

大蒜气生鳞茎快繁体系研究

王 珍, 范宝莉, 任春雪, 顾增惠, 刘晓颖, 王振英

(天津师范大学 生命科学院, 天津 300387)

摘 要:以宝坻大蒜气生鳞茎为试材,比较了不同低温处理时间、不同诱导培养基对试管苗诱导率的影响,优化了气生鳞茎快繁体系。结果表明:低温处理 14 d,试管苗的诱导率最高;诱导生根的最佳培养基为 MS 基本培养基。由于气生鳞茎诱导试管苗不经过脱分化和再分化过程,所以不会产生遗传变异。

关键词:宝坻大蒜;气生鳞茎;植物脱毒;快繁

中图分类号:S 633.403.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0079-04

大蒜(*Allium sativum* L.)属百合科(Liliacea)葱属(*Allium tistalosum*),在我国栽培历史有 2000 余年,遍及全国各地。大蒜以鳞茎(地蒜)、蒜薹和幼株食用,还可以生产青蒜和蒜黄,是群众最喜爱的主要蔬菜之一。宝坻大蒜“六瓣红”是津沽名优特产之一,营养价值高,具有强力杀菌、防治癌症、排毒清肠、降低血糖和防治心脑血管疾病等功效。但是大蒜通常以蒜瓣进行无性繁殖,在长期的无性繁殖过程中,因病毒逐年积累并代代相传,使种性逐渐退化,蒜头变小,产量、品质大幅下降。大蒜采用气生鳞茎(天蒜)繁殖时,天蒜采自蒜薹(花薹)顶端的花苞(生长点),而大蒜生长点部位一般不带病毒,因而可自然脱毒^[1]。

目前已建立了以茎尖^[2]、根尖^[3]、全展叶^[4]、贮藏叶^[5]、茎盘切块^[6]和花原始体^[7]等为外植体的大蒜组织培养再生体系。大蒜的离体再生途径主要有愈伤组织途径和不定芽途径。愈伤组织途径是通过外植体的脱分化实现的,但是愈伤组织再生途径的效率不高,因此建立一种新的高效的大蒜快繁体系是非常必要的。大蒜气生鳞茎在生产实践上主要被用来提纯及复壮^[8],但由于只有成熟的气生鳞茎才能做“种子”,而培养成熟的气生鳞茎会争夺地蒜的营养,影响地蒜的产量,降低种蒜的收益。该研究利用未成熟的大蒜气生鳞茎作为外植体直接诱导试管苗,使大蒜实现天然脱毒的同时,又避免愈伤组织途径脱分化、再分化、繁殖系数低以及容

易产生遗传变异的缺憾,同时不影响地蒜的正常生长,以期之宝坻大蒜的脱毒快繁和种质创新打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为宝坻大蒜“六瓣红”的气生鳞茎。

1.2 试验方法

1.2.1 气生鳞茎的形态学解剖 选取 3 个花苞,按体积的大小从中挑取 10 颗气生鳞茎进行排序,分别称量并记录气生鳞茎重量,并进行形态学解剖,观察其是否含有贮藏叶。统计重量为何值时气生鳞茎中不再含有贮藏叶。因为只有含有贮藏叶,气生鳞茎才有可能诱导生成试管苗。3 次重复。

1.2.2 培养基的配置 以 MS 培养基为基本培养基,添加不同种类和浓度的激素,pH 5.8;高温高压灭菌 20 min;待冷却至 60℃时,分装到 200 mL 的组培瓶中,每瓶约 35 mL,盖紧瓶盖备用。试验中所用培养基为:试管苗诱导培养基:MS 基础培养基+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L KT;试管苗生根培养基:MS 基础培养基。

1.2.3 大蒜气生鳞茎的低温处理 在不影响地蒜生长的前提下将尚未成熟的花苞采摘下来,4℃保存,共设置低温 7、14、28、84 d 4 个处理,用于试管苗诱导试验。

1.2.4 接种及试管苗的诱导 取生长良好有贮藏叶的宝坻大蒜气生鳞茎,用 75%的乙醇浸泡 10 min,用无菌水冲洗,滤纸吸干,再用 0.1%的 HgCl₂ 灭菌 10 min,用无菌水冲洗 3 次,滤纸吸干,接入试管苗诱导培养基上,每瓶接入 7 颗气生鳞茎,每个处理 20 瓶,按 1.2.3 下的方法低温处理。培养条件为日温 25℃,夜温 20℃,光照 1 500 lx,光照时间 14 h/d。培养 49 d,每 7 d 进行观察统计诱导率。

1.2.5 生根培养 将诱导出来的生长旺盛的苗转入生根培养基中,诱导生根,生根培养基为 MS 基础培养基。

第一作者简介:王珍(1990-),女,硕士研究生,研究方向为植物细胞遗传学。E-mail:chilaideaiwangzhen@qq.com

责任作者:王振英(1965-),女,博士,教授,研究方向为植物抗性分子生物学。

基金项目:天津市农委重点资助项目(5KNI3001);天津师范大学应用开发研究基金资助项目(52XK1210)。

收稿日期:2014-07-14

35 d 之后统计生根率。

1.2.6 试管苗的练苗及移栽 生根后的试管苗,待其长到 3 片真叶、生根 3~4 条时,室温开瓶练苗,7~10 d 后将小植株从试管中取出,洗去根部培养基将其移栽至灭菌的珍珠岩、蛭石和泥炭土(1:3:6)中,移栽后保持日温 25℃,夜温 15℃,在组织培养室中放置 30 d 壮苗,之后移栽到大田。

1.2.7 气生鳞茎试管苗根尖和地蒜根尖染色体的观察 待地蒜根(对照)和气生鳞茎诱导的试管苗的根长到 1 cm 时将根取下,用卡诺固定液固定 24 h,于 70%乙醇中保存,用于染色体观察。将根在 1 mol/L 盐酸、60℃条件下解离 8 min,蒸馏水冲洗 3 遍,用滤纸将处理好的根擦干,取根尖,用卡宝品红染色 8 min,压片,进行染色体的观察。

表 1 不同重量的气生鳞茎与贮藏叶的关系

Table 1 The relationship between aerial bulb weight and storage leaf

组数 Group number	编号 Number	重量 Weight /g	是否含有贮藏叶 Whether it contain storage leaf	能否诱导试管苗 Whether induction plantlets	组数 Group number	编号 Number	重量 Weight /g	是否含有贮藏叶 Whether it contain storage leaf	能否诱导试管苗 Whether induction plantlets	组数 Group number	编号 Number	重量 Weight /g	是否含有贮藏叶 Whether it contain storage leaf	能否诱导试管苗 Whether induction plantlets
第 1 组	1	0.1883	是	能	第 2 组	1	0.1724	是	能	第 3 组	1	0.1655	是	能
	2	0.1415	是	能		2	0.1567	是	能		2	0.1519	是	能
	3	0.0903	是	能		3	0.1203	是	能		3	0.0951	是	能
	4	0.0502	是	能		4	0.0676	是	能		4	0.0830	是	能
	5	0.0423	是	能		5	0.0478	是	能		5	0.0592	是	能
	6	0.0170	是	能		6	0.0250	是	能		6	0.0277	是	能
	7	0.0115	是	能		7	0.0162	是	能		7	0.0125	是	能
	8	0.0093	是	能		8	0.0089	是	能		8	0.0088	是	能
	9	0.0076	否	否		9	0.0078	否	否		9	0.0082	否	否
	10	0.0028	否	否		10	0.0053	否	否		10	0.0063	否	否

2.2 不同时间低温处理对试管苗诱导率的影响

从表 2 可以看出,低温处理 7、14、28、84 d 的气生鳞茎,培养 7 d 后,前 3 种处理的气生鳞茎诱导率基本相近,分别为 2.09%、2.16%、2.12%,而低温处理 84 d 的

表 2 不同时间低温处理试管苗的诱导率

Table 2 The induction rate of plantlets under low temperature treatment with different time

诱导时间 Induction time/d	诱导率 Induction rate/%			
	低温处理 7 d Low temperature treatment for 7 days	低温处理 14 d Low temperature treatment for 14 days	低温处理 28 d Low temperature treatment for 28 days	低温处理 84 d Low temperature treatment for 84 days
7	2.09	2.16	2.12	0
14	15.24	17.35	14.86	0
21	26.83	47.47	42.72	2.24
28	49.2	65.24	48.11	19.24
35	55.62	73.47	44.68	27.75
42	61.35	77.26	42.24	30.26
49	64.24	79.71	36.85	32.71
56	67.79	82.60	36.85	33.24
63	71.43	81.66	34.24	36.57
70	68.61	81.66	34.24	38.65

2 结果与分析

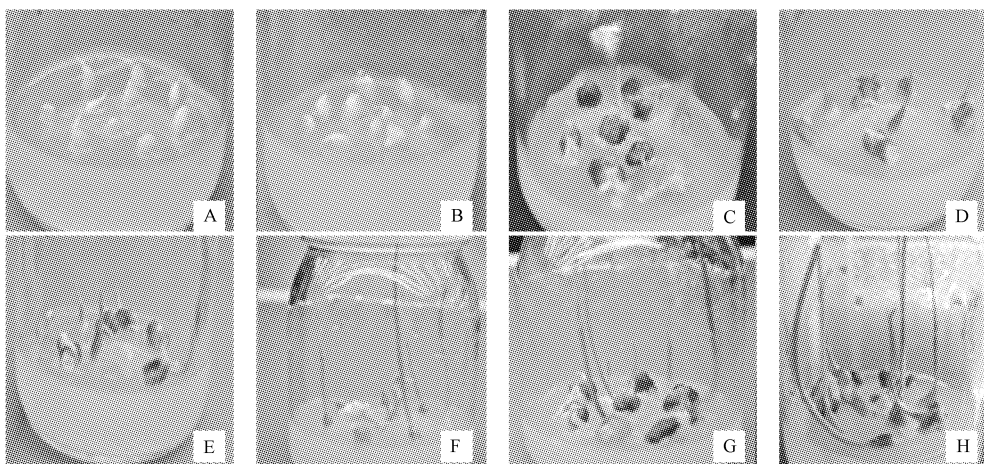
2.1 气生鳞茎大小与储藏叶的关系

气生鳞茎是否含有贮藏叶是其能否发芽的关键,只有含有贮藏叶的气生鳞茎才有可能被诱导生成试管苗,所以,在气生鳞茎诱导培养之前,对不同大小的气生鳞茎做形态学解剖,找出气生鳞茎的重量与是否含有贮藏叶之间的关联,最终通过称重挑选带有贮藏叶的气生鳞茎进行试管苗诱导。从表 1 可以看出,在第 1 组中重量为 0.0093 g 的气生鳞茎含有贮藏叶,重量为 0.0076 g 的气生鳞茎不含有贮藏叶,第 2 组中重量为 0.0089 g 的含有贮藏叶,重量为 0.0078 g 的不含有贮藏叶,在第 3 组中重量为 0.0088 g 的含有贮藏叶,重量为 0.0082 g 不含有贮藏叶。3 次试验中不含贮藏叶的气生鳞茎重量的平均值为 0.009 g,所以,选取重量大于 0.009 g 的气生鳞茎用于试管苗的诱导,弃掉重量小于 0.009 g 的气生鳞茎。

气生鳞茎,培养 7 d 后诱导率为 0,到 21 d 时才达到 2.24%,此时低温处理 14 d 的气生鳞茎诱导率已经达到 47.47%;培养到第 70 天时,试管苗的诱导率分别为 68.61%、81.66%、34.24%、38.65%,显然低温处理 14 d 的气生鳞茎萌发率和试管苗的诱导率都高于其它低温处理组。

2.3 大蒜气生鳞茎可以直接诱导试管苗

由图 1 可以看出,在接入诱导培养基 7 d 后,气生鳞茎的表面开始变绿(图 B);生长 14 d 后,部分气生鳞茎的内部开始长出嫩芽(图 C);21 d 后,气生鳞茎诱导生成的苗逐渐长大,数量开始增多,诱导率逐渐增大(图 D);生长 28 d 后,气生鳞茎诱导出的苗不断生长,出苗率不断增加;发育至 49 d 时,苗已长至 10 cm 左右,生长强壮、呈深绿色(图 E-H)。每个宝坻大蒜的花苞平均含有 70 颗气生鳞茎,其中 65 颗含有贮藏叶,可用于试管苗的诱导,一个花苞平均可以获得试管苗 40 株(繁殖系数为 40),与用地蒜繁殖大蒜(繁殖系数为 6)相比,效率提高了 6.67 倍。



注:A:气生鳞茎刚接入诱导培养基;B:生长 7 d;C:生长 14 d;D:生长 21 d;E:生长 28 d;F:生长 35 d;G:生长 42 d;H:生长 49 d。

Note: A: Aerial bulb vaccinate to inductive medium; B: growth for 7 days; C: growth for 14 days; D: growth for 21 days; E: growth for 28 days; F: growth for 35 days; G: growth for 42 days; H: growth for 49 days.

图 1 气生鳞茎诱导试管苗

Fig. 1 Aerial bulbils induce plantlets

2.4 试管苗的生根培养

有 9% 的气生鳞茎试管苗在诱导培养基上出现生根现象,但绝大多数的试管苗没有生根。将未生根的试管

苗接种在生根培养基上(MS 基础培养基),6 d 后,部分试管苗出现生根现象,继续培养到 45 d 时,试管苗的生根率达到 95% 以上(图 2)。

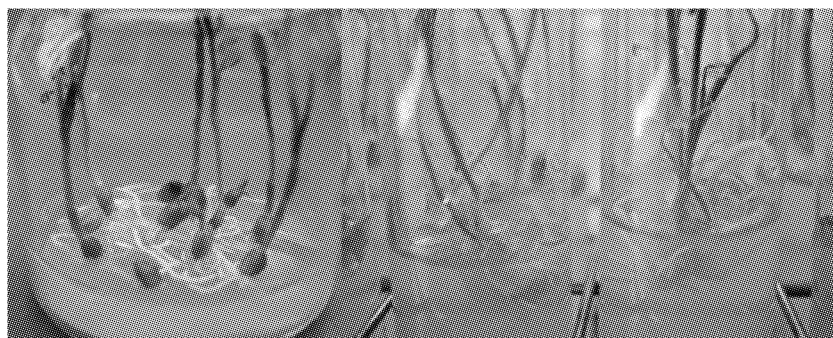


图 2 气生鳞茎试管苗的生根情况

Fig. 2 Roots of plantlet induced from aerial bulbils

2.5 试管苗练苗及移栽

为了提高试管苗对外界环境条件的适应性,提高其光合作用的能力,促使组培苗健壮,移栽成活率高,试管苗必需经过一段时间的练苗后方可移栽。该研究共移栽试管苗 330 株,成活 330 株,成活率为 100%。

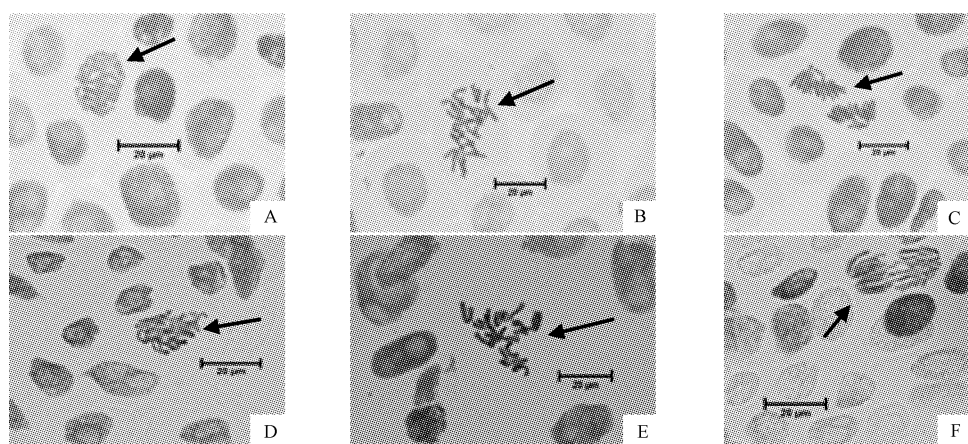
2.6 气生鳞茎试管苗与地蒜染色体观察分析

从图 3 可以看出,A 为大蒜根尖细胞分裂前期图,B 为细胞分裂中期图,能清晰的看出细胞中含有 16 条染色体。C 为细胞分裂后期图。D 为气生鳞茎试管苗根尖细胞分裂前期图,B 为细胞分裂中期图,能清晰的看出细胞中含有 16 条染色体。F 为细胞分裂后期图。上述结果说明,用气生鳞茎直接诱导的试管苗细胞染色体数目、形态结构正常,诱导过程中没有发生染色体变异,进一步说明不经过脱分化和再分化过程,对保持大蒜品种

的遗传特性有现实意义。

3 讨论

用大蒜愈伤组织进行脱毒和快繁虽然有诸多优点,但大蒜愈伤组织在脱分化和再分化过程中普遍存在着染色体的高变异率,Maggioni 等^[9]用叶片外植体诱导的愈伤组织,只有 45.9% 的细胞是二倍体,其它为八倍体、三倍体、四倍体、非整倍体,还有 20% 的细胞含很多染色体。为了保持大蒜的遗传特性,同时又能进行大蒜的脱毒、快繁,生产上常常用成熟的气生鳞茎做“种子”进行大蒜提纯、复壮繁殖。张绍文等^[10]对大蒜气生鳞茎利用价值进行研究,发现用成熟的天蒜播种,其增殖倍数均在 30 倍以上,但留天蒜植株的地蒜产量较不留株减产 22.6%~33.0%。该研究建立了用未成熟的气生鳞茎进



注:A~C为大蒜根尖染色体观察;D~F为气生鳞茎试管苗根尖染色体观察。A:前期图;B:中期图;C:后期图;D:前期图;E:中期图;F:后期图。

Note: A~C observation of chromosome in garlic root tip; D~F observation of chromosome in plantlets root tip. A: prophase; B: metaphase; C: anaphase; D: prophase; E: metaphase; F: anaphase.

图3 大蒜和气生鳞茎试管苗染色体观察

Fig. 3 Observation of chromosome in garlic root tip and plantlets root tip

行大蒜脱毒快繁的技术体系,在不影响地蒜生长的情况下实现了大蒜快繁。

大蒜气生鳞茎的萌发受到贮藏时间、温度、气生鳞茎大小、植物激素配比等多种因素的影响。低温处理时间对气生鳞茎试管苗的诱导率有一定的影响,李小川等^[11]、Seabrook^[12]认为气生鳞茎在4℃的低温条件下贮藏一定的时间能够打破其休眠,促进试管鳞茎的萌发。但该研究发现,虽然低温贮藏能够促进气生鳞茎的萌发,但是低温贮藏时间有一定的限度,该研究用4℃低温贮藏气生鳞茎14 d,试管苗的诱导率最高能达到81.66%,而随着贮藏时间的增加其诱导率逐渐降低,可能是由于低温贮藏时间长,引起气生鳞茎内源代谢发生紊乱,从而造成气生鳞茎的生理活性降低,因此低温贮藏时间应在14 d左右为宜。

参考文献

- [1] 强芳英,王转军.大蒜气生鳞茎繁殖复壮效果与技术[J].上海蔬菜,2010(6):18.
- [2] 于德才,李学湛,吕典秋,等.大蒜茎尖脱毒及快繁研究[J].北方园艺,2005(6):84-85.

- [3] 张昌伟,侯喜林,袁建玉,等.太大大蒜根尖离体培养直接诱导不定芽及试管鳞茎的形成[J].植物生理学通讯,2004,40(2):167-170.
- [4] 杨乃博.大蒜全展叶愈伤组织的诱导和植株再生[J].植物生理学通讯,1981(6):47-48.
- [5] 周云罗,钱迎倩,蔡起贵,等.大蒜贮藏叶诱导愈伤组织及植株再生[J].植物学报,1980,22(4):402-403.
- [6] Mohamed Yasseen Y. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflorescences[J]. Hortscience,1993,28(10):1052.
- [7] 栾非时,陈典,陈友.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.
- [8] 马雯,李唯,李金娟.贮藏时间和外源激素对大蒜气生鳞茎形成的影响[J].湖南农业科学,2011(19):41-44,56.
- [9] Maggioni L, Cordi C, Fogher C. Callus induction ploidy level and plant regeneration in vitro garlic (*Allium sativum* L.) cultures[J]. Journal of Genetics and Breeding,1989,43(4):251-254.
- [10] 张绍文,孙治强,杨佳辉,等.大蒜气生鳞茎(天蒜)利用价值的研究[J].中国蔬菜,1994(4):14-16.
- [11] 李小川,赵美华.大蒜鳞茎生长点离体培养诱导小鳞茎的形成[J].山西农业科学,1996,24(3):59-60.
- [12] Seabrook J E A. *In vitro* propagation and bulb formation of garlic[J]. Canadian Journal of Plant Science,1994,74:155-158.

Research on the Rapid Propagation System of Garlic Bulbils

WANG Zhen, FAN Bao-li, REN Chun-xue, GU Zeng-hui, LIU Xiao-ying, WANG Zhen-ying
(College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract: Taking the bulbils of the Baodi garlic as materials, the conditions of the rapid propagation system were optimized by comparing the different low temperatures processing time and different medium induction rate. The results showed that the highest induction rate of plantlets was acquired when processed under low temperature for two weeks. The basic MS medium was the best medium for root induction. Since bulbils induced plantlets without dedifferentiation and re-differentiation process, so it would not produce genetic variation.

Keywords: Baodi garlic; bulbil; virus elimination; rapid propagation