

分蘖洋葱茎尖培养脱毒苗技术研究^{*}

徐启江¹, 陈 典², 张云修³

(1 黑龙江农垦师范专科学校 生物系, 黑龙江 阿城 150301; 2 东北农业大学 园艺系, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3 大庆市 龙凤区农业局, 黑龙江 大庆 163711)

[摘 要] 利用阿城紫皮分蘖洋葱进行茎尖培养脱毒苗技术研究。结果表明: 最佳诱芽培养基为MS+NAA 0.1 mg/L+BA mg/L; 最佳生根培养基为1/2MS+NAA 0.01 mg/L+BA 1.5 mg/L+PP₃₃₃ 0.1 mg/L。以上各培养基均加蔗糖30 g/kg, 琼脂8 g/kg, pH 值调至5.7~5.8。试验还就外植体的大小、鳞茎热处理对脱毒效果的影响进行了探讨。细胞学观察表明, 该途径保持了原材料的遗传稳定性。

[关键词] 分蘖洋葱; 茎尖培养; 脱毒

[中图分类号] S633.203.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0101-06

分蘖洋葱(*Allium cepa* L. var. *multiplacans* Bailey syn. var. *Agrogatum* Don)俗称毛葱, 百合科葱属草本植物, 体细胞染色体数为 $2n=16$ 。叶中空圆筒状, 植株密集丛生; 极少抽薹开花结实, 以蘖生小鳞茎进行繁殖。鳞茎为狭卵形或卵形, 聚生^[1], 由肉质鳞片和鳞芽组成, 每株蘖生几个至十多个大小不规则的鳞茎, 多为铜黄色, 耐贮藏, 植株抗寒性强, 适宜于北方地区栽培^[2]。长期进行无性繁殖, 导致一种病毒单独侵染或几种病毒复合侵染所引发的病毒病十分严重。

作者于1999年5月末6月初对黑龙江省分蘖洋葱主产区——阿城市阿什河乡、宾县宾安镇科技示范园及五常市兴隆乡新和村分蘖洋葱病毒病危害程度进行调查, 发病率均为100%, 病情指数分别为62.13%, 71.07%和49.87%。人工接种发现, 可被分蘖洋葱病毒系统感染的植物有洋葱、大葱、大蒜和蚕豆; 局部感染的有千日红、苋色藜。电镜观察表明, 病体细胞中含有大量线状病毒粒体, 其长度在300~1450 nm。通过叶片超薄切片, 在叶肉细胞质中观察到大量的风轮状、束状和涡轮状内含体, 叶绿体被破坏。体外抗性测定结果: 致死温度为55~65℃, 稀释限点为 10^{-4} , 体外保毒期为3 d。酶联免疫测试和洋葱黄矮病毒(OYDV)抗血清、韭葱黄条纹病毒(LYSV)抗血清、大蒜复合病毒抗血清呈阳性反应。以上特征表明, 黑龙江省分蘖洋葱病毒病为几种病毒复合侵染, 初步鉴定为洋葱黄矮病毒

(OYDV)和韭葱黄条纹病毒(LYSV)(另文待发)。植株感病后, 生长势弱, 植株矮小, 分蘖减少; 葱头退化变小, 致使产量和品质大幅度降低, 给生产消费和出口创汇带来了严重的障碍。

目前, 利用茎尖培养脱毒苗已成为防治植物病毒病最有效的方法。本试验在对黑龙江省分蘖洋葱主产区病毒病原种类鉴定的基础上, 以分蘖洋葱鳞茎茎尖为外植体, 进行组培脱毒技术研究, 获得了无毒试管苗, 为无毒种苗的工厂化生产提供了科学理论依据和关键技术。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为阿城紫皮分蘖洋葱鳞茎茎尖。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体的获得 剥除鳞茎外皮, 用自来水冲洗干净后切除顶部2/3, 于70℃温箱中热处理10 min, 用体积分数10%次氯酸钠溶液浸泡10 min, 无菌水冲洗3~4次, 再用无菌滤纸吸干水分, 在无菌条件下于40倍双目实体解剖镜下用消毒镊子和解剖针剥离0.15~0.3 mm茎尖, 获得茎尖外植体(图版A)。

1.2.2 培养方法 以MS为基本培养基, 添加蔗糖30 g/kg, 琼脂8 g/kg, 调pH值至5.7~5.8, 起始培养与生根培养分别添加NAA、BA、BA、PP₃₃₃不同质量浓度组合的植物激素。培养温度 (22 ± 1) ℃, 光

* [收稿日期] 2001-09-29

[作者简介] 徐启江(1969-), 男, 山东安丘人, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术和设施园艺研究。

照强度 2 000 lx, 光照时间 13 h/d。待初生茎尖组培苗长至 3.5~5 cm 时分离、切割, 转入生根培养基上进行生根培养, 20 d 时统计生根率。

1.2.3 试管苗驯化与移栽 试管苗移栽成活是组培繁殖的关键环节之一^[3]。为提高移栽成活率, 选择生长健壮、根系发达的试管苗在驯化移栽前低温炼苗 5~7 d, 然后移植到营养钵中, 在自然光照、白天 22~24℃、夜间 11~14℃、空气相对湿度(RH) 90% 的温室内进行驯化。15 d 时统计成活率; 40 d 后即 4 月 5 日前后将成活的秧苗栽植于冷床中。扣网棚防蚜。

1.2.4 茎尖大小及热处理汰毒试验 剥离茎尖的大小分为 0.15~0.3, 0.3~0.5 和 1 mm 3 级; 将鳞茎置于 70、80 和 90℃ 恒温干燥箱中处理 10 min, 然后进行组织培养, 调查成活率。从试管苗炼苗到移栽网棚后整个生育过程, 仔细检查苗株有无褪绿条斑、花叶、皱缩扭曲等病毒病症状。先后 3 批次共 35 株作电镜检测, 观察有无病毒粒体。

1.3 遗传稳定性检测

在组培中对茎尖分生组织直接成苗根尖、普通分蘖洋葱根尖进行染色体观察。将样品用体积分数 5% 的对二氯苯溶液在 10~20℃ 下处理 3 h, 蒸馏水冲洗 2~3 次, 放在 Carnoy 固定液中, 1~4℃ 条件下固定 12 h, 用 1 mol/L HCl 在 60℃ 解离 5~6

min, 水洗后用卡宝品红染色 3 h, 压片。于光学显微镜下观察, 计数染色体数^[4], 用 Olympus 显微照像。

2 结果与分析

2.1 茎尖生长点的起始培养

茎尖接种 5 d 后, 生长点产生明显的浅绿色芽点突起, 继而长成绿色小芽。40 d 后不同培养基上的茎尖试管苗生长状态有明显差别。降低 IAA 质量浓度虽可提高茎尖生长点转绿率, 但幼芽伸长困难, 易处于芽点状态; 而提高 IAA 质量浓度则不利于茎尖生长点的转绿成活。其他激素如 2ip、KT 等与 IAA 不同配比试验中, 茎尖生长点多发生 3 种生长分化情况: (1) 停止生长, 接种的茎尖并不成活, 颜色逐渐变褐, 最后枯死; (2) 生长缓慢, 离体茎尖分生组织虽然成活, 也逐渐转绿, 但伸长生长极其缓慢, 外观一直处于绿色小芽点状态; (3) 茎尖分生组织成活, 但基部产生较多的浅黄色愈伤组织, 不妨碍成苗。

将 0.15~0.30 mm 茎尖外植体分别接种在含有不同质量浓度组合 NAA 和 BA 的 MS 培养基上, 通过观察幼芽形成的数量、质量及形态学变化, 研究激素对外植体分化形成幼芽的影响。培养 40 d 后, 两种植物激素不同质量浓度配比的混合液对外植体分化成芽率的影响见表 1。

表 1 IAA 和 BA 对分蘖洋葱茎尖外植体分化的影响

Table 1 Effects of IAA and BA on differentiation of the meristem tip

培养基 No. of medium	植物激素/(mg·L ⁻¹) Phytohormone combination	茎尖数 No. of inoculation explant	诱芽率/% Rate of shooting	每茎尖平均 分化芽数 Mean shoots per meristem tip	40 d 时植株状态 State in culture for 40 days	
					株高/cm Plant height	茎粗/mm Stem width
A1	NAA 0.1+BA 0.1	60	68.33 cd	1.0	3.53 cd	0.90 bcd
A2	NAA 0.1+BA 0.4	60	100.00 a	3.1	4.03 bc	1.23 a
A3	NAA 0.1+BA 1.0	60	71.67 cd	1.2	4.63 ab	0.97 b
A4	NAA 0.5+BA 0.1	55	73.82 c	1.0	3.37 cd	0.66 d
A5	NAA 0.5+BA 0.4	60	85.00 b	1.4	4.80 a	1.13 ab
A6	NAA 0.5+BA 1.0	50	66.63 cd	1.0	4.99 a	0.63 d
A7	NAA 1.0+BA 0.1	55	62.84 d	1.1	3.27 d	0.91 bc
A8	NAA 1.0+BA 0.4	60	71.67 cd	1.0	3.93 cd	1.04 ab
A9	NAA 1.0+BA 1.0	60	65.00 d	1.0	3.40 cd	0.72 cd

注: 1) MS 为基本培养基; 2) 茎尖数为 3 次重复接种茎尖总数; 3) 具不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: 1) The basal medium is MS; 2) The number of inoculated meristem tip is the total of 3 repetitions; 3) Means followed by different letter are significantly different ($P < 0.05$).

从表 1 可见, 在相同试验条件下, 就所选择的 9 种培养基而言, 没有发现一种质量浓度激素组合比其他质量浓度组合具有更明显的促进茎尖外植体分化生长的作用, 但以 BA 0.4 mg/L + NAA 0.1 mg/L 组合为最佳, 茎尖成芽率为 100%, 平均每个外植体分化不定芽 3.1 个, 株高可达 4.03 cm, 茎粗 1.23 mm,

生长健壮(图版 B)。在 MS 培养基中, NAA 和 BA 的添加量不同, 对外植体的分化作用也随之变化。就形态学变化而言, NAA 能够促进愈伤组织的形成, 而 BA 能够促进外植体基部营养叶的伸长^[5]。

2.2 根的诱导

将茎尖外植体起始培养生成的幼芽进行切割,

保留基部 2 cm 切段, 接种到不同激素配比的生根培养基上, 诱导生根, 20 d 后观察生根情况, 并统计结果(表 2)。从表 2 可以看出, 无根苗在 6 种培养基上, 虽然均可生根, 但根的发生和植株长势存在着极大差异。生根率最高可达 100 % (B4,B5); 最低仅为 38.33 % (B6)。分蘖洋葱试管苗在多种不同的培养基上均可生根, 而且在培养基量充足的条件下, 随着培养时间的延长, 增殖迅速而且植株基部膨大, 这可能与分蘖洋葱本身内源激素水平及分蘖性强的品种特性有关。

从植物激素组成来看, 单独加入 BA (B6) 虽可生根, 但生根率和苗均根数很低。生长素类质量浓度过高会抑制生根, 且在苗基部形成大量愈伤组织, 当生长素类植物激素与细胞分裂素类植物激素以适当

质量浓度配合时, 生根效果最佳。试验还发现, 含有相同植物激素配比的 1/2MS 培养基比 MS 培养基更有利于苗和根的分化生长, 表现在根诱导率高、分根数多。其原因是, 由于大量元素减半, 特别是 N 元素减半, 增加了培养基的 C/N 比, 从而提高了试管苗的 R/T (根冠比)。说明培养基中无机盐含量对根苗的分化生长有明显的影响, 较少量的无机盐更有利于根的分化生长。从生根率、苗均根数及根的形态、植株长势等方面看, B5 培养基最佳, B4 次之。无根苗接种到 B5 后, 能诱导根系早生快发, 根粗而多, 根系发达, 根毛多, 地上部生长健壮, 叶色浓绿, 植株整齐一致, 地上部与地下部能协调生长(图版 C)。

表 2 分蘖洋葱无根苗在生根培养基上生根

培养基 No. of medium	植物激素/(mg · L ⁻¹) Phytohormone combination	接种无根苗数 No. of rootless shoots inoculation	生根率/% Rate of rooting	根的形态 Root shape	植株状态 Plants status
B1	MS 无激素 No phytohormone	60	56.67 d	根细长, 根数极少, 白色 Slender, much fewer roots, white	不整齐, 浅绿, 长势弱 Not regular, light-green, growth vigour is weak
B2	MS+ BA 0.5+ NAA 0.05	60	63.33 c	根细长, 根数少, 白色 Slender, fewer roots, white	较整齐, 长势中等, 浅绿 A little regularer, growth vigour is moderate, light- green
B3	MS+ BA 1.5+ NAA 0.01	55	72.78 b	根略细, 较长且多, 根毛 少 Slenderer, long and many roots, but few root hairs	整齐, 长势中等, 浅绿 Regular, growth vigour is moderate, light-green
B4	1/2MS+ BA 1.5 + NAA 0.01	60	100.00 a	根略细, 较长且多, 根毛 少 Slenderer, longer and a little more roots, few root hairs	整齐, 长势较强, 浅绿 regular, growth vigour is stronger, light-green
B5	1/2MS+ BA 1.5 + NAA 0.01+ PP333 0.1	60	100.00 a	根短粗, 根数极多, 根毛 多 Short and thick roots, a great many roots, much more root hair	整齐健壮, 长势强, 浓绿 Regular, growth vigour is strong, thick green
B6	MS+ BA 4.0	60	38.33 e	根细长, 根数少, 有大量 愈伤组织 Slender, few roots, much callus	极不整齐, 长势弱, 浅绿, 玻璃化苗多 Much irreg- ular, growth vigour is weak, light-green, vitrifi- cation

注: 1) 为 3 次重复接种无根苗总数; 2) 具不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: 1) Total number of thrice repeat inoculated rooting shoots; 2) Means followed by different letter are significantly different ($P < 0.05$).

2.3 炼苗与移栽

3 月上旬, 将根系发达、生长健壮的试管苗移出培养室, 打开封口膜, 于 18℃ 室温下低温炼苗 5~7 d。然后洗净根系附着的琼脂, 移植到 5 cm × 5 cm 的营养钵中, 移植基质体积比为 1/3 草炭土、1/3 大田土、1/3 厩肥, 并添加少量过筛炉灰渣。浇足水后置于温室中管理, 其成活率为 100% (图版 D); 04-05 前后移栽到冷床中, 植株能很好地适应外界环境条件, 生长势强(图版 E)。

2.4 茎尖大小及热处理对脱毒效果的影响

从病株鳞茎上分别切取 0.15~0.3、0.3~0.5 和 1.0 mm 大小的茎尖进行组织培养。试管苗在移栽前和移栽到网棚中正常生长后, 用电镜检测脱毒效果。结果表明, 只有用 0.15~0.3 mm 茎尖培养, 方可获得 100% 的脱毒苗(表 3)。

将病株鳞茎先进行不同热处理, 然后切取 0.3~0.5 mm 茎尖, 进行组织培养, 结果见表 4。从表 4 可知, 病株鳞茎经高温处理后, 可用较大茎尖进行组织

培养而获得脱毒苗,且获得脱毒苗的比例较高。脱毒率也提高到与小茎尖相似的水平,因此,从温度处理对植株存活率、脱毒率、操作效率等综合因素来看,于 80℃ 高温条件下处理 10 min,然后切取 0.3~0.5 mm 茎尖进行培养,可获得最佳脱毒效果。

用 0.15~0.3 mm 茎尖可以完全脱除分蘖洋葱病毒,但成活率低,且操作困难,易污染。而大茎尖剥离方便,污染少,成苗率高。鳞茎经高温热处理后,其

表 3 茎尖大小对脱毒效果的影响
Table 3 Effect of length of meristem tip on detoxication

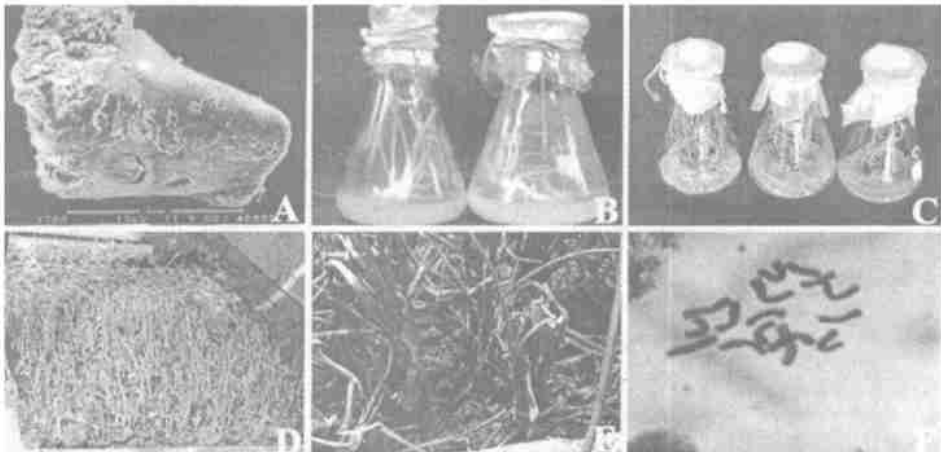
茎尖大小/mm Size of meristem tip	接种数量 No. of inoculated explants	成活率/% Survival rate	移苗期脱毒率/% Virus-free rate at seedling stage
0.15~0.3	45	35.56	100
0.3~0.5	40	87.5	77.5
1.0	45	100	48.89

表 4 不同热处理结合茎尖培养脱除病毒效果比较
Table 4 Comparison of virus-free rate in meristem tip culture after different heat treatments of diseased plants

热处理类型 Types of heat treatment	茎尖大小/mm Size of meristem tip	接种数量 No. of inoculated explants	成活率/% Survival rate	移苗期脱毒率/% Virus-free rate at seedling stage
连续 70℃ 高温处理 10 min Consecutive heat treatment at 70℃ for 10 min	0.3~0.5	50	100	80
连续 80℃ 高温处理 10 min Consecutive heat treatment at 80℃ for 10 min	0.3~0.5	50	96	100
连续 90℃ 高温处理 10 min Consecutive heat treatment at 90℃ for 10 min	0.3~0.5	50	50	100

2.5 遗传稳定性检测

植物组织经离体培养后,其遗传稳定性对微繁殖技术的应用至关重要。本试验研究了分蘖洋葱组培材料染色体变化情况,结果表明,茎尖分生组织培养苗未发现染色体变异现象,其染色体数均为 $2n=16$ (图版 F)。这说明通过茎尖分生组织分化的幼苗在染色体数目上是稳定的,即该途径保持了原材料的遗传稳定性,用于脱毒快繁既可保持其种的遗传稳定性而且脱毒效果较好,可用于生产实践。



图版 A-F 分蘖洋葱茎尖培养脱毒苗技术研究

A. 茎尖电镜扫描; B. 茎尖外植体形成不定芽; C. 不定芽诱导生根, 形成完整植株; D, E. 驯化移栽及移入冷床成活的植株; F. 染色体 ($2n=16$)

Plate A-F Study on virus elimination of tillered-onion by meristem tip culture

A. Electron micrograph of meristem tip; B. Shoots formation from meristem tip; C. The shoots root in the rooting medium; D, E. In vitro plants were transplanted into the soil, they grew robustly; F. Chromosome ($2n=16$)

3 讨 论

3.1 茎尖大小对脱毒效果的影响

利用茎尖培养脱毒苗已成为防治植物病毒病最有效的方法。感染病毒的植株体内病毒分布并不均匀,顶端分生组织区域一般无毒或只携带浓度很低的病毒,因此在进行茎尖培养脱毒苗时,在保障成活的前提下,切取的茎尖越小脱毒率越高。另外,不同种类植物和不同种类病毒在茎尖培养时切取的茎尖大小也各不相同。Bhojwani 和 Havranek 等利用 0.4~0.9 mm 的茎尖培养大蒜脱毒苗,脱毒率可达 75%^[6,7];而 Pena-Iglesias^[8]利用 0.3 mm 的茎尖脱毒率可达 90%;Sako-I 等^[9]利用 0.5~0.7 mm 茎尖培养,有效地脱除了洋葱中的 OYDV 和 GLV。本试验也探讨了不同大小的茎尖外植体对脱毒效果的影响,经病症观察和电镜检测,0.15~0.3 mm 茎尖可完全脱除病毒。但由于未通过免疫电镜(ISEM)、酶联免疫吸附法(ELISA)等手段进行检测,其结果的可靠性尚有待于进一步深入研究。

3.2 茎尖培养与热处理对脱毒效果的影响

茎尖培养与热处理方法相结合脱去病毒,已在许多植物上得到应用^[10]。Robert-Uman 等^[11]利用热处理结合茎尖培养,通过 ELISA 分析发现,对大蒜中的 OYDV 脱除率可达 90%~100%,但传统的热处理一般是在 35~40 °C 高温条件下处理几十分钟,甚至数月。这种对寄主进行长时间的高温处理有可能钝化植物组织中的阻抗因子,使寄主抗病毒因子也不活化,从而增加无效植株的发生率^[12]。本试验突破常规,采取极限高温(80 °C)短时(10 min)处理分蘖洋葱鳞茎,然后切取 0.3~0.5 mm 茎尖进行

培养,脱毒率可达 100%。但起始培养形成的不定芽比较弱,颜色淡绿,可能与高温处理有关,有必要做常规热处理试验,比较两者的脱毒效果。

3.3 脱毒苗田间种植再度染病的机率

无病毒植株不具备抗病毒的能力,而且在清除病毒以后,体内营养和生理状况发生改变,因而对其他病毒和病原体的侵染更为敏感。日本马铃薯栽培品种均用茎尖培养脱除 PVX 病毒,结果导致花叶病的突然蔓延;张明厚等^[13]研究发现,脱毒大蒜在田间种植 3 年后,发病率达 80%。脱毒分蘖洋葱种植田间后,是否能够被病毒再度侵染以及染病机率的大小,有待于进一步试验。现已知道病毒交叉保护(Virus cross protection)现象,即一种病毒的存在可使寄主植物抵抗其他病毒的侵染,有必要对分蘖洋葱进行这方面的研究。

3.4 离体培养过程中的遗传稳定性

植物组织经离体培养后,其遗传稳定性对微繁技术的应用至关重要。通过组织培养产生的植物群体中,变异是一种常见的现象,也就是说植物组织培养物及其再生植株通常并非是遗传上同一的。除了组织的自然变异倾向外,还有培养过程中的变异。其中培养基是变异的重要因子。有人认为培养基中多种植物激素(特别是 2,4-D)作用,导致组培材料细胞分裂变异。已有报道认为,在组培中组培材料染色体变异与材料来源、成苗途径及培养时间等因素有关^[14]。

由分蘖洋葱茎尖分生组织通过组培直接成苗,经检测未发现染色体变异,这说明通过茎尖分生组织分化的幼苗在染色体数目上是稳定的,即该途径保持了原材料的遗传稳定性。

[参考文献]

- [1] 郭贵林,邢启妍. 黑龙江省植物检索表[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,1990:666
- [2] 山东农业大学. 蔬菜栽培学各论(北方本)[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社,1999:109
- [3] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养教程(修订本)[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999:100-111
- [4] 李国珍. 染色体及其研究方法[M]. 北京:科学技术出版社,1985
- [5] Ayabe M, Sumi S. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 773-779
- [6] Bhojwani S S, Cohen D, Fry P R. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants [J]. Scientia Horticulture, 1982, 18(1): 39-43
- [7] Havranek P. The virus-free garlic obtained from meristematic cultures [J]. Ochr Rostl (Raha), 1972, 8(4): 291-293
- [8] Pena-Iglesias A. Characterization of spanish garlic viruses and their elimination by in vitro shoot apex culture [J]. Acta Horticulture, 1982, 127: 183-193
- [9] Sako-I, Takan-i T. Mass propagation of virus-free seedless Welsh onion (cv. Bozushirazu) by meristem tip culture [J]. Nihon Sakyu

Gakkaishi, 1994, 41(1): 13- 20

- [10] Hohne C, Schuster G, Frommhold I Growth regulatory effects of 5-Azadihydrouracil and ribavirin[J]. Biochem Physiol Pflanzen, 1987, 182: 375- 384
- [11] Robert-U man, Zel-Jana, Ravnikar-Maja. Themothrapy in virus elimination from garlic: Influences on shoot multiplication from meristems and bulb fomatoin in vitro[J]. Scientia-Horticultureae-Amsterdam, 1998, 73(4): 193- 202
- [12] 莽克强, 陈受宜, 李季伦, 等. 农业生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998 127.
- [13] 张明厚, 魏培文, 朱俊华, 等. 大蒜茎尖组培苗的检测[J]. 东北农业大学学报, 1999, 30(2): 105- 110
- [14] 贾春兰, 王纪方, 金 波. 蔬菜作物组织培养对染色体倍性变异的影响[J]. 中国蔬菜, 1991, (6): 17- 18

Study on virus elimination of tillered-onion by meristem tip culture

XU Qi-jiang¹, CHEN Dian², ZHANG Yun-xiu³

(1 Department of Biology, Heilongjiang Nongken Teachers College, Acheng, Heilongjiang 150301 China;

2 Department of Horticulture, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

3 Agricultural Bureau of Longfeng District, Daqing City, Daqing, Heilongjiang 163711, China)

Abstract: The results of virus elimination by shoot-tip culture of purple-skinned tillered-onion commonly grown in Acheng city showed that the best medium for shooting was MS + NAA 0.1 mg/L + BA 0.4 mg/L, and that for rooting was 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L + BA 1.5 mg/L + PP₃₃₃ 0.1 mg/L. Each medium was added 30 g/kg sucrose and 8 g/kg agar. The value of pH was adjusted to 5.7- 5.8. Effect of culture with Meristem tips from thermo-treated bulbs and the tips size on virus elimination are discussed. Cytogenetic analysis on vitro showed that there were 16 Chromosomes in all single cells observed, no variation was found. So the genetic type of material was maintained well.

Key words: tillered-onion; meristem tip culture; virus elimination