⁻²·s⁻¹, 16 h·d⁻¹, 温度(25±2)℃的条件下培养, 诱导气生鳞茎的形成。

1.3.3 气生鳞茎的消毒与接种

气生鳞茎流水冲洗5~10 min后转移至超净工

作台内, 先用75%体积分数的乙醇消毒30 s, 无菌水冲洗3~4次, 再用4%体积分数的NaClO溶液消毒15 min, 无菌水冲洗4~5次, 最后将其表面水分吸干后接种到芽诱导培养基中, 转移至组培室培养, 光照条件为32.5 μmol·m⁻²·s⁻¹, 16 h·d⁻¹, 室温为(25±2)℃。

1.3.4 RT-PCR检测大蒜病毒

采用北京艾德莱生物科技有限公司的RN09植物RNA提取试剂盒, 提取脱毒苗的总RNA, 然后用北京天诺天诚生物科技有限公司的ABMG492试剂盒进行反转录, 设计引物序列。建立RT-PCR反应体系, 10×PCR缓冲液2.5 μL, dNTPs 1 μL, 上游引物2 μL, 下游引物2 μL, ddH₂O 15.3 μL, rTaq酶1 μL, PCR反应程序为94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35个循环; 最后72℃延伸10 min。PCR产物用琼脂糖凝胶电泳和EB染色观察(温玉洁等2015)。

1.3.5 DAS-ELISA检测洋葱黄矮病毒

脱毒苗中洋葱黄矮病毒(*Onion yellow dwarf virus*, OYDV)含量的检测使用美国Agdia公司生产的DAS-ELISA洋葱黄矮病毒检测试剂盒, 检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。检测完成后, 用酶标仪在405 nm下测定数值, 求脱毒率。

脱毒率(%)=(1-检测样品值/阳性对照值)×100。

1.3.6 石蜡切片观察叶片结构

叶片解剖结构特征试验处理方法: 利用石蜡切片法将已用福尔马林-醋酸-酒精固定液(FAA) 50%体积分数的乙醇90 mL+冰醋酸5 mL+福尔马林(38%甲醛) 5 mL固定好的脱毒苗叶片制作成切片。采用浓度为50%、70%、85%、95%、100%的酒精依次对叶片进行脱水, 然后用二甲苯透明处理, 渗蜡, 石蜡包埋, 切片机切片, 切片厚度为10~12 μm, 番红-固绿双重染色, 中性树胶封片(李岩等2011)。采用光学显微镜观察叶肉细胞的形态结构。

1.4 数据分析和处理

采用Microsoft Excel 2007对试验数据进行整理分析, 采用SPSS (Version 18.0)对数据进行差异显著性检验(Duncan新复极差法)。所有实验的处理及测定都为3次或者以上的重复, 实验数据为3次及3次以上重复实验的平均值。

2 实验结果

2.1 不同蒜薹长度对气生鳞茎形成的影响

以不同长度的蒜薹为外植体诱导形成的气生鳞茎存在显著差异。如图1所示, 3种长度的蒜薹诱导后形成的花苞大小不同, 外植体长5 cm时诱导形成的花苞较小, 15 cm时花苞较大。不同长度外植体形成的气生鳞茎数量和单粒重也不同。由表1可知, A3处理形成的气生鳞茎数量和重量均高于A1和A2处理, 且差异显著, 可见, 随着蒜薹长度的增加, 形成的气生鳞茎数量增加, 气生鳞茎单重也增加。

2.2 不同激素种类及浓度对气生鳞茎形成的影响

气生鳞茎的形成过程如图2所示。剪下蒜薹带花苞段, 消毒后接种入添加不同激素种类及浓度的液体MS培养基, 诱导21 d后花苞胀大, 形成气生鳞茎。不同激素种类和浓度对气生鳞茎形成的诱导效果不同。如表2所示, 处理7~16, 即添加0.2~0.3 mg·L⁻¹ NAA的处理, 气生鳞茎诱导率可达到100%, 其中添加0.3~0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的处理其形成的气生鳞茎数量和单粒重均达较高水平, 由此可见, 诱导气生鳞茎形成的适宜培养基为MS+(0.2~0.3 mg·L⁻¹) NAA+(0.3~0.5 mg·L⁻¹) 6-BA。

2.3 不同激素种类及浓度对气生鳞茎萌发的影响

不同激素种类及浓度对气生鳞茎萌芽诱导的效果不同。如表3所示, 处理B2、B3、B5和B6萌芽率均可达到90%以上, 显著高于不添加激素的处理, 且苗生长势较好。可见, 诱导气生鳞茎萌发的适宜培养基条件为MS+(0.05~0.10 mg·L⁻¹) NAA+

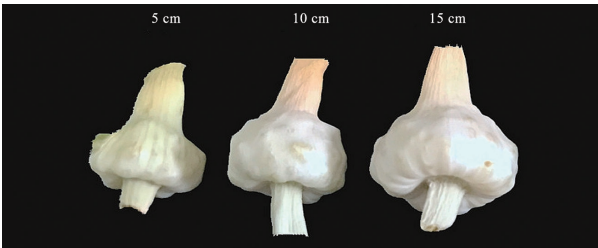


图1 不同长度蒜薹培养后形成的花苞
Fig.1 Buds formed by garlic scapes of different lengths after culture

表1 不同蒜薹长度对气生鳞茎形成的影响

Table 1 Effects of different garlic scape lengths on the formation of aerial bulbs

处理	蒜薹长度/cm	气生鳞茎数量/个	气生鳞茎单粒重/mg
A1	5	55 ^c	14.72 ^b
A2	10	84 ^b	16.19 ^b
A3	15	94 ^a	23.37 ^a

每列中字母相同者表示差异未达显著水平($P>0.05$), 字母不同者表示差异达显著水平($P<0.05$)。表2、3、8同此。

(0.2~0.3 mg·L⁻¹) 6-BA。

2.4 气生鳞茎休眠解除技术的研究

2.4.1 不同机械伤害处理对气生鳞茎萌发的影响

对气生鳞茎进行适当的机械伤害有助于其休眠的解除。由表4可知, 不同机械伤害处理对气生鳞茎萌发的诱导情况不同, 与不做处理的对照相比, 轻伤(不过芽孔)、重伤(过芽孔)、切除1/3和切除1/2的伤害处理均能不同程度的提高气生鳞茎的



图2 气生鳞茎形成过程
Fig.2 Formation of aerial bulbs

表2 不同激素种类及浓度对大蒜气生鳞茎形成的影响

Table 2 Effects of different hormone types and concentrations on the formation of aerial bulbs in garlic

处理编号	激素浓度/mg·L ⁻¹		气生鳞茎诱导率/%	气生鳞茎数量/个	气生鳞茎单粒重/mg
	NAA	6-BA			
1	0	0	66.67 ^{ef}	79.33 ^c	29.51 ^{abc}
2	0.1	0.1	72.22 ^{def}	84.33 ^{bc}	31.26 ^{abc}
3	0.1	0.2	77.78 ^{cde}	84.00 ^{bc}	41.51 ^a
4	0.1	0.3	88.89 ^{abc}	134.67 ^{abc}	19.62 ^{cd}
5	0.1	0.4	83.33 ^{bcd}	98.67 ^{abc}	37.12 ^{ab}
6	0.1	0.5	94.44 ^{ab}	94.00 ^{abc}	29.55 ^{abc}
7	0.2	0.1	100 ^a	101.33 ^{abc}	31.33 ^{abc}
8	0.2	0.2	100 ^a	118.33 ^{abc}	22.87 ^{cd}
9	0.2	0.3	100 ^a	136.00 ^{abc}	22.75 ^{cd}
10	0.2	0.4	100 ^a	116.33 ^{abc}	31.10 ^{abc}
11	0.2	0.5	100 ^a	132.33 ^{abc}	22.05 ^{cd}
12	0.3	0.1	100 ^a	100.00 ^{abc}	30.68 ^{abc}
13	0.3	0.2	100 ^a	115.67 ^{abc}	21.97 ^{cd}
14	0.3	0.3	100 ^a	116.00 ^{abc}	21.97 ^{cd}
15	0.3	0.4	100 ^a	106.67 ^{abc}	20.88 ^{cd}
16	0.3	0.5	100 ^a	137.00 ^{abc}	25.04 ^{bcd}
17	0.4	0.1	83.33 ^{bcd}	147.00 ^a	15.39 ^d
18	0.4	0.2	83.33 ^{bcd}	122.67 ^{abc}	18.94 ^{cd}
19	0.4	0.3	88.89 ^{abc}	128.67 ^{abc}	18.18 ^{cd}
20	0.4	0.4	77.78 ^{cde}	144.00 ^a	14.70 ^d
21	0.4	0.5	50.00 ^g	125.00 ^{abc}	20.20 ^{cd}
22	0.5	0.1	61.11 ^{fg}	110.00 ^{abc}	20.52 ^{cd}
23	0.5	0.2	83.33 ^{bcd}	115.33 ^{abc}	18.56 ^{cd}
24	0.5	0.3	83.33 ^{bcd}	118.33 ^{abc}	15.53 ^d
25	0.5	0.4	83.33 ^{bcd}	146.67 ^a	18.22 ^{cd}
26	0.5	0.5	88.89 ^{abc}	137.33 ^{ab}	17.59 ^{cd}

表3 不同激素种类及浓度对气生鳞茎萌发的影响

Table 3 Effects of different hormone types and concentrations on the germination of aerial bulbs

处理	激素浓度/mg·L ⁻¹		萌芽率/%
	NAA	6-BA	
CK	0	0	80 ^e
B1	0.05	0.1	90 ^b
B2	0.05	0.2	90 ^b
B3	0.05	0.3	100 ^a
B4	0.10	0.1	80 ^e
B5	0.10	0.2	95 ^b
B6	0.10	0.3	90 ^b
B7	0.15	0.1	80 ^e
B8	0.15	0.2	87.5 ^c
B9	0.15	0.3	85 ^d

表4 不同机械伤害处理对气生鳞茎萌发的影响

Table 4 Effects of different mechanical injury treatments on germination of aerial bulbs

诱导时间/d	萌芽率/%				
	机械伤害处理				
	CK	轻伤	重伤	切除1/3	切除1/2
20	0 ^e	6.67 ^c	13.33 ^b	3.33 ^d	20.00 ^a
40	3.33 ^d	26.67 ^c	33.33 ^b	26.67 ^c	60.00 ^a
60	6.67 ^d	33.33 ^b	33.33 ^b	26.67 ^c	73.33 ^a
80	13.33 ^c	40.00 ^b	40.00 ^b	40.00 ^b	80.00 ^a

每行中字母相同者表示差异未达显著水平($P<0.5$), 字母不同者表示差异达显著水平($P<0.5$)。表4~7、9同此。

萌芽率, 其中切除1/2的机械伤害处理的气生鳞茎萌芽率显著高于其他处理。

2.4.2 不同低温处理时间对气生鳞茎萌发的影响

低温冷藏可有效解除气生鳞茎休眠, 低温处理时间不同对休眠的解除效果不同。从表5可以看出, 经低温处理的气生鳞茎其萌芽率均高于不经低温处理的气生鳞茎, 其中, 低温处理21~42 d的气生鳞茎在诱导20 d后萌芽率均可达到20%以上, 诱导80 d后可达到80%以上, 诱导效果显著高于其他处理。

2.4.3 不同浓度GA₃处理时间对气生鳞茎萌发的影响

不同浓度的外源GA₃及不同处理时间对气生鳞茎萌芽的诱导效果不同, 如表6所示, 无论用多少浓度的外源GA₃处理气生鳞茎, 浸泡12 h的萌芽率都显著高于浸泡24和36 h的萌芽率, 可见用外源GA₃浸泡12 h的破眠效果更好。在4种浸泡12 h的浓度处理中, GA₃浓度为150和200 mg·L⁻¹时萌芽率显著高于其他处理。综上所述, 150~200 mg·L⁻¹的GA₃浸泡12 h对于打破休眠效果最佳。

2.4.4 不同ETH处理对气生鳞茎萌发的影响

ETH对大蒜气生鳞茎休眠的解除也有一定的效果。表7为经不同浓度ETH处理后气生鳞茎的萌

芽率, 从表中可知经ETH处理的气生鳞茎其萌芽率显著高于未经ETH处理的气生鳞茎, 其中, 浓度为15 μL·L⁻¹ ETH的处理效果最佳, 其次是浓度为10 μL·L⁻¹ ETH的处理, 可见, 浓度范围10~15 μL·L⁻¹的ETH处理诱导气生鳞茎萌发的效果较好。

2.4.5 不同GA₃+ETH处理对气生鳞茎萌发的影响

外源GA₃+ETH处理的破眠效果更好。如表8所示, 100 mg·L⁻¹ GA₃+20 μL·L⁻¹ ETH的处理, 气生鳞茎萌芽率最高, 诱导80 d萌芽率达73.33%, 且苗长势好。50~100 mg·L⁻¹ GA₃+15~20 μL·L⁻¹ ETH的处理整体萌芽率较高且苗长势较好。综合表6~8可知, 外源GA₃和ETH配合使用的诱导效果要优于各自单独使用的效果。

2.4.6 不同低温+GA₃+ETH处理对气生鳞茎萌发的影响

由表5和8得出, 低温处理后的气生鳞茎需在诱导后60 d达到较高的萌芽率, GA₃+ETH处理的气生鳞茎诱导后达到较高萌芽率需要80 d左右, 因此, 根据表8筛选出GA₃+ETH的最适浓度, 100 mg·L⁻¹ GA₃+20 μL·L⁻¹ ETH, 配合低温处理, 研究两种方法

表5 不同低温处理时间对气生鳞茎萌发的影响
Table 5 Effects of different low temperature treatment time on germination of aerial bulbs

诱导时间/d	萌芽率/%							
	低温处理时间/d							
	0	7	14	21	28	42	56	70
20	0.00 ^b	13.33 ^c	19.65 ^d	26.25 ^b	34.29 ^a	24.14 ^c	11.00 ^f	2.24 ^g
40	3.33 ^b	20.91 ^f	37.01 ^d	41.43 ^c	50.00 ^a	46.00 ^b	21.12 ^e	19.24 ^g
60	6.67 ^b	23.64 ^g	59.41 ^d	62.64 ^c	66.82 ^a	63.54 ^b	37.00 ^e	27.75 ^f
80	13.33 ^b	29.25 ^g	61.23 ^d	82.49 ^c	89.24 ^a	84.45 ^b	38.65 ^e	30.26 ^f

表6 不同GA₃处理对气生鳞茎萌发的影响
Table 6 Effects of different GA₃ treatments on germination of aerial bulbs

诱导时间/d	CK	萌芽率/%											
		50 mg·L ⁻¹ GA ₃			100 mg·L ⁻¹ GA ₃			150 mg·L ⁻¹ GA ₃			200 mg·L ⁻¹ GA ₃		
		12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
20	0 ^c	3.21 ^b	0 ^c	0 ^c	3.90 ^a	0 ^c	0 ^c	6.10 ^a	0 ^c	0 ^c	6.00 ^a	0 ^c	0 ^c
40	0.81 ^b	10.87 ^d	0 ⁱ	1.82 ^g	24.00 ^a	0 ⁱ	1.82 ^g	20.83 ^b	0 ⁱ	4.48 ^e	20.41 ^c	3.13 ^f	1.67 ^g
60	5.05 ^j	33.33 ^d	6.45 ^h	10.91 ^e	36.73 ^c	3.03 ^l	3.64 ^k	45.83 ^a	3.13 ^l	7.46 ^f	45.45 ^b	6.25 ⁱ	6.67 ^g
80	9.41 ^g	42.22 ^d	13.33 ^e	12.73 ^f	47.83 ^c	3.03 ^k	5.45 ^j	56.25 ^a	3.13 ^k	8.96 ^h	54.76 ^b	9.38 ^g	8.33 ⁱ

表7 不同ETH处理对气生鳞茎萌发的影响

Table 7 Effects of different ETH treatments on germination of aerial bulbs

诱导时间/d	萌芽率/%				
	ETH浓度/ $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$				
	0	5	10	15	20
20	0 ^d	0 ^d	6.67 ^b	13.33 ^a	3.33 ^c
40	3.33 ^d	6.67 ^c	13.33 ^b	26.67 ^a	6.67 ^c
60	6.67 ^d	20.00 ^c	26.67 ^b	33.33 ^a	20.00 ^c
80	13.33 ^d	20.00 ^c	33.33 ^b	40.00 ^a	20.00 ^c

表8 不同GA₃+ETH处理对气生鳞茎萌发的影响

Table 8 Effects of different GA₃+ETH treatments on germination of aerial bulbs

GA ₃ /mg·L ⁻¹ ETH/ $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$		萌芽率/%			
		诱导时间/d			
		20	40	60	80
50	5	6.67 ^c	13.33 ^d	20.00 ^f	33.33 ^g
	10	6.67 ^c	20.00 ^e	33.33 ^d	40.00 ^f
	15	13.33 ^b	33.33 ^a	46.67 ^b	60.00 ^b
	20	13.33 ^b	20.00 ^e	26.67 ^e	46.67 ^e
100	5	6.67 ^c	13.33 ^d	20.00 ^f	26.67 ^h
	10	6.67 ^c	13.33 ^d	33.33 ^d	40.00 ^f
	15	13.33 ^b	26.67 ^b	33.33 ^d	56.67 ^c
	20	20.00 ^a	33.33 ^a	50.00 ^a	73.33 ^a
150	5	13.33 ^b	20.00 ^e	33.33 ^d	46.67 ^e
	10	6.67 ^c	20.00 ^e	40.00 ^c	56.67 ^c
	15	13.33 ^b	26.67 ^b	33.33 ^d	40.00 ^f
	20	13.33 ^b	13.33 ^d	26.67 ^e	33.33 ^g
200	5	6.67 ^c	20.00 ^e	33.33 ^d	40.00 ^f
	10	6.67 ^c	13.33 ^d	33.33 ^d	40.00 ^f
	15	13.33 ^b	33.33 ^a	46.67 ^b	53.33 ^d
	20	13.33 ^b	20.00 ^e	26.67 ^e	33.33 ^g

表9 不同GA₃+ETH+低温处理对气生鳞茎萌发的影响

Table 9 Effects of different GA₃+ETH+low temperature treatments on germination of aerial bulbs

诱导时间/d	萌芽率/%					
	低温处理时间/d					
	7	14	21	28	42	56
20	29.17 ^d	54.17 ^a	50.00 ^b	50.00 ^b	45.83 ^c	16.67 ^e
40	37.50 ^e	62.50 ^b	58.33 ^c	66.67 ^a	54.17 ^d	25.00 ^f
60	45.83 ^e	83.33 ^a	75.00 ^c	79.17 ^b	70.83 ^d	33.33 ^f
80	58.33 ^e	100.00 ^a	91.67 ^c	95.83 ^b	87.50 ^d	41.67 ^f

相结合对气生鳞茎休眠解除的诱导效果,以期缩短诱导时间,快速打破休眠。结果如表9所示,低温和激素相结合的处理方式可以大大缩短萌芽时间,在诱导后20 d就可达到50%的萌芽率,其中激素处理后再经低温处理14 d的气生鳞茎的萌芽率显著高于其他处理,在80 d时可达100%的萌芽率。综上,100 mg·L⁻¹ GA₃+20 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ETH+低温14 d的处理对气生鳞茎休眠解除的诱导效果最好。

2.5 气生鳞茎试管苗脱毒效果

2.5.1 试管苗培养

由气生鳞茎培养脱毒苗的过程如图3所示。从蒜薹花苞剥离气生鳞茎,消毒后接种于芽诱导培养基,气生鳞茎先变绿后萌芽,培养一段时间后移栽于已灭菌的基质中,成活率可达100%。

2.5.2 RT-PCR检测试管苗病毒

应用RT-PCR的方法检测气生鳞茎脱毒苗和普通蒜苗(CK)含病毒情况,共检测了OYDV、韭葱黄条病毒(*Leek yellow stripe virus*, LYSV)和大蒜普通潜隐病毒(*Garlic common latent virus*, GarCLV) 3种常见大蒜病毒,结果如图4所示,1~3为脱毒苗的检测结果,4~6为对照的检测结果。从图中可以看出,由气生鳞茎诱导形成的试管苗的脱毒效果显著,可以100%完全脱除GarCLV,对OYDV的脱除效果也比较明显。

2.5.3 DAS-ELISA检测试管苗OYDV含量

应用酶联免疫的方法定量检测气生鳞茎脱毒苗和普通蒜苗中OYDV的含量,结果如表10所示,气生鳞茎脱毒苗中OYDV的脱除率均达到90%以上,最高达94.87%,说明脱毒效果显著。



图3 诱导气生鳞茎成苗示意图
Fig.3 Schematic diagram of induced aerial bulb seedling formation

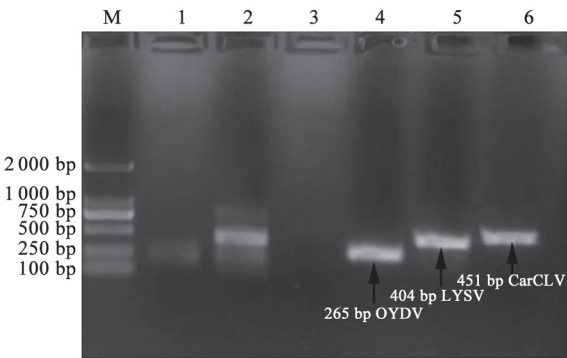


图4 RT-PCR检测病毒结果
Fig.4 RT-PCR detect virus results
M为Marker, 1、2、3分别为脱毒苗中OYDV、LYSV、Gar-CLV病毒检测结果, 4、5、6分别为CK中OYDV、LYSV、GarCLV病毒检测结果。

表10 DAS-ELISA检测结果
Table 10 DAS-ELISA test results

阳性对照值	样品值	脱毒率/%
2.437	0.185	92.41
	0.176	92.78
	0.125	94.87
	0.158	93.52
	0.164	93.27
	0.181	92.57

2.5.4 试管苗叶片解剖结构

用石蜡切片方法观察气生鳞茎脱毒苗和普通蒜苗(CK)的叶片结构, 结果如图5所示。叶片的基本结构是一致的, 叶片上下表皮由单层细胞构成, 叶片上下结构对称; 与其他单子叶植物叶片结构不同, 在大蒜叶片解剖结构中可以看到较为明显的栅栏组织和海绵组织。与对照相比, 脱毒苗的

海绵组织和栅栏组织的细胞排列更加紧密更加规则。对照中可见空腔很大的薄壁组织, 而脱毒苗中空腔小。

3 讨论

大蒜气生鳞茎离体条件下的形成受多种因素的影响, 如蒜薹品种、蒜薹长度、培养基种类、培养基中添加的植物激素种类及浓度等。在植物组织培养与快繁过程中, 植物生长调节剂的种类及浓度是最为主要的影 响因子, 主要使用的细胞分裂素有6-BA、氯吡脲(KT)、玉米素(ZT)和噻苯隆(TDZ), 生长素有NAA、IBA和IAA(潘梅等2015)。本研究中采用添加了不同种类和浓度激素的液体MS培养基培养不同长度的带花苞金乡蒜薹, 诱导形成气生鳞茎, 结果表明, 在MS+(0.2~0.3 mg·L⁻¹) NAA+(0.3~0.5 mg·L⁻¹) 6-BA 的培养基中气生鳞茎的诱导率可达100%, 且较长的蒜薹长度有利于形成更多更重的气生鳞茎。马雯等(2011)将蒜薹花苞去除苞皮后接种在固体培养基上诱导, 研究了贮藏时间和外源激素对气生鳞茎形成的影响, 得出若蒜薹于低温下的贮藏时间过长则不易诱导形成气生鳞茎, MS+0.15 mg·L⁻¹ NAA+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA培养基为适宜诱导培养基。与上述研究相比, 本试验中的液体培养基诱导气生鳞茎的方法操作更简单、成本更低、诱导率更高。

植物休眠的解除方法有许多种, 根据其作用方式的不同, 可分为3类: 物理破眠方法, 如低温、高温等; 植物生长调节剂破眠方法, GA、TDZ等; 化学破眠方法, 如单氰胺、二硝基临甲酚等。研究表明, 多数破眠处理对植物都有一定的伤害作

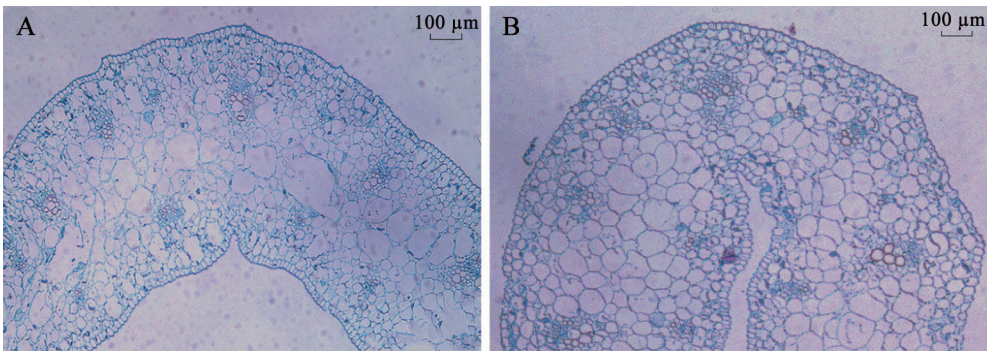


图5 叶片解剖结构
Fig.5 Anatomical structure of leaves
A: CK叶片解剖结构; B: 气生鳞茎脱毒苗解剖结构。

用。如0~7℃低温破眠方式对植物有胁迫作用; 单氰胺破眠方式会导致桃树花芽坏死、芽周边组织脱落、枝条顶端干枯(谭钺等2014); 二硝基临甲酚有生物毒性; 硫脲是过氧化氢酶抑制剂(Bajji等2007)。可见, 对植物体产生伤害或胁迫是低温破眠和化学破眠剂破眠的共性。本研究中采用机械伤害、低温(4℃)、外源GA₃、乙烯等几种不同的方式处理气生鳞茎, 结果得出最佳破眠方式为低温14 d+100 mg·L⁻¹ GA₃+20 μL·L⁻¹ ETH, 可快速有效破眠, 且萌芽后苗的长势好。李小川等(1996)认为4℃低温能解除气生鳞茎的休眠, 促进其萌发, 且试管苗的诱导率最高能达到81.66%。本研究中经低温处理的气生鳞茎的试管苗诱导率可达90%以上, 外源GA₃处理的气生鳞茎萌发率可达60%。

大蒜气生鳞茎的萌发受多种因素的影响, 如气生鳞茎低温贮藏时间、植物激素配比、气生鳞茎的成熟度等。虽然低温贮藏有利于气生鳞茎的萌发, 但是贮藏时间不宜过长。本研究中, 气生鳞茎于4℃低温下贮藏28 d, 其萌芽率可达到89.24%, 之后随着时间的延长气生鳞茎的萌芽率逐渐降低, 原因可能是长时间的低温会导致气生鳞茎的代谢紊乱, 生理活性降低。张素芝等(2006)研究发现气生鳞茎在低温(4℃)下贮藏90 d以后, 其发芽率显著降低, 得出低温贮藏时间不宜长于60 d。植物激素种类和浓度对气生鳞茎的萌发影响显著, 可能会对气生鳞茎内源激素的平衡有一定影响, 从而促进气生鳞茎萌发。张素芝等(2006)发现NAA和BA

的交互效应对气生鳞茎的萌发有极其显著的影响。本研究中, 在MS+(0.05~0.10 mg·L⁻¹) NAA+(0.2~0.3 mg·L⁻¹) 6-BA培养基上, 气生鳞茎的萌芽诱导率可达到90%以上, 且苗长势较好。因此, 采用气生鳞茎作为外植体诱导试管苗时, 首先要选择适宜大小的气生鳞茎, 然后采用合适的方式打破其休眠, 再在添加适宜浓度激素的培养基上进行诱导培养。

植物组织培养法、热处理法和抗病毒药剂法是植物脱毒常用的方法, 但脱毒后得到的脱毒苗的数量一般都较少, 需利用离体快繁技术来进行脱毒苗的快速繁殖, 才可获得大批量的脱毒种苗(巩振辉等2009)。目前在大蒜的脱毒快繁研究中常用大蒜愈伤组织和茎尖培养的方法, 但在愈伤组织脱分化和再分化的过程中, 大蒜染色体往往发生变异, 而茎尖培养操作难度高且成苗率低。气生鳞茎可以保持大蒜的遗传特性且操作简单成苗率高(王珍等2014)。若气生鳞茎在田间自然生长, 会对地蒜的生长造成影响。张绍文等(1994)研究发现, 留有气生鳞茎的地蒜的产量降低22.6%~33.0%。

本研究以‘金乡’蒜薹为外植体诱导形成气生鳞茎, 再以气生鳞茎为外植体诱导形成试管苗, 气生鳞茎本身含毒量就很低, 试管苗可自然脱毒, 且平均每个花苞可获得130粒以上的气生鳞茎, 此方法在不影响地蒜生长的情况下实现了大蒜的脱毒快繁。不仅避免了茎尖培养和愈伤组织培养的复

杂操作, 还可降低成本, 缩短时间, 提高繁殖率。研究中还利用RT-PCR技术及DAS-ELISA方法对获得的脱毒试管苗进行了病毒检测, 采用石蜡切片观察了脱毒苗的叶片结构, 结果显示气生鳞茎形成的试管苗可完全脱除GarCLV, 对OYDV的脱除率可达90%以上, 且脱毒苗细胞结构更加规则而紧密。

参考文献(References)

- Bajji M, Hamdi MM, Gastiny F, et al (2007). Catalase inhibition alters suberization and wound healing in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol Plantarum*, 129: 472–483
- Gao SL, Jin YA, Cai CH, et al (2000). Virus-free culture and rapid-propagation from shoot apex of *Allium sativum* L. *J Plant Resour Environ*, 9: 15–18 (in Chinese with English abstract) [高山林, 金雅安, 蔡朝晖等(2000). 大蒜分生组织培养脱病毒和快速繁殖技术. *植物资源与环境学报*, 9: 15–18]
- Gong ZH, Shen SX (2009). *Plant Tissue Culture*. Beijing: Chemical Industry Press (in Chinese) [巩振辉, 申书兴(2009). *植物组织培养*. 北京: 化学工业出版社, 104–137]
- Li XC, Zhao MH (1996). Garlic bulblet formation via the in vitro culture of the bulbous apical meristem scaly bud. *J Shanxi Agr Sci*, 24: 59–60 (in Chinese with English abstract) [李小川, 赵美华(1996). 大蒜鳞芽生长点离体培养诱导小鳞茎的形成. *山西农业科学*, 24: 59–60]
- Li Y, Cai LG, Niu L, et al (2011). Studies on secondary vascular tissue and fruit anatomy of elm stems in different habitats. *J Tonghua Norm Univ*, 32: 38–39 (in Chinese) [李岩, 蔡立格, 牛陆等(2011). 不同生境榆树茎次生维管组织及果实解剖研究. *通化师范学院学报*, 32: 38–39]
- Lin SY, Zhao R, Zheng X (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Bambusa glaucophylla*. *J Plant Physiol*, 51 (12): 2175–2180 (in Chinese with English abstract) [林树燕, 赵荣, 郑笑(2015). 马来簕竹的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51 (12): 2175–2180]
- Ma W, Li W, Li JJ (2011). Effects of storage time and exogenous phytohormone on the formation of garlic aerial bulblets. *Hunan Agr Sci*, (10): 41–44 (in Chinese) [马雯, 李唯, 李金娟(2011). 贮藏时间和外源激素对大蒜气生鳞茎形成的影响. *湖南农业科学*, (10): 41–44]
- Pan M, Huang S, Qi HS, et al (2015). *In vitro* culture and rapid propagation of *Oreocharis flavida*. *J Plant Physiol*, 51 (10): 1729–1734 (in Chinese with English abstract) [潘梅, 黄赛, 戚华莎等(2015). 黄花马铃苣苔的离体培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51 (10): 1729–1734]
- Qu HY, Liu LM, Wang YL, et al (2008). Effect of gibberellin on breaking dormancy of onion seeds and its effect on growth and development of onion. *J Jiangsu Agr Sci*, (2): 130–132 (in Chinese) [屈海泳, 刘连妹, 王艳伶等(2008). 赤霉素打破洋葱种子休眠的效果及其对洋葱生长发育的影响. *江苏农业科学*, (2): 130–132]
- Rahman MH, Haque MS, Ahmed M (2003). Pre-planting temperature treatments for breaking dormancy of garlic cloves. *Asian J Plant Sci*, 2: 123–126
- Tan Y, Wang MS, Lv M, et al (2014). Effects of different treatments on dormancy breaking and bud respiration of nectarine. *Shandong Agr Sci*, 46: 49–52 (in Chinese with English abstract) [谭钺, 王茂生, 吕勐等(2014). 不同处理打破油桃自然休眠的效果及对芽呼吸的影响. *山东农业科学*, 46: 49–52]
- Wang Z, Fan BL, Ren CX, et al (2014). Research on the rapid propagation system of garlic bulbils. *North Hortic*, 23: 79–82 (in Chinese with English abstract) [王珍, 范宝莉, 任春雪等(2014). 大蒜气生鳞茎快繁体系研究. *北方园艺*, 23: 79–82]
- Wen YJ, Zhao WL, Ge HX (2015). Study on virus disease of *Aristolochia debilis* by using DAS-ELISA and RT-PCR. *Prot Forest Sci Technol*, 8: 36–39 (in Chinese with English abstract) [温玉洁, 赵文龙, 葛红霞(2015). 采用DAS-ELISA和RT-PCR方法对马兜铃病毒病的研究. *防护林科技*, 8: 36–39]
- Zhang SW, Sun ZQ, Yang JH, et al (1994). Study on the utilization value of aerial bulb of garlic. *China Vegetables*, 4: 14–16 (in Chinese) [张绍文, 孙治强, 杨佳辉等(1994). 大蒜气生鳞茎(天蒜)利用价值的研究. *中国蔬菜*, 4: 14–16]
- Zhang SZ, Li JR (2006). Analysis of factors affecting the germination of bulbils in the inflorescence of garlic (*Allium sativum* L.). *J Sichuan Agr Univ*, 24: 148–151 (in Chinese) [张素芝, 李纪蓉(2006). 影响大蒜气生鳞茎萌发的因素分析. *四川农业大学学报*, 24: 148–151]

Rapid propagation of virus-free garlic aerial bulbs

DONG Yu-Hui, GU Qi-Yu, YUAN Lei, WANG Li-Xia, SUN Xiu-Dong, LIU Shi-Qi*

Shandong garlic Engineering Research Center, State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: Serious problems such as garlic virus accumulation and a low reproductive coefficient stemming from long-term asexual reproduction in the garlic industry, can be effectively overcome using *in vitro* micropropagation technology. Garlic aerial bulbs are the optimum material for *in vitro*-induced virus-free seedlings but have dormancy characteristics. Therefore, efficient artificial dormancy-breaking technology is the basis to solve these problems thoroughly. In this study, garlic scapes were used as explants to induce aerial bulbs, whose dormancy was then broken using physical and growth regulators. The aerial bulbs were subsequently used as explants to directly induce plantlets, which were then tested for the presence of viruses. The optimum induction of aerial bulbs was obtained from 15-cm-long scapes bearing flower buds, and the best induction medium was liquid Murashige–Skoog (MS) medium containing 1-naphthylacetic acid (NAA) ($0.2\text{--}0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and 6-benzylaminopurine (6-BA) ($0.3\text{--}0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The rate of aerial bulbs induction was 100%, with up to 147 aerial bulbs generated per scape. The optimum treatment for aerial bulb dormancy break, which was determined by comparing the effects of mechanical injury, low temperature (4°C), and treatment with gibberellin (GA_3) and ethylene (ETH), was low temperature for 14 days followed by application of $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ GA}_3 + 20\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ETH}$. After 20 days of treatment, the aerial bulb germination rate was as high as 50%. Garlic common latent virus (GarCLV) was completely absent from the aerial bulb-induced plantlets, and up to 94.87% of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) was removed using this approach. Leaf tissue cells of the virus-free plantlets were tightly and regularly arranged.

Key words: garlic; aerial bulbs; virus free; rapid propagation; dormancy break

Received 2019-07-08 Accepted 2019-08-30

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31772323) and the Shandong Provincial Natural Science Foundation (2R2016CM33).

*Corresponding author (liusq99@sdaa.edu.cn).