



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109526743 A
(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811625670.7

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 中国农业科学院蔬菜花卉研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72)发明人 王海平 李锡香 武亚红 宋江萍
张晓辉 邱杨

(74)专利代理机构 西安知诚思迈知识产权代理
事务所(普通合伙) 61237
代理人 麦春明

(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)

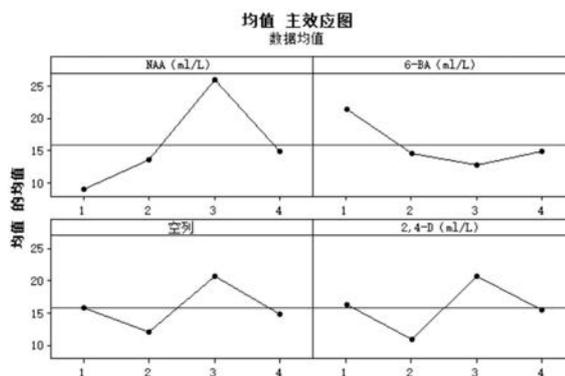
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法

(57)摘要

本发明公开了一种大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,具体步骤如下:步骤S1、选取当年收获的10月至第二年6月饱满无病伤大蒜鳞芽,并去除外叶;步骤S2、分别取大蒜鳞芽的鳞茎盘、外叶鞘、内叶鞘和根尖为外植体诱导愈伤组织;步骤S3、外植体诱导愈伤组织45~50天后,将其愈伤组织继代扩繁并进行分化获得再生植株;步骤S4、对再生植株进行微型蒜诱导或田间移栽,获得原原种;步骤S5、播种原原种繁育原种大蒜,并对原种大蒜进行扩繁。外植体诱导愈伤组织的愈伤诱导培养基为B5+NAA 0.5mg/l+6-BA 0.1mg/l+2,4-D 1.0mg/l+蔗糖30g/L培养基。解决了优良大蒜品种繁殖系数低的问题。



1. 大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,具体步骤如下:

步骤S1、选取材料:选取当年收获的10月至第二年6月的饱满无病伤大蒜鳞芽,将大蒜鳞芽去除外叶;

步骤S2、分别取大蒜鳞芽的储藏叶、鳞茎盘、外叶鞘、内叶鞘和根尖为外植体诱导愈伤组织;

步骤S3、植株分化和再生:外植体诱导愈伤组织45~50天后,将其愈伤组织继代扩繁并进行分化获得再生植株;

步骤S4、获得原原种:对再生植株进行微型蒜诱导或田间移栽,获得原原种;

步骤S5、播种原原种繁育原种大蒜,并对原种大蒜进行扩繁。

2. 根据权利要求1所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述步骤S2的实现过程如下:

步骤S21、在灭菌后的培养皿中放入灭菌滤纸,然后倒入灭菌蒸馏水浸湿灭菌滤纸,并形成愈伤诱导培养基中;

步骤S22、根尖做外植体诱导愈伤组织:切取大蒜鳞芽根尖4~5mm接种于愈伤诱导培养基中;

鳞茎盘做外植体诱导愈伤组织:切下大蒜鳞芽的蒜瓣基部,将蒜瓣基部去除四周褐色硬化部分后切块,接入愈伤诱导培养基中;

内叶鞘和外叶鞘做外植体诱导愈伤组织:将大蒜鳞芽的新生茎段切成2mm,然后将中心新鲜呈黄绿色部分和最外层白色部分切成5mm片状,分别接入到愈伤诱导培养基中;

储藏叶做外植体诱导愈伤组织:取大蒜鳞芽蒜瓣靠近新生茎段部分,将去除最外层和最内层的蒜瓣切成2mm的薄片,接种于愈伤诱导培养基中。

3. 根据权利要求1所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述步骤S3是在光照强度为3000lux~5000lux、温度为18~28℃的无菌培养室条件下,将外植体的愈伤取下,放入愈伤继代培养基中,每20天继代一次,继代3次后转入再生培养基中,30~40天分化成再生植株。

4. 根据权利要求2所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述愈伤诱导培养基为B5+NAA 0.5mg/l+6-BA 0.1mg/l+2,4-D 1.0mg/l+蔗糖30g/L培养基。

5. 根据权利要求3所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述愈伤继代培养基为B5+0.1mg/L6-BA+1mg/LNAA培养基;

所述再生培养基为MS+1mg/L6-BA+0.1mg/LNAA培养基。

6. 根据权利要求1所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述步骤S4中对再生植株进行微型蒜诱导获得原原种的具体步骤为:切取2.8~3.2cm带根再生植株分别接入微型蒜诱导培养基MS+1.0mg/L IBA+蔗糖30g/L中,初代培育29~31天,长出白色小鳞茎,68~72天后收获小鳞茎,获得原原种。

7. 根据权利要求1所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在於,所述步骤S4中再生植株田间移栽获得原原种的具体步骤为:

步骤S41、炼苗:从培养室中取出再生植株培养瓶,放于温度 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的温室中,在温室中封口炼苗2~3天后,打开封口膜加入盖过培养基3~5mm的自来水,再继续炼苗2~3天后移栽;

步骤S42、育苗移栽:育苗基质为蛭石,移栽前对蛭石灭菌并用水浇透,在蛭石上挖小穴,用水冲洗再生植株后放于穴中并覆盖;前7天每天浇营养液2次,并适当补水;

步骤S43、田间移栽:育苗移栽14天后,将蒜苗移栽于环境温度为15~28℃的苗钵或者大田后正常田间管理,再生苗在田间移栽后获得的鳞茎为原原种。

8. 根据权利要求1所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在于,所述步骤S5播种原原种,繁育原种大蒜并对原种大蒜进行扩繁的具体步骤如下:

步骤S51、选择播期:在10月上旬,日均温为20~22℃时期播种原原种;

步骤S52、土壤选择:选取有机质丰富、土层深厚、排水良好的微酸性沙质土壤;

步骤S53、设立防虫网室:防虫网室以钢架大棚的骨架为支撑,覆以40目防虫网;

步骤S54、整地施肥:早耕晒垡细耙,耕深20~30cm;在翻地时施充分腐熟的有机肥200~333kg/hm²,腐熟鸡粪6.67kg/hm²,并均匀混入磷酸二铵2.67kg/hm²,尿素1kg/hm²,N元素含量15%、P₂O₅含量15%和K₂O含量15%的硫酸钾复合肥6.67kg/hm²;

步骤S55、原原种播种:原原种播种按行距8cm开浅沟,播种前浅沟内浇水,按株距6cm进行播种,播种后插小拱棚覆膜保温保湿;

步骤S56、播种后除草:施用大蒜用除草剂并用地膜覆盖;

步骤S57、苗期管理:原原种苗期管理,控制拱棚内的温度,使苗成活并逐渐适应外部环境;原种苗期,控制发芽时温度为12~20℃、幼苗生长的温度为12~16℃,大蒜出苗期间,对未能顶破薄膜的大蒜幼苗及时人工破膜辅助出苗;同时进行肥水管理、病虫害防治和摘薹工作;

步骤S58、收获原种大蒜:摘薹后20天或地上部植株2/3已经黄化即可收获蒜头,蒜头成熟的标志是大蒜植株叶片开始发黄,假茎变软;

步骤S59、对原种大蒜进行扩繁:先进行原种大蒜播种前处理,原种大蒜的播种行距为20cm,株距为12cm,播种前按行距开深5cm的浅沟。

9. 根据权利要求8所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在于,所述步骤S57肥水管理具体为:在大蒜越冬前喷水1次,3月上旬结合浇水追施尿素150kg/hm²,4月上旬结合浇水追施尿素150kg/hm²;摘薹后结合浇水追施尿素150kg/hm²;

所述步骤S58摘薹具体步骤为:在蒜薹抽出24~26cm时,于晴天中午前后用铁钉在蒜薹距地面15~20cm处中间扎孔,然后将蒜薹慢慢抽出,摘薹时尽量保护叶片不受损害。

10. 根据权利要求8所述的大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,其特征在于,所述步骤S59中原种大蒜播种前处理是:将原种大蒜摊开,在太阳下晒2天,去除蒜皮后将种蒜放入50%多菌灵500倍液中浸种12~16小时,捞出晾干后再播种。

大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法

技术领域

[0001] 本发明属于农产品种植领域,特别是涉及一种大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法。

背景技术

[0002] 大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科(Liliaceae)葱属植物(*Allium* spp.),大蒜是典型的无性繁殖作物,在生产上通常采用鳞茎繁殖,病毒一旦侵入大蒜植株,因鳞茎母体带病毒,以垂直传染方式传给后代,致使大蒜体内病毒浓度逐代增高,引起种性退化,产量及品质逐年降低。植物茎尖培养是解决上述问题的重要途径,但优良的大蒜品种需要快速满足生产的需要,只通过田间鳞芽或茎尖培养仍然不能达到对优良种源进行快速繁殖的需要。

[0003] 虽然大蒜的组织培养和微型蒜的形成在过去已经有一些研究报道,也为大蒜的组织快繁殖奠定了一定研究基础。但传统茎尖培养方法繁殖系数低和周期长是障碍优良大蒜品种产业化的难题。愈伤组织培养作为一种最常的组织培养形式,除茎尖分生组织培养的一部分器官培养以外,其他几种培养形式最终都要愈伤组织才能产生再生植株。愈伤组织培养具有多种用途。一方面可研究植物生长发育及分化的机制、遗传变异规律,对植物遗传育种具有特殊意义;另一方面可用于大规模工厂化生产有用化合物,或用于细胞培养筛选工业、农业、医药生产上有用的无性系。实践证明,愈伤组织培养不仅是一种植物快繁的新手段,同时也是植物改良,种质保存和有用化合物生产的理想途径。因此,通过研究建立大蒜愈伤组织快繁、良种繁育技术非常必要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,以解决传统大蒜繁育方法优良品种繁殖系数低的问题。

[0005] 本发明所采用的技术方案是,大蒜愈伤组织快繁和良种繁育方法,具体步骤如下:

[0006] 步骤S1、选取材料:选取当年收获的10月至第二年6月的饱满无病伤大蒜鳞芽,将大蒜鳞芽去除外叶;

[0007] 步骤S2、分别取大蒜鳞芽的储藏叶、鳞茎盘、外叶鞘、内叶鞘和根尖为外植体诱导愈伤组织;

[0008] 步骤S3、植株分化和再生:外植体诱导愈伤组织45~50天后,将其愈伤组织继代扩繁并进行分化获得再生植株;

[0009] 步骤S4、获得原原种:对再生植株进行微型蒜诱导或田间移栽,获得原原种;

[0010] 步骤S5、播种原原种繁育原种大蒜,并对原种大蒜进行扩繁。

[0011] 进一步的,所述步骤S2的实现过程如下:

[0012] 步骤S21、在灭菌后的培养皿中放入灭菌滤纸,然后倒入灭菌蒸馏水浸湿灭菌滤纸,并形成愈伤诱导培养基中;

[0013] 步骤S22、根尖做外植体诱导愈伤组织:切取大蒜鳞芽根尖4~5mm接种于愈伤诱导培养基中;

[0014] 鳞茎盘做外植体诱导愈伤组织:切下大蒜鳞芽的蒜瓣基部,将蒜瓣基部去除四周褐色硬化部分后切块,接入愈伤诱导培养基中;

[0015] 内叶鞘和外叶鞘做外植体诱导愈伤组织:将大蒜鳞芽的新生茎段切成2mm,然后将中心新鲜呈黄绿色部分和最外层白色部分切成5mm片状,分别接入到愈伤诱导培养基中;

[0016] 储藏叶做外植体诱导愈伤组织:取大蒜鳞芽蒜瓣靠近新生茎段部分,将去除最外层和最内层的蒜瓣切成2mm的薄片,接种于愈伤诱导培养基中。

[0017] 进一步的,所述步骤S3是在光照强度为3000lux~5000lux、温度为18~28℃的无菌培养室条件下,将外植体的愈伤取下,放入愈伤继代培养基中,每20天继代一次,继代3次后转入再生培养基中,30~40天分化成再生植株。

[0018] 进一步的,所述愈伤诱导培养基为B5+NAA 0.5mg/l+6-BA 0.1mg/l+2,4-D 1.0mg/l+蔗糖30g/L培养基。

[0019] 进一步的,所述愈伤继代培养基为B5+0.1mg/L6-BA+1mg/LNAA培养基;所述再生培养基为MS+1mg/L6-BA+0.1mg/LNAA培养基。

[0020] 进一步的,所述步骤S4中对再生植株进行微型蒜诱导获得原原种的具体步骤为:切取2.8~3.2cm带根再生植株分别接入微型蒜诱导培养基MS+1.0mg/L IBA+蔗糖30g/L中,初代培育29~31天,长出白色小鳞茎,68~72天后收获小鳞茎,获得原原种。

[0021] 进一步的,所述步骤S4中再生植株田间移栽获得原原种的具体步骤为:

[0022] 步骤S41、炼苗:从培养室中取出再生植株培养瓶,放于温度 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的温室中,在温室中封口炼苗2~3天后,打开封口膜加入盖过培养基3~5mm的自来水,再继续炼苗2~3天后移栽;

[0023] 步骤S42、育苗移栽:育苗基质为蛭石,移栽前对蛭石灭菌并用水浇透,在蛭石上挖小穴,用水冲洗再生植株后放于穴中并覆盖;前7天每天浇营养液2次,并适当补水;

[0024] 步骤S43、田间移栽:育苗移栽14天后,将蒜苗移栽于环境温度为15~28℃的苗钵或者大田后正常田间管理,再生苗在田间移栽后获得的鳞茎为原原种。

[0025] 进一步的,所述步骤S5播种原原种,繁育原种大蒜并对原种大蒜进行扩繁的具体步骤如下:

[0026] 步骤S51、选择播期:在10月上旬,日均温为20~22℃时期播种原原种;

[0027] 步骤S52、土壤选择:选取有机质丰富、土层深厚、排水良好的微酸性沙质土壤;

[0028] 步骤S53、设立防虫网室:防虫网室以钢架大棚的骨架为支撑,覆以40目防虫网;

[0029] 步骤S54、整地施肥:早耕晒垡细耙,耕深20~30cm;在翻地时施充分腐熟的有机肥200~333kg/hm²,腐熟鸡粪6.67kg/hm²,并均匀混入磷酸二铵2.67kg/hm²,尿素1kg/hm²,N元素含量15%、P₂O₅含量15%和K₂O含量15%的硫酸钾复合肥6.67kg/hm²;

[0030] 步骤S55、原原种播种:原原种播种按行距8cm开浅沟,播种前浅沟内浇水,按株距6cm进行播种,播种后插小拱棚覆膜保温保湿;

[0031] 步骤S56、播种后除草:施用大蒜用除草剂并用地膜覆盖;

[0032] 步骤S57、苗期管理:原原种苗期管理,控制拱棚内的温度,使苗成活并逐渐适应外部环境;原种苗期,控制发芽时温度为12~20℃、幼苗生长的温度为12~16℃,大蒜出苗期

间,对未能顶破薄膜的大蒜幼苗及时人工破膜辅助出苗;同时进行肥水管理、病虫害防治和摘薹工作;

[0033] 步骤S58、收获原种大蒜:摘薹后20天或地上部植株2/3已经黄化即可收获蒜头,蒜头成熟的标志是大蒜植株叶片开始发黄,假茎变软;

[0034] 步骤S59、对原种大蒜进行扩繁:先进行原种大蒜播种前处理,原种大蒜的播种行距为20cm,株距为12cm,播种前按行距开深5cm的浅沟。

[0035] 进一步的,所述步骤S57肥水管理具体为:在大蒜越冬前喷水1次,3月上旬结合浇水追施尿素150kg/hm²,4月上旬结合浇水追施尿素150kg/hm²;摘薹后结合浇水追施尿素150kg/hm²;所述步骤S58摘薹具体步骤为:在蒜薹抽出24~26cm时,于晴天中午前后用铁钉在蒜薹距地面15~20cm处中间扎孔,然后将蒜薹慢慢抽出,摘薹时尽量保护叶片不受损害。

[0036] 进一步的,所述步骤S59中原种大蒜播种前处理是:将原种大蒜摊开,在太阳下晒2天,去除蒜皮后将种蒜放入50%多菌灵500倍液中浸种12~16小时,捞出晾干后再播种。

[0037] 本发明的有益效果是,通过对大蒜愈伤组织快繁殖获得试管苗,经过试管苗继代扩繁和植株再生繁育原原种,经过3级扩繁进行快繁,最终获得良种用于生产,解决了传统大蒜繁育方法优良品种繁殖系数低的问题,可以达到优良品种的快速繁殖。

[0038] 通过本发明方法,大大有效地提高了微型大蒜苗的快繁效率:

[0039] (1) 平均每个外殖体分化微型大蒜苗200~300个,明显提高了微型大蒜苗的增殖系数;与现有技术中的最优激素配方相比较,其繁殖系数得到了明显提高。

[0040] (2) 与现有技术的方法相比较,本发明获得的微型大蒜苗健壮程度有了显著提高;移入大田15天后的成活率在90~95%以上。

[0041] (3) 本发明的方法简易,更易应用于生产,可在大蒜组织培养快繁和工厂化种苗生产中应用。

[0042] (4) 可用于大蒜种质资源的保存和扩繁,在有效保存种质的同时,增加种质资源的繁殖量,可有效提高种质资源分发和利用效率。

附图说明

[0043] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0044] 图1是愈伤诱导培养基正交实验分析的主效应图;

[0045] 图2是愈伤继代培养基正交实验分析的主效应图;

[0046] 图3是微型蒜诱导培养基正交实验分析的主效应图。

具体实施方式

[0047] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0048] 大蒜愈伤组织快繁及良种繁育方法的具体步骤如下:

[0049] 步骤S1、选取材料;

[0050] 当年收获的大蒜10月至第二年6月的蒜营养状况较好,此时为大蒜进行室内脱毒快繁初代培养的最佳时间。选择饱满无病伤的大蒜鳞芽,对每个样品种进行编号并记录,防止不同品种间混杂,将收获的大蒜鳞芽去除外叶,放于干净的方盒内,用沙布封口。

[0051] 步骤S2、分别取大蒜鳞芽的储藏叶、鳞茎盘、外叶鞘、内叶鞘和根尖为外植体诱导愈伤组织;

[0052] 步骤S21、在灭菌后的培养皿中放入灭菌滤纸,然后倒入灭菌蒸馏水浸湿滤纸,并形成愈伤诱导培养基B5+NAA 0.5mg/l+6-BA 0.1mg/l+2,4-D 1.0mg/l+蔗糖30g/L;

[0053] 步骤S22、根尖做外植体诱导愈伤组织:切取大蒜鳞芽根尖4~5mm接种于愈伤诱导培养基中;此处将大蒜鳞芽根尖切取4~5mm,是为了使外植体大小合适,可依据需求适当调整。

[0054] 鳞茎盘做外植体诱导愈伤组织:切下大蒜鳞芽的蒜瓣基部,将蒜瓣基部去除四周褐色硬化部分后切成4块适当大小的组织块,接入愈伤诱导培养基中;此处将蒜瓣基部去除四周褐色硬化部分后切成4块,是为了使外植体大小合适,可依据需求适当调整。

[0055] 内叶鞘和外叶鞘做外植体诱导愈伤组织:将大蒜鳞芽的新生茎段切成2mm,将其中中心新鲜呈黄绿色部分和最外层白色部分切成5mm片状,分别接入到愈伤诱导培养基中;将大蒜鳞芽的新生茎段切成2mm,再将中心新鲜呈黄绿色部分和最外层白色部分切成5mm片状,是为了使外植体大小合适,可依据需求适当调整。

[0056] 储藏叶做外植体诱导愈伤组织:取大蒜鳞芽蒜瓣靠近新生茎段部分,将去除最外层和最内层的蒜瓣切成2mm左右的薄片,接种于愈伤诱导培养基中;此处将蒜瓣切成2mm左右的薄片,是为了使外植体大小合适,可依据需求适当调整。

[0057] 愈伤诱导培养通过正交实验确定,以B5培养基为基本培养基,对6-BA、NAA和2,4-D共3种成分进行4个水平的设计,再通过正交实验设计开展实验,统计平均出愈率,各水平状况如表1所示,实验数据如表2所示。

[0058] 表1确定愈伤诱导培养基的正交实验各激素水平组分含量

[0059]

水平	NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)	2,4-D (mg/L)
1	0.1	0.1	0.1
2	0.2	0.2	0.5
3	0.5	0.5	1.0
4	1.0	1.0	2.0

[0060] 表2愈伤诱导培养基的正交实验数据

[0061]

组别	NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)	2,4-D (mg/L)	空列	平均出愈率(%)
1	1	1	1	1	19.75
2	1	2	2	2	6.24
3	1	3	3	3	6.17
4	1	4	4	4	3.7

5	2	1	3	2	17.28
6	2	2	4	1	2.47
7	2	3	1	4	17.28
8	2	4	2	3	17.28
9	3	1	4	3	43.33
10	3	2	3	4	33.33
11	3	3	2	1	14.81
12	3	4	1	2	12.33
13	4	1	2	4	4.94
14	4	2	1	3	16.05
15	4	3	4	2	12.35
16	4	4	3	1	25.93

[0062] 表3愈伤诱导培养基正交实验后方差分析数据

[0063]

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
NAA	3	622.6	622.6	207.5	1.46	0.315
6-BA	3	172.2	172.2	57.4	0.40	0.755
2,4-D	3	196.1	196.1	65.4	0.46	0.719
误差	3	850.3	850.3	141.7		
合计	15	1841.1				

[0064] 表4愈伤诱导培养基正交实验后排秩状况

[0065]

水平	NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)	空列	2,4-D (mg/l)
1	8.965	21.325	15.740	16.352
2	13.578	14.523	12.050	10.818
3	25.950	12.653	20.708	20.678
Delta	14.985	14.810	14.813	15.463
排秩	1	3	4	2

[0066] 通过正交实验分析,如表3所示,在方差分析表明,各因素间的影响未达到显著水平。排秩状况如表4所示,表明接种培养基各组分对出愈率的影响度NAA>2,4-D>6-BA。主效应分析得主效应图如图1所示,从图1可看出0.5mg/l NAA、0.1mg/l 6-BA和1.0mg/l 2,4-D为最佳,因而愈伤诱导培养基为B5+NAA 0.5mg/l+6-BA 0.1mg/l+2,4-D 1.0mg/l+蔗糖30g/L。

[0067] 步骤S3、愈伤组织继代扩繁获得再生植株;

[0068] 愈伤组织对光照强度和组织条件没有特别要求,在正常的光照强度为3000lux~5000lux、温度为18~28℃的无菌培养室条件下,接种后45~50天将外植体的愈伤取下,放入愈伤继代培养基B5+0.1mg/L6-BA+1mg/LNAA中,每20天继代一次,最多继代3次转入再生培养基MS+1mg/L6-BA+0.1mg/LNAA中,30~40天分化成再生植株。

[0069] 表5不同激素浓度的愈伤继代培养基

[0070]

处理	植物激素 (mg/L)			愈伤生长状态
	NAA	6-BA	2,4-D	
B5	1	0.1	0	愈伤增殖迅速, 黄色, 结构致密, 极易分化。
	0.5	0.1	0	愈伤乳白偏淡黄色, 致密, 增殖快, 易分化。
	0.1	0.1	0	愈伤淡黄色, 增殖快, 结构致密, 分化快。
	0.5	0.1	1	愈伤增殖迅速, 体积膨大明显, 乳白色, 结构松散, 表面颗粒较大, 不易分化。

[0071] 表6确定愈伤继代培养基的正交实验各激素水平组分含量

[0072]

水平	NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)
1	0.1	0.1
2	0.5	0.5
3	1	1

[0073] 表7确定愈伤继代培养基的正交实验结果

[0074]

实验号	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	空列	每块愈伤组织出苗数
1	1	1	1	140
2	1	2	2	134
3	1	3	3	165
4	2	1	2	132
5	2	2	3	121
6	2	3	1	120
7	3	1	3	105
8	3	2	1	112
9	3	3	2	123

[0075] 表8确定愈伤继代培养基的正交实验后方差分析数据

[0076]

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
NAA (mg/L)	2	1694.0	1694.0	847.0	6.92	0.050
6-BA (mg/L)	2	304.7	304.7	152.3	1.25	0.380
误差	4	489.3	489.3	122.3		
合计	8	2488				

[0077] 表9确定愈伤继代培养基的正交实验后排秩状况

[0078]

水平	NAA (mg/l)	6-BA (mg/l)	空列
1	146.3	125.7	124.0
2	124.3	122.3	129.7

3	113.3	136.0	130.3
Delta	33.0	13.7	6.3
排秩	1	2	3

[0079] 再生培养基筛选,由表5可知,加入2,4-D愈伤增殖迅速,体积膨大明显,乳白色,结构松散,表面颗粒较大,不易分化,因此,要想获得分化后再生苗,愈伤继代培养基中不应加入2,4-D。将愈伤组织置于不同浓度NAA与6-BA配比的培养基中,通过正交实验分析,如表8所示,在方差分析表明,NAA因素的影响达到显著水平。排秩状况如表9所示,表明接种培养基各组分对出苗率的影响度NAA>6-BA。主效应分析得主效应图如图2所示,从图2可看出0.1mg/l NAA、1mg/l 6-BA组合为最佳,因而愈伤继代培养基为MS+NAA 0.1mg/l+6-BA 1mg/l+蔗糖30g/L。

[0080] 本发明愈伤诱导培养基和愈伤继代培养基中的蔗糖浓度为公知的浓度,因此不进行实验确定。

[0081] 步骤S4、微型蒜诱导或田间移栽获得原原种;

[0082] 微型蒜诱导:切取2.8~3.2cm带根再生植株分别接入微型蒜诱导培养基MS+1.0mg/LIBA+蔗糖30g/L中,初代培育29~31天,长出白色小鳞茎,68~72天后收获小鳞茎,获得原原种。

[0083] 表10确定微型蒜诱导培养基的正交实验各激素水平组分含量

[0084]

水平	IBA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	GA3 (mg/L)
1	0.0	0.0	0.0
2	0.5	1.0	0.1
3	1.0	3.0	0.5
4	2.0	5.0	1.0

[0085] 表11确定微型蒜诱导培养基的正交实验结果

[0086]

实验号	IBA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	空列	GA3 (mg/L)	微型蒜诱导率
1	1	1	1	1	1.67
2	1	2	2	2	2.00
3	1	3	3	3	1.67
4	1	4	4	4	2.00
5	2	1	2	3	9.33
6	2	2	1	4	1.33
7	2	3	4	1	9.33
8	2	4	3	2	1.33
9	3	1	3	4	38.67
10	3	2	4	3	31.67
11	3	3	1	2	38.67
12	3	4	2	1	37.67
13	4	1	4	2	9.33

14	4	2	3	1	9.33
15	4	3	2	4	1.33
16	4	4	1	3	1.33

[0087] 表12确定微型蒜诱导培养基的正交实验方差分析

[0088]

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
IBA (mg/L)	3	3202.21	3202.21	1067.40	76.55	0.000
Kinetin (mg/L)	3	42.54	42.54	14.18	1.02	0.448
GA3 (mg/L)	3	35.85	35.85	11.95	1.25	0.380
误差	6	83.67	83.67	13.94	0.86	0.512
合计	15	3364.26				

[0089] 表13确定微型蒜诱导培养基的正交实验后排秩状况

[0090]

水平	IBA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	空列	GA3 (mg/L)
1	1.835	14.750	10.751	14.500
2	5.330	11.083	12.583	12.833
3	36.670	12.751	12.750	11.001
4	5.332	10.583	13.083	10.833
Delta	34.835	4.167	2.332	3.667
排秩	1	2	4	3

[0091] 微型蒜诱导培养基的确定,将再生植株放置于含有不同激素的培养基中,通过正交实验分析,如表12所示,在方差分析表明,IBA激素对微型的诱导影响达到极显著水平。排秩状况如表13所示,表明接种培养基各组分对出苗率的影响度IBA>KT>GA3。主效应分析得主效应图如图3所示,从图3可看出1mg/l IBA不加KT和GA3组合为最佳,因此,组织培养室内微型蒜诱导培养基培养基为MS+IBA1mg/l+蔗糖30g/L为最佳。

[0092] 再生苗移栽:

[0093] 步骤S41、炼苗:从培养室中取出再生植株培养瓶,放于温度 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的温室中,在温室中封口炼苗2~3天后,打开封口膜加入盖过培养基3~5mm的自来水,再继续炼苗2~3天后移栽;

[0094] 步骤S42、育苗移栽:育苗基质为蛭石,移栽前对蛭石灭菌并用水浇透,在蛭石上挖小穴,用水冲洗再生植株后放于穴中并覆盖;前7天每天浇营养液2次,并适当补水;

[0095] 步骤S43、田间移栽:育苗移栽14天后,将蒜苗移栽于环境温度为15~28 $^{\circ}\text{C}$ 的苗钵或者大田后正常田间管理,再生苗在田间移栽后获得的鳞茎为原原种。

[0096] 移栽后的蒜苗的环境温度为15~28 $^{\circ}\text{C}$ 最佳,低于8 $^{\circ}\text{C}$,或者高于30 $^{\circ}\text{C}$ 不利于蒜苗的正常生长。为了生产的需要,原原种的生产可建设原原种生产基地。

[0097] 步骤S5、播种原原种繁育原种大蒜,并对原种大蒜进行扩繁;

[0098] 步骤S51、选择播期:原原种与原种的适宜播期相似,在日均温为20~22 $^{\circ}\text{C}$ 时期移栽或播种为宜,华北(指徐州及河南)地区原原种移栽、原种播种适宜时间为10月上旬。

[0099] 步骤S52、土壤选择:大蒜对土壤的适应性比较广泛,沙壤、壤土都可以,但有机质

丰富、土层深厚、排水良好的微酸性沙质土壤最佳,在这样的土壤上种植原原种与原种容易成活且生长健壮。

[0100] 步骤S53、设立防虫网室:为避免菜蚜、桃蚜等传毒媒介的影响,必须设立防虫网室。防虫网室可以以钢架大棚的骨架为支撑,覆以40目防虫网,有效防虫。

[0101] 步骤S54、整地施肥:大蒜的须根破土能力弱,分布范围小,主要集中在耕作层;同时大蒜的蒜头是在土中膨大,土壤的紧实程度对鳞茎的生长发育会产生直接影响。因此,精细整地、增施有机肥有利于原原种与原种的生产。

[0102] 精细整地,种植原原种与原种的地块需要深翻细耙,增加土壤的通透性,有利于土壤微生物的活动和土壤养分的转化,有利于根系的发展和鳞茎肥大。大蒜地的耕深一般是20~30cm。上茬作物收获后要及早耕翻晒垡,活化土壤。

[0103] 施足底肥,根据大蒜的需肥特点和当地的土壤特性,重点增施大蒜需求量大的磷、钾、硫等肥料元素,大力推广施用优质农家肥和有机肥。种植时以基肥为主、追肥为辅,在翻地时施充分腐熟的有机肥200~333kg/hm²,腐熟鸡粪6.67kg/hm²,并均匀混入磷酸二铵2.67kg/hm²、尿素1kg/hm²、效成分N含量15%,P₂O₅含量15%,K₂O含量15%的硫酸钾复合肥6.67kg/hm²等化肥。整地后要做到畦面土细平整、沟系配套、排灌自如。

[0104] 步骤S55、原原种播种:按行距8cm开浅沟,播种前浅沟内浇水,按株距6cm进行播种,播种后插小拱棚覆膜保温保湿。

[0105] 步骤S56、播种后除草:播后施用大蒜用除草剂并采用地膜覆盖,原种播种后喷50%乙氧·异·甲戎乳油150倍液防草,施药前后土壤要保持湿润状态,畦面的表土不能翻动。施药后采用地膜覆盖,可有效提高地温,保持土壤墒情,使大蒜出苗早,出苗齐,出苗旺,生长发育快,同时利于大蒜安全越冬,避免冻害。覆膜时必须拉紧薄膜,使薄膜紧贴地面,以防风大将薄膜刮破。边覆膜边用土在薄膜两侧压实。

[0106] 步骤S57、苗期管理:原原种苗期管理,控制拱棚内的温度,大于20℃及时通风降温,待脱毒苗成活后,夜晚薄膜继续覆盖,白天温度上升后逐渐加大通风,使拱棚内的脱毒苗逐渐适应外部环境;原种苗期管理,大蒜发芽的适温是12~20℃,幼苗生长的适温是12~16℃,大蒜出苗期间,对未能顶破薄膜的大蒜幼苗及时人工破膜辅助出苗,力争苗全、苗齐。

[0107] 肥水管理:在大蒜越冬前喷水1次,有利于大蒜的安全越冬。3月上旬,结合浇水追施尿素约150kg/hm²,4月上旬结合浇水追施尿素约150kg/hm²,利于蒜苗、蒜薹生长;摘薹后应结合浇水追施尿素约150kg/hm²,促进蒜头生长。

[0108] 摘薹方法:当蒜薹抽出25cm左右时,于晴天中午前后用铁钉距地面15~20cm处,在茎的中间扎孔,然后将蒜薹慢慢抽出,摘薹时尽量保护叶片不受损害。

[0109] 病虫害防治:脱毒大蒜病害较少,为了防止病毒病重复感染,网室内需要及时防治蚜虫、蓟马、线虫等。蚜虫及蓟马的防治在大蒜生育期间可用90%敌百虫晶体1000~1500倍液喷洒植株。在大蒜播前用38℃水浸种1h,而后放入1%福尔马林溶液中,提高温度到49℃持续20min,再用冷水洗净晾干后播种,可完全防治线虫而对种蒜发芽无影响;或用种蒜重量1%的福美联和苯菌灵剂做粉衣而后播种,杀虫和防虫效果均好。叶枯病、叶斑病等细菌性病害,主要采用75%百菌清、农用庆大霉素等抗菌剂进行防治。锈病等真菌性病害采用抗真菌的药物。软腐病等病害也可用抗菌剂防治。蒜蛆是危害大蒜的地下害虫,主要采用毒死蜱等高效低毒农药进行防治。

[0110] 步骤S58、收获原种大蒜：一般摘薹后20天或地上部植株2/3已经黄化即可收获蒜头，蒜头成熟的标志是植株叶片开始发黄，假茎变软。

[0111] 步骤S59、对原种大蒜进行扩繁：先进行原种大蒜播种前处理，原种大蒜的播种行距为20cm，株距为12cm，播种前按行距开深5cm的浅沟，按株距进行播种。直立栽种一定要将底部朝下，直立插入沟中，切忌斜插；尽量避免蒜种受损伤，不可捏住蒜种顶部用力往板结的土里按，以免种蒜受到挤压而损伤，造成缺苗；摆蒜后，用开第2条沟的土覆盖第1条沟的蒜，如此进行，直至结束。播后为方便覆膜，须将地面镇压平整。

[0112] 原种大蒜播种前处理：将大蒜摊开，在太阳下晒2天，去除蒜皮，促进萌芽、发根，一般原原种收获的蒜头为独头蒜，也有部分具有分瓣的蒜，分瓣的蒜播前需要剥开；将种蒜放入500倍50%多菌灵可湿性粉剂配置成的药液中浸种12~16h，捞出晾干后再播种，可提高出苗率，出苗齐、苗壮。

[0113] 原种和原原种繁育基地建设：为了达到防虫、保温、保湿及遮阴的作用，原原种繁育基地一般建成防虫网室外覆薄膜及遮阳网，网室内建栽培池；大蒜对土壤的适应性比较广泛，沙壤、壤土都可以，但原种繁育基地选择有机质丰富、土层深厚、排水良好的微酸性沙质土壤为最好，在这样的土壤上种植原原种与原种容易成活且生长健壮。

[0114] 一般大蒜在田间繁殖需要1个季节(1年的时间)进行繁殖，本发明的繁育方法通过在组织培养内通过愈伤组织繁殖后，每个鳞芽则可以分成至少分4~10个外殖体，4~10个外殖体可按出愈伤率19% (表2) 计算产出1~2个愈伤，愈伤继代扩繁可分为4个愈伤组织块，6个月内至少可扩繁1次，则产生4~8个愈伤组织块，每个愈伤组织块可产生160株再生苗，10个月后则可生产640 (4*160) ~1280 (8*160) 株再生苗，按微型蒜诱导率38%出苗率计算，则可产出243~486个微型蒜，即1个鳞芽在一个生长季节，可生产出约243~486个微型蒜，即原原种蒜。同时每个愈伤可以继续继代，将成指数增长，在可控空间，不受外界环境影响扩大繁殖系数。

[0115] 通过本文方法进行生产的良种与茎尖组织培养的原原种在产量上相同，与原始品种进行产量对比实验如表13所示，表明本发明的方法对原始品种的改良明显，产量可以提高22%~25%。

[0116] 表13获得的良种与原始品种的产量比对

年度	实验组别	(亩产/公斤)		产量提高%
		试验组	原始品种	
[0117] 品种 1	I	1600.60	1289.77	24.10±0.89**
	II	1650.3	1322.36	24.80±0.30**
	III	1620.10	1321.45	22.60±0.26*
品种 2	I	1640.00	1310.95	25.10±0.24**
	II	1650.00	1317.89	25.20±0.01**
	III	1675.00	1369.58	22.30±0.25*

[0118] 注：*表示与对照差异显著 ($\alpha=0.05$)，**表示与对照差异极显著 ($\alpha=0.01$)。

[0119] 微型大蒜苗良种繁育方法，可防止多代无性繁殖种性退化及病毒感染，保证种源

的优良性和遗传稳定性,促进高产、稳产。解决传统大蒜种质资源保存方法所面临的问题(如通过窑贮藏种大蒜,易腐烂,所需空间大,种源易退化),对于保存珍贵、稀有、濒临灭绝的资源有着重要的意义。并能为大蒜生产和种质资源的交换提供足够的种源。同时,形成的微型大蒜苗在贮存和运输过程中极大的节省了空间,节约运输成本。

[0120] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均包含在本发明的保护范围内。

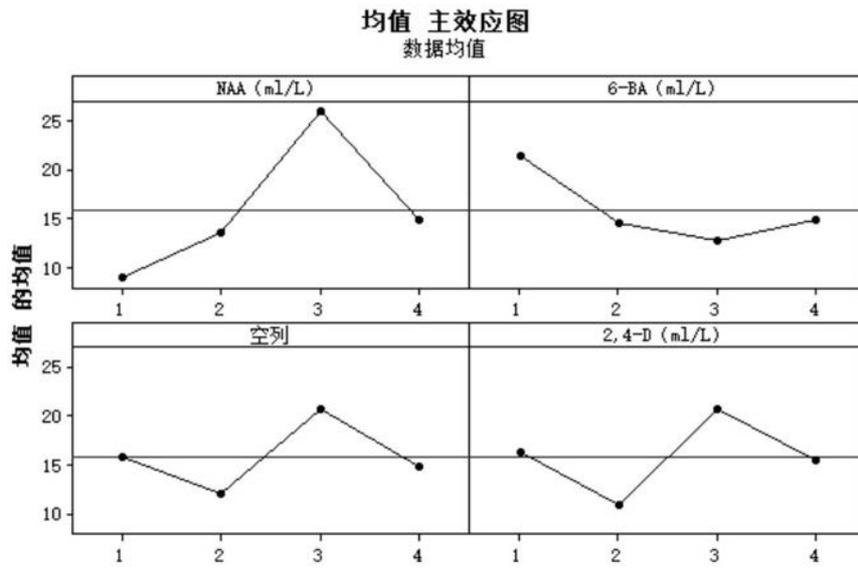


图1

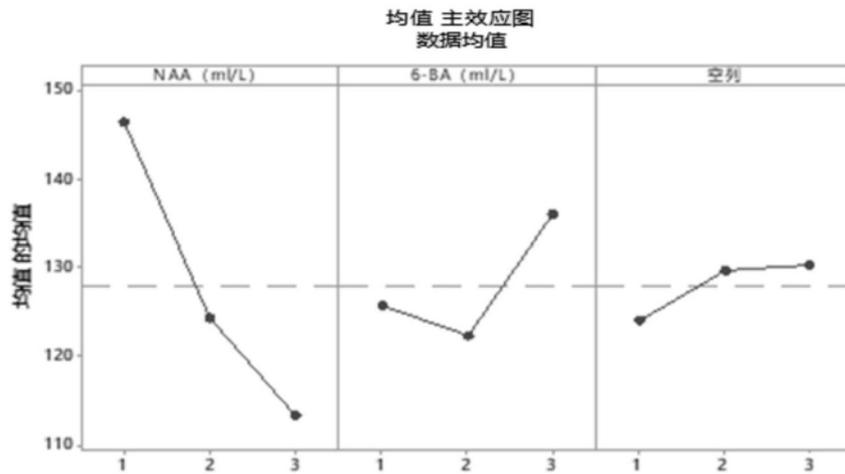


图2

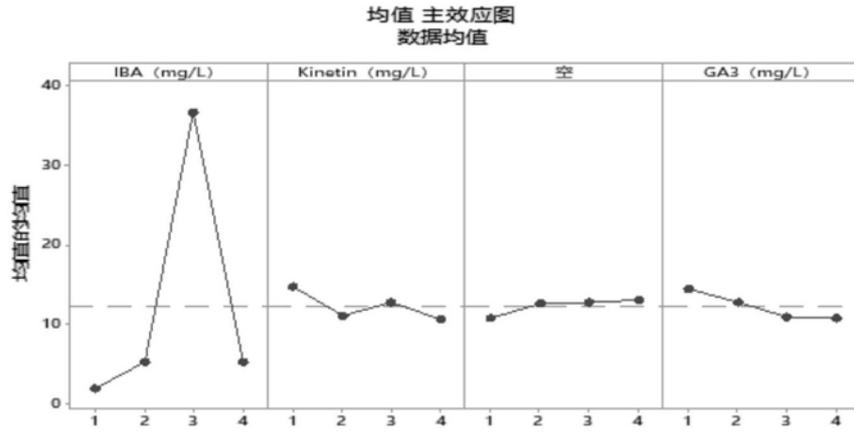


图3