

# 大蒜脱毒研究初报

朱之垠

刘文萍

(黑龙江省农科院育种所生物技术研究室)

崔荣昌

朱光新 李学湛

(黑龙江省农科院克山马铃薯研究所)

(黑龙江省农科院电镜室)

**摘要** 通过茎尖离体培养获得了再生植株。从贮藏叶诱导产生了胚性细胞团和再生植株。筛选出 $D_8$ 和 $D_7$ 二种生长快,成活率高的茎尖生长培养基。再生苗病毒检测结果表明,大部再生苗的病毒含量大幅度降低,部分再生苗脱去了一种或数种病毒。得到了少量脱毒苗。从茎尖,气生鳞茎的茎尖和贮藏叶等外植体都诱导产生了脱毒苗。再生苗移栽后常有不同程度的病症,但有的苗叶色较绿。共结出138个蒜头。其中大部为独瓣蒜,少数蒜头当年分瓣;也有从一个外植体产生二个或二个以上茎的丛苗,移栽后结出2~8个蒜头不等。

大蒜病毒病是世界性的普遍感染的病害,是导致大蒜种性退化,产量降低的重要原因。我省大蒜退化问题日趋严重,产品的市场竞争力正在不断衰退。大蒜病毒病是由多种病原复合侵染引起的病害。崔荣昌等研究查明了我省大蒜至少被四种 Poty、四种 CaMa 和 TMV 等九种病毒病原侵染,澄清了关于大蒜病毒病原种类的紊乱状况。

许多感病毒病的植物不能用育种方法恢复其种性。利用病毒在植物体内分布不均的特点,用离体培养技术可使植物脱去病毒,使作物的生产力得到明显的恢复。这样的工作在国内外已有在多种园田植物上得到成功应用的报导,如马铃薯,草莓和大蒜等。本试验目的是研究大蒜脱毒苗的培养技术,并

通过对各种处理再生苗的病毒检测,对大蒜脱毒的技术途径和操作效果进行检验。

## 材料与方 法

以我省主栽大蒜品种阿城紫皮蒜,宁安紫皮蒜和宁安白皮蒜为试材。以茎尖,气生鳞茎的茎尖和贮藏叶为外植体。采用 MS 培养基,附加 $K_0 \sim 3.0$ ,  $6BA_0 \sim 2.0$ ,  $NAA_0 \sim 3.0$ ,  $2,4-D_0 \sim 6$ ,  $GA_3_0 \sim 0.2mg/L$ 的各种组合,共30余种培养基。用负染法电镜检测病毒粒体时,对蒜样进行称重,按每1毫克病叶加10微升磷酸缓冲液的比例研磨,使汁液稀释浓度保持一致。制样后随机找三个网孔,在五万倍率下沿网孔内圈旋转观察一

韩玉琴同志参加了部份工作。

周, 记数所见病毒粒体数。未见到病毒粒体的标样, 再找三个网孔重复观察。此外, 还用了十种大蒜病毒病原抗血清的ELISA反应检测再生苗的脱毒效果。再生苗移栽在消毒土壤上, 在防虫网内生长结球。

表 1 不同大蒜品种组织内带病毒情况

品 种	标 样 号	组 织	病毒粒体数		
			I	II	III
阿城 紫皮蒜	32	蒜瓣苗叶	210	150	240
			170	295	145
	2	气生鳞茎苗叶	170	185	150
			165	100	132
	20	气生鳞茎苗叶	85	110	69
	1	愈伤组织	2	4	1
宁安 紫皮蒜	21	蒜瓣苗叶	225	236	270
			240	256	251
宁安 白皮蒜	31	蒜瓣苗叶	86	110	97
			75	63	128

### 试 验 结 果

1. 大蒜各器官组织内和品种间病毒的分布情况: 用负染法电镜检查了大蒜的叶, 贮藏叶和根。观察到各器官内都有大量病毒粒体存在, 其长度不等。有一类病毒粒体长度在520~820nm左右, 可能是一些 Poty 和 Carla 病毒。另一类病毒粒体较长, 达到1200nm以上 (图1, 2)。把三个供试品种的蒜芽和气生鳞茎的小芽做成试管苗, 用负染法检测蒜叶内含病毒情况 (表1)。结果表明, 紫皮蒜叶组织内病毒含量比白皮蒜高, 由气生鳞茎产生苗的叶组织内病毒量比同品种的蒜瓣苗高 (表1)。这一结果可用来理解可以培养气生鳞茎做种蒜具有增产效应的经验。愈伤组织内病毒浓度极低, 有值得重视的脱毒作用。

2. 再生苗的培养与结蒜: 茎尖培养外植体大小限带一个叶原基。筛选出D<sub>6</sub>和D<sub>7</sub>二种生长快, 成活率高的茎尖生长培养基, 接种后10~15天左右就可见绿色小芽点。外植



宁安白皮蒜叶5万倍

$l_{11} = 1360nm$        $\phi_1 = 12nm$   
 $l_{12} = 672nm$        $\phi_2 = 12nm$



宁安紫皮蒜叶

$L_1 = 520nm$        $L_2 = 820nm$   
 $L_3 = 660nm$        $\phi = 12nm$

体在培养基上转绿和生长所需时间个体间有较大差别。这种差别在很大程度上可能与剥离茎尖时的操作情况有关。部分外植体产生了二个或二个以上茎的丛苗。少数外植体有不同程度的愈伤组织化。适时调整培养基的激素成份也获得再生苗。生根培养基采用1/2~1/4MS附加2~3%蔗糖。从接种到试管苗达到可移栽状态约需9个月和更长一些

时间。把贮藏叶表面灭菌后切成2.0mm见方的小块,接种在含2,4-D的培养基上。先暗培养约20天,然后移至光下培养。从外植体上切取愈伤组织并转到降低2,4-D的新鲜培养基上。以后定期继代,形成浅黄色颗粒状胚性愈伤组织,并分化出一些小苗。试管苗移植在消毒土中,在防虫网内生长。定期喷洒防虫农药和除去杂草。共收获138个蒜头,其中少部分蒜头当年分瓣。

3. 茎尖培养和愈伤组织的脱毒效果:  
三个大蒜品种的茎尖或气生鳞茎的茎尖再生苗十四株用负染法进行病毒检测(表2)。六株阿城蒜叶内未见病毒粒体的有三株;四株宁安紫皮蒜苗中有三株,四株宁安白皮蒜苗中有二株未见病毒粒体。由此可见,不同品种,不同器官来源的茎尖都能通过离体培养取得脱毒效果。

用洋葱黄矮病毒(Onion Yellow Dwarf Virus)、韭葱黄条病毒(Leek Yellow Stripe Virus)、亚实基隆葱潜隐

病毒(Shallot Latent virus)、马铃薯Y病毒(PVY)、马铃薯A病毒(PVA)、马铃薯S病毒(PVS)、马铃薯M病毒(PVM)康乃馨潜隐病毒(Carnation Latent Vir.s)、烟草花叶病毒(TMV)和大蒜混合病毒等十种抗血清对十五株茎尖再生苗、九株贮藏叶再生苗和15块愈伤组织做ELISA反应(表3)。十五株茎尖再生苗中有60%脱去了一种或一种以上病毒。愈伤组织和由愈伤

大蒜茎尖培养试管苗叶内病毒粒体数  
表 2

株 号	I	II	III	株 号	I	II	III	株 号	I	II	III
阿城蒜气生鳞茎				宁安紫皮蒜				宁安白皮蒜			
CF <sub>59</sub>	1	0	0	CZ <sub>83</sub>	3	2	3	CB <sub>00</sub>	0	0	0
CF <sub>39</sub>	1	0	0	CZ <sub>91</sub>	0	0	0		0	0	0
CF <sub>84</sub>	0	0	0		0	0	0	CB <sub>42</sub>	0	1	0
	0	0	0	CZ <sub>87</sub>	0	0	0	CB <sub>9</sub>	1	0	0
CF <sub>138</sub>	0	0	1		0	0	0		0	0	0
CF <sub>152</sub>	0	0	0	CZ <sub>20</sub>	0	0	0	CB <sub>55</sub>	0	0	0
	0	0	0		0	0	0		0	0	0
CF <sub>154</sub>	0	0	0								
	0	0	0								

表 3 茎尖和愈伤组织再生苗的ELISA反应结果

材 料	株 号	Mix	OYDV	LYSV	SLV	PVY	PVA	PVS	PVM	CLV	TMV
阿 城 蒜 气生鳞茎 茎 尖 苗	CF140	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CF152	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	CF143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿 城 蒜 贮 藏 叶 再 生 苗	C1091		+	+	-	-	+	-	-	-	-
	C1091		+	+	+	-	+	-	-	-	-
	C108		-	-	+	-	+	-	-	-	-
	C106		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C124		-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿 城 蒜 贮 藏 叶 愈 伤 组 织	C116		-	-	-	-	+	-	-	-	-
	C116		-	-	-	-	+	-	-	-	-
	C104		-	-	-	-	-	-	-	-	+
	C105		+	+	-	-	+	+	-	-	-
	C105		-	-	+	-	+	-	-	-	-
宁 安 紫 皮 茎 尖 再 生 苗	CZ77	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
	CZ78	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
	CZ79	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	CZ80	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	CZ42	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	CZ65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
宁 安 白 皮 茎 尖 再 生 苗	CB34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CB35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CB33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CB42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CB129	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
	CB128	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

组织再生的蒜苗脱毒效果明显优于茎尖再生苗。五株愈伤再生苗中有二株为无病毒苗，其它三株脱去了五~七种病原病毒。5块愈伤组织标样内仅带一种病毒的有三株，其它二株尚有少数（二~四种）病毒未脱尽。

4. 热处理的脱毒效果：宁安白皮蒜的蒜瓣和阿城紫皮蒜的气生鳞茎经表面灭菌后接种在事先准备好的培养基上，置培养室内令其萌芽和生长。然后移入生物培养箱内，在35℃条件下培养八周后剥离茎尖。高温处理前宁安白皮蒜苗高约8公分左右，而阿城紫皮蒜因未充分结束休眠，蒜芽刚露出贮藏叶。在高温处理期间不见明显的生长。剥离茎尖时大部分已经死亡，只得到了少数再生苗。用负染法电镜检查脱毒效果（表4），宁安白皮蒜取得了明显的脱毒效果，四株受

表 4 35℃ 高温处理脱毒效果

株 号	I	II	III
阿城紫皮蒜			
CFt <sub>4</sub>	43	28	25
CFt <sub>5</sub>	19	22	26
	27	16	20
CFt <sub>6</sub>	0	1	0
CFt <sub>7</sub>	26	20	28
宁安白皮蒜			
CBt <sub>1</sub>	0	0	0
	0	0	0
CBt <sub>2</sub>	0	0	0
	0	0	0
CBt <sub>3</sub>	0	0	0
	0	0	0
CBt <sub>4</sub>	0	0	0
	0	0	0

检苗内全未发现病毒粒体。而四株阿城紫皮蒜苗中只有一株含极微量病毒。这一结果除了可以考虑白皮蒜病毒含量较紫皮蒜低这一因素外，高温处理前试管苗一定量的生长状态可能是影响脱毒效果的重要因素。

## 讨 论

用气生鳞茎作脱毒培养的外植体来源具

有成本低，操作效率高，组织内病毒含量较低等优点。通过愈伤组织再生是值得重视的一种脱毒途径，脱毒效率可能比茎尖培养高得多，但分化技术亟待完善。利用高温培养技术获得脱毒苗，在处理前苗的生长是重要的条件。各种不同的脱毒途径都能产生一定比例的脱毒苗，但脱毒效率有区别。建立高效简便的脱毒苗培养技术和再生苗选汰技术是大蒜脱毒工作的核心技术。

（参考文献略 1991.12.31 邮码150054）

## 补淡中熟品种——岳阳二号

8月中旬至9月中旬，正值祝光苹果下市，金帅尚不成熟的时候，是苹果市场的一个小淡季，博山区新选出的岳阳二号苹果则是弥补这个小淡季的优良品种。该品种是七十年代初期在山东省淄博市博山区北崮山果园发现的，经过十几年的区域实验证明，确是一个丰产优质色好果大抗性强的优良品种。

北崮山果园建于1967年冬季，主栽品种为青香蕉、红玉，苗木来自本省蓬莱县园艺场。1974年该园发现一株变异苹果树，经加强管理，1976年开始结果，此时该树十年生，树高4.8米，干周59厘米，冠径5.6×5.8米。此树多年生灰褐色，当年生枝红褐色，新梢年生生长量24厘米，萌芽率61%，成枝率24%，新梢粗壮节间短，长中短枝比为3:15:39，具有半矮化特征，叶片长圆形，光滑平展，叶基圆，叶片长×宽为11.0厘米×6.5厘米，叶柄长2.5厘米。岳阳二号以短果枝群结果为主，座果率极高，平均每个果台座果2.8个，座4—5个果的占30~40%，果实长圆形，纵径为5厘米左右，横径为6厘米左右，单果重220克，果面有红条纹，色泽鲜艳，果实硬度为7—9磅/厘米<sup>2</sup>，可溶性固形物16—18%，风味特甜，果实贮藏期一个月，该树树势强壮，抗病、抗瘠薄、抗旱能力均强，但由于座果率高，在不疏花、疏果的情况下有“大小年”现象。

1967年开始在本区试栽，其中后峪果园20多亩，该园土质为砂砾土，肥力较差，在粗放管理的情况下，四年生开始结果，六年生亩产五百公斤，植物学特征与生物学特性完全同母树，深受生产者和消费者欢迎。从八十年代初开始在本地区大力推广，目前已开始结果，作为一个中熟补淡品种很有发展前途。（山东省淄博市博山区科委 马守信 邮码 255200）