



研究报告

A Letter

全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)的离体快繁

董玉梅^{*}, 王云海^{*}, 尹金阳^{*}, 程丹^{*}, 邱钦蓉^{*}, 林春^{*}, 毛自朝^{*}

云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明, 650201

*同等贡献作者

✉ 通讯作者: mao2010zichao@126.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 103 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0103

收稿日期: 2011 年 08 月 12 日

接受日期: 2011 年 09 月 09 日

发表日期: 2011 年 09 月 21 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

董玉梅等, 2011, 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)的离体快繁, 分子植物育种(online) Vol.9 No.103 pp.1741-1748 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0103)

引用格式(英文):

Dong et al., 2011, The Propagation in Vitro of the All Male Asparagus 'Jersey Knight', Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.103 pp. 1741-1748 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0103)

摘要 离体快繁技术可用于快速繁殖全雄芦笋种苗。本试验通过芦笋泽西骑士(Jersey Knight)雄株的嫩茎表皮、髓部和侧芽等为外植体, 利用不同激素浓度配比的 MS 培养基, 探讨愈伤诱导、芽增殖和生根的激素调控的情况。研究结果显示: 芦笋的茎段、茎段外皮和芦笋的髓组织均能诱导愈伤组织, 但在出愈率和愈伤生长方面差异较大。其中以髓部诱导愈伤组织效果最好, 培养基以 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 效果最好, 诱导率为 100%; 不同外植体所产生的愈伤组织均可分化再生成芽, 其中以髓部和茎段为外植体产生愈伤的芽再分化率较好, 分别为 100%和 86.7%; 以芦笋茎段为外植体诱导侧芽增殖, 培养基以 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 效果最好, 芽增殖系数为 2.87; 将芦笋已增殖好的芽体用于生根, 不同的激素浓度配比和不定芽大小, 都会导致不同的生根效果, 其中以不定芽长度为 0.5~2 cm, 培养基为 MS+NAA 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L+6-BA 0.25 mg/L 生根效果最好, 生根率可达 75%。该研究将有益于低成本、大规模全雄芦笋种苗的组培生产。

关键词 全雄芦笋; 离体快繁; 愈伤组织; 不定芽; 生根

The Propagation in Vitro of the All Male Asparagus 'Jersey Knight'

Dong Yumei^{*}, Wang Yunhai^{*}, Yin Jinyang^{*}, Cheng Dan^{*}, Qiu Qinrong^{*}, Lin Chun^{*}, Mao Zichao^{*}

College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, P.R. China

*These authors contributed equally to this work

✉ Corresponding author, mao2010zichao@126.com; ✉ Authors

Abstract Fast asexual propagation is another way to get all male seedlings for high yielding of asparagus. The epidermis, pith, young stem, and lateral bud of male asparagus 'Jersey Knight' were used as different explants for studying the inducing abilities and efficiency on callus, shoots and rooting. The results suggested that the epidermis, pith, and lateral bud of asparagus 'Jersey Knight' were able to induce callus with differences. When the concentrations of NAA 1.0 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L, and 2,4-D 2.0 mg/L were used, the ratio for callus development of the pith of 'Jersey Knight' was the highest, which was 100%. The callus induced from different explants can be regenerated to shoots, however the regeneration rate of callus from the pith and young stem of 'Jersey Knight', which were better, were 100% and 86.7% respectively. When the concentrations of NAA 1.0 mg/L and 6-BA 0.5 mg/L were used, the shoots inducing from the lateral bud of 'Jersey Knight' was the top, and percentage of shoots propagation reaches to 2.87. Rooting of all kinds of young shoots were various with the changes of concentrations of the plant-regulators, the age and length of young shoots. When the concentrations of NAA (0.1 mg/L), 6-BA (0.25 mg/L), and KT (0.1 mg/L) were used, the rooting rate from shoots with 0.5~2 cm length, reaches to 75%. The studying will be useful for large scale producing all-Male Asparagus seedling through tissue culture at low cost in future.

Keywords All male asparagus; In vitro propagation; Callus; Shoots; Rooting

研究背景

芦笋, 又名石刁柏(*Asparagus officinalis* L.), 系百合科天门冬属多年生宿根草本植物(黄雷芳和陈

波, 2006), 通常以嫩茎为蔬菜食用。芦笋还可做成芦笋罐头、芦笋粉、芦笋茶等加工产品(杨淑琴和温淑萍, 1997, 宁夏科技, 4: 27-29)。芦笋中含有人体

不可缺少的氨基酸、矿物质和其它多种营养元素, 也含有黄酮类(如芦丁)、甾体皂甙等多种药用活性成分, 因具有丰富的营养价值被称为“蔬菜之王”, 又因有较高的药用价值而被誉为“第一抗癌食品”(赵静等, 2007)。芦笋具有的药效成分可用于治疗更年期症状、腹泻、消化不良、神经衰退性疾病, 被视为强有力的植物雌激素(phytoestrogen)而被广泛应用(Saxena and Bopana, 2009)。

较好的经济价值及广阔的应用前景, 使芦笋产业在国内发展较快, 如福建、山东、华北和西北等省份均有大规模的芦笋种植, 中国目前已成为全球第一大芦笋生产国。随着芦笋种植年限延长, 及利用大棚、温室等设施进行周年栽培, 笋株的各种病原在栽培地因种群扩大而增高了病害发生率(Liddycoat et al., 2009), 导致产量和品质的直线下滑。为巩固和发展芦笋产业, 提高芦笋生产效益, 需要培育大量优良的种苗, 其中选用全雄一代杂种是目前芦笋高产的有效手段。

芦笋雄株不结实、光合作用产物集中分配给新生嫩茎而发茎多、品质好, 芦笋雄株较雌株的产量约高出 20%~30% (沈汉清等, 1992, 福建农业科技, 3: 22-23)。另外, 雄株还因不结实重压、不易倒伏而利于植株之间的通风透光, 从而减轻病虫害。全雄品种的获得, 通常主要是通过获得超雄材料来进行常规育种(李方等, 2006, 山东农业科学, 2: 40-41), 其次是雄株离体快速无性繁殖, 或者是花药培养法(沈汉清等, 1992, 福建农业科技, 3: 22-23)。而本研究采用的途径是雄株的离体快繁。对优质的雄性芦笋进行离体快繁, 不仅可以通过无性繁殖获得与父本具有相同遗传特性的优质雄性芦笋, 而且其愈伤组织脱分化和再分化体系的建立(王蒂等, 2003)还可为分子育种研究和(或)为植物离体培养生产药用活性代谢物等方面奠定基础(Chaturvedi et al., 2007)。

杰西奈特又称为泽西骑士(Jersey Knight), 是美国泽西芦笋试验场培育出的早熟、全雄杂交 F₁ 代。该品种生长势强, 嫩茎绿色粗大、均匀, 平均单茎重 22~24.1 g; 嫩茎质地细腻, 微甜, 纤维含量少, 口感好, 是目前国际保鲜芦笋市场最佳品种(北京中农金玉国际蔬菜种子部, http://www.jm591.com/lusun_show.asp?id=340)。而且更为重要的是该品种对根腐病、茎枯病具有较强的耐受性, 在湿度比较大, 周年生产的云南、海南等热区栽培能获得

优质高产。

本文结合前人芦笋组培的文献报道(Pontaroli and Camadro, 2005; 孔萌萌和周根余, 2006; 陈振东, 2007; 徐化凌和陈纪香, 2009), 对全雄芦笋品种泽西骑士进行离体快繁研究, 通过脱分化培养获得愈伤组织、再分化和生根培养获得完整植株的全过程, 建立了全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)的快繁体系。

1 结果分析

1.1 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)不同外植体愈伤组织诱导培养

不同外植体愈伤组织诱导培养试验表明: 髓部和茎段愈伤分化较早, 一般接种约 7 d 后, 外植体边缘或中间逐渐膨大, 接种约 14 d 后, 淡黄色至浅绿色愈伤组织逐渐形成, 并进入迅速生长期, 约 25~30 d 即可长成典型愈伤组织(图 1)。不同外植体的愈伤组织诱导率见表 1。从表 1 可知, 以芦笋嫩茎表皮、髓部和含侧芽茎段诱导形成愈伤组织的能力不同, 其中髓部的诱导效果最好, 在培养基 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 中诱愈率高达 100%; 利用茎段为外植体在该培养基上的诱愈率为 90.6%; 而以表皮为外植体的愈伤组织诱导率最高仅为 68.8%。另外, 利用不同外植体来诱导愈伤组织时, 还受不同植物生长调节剂的种类和浓度的影响, 当 MS 培养基中添加 2,4-D 和 6-BA 时, 有利于芦笋茎段愈伤组织的形成, 且 6-BA 的浓度要大于或等于 0.5 mg/L 的诱导效果才明显, 而 2,4-D 的浓度为 2.0~5.0 mg/L 时对芦笋的愈伤诱导起到决定性作用。加激动素 KT 后, 外植体的愈伤诱导率都明显下降, 说明激动素 KT 对芦笋外植体的愈伤组织诱导效果不明显。

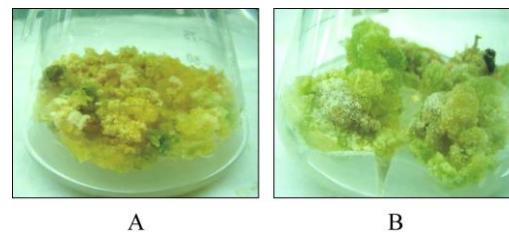


图 1 芦笋愈伤组织的诱导

注: A: 泽西骑士髓部诱导的愈伤组织; B: 泽西骑士茎段诱导的愈伤组织

Figure 1 Callus inducing of *Asparagus* 'Jersey Knight'

Note: A: Callus from pith; B: Callus from young stem

表 1 不同激素组合及泽西骑士外植体对愈伤诱导的影响

Table 1 Effects of phytohormones combination and different explants of 'Jersey Knight' on callus induction

处理 Treatment	激素组合及浓度 (mg/L)	外植体 数(个)	愈伤组织诱导率(%)			愈伤组织的颜色和形态		
			Percentage of induction			Color and morphology of the callus		
			Combination and No. of Concentration of explants			髓部	茎段	表皮
phytohormone (mg/L)			Pith	Stem	Epidermis	Pith	Stem	Epidermis
1	NAA 0+6-BA 0+2,4-D 0+KT 0	30	0	0	0	无变化	无变化	无变化
2	NAA 0.5+6-BA 0.1+2,4-D 0+KT 0	32	50.0	40.6	28.1	黄绿, 质地紧密	淡绿, 质地紧密	深绿, 较硬
3	NAA 0.5+6-BA 0.5+2,4-D 0+KT 0	36	77.8	61.1	47.2	淡黄, 疏松易碎	淡黄绿, 质地紧密	深绿, 较硬
4	NAA 0.5+6-BA 0.5+2,4-D 0+KT 0.5	40	57.5	42.5	27.5	黄绿, 质地紧密	浅绿, 质地紧密	黄绿, 质地紧密
5	NAA 0.5+6-BA 0+2,4-D 2.0+KT 0	36	55.6	33.3	27.8	淡绿, 疏松易碎	淡绿, 疏松易碎	淡绿, 质地紧密
6	NAA 0.5+6-BA 0+2,4-D 2.0+KT 0	32	87.5	43.8	37.5	淡绿, 疏松易碎	淡绿, 疏松易碎	淡绿, 质地紧密
7	NAA 0+6-BA 1.0+2,4-D 2.0+KT 0	36	33.3	27.8	19.4	黄色, 疏松易碎	黄绿, 质地紧密	黄绿, 质地紧密
8	NAA 0.5+6-BA 1.0+2,4-D 2.0+KT 0	40	77.5	67.5	50.0	黄绿, 疏松易碎	黄绿, 质地紧密	深绿, 质地紧密
9	NAA 1.0+6-BA 1.0+2,4-D 2.0+KT 0	32	100.0	90.6	68.8	黄绿, 疏松易碎	黄绿, 疏松易碎	淡绿, 质地紧密
10	NAA 1.0+6-BA 1.0+2,4-D 2.0+KT 0.5	32	84.4	59.3	37.5	淡黄, 疏松易碎	黄绿, 质地紧密	淡绿, 较硬
11	NAA 1.0+6-BA 0+2,4-D 2.0+KT 0.5	36	72.2	50.0	38.9	淡绿, 疏松易碎	淡绿, 质地紧密	淡绿, 较硬

1.2 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)愈伤组织再分化培养

试验表明: 将愈伤组织接种到再分化的培养基中时, 逐渐形成绿色不定胚, 进而再分化形成不定芽(图 2)。不同激素组合对泽西骑士愈伤组织再分化的影响(表 2), 在 MS 培养基中添加 2,4-D 和 KT 时, 有利于芦笋愈伤组织的再分化培养。当培养基中不添加 KT 时, 6-BA 促进芽的分化, 但在适宜的激素条件, 当培养基中含 2,4-D 2.0 mg/L, KT 0.5 mg/L

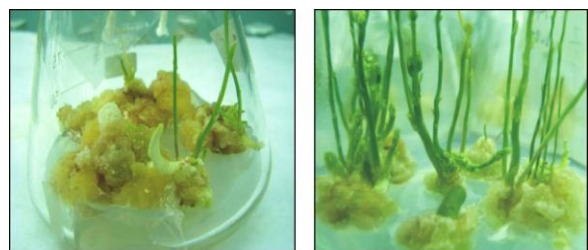


图 2 芦笋愈伤组织再分化为不定芽

Figure 2 Regenerating shoots from the callus of Asparagus

表 2 不同激素诱导的泽西骑士愈伤组织不定芽分化率的比较

Table 2 The effects of phytohormones on shoots regeneration rate with callus of 'Jersey Knight'

处理 Treatment	NAA (mg/L)	6-BA (Mg/L)	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	接种数(个) No. of culture	不定芽再生数 No. of regene- rating shoots	不定芽分化率(%) Percentage regeneration (%)	生长情况 of Status of growth	愈伤组织的形态 Morphology of the Callus
1	0.5	0.0	2.0	0.5	30	26	86.7	+++	黄绿, 疏松 Yellow and green, loose
2	0.5	0.1	2.0	0.5	30	17	56.7	++	淡黄色, 疏松 Light yellow, loose
3	0.5	0.5	2.0	0.5	32	24	75	+	淡黄色, 疏松 Light yellow, loose
4	1.0	0.1	2.0	0.5	30	30	100	++++	黄绿, 疏松 Yellow and green, loose
5	1.0	0.1	2.0	0.5	30	12	40	+++	黄绿色, 疏松 Yellow and green, loose
6	1.0	0.5	2.0	0.5	30	23	76.7	++	淡黄色, 疏松 Lightyellow, loose
7	1.0	1.0	2.0	0.0	30	19	63.3	+++	黄绿, 疏松 Yellow and green, loose
8	1.0	1.0	2.0	0.5	30	21	70	+++	黄绿, 疏松 Yellow and green, loose

注: 愈伤组织体积 0.5~1 cm³ 标记为“+”, 1.0~1.2 cm³ 标记为“++”, 1.2~1.5 cm³ 标记为“+++”, 大于 1.5 cm³ 标记为“++++”
Note: '+' indicated the callus size was between 0.5~1cm³, '++' the callus size was between 1.0~1.2cm³, '+++ the callus size was between 1.2~1.5 cm³, '++++' the callus size was more than 1.5cm³

和 NAA 0.5~1.0 时, 再添加 6-BA, 则导致愈伤组织的不定芽频率降低, 但分化的芽体增粗大, 6-BA 结合 KT 促进芦笋不定芽加粗生长的作用有待进一步研究证实。

再分化培养时, 愈伤组织在接种前均被分割成 0.5 cm³ 大小, 培养相同的天数后, 愈伤组织再分化形成不定芽的同时还会膨大增殖。因此, 观察结果时, 除了记录不定芽再生频率, 记录愈伤组织的颜色、质地或疏松或紧密, 还可测量愈伤组织块的大小, 结果见表 2。不同激素组合培养发现, 适宜芦笋愈伤组织不定芽分化的培养基是: MS+NAA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L, 分化频率达 100%, 而且在此培养基中, 愈伤组织的生长体积也最大。由此可知, 该培养基同样适合于愈伤组织增殖培养。

1.3 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)茎段诱导侧芽增殖培养

利用茎段抑制顶端优势、诱导侧芽增殖的试验

表明: 在 MS 培养基中添加不同浓度的 NAA 和 6-BA 对诱导芦笋茎段的侧芽增殖效果不同, 茎段不同部位的芽增殖系数在 0.57~2.87 之间, 见表 3。从表 3 可知, 当 NAA 的浓度为 6-BA 的两倍时, 侧芽的增殖系数明显提高, 可得到较多的丛生芽(见图 3), 适宜芦笋茎段侧芽增殖的培养基是: MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, 每个带芽茎段, 平均可得到 2~3 个丛生芽。

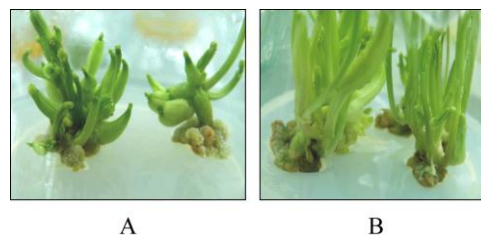


图 3 带侧芽茎段增殖培养

注: A: 20 d 培养后茎段侧芽增殖的情形; B: 30 d 培养后茎段侧芽增殖的情形

Figure 3 Shoots propagating from the lateral buds

Note: A: 20 day; B: 30 day cultivation of shoots propagating

表 3 不同激素组合对泽西骑士侧芽增殖的影响比较

Table 3 The effects of different phytohormones on percentage of bud of Jersey Knight

处理 Treatment	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	接种数(个) No. of culture	新芽数(个) No. of new buds	增殖系数 Percentage of propagation
1	0.5	0.10	0	0	30	41	1.37
2	0.5	0.25	0	0	30	48	1.60
3	0.5	0.50	0	0	32	38	1.19
4	0.5	0.75	0	0	30	31	1.03
5	0.5	1.00	0	0	30	30	1.00
6	0.5	0.50	0	0.5	32	35	1.09
7	0.5	0.10	1	0	30	38	1.27
8	1.0	0.50	0	0.5	30	62	2.07
9	1.5	0.50	0	0	30	42	1.40
10	0.5	0.10	0	0.5	30	17	0.57
11	0.5	0.25	0	0.5	30	58	1.93
12	0.5	0.50	1	0	30	34	1.13
13	1.0	0.50	0	0	30	86	2.87

1.4 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)试管苗生根培养

试管苗生根试验表明:不定芽长度及激素浓度的配比都会导致芦笋试管苗生根率不同(见表 4),在不定芽长度小于 2 cm 时,试管苗的生根率最高,达到 75%;不定芽长 3 cm 时,生根率次之;而不定芽长 4~5 cm 时,诱导生根的效果不明显。从表 4 可知,不同浓度的 NAA 和 6-BA 对芦笋试管苗的生根效果不同,在 MS 基本培养基中添加 NAA 和 6-BA 的浓度都不宜过高,过高则会抑制芦笋试管苗生根,而加入低浓度的 KT 有利于芦笋试管苗的生根(见表 4 和图 4),适宜芦笋试管苗生根的培养基是:MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.25 mg/L+KT 0.1 mg/L。芦笋生根时有两种可能的途径,一种是根从茎基部长出(图 4B, 图 4D, 图 4E),另一种则是先在基部膨大产生愈伤(图 4A),然后根从愈伤上长出,前者形成的根与茎的维管束能连通,移栽易成活,而后者根的维管束与茎的维管束不连通,移栽无法成活(图 4C)。

1.5 全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)试管苗炼苗、移栽

选用正常生根苗(见图 4),利用不同基质和营养液组合,进行炼苗、移栽(见表 5)。结果显示不同的移栽基质具有不同的水分、养分供给和通气状况,从而导致不同的成活率。从供试的 4 种基质看,以腐殖土 5 份和埴石 3 份的基质通气性好,用薄膜保湿 3~5 d 有利试管苗成活,移栽成活率达 75% (见

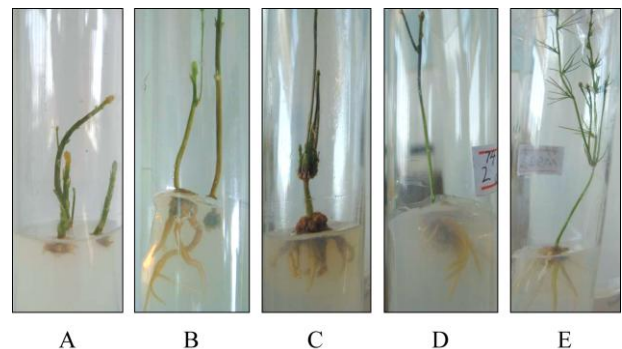


图 4 试管苗生根

注: A: 基部膨大产生愈伤; B, D, E: 根直接从茎段基部产生,能移栽成活; C: 茎段与根通过愈伤连接,不能移栽成活

Figure 4 Rooting of shoots in vitro propagation

Note: A: Callus producing from inflated end of shoots; B, D, E: Normal rooting of shoots, seedling can survive in soil; C: Innormal rooting, stem and roots ligated with callus, seedling cannot survive in soil

表 5)。移栽后的环境条件对移栽成活率也具有影响。试管苗移栽后,要适当进行遮阴,减少阳光直射,控制好湿度、温度,能显著提高成活率。另外由于试管苗在无菌培养阶段都进行异养生长,其根吸收养分的能力比较弱,只有促进其从异养状态转入自养状态才能健壮生长,因此为了提高试管苗的移栽成活率,在移栽当天可向基质浇灌不含有机物和蔗糖的 1/2MS 培养基,成活后改为间隔 10 d 喷洒 1/4 无糖的 MS 营养液一次,以保证健苗的生长。当试管苗根部抽生出 2~3 条新茎时,便可进行大田栽培。

表 4 不同激素组合对泽西骑士试管苗生根的影响

Table 4 The effect of different phytohormone concentration on regeneration rate of 'Jersey Knight'

处理 Treatment	MS	激素组合(mg/L) Concentration of Phytohormone (mg/L)	接种数(个) No. of culture	所用不定芽的长度(cm)及相应的生根率(%) The length of the shoots (cm) and their percentage of rooting (%)			
				0.5~2 cm	3 cm	4 cm	5 cm
1	1/2MS	NAA 0.1+6-BA 0+IBA 0.5+KT 0.05	30	30	26.7	10	3.3
2	1/2MS	NAA 0.5+6-BA 0+IBA 0.5+KT 0.05	30	16.7	10	0	0
3	1/2MS	NAA 0.5+6-BA 0+IBA 0 +KT 0.05	32	12.5	18.8	9.3	3.1
4	1/2MS	NAA 0.5+6-BA 0.1+IBA0+KT 0.1	30	10	3.3	0	0
5	1/2MS	NAA 0.5+6-BA 0.5+IBA 0+KT 0.1	30	6.7	0	0	0
6	1/2MS	NAA 0.5+6-BA 0+IBA 0+KT 0	30	13.3	16.7	0	0
7	MS	NAA 0+6-BA 0+IBA 0+KT 0	32	18.8	18.8	3.1	0
8	MS	NAA 0.5+6-BA 0.1+IBA 0+KT 0	30	20	16.7	6.7	0
9	MS	NAA 0.5+6-BA 0.25+IBA 0+KT 0.1	30	43.3	36.7	10	6.7
10	MS	NAA 0.1+6-BA 0.25+IBA 0+KT 0.1	32	75	56.3	12.5	6.3

表 5 不同的移栽基质对试管苗移栽成活率的影响

Table 5 The effect of different media on survival ratio of 'Jersey Knight'

基质配比(腐殖土:埴石:沙) Proportion of the matrix (umus: stone: sands)	移栽数(株) No. of transplanting plants	成苗数(株) No. of living plants	成活率(%) percentage of the alive plants (%)
5:5:0	20	11	55
5:3:0	20	15	75
5:3:1	20	9	45
1:0:0	25	6	24

2 讨论

本研究中, 全雄芦笋利用不同外植体培养成苗时的两条途径(王蒂等, 2003): ①是直接经器官发生途径诱导侧芽增殖成多个不定芽, 生根成试管苗; ②是诱导愈伤组织发生, 再经愈伤组织再分化产生不定芽, 生根成试管苗。试验结果显示, 该两条途径都能离体快繁优质泽西骑士(Jersey Knight)芦笋种苗。该离体快繁体系的建立, 可能为其它品种的芦笋离体快繁提供理论依据。在本研究中, ①在培养基 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 中泽西骑士品种髓部诱愈率达 100%, 茎段诱愈率为 90.6%, 此结果预示, 芦笋中具有生物活性的次生代谢产物, 可利用愈伤组织培养等细胞工程手段来规模化生产; ②利用茎段抑制顶端优势、促进侧芽增殖的有效培养基是: MS+NAA (0.5~1.0) mg/L+6-BA (0.25~0.5) mg/L, 每个带芽茎段平均每个芽体可得到 2~3 个丛生芽, 此点提示, 诱导泽西骑士芦笋品种的侧芽增殖时, 与常规(王蒂等, 2003)激素模式不同的是, 当生长素 NAA 的浓度是细胞分裂素 6-BA 的两倍左右时, 侧芽的增殖系数明显提高, 而细胞分裂素浓度不高于生长素浓

度时有利于侧芽增殖。这一现象是否在其他的芦笋品种的组培中有共同规律, 需进一步重复不同基因型芦笋的离体快繁来定论。

一个高效的芦笋快繁体系的建立不仅能为企业或农户提供生产用种, 同时还能为芦笋的分子生物学和次生代谢网络等方面的研究奠定基础(Sanjay and Bopana, 2009)。在以芦笋各部分为外植体进行快繁时, 成功与否的关键技术是生根。本研究用较短的不定芽(小于 2 cm)来获得较高的生根率。预示较长的茎段可能合成生根抑制物, 抑制了根的生长。叶茎松等(私人通讯, 2011)用赤霉素(GA)合成与作用抑制剂, 嘧啶醇(ancymidol), 促进芦笋生根, 预示较长的芦笋茎段合成的生根抑制剂可能是 GA 类激素。另外从芦笋无菌培养物到完整试管苗获得的过程中, 2,4-D 和 KT 两种生长调节剂起关键作用, 其中 2,4-D 对芦笋的愈伤诱导起到决定性作用; 而 KT 有利于芦笋不定芽的诱导及试管苗的生根, 这与前人的研究结果一致(孔萌萌和周根余, 2006)。为避免不正常生根(图 4 C), 尽量取较短的不定芽来诱导, 并抑制 GA 的功能可能是解决问题的关键途径, 这可能与雄株芦笋为保持雄性性状而产生过多

的促雄植物激素赤霉素有关。

芦笋具有很高的营养、保健和药用价值,是我国目前主要创汇作物之一。研究表明芦笋中含有大量的黄酮类化合物,而具有清除人体中超氧离子自由基、提高抗衰老和增加机体免疫的能力,所产生的三萜皂甙有抗肿瘤、降脂等多种功能。因此,随着越来越多的人意识到芦笋的保健和药用作用,芦笋的需求量也将日益扩大。在各国,特别是发达国家及新兴的经济体国家(如中国)对芦笋的需求量日益增加,从而促进了芦笋种植逐渐扩大。由于目前芦笋生产过程中实生种子昂贵、种子发芽率低(30%~80%不等)、种苗不足等问题,限制了它的生产。现采用组织培养技术,对芦笋进行快繁的相关研究,建立高效的全雄芦笋快繁体系,不但可提供足够的生产用种,而且为今后芦笋细胞融合、转基因和细胞工程等方面的研究奠定基础。

3 材料与方 法

3.1 实验材料

全雄泽西骑士芦笋幼嫩茎段;基本培养基为MS,蔗糖浓度3%~5%,琼脂浓度0.7%,Ph 5.8,并添加不同浓度激素。121℃,0.1~0.15 kPa下20 min进行培养基灭菌;组培材料的培养温度(25±2)℃,相对湿度70%~80%,光照强度2 000 Lx,光照时间12 h/d。

3.2 方 法

3.2.1 无 菌 苗 的 获 得

从良种圃选取健康、综合性状好的全雄芦笋泽西骑士(Jersey Knight)植株,切取露出地面但笋尖尚未分枝的绿色嫩茎为研究材料。以75%酒精浸润1 min迅速取出,再用2.5%次氯酸钠消毒10~15 min后倒出,无菌水冲洗3~5遍,在超净工作台上接种于无菌培养基,然后,置于培养室中进行培养。

3.2.2 全雄芦笋不同外植体愈伤组织诱导培养

为建立良好的再生体系,本实验尝试分别以芦笋嫩茎表皮、髓部和茎段为外植体诱导愈伤组织,所用培养基中NAA设置为0.5 mg/L和1.0 mg/L两个水平,6-BA设置6-BA 0.1 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,6-BA 1.0 mg/L三个水平,2,4-D设置2,4-D 2.0 mg/L和2,4-D 5.0 mg/L两个水平,而激动素(KT)设置为0.5 mg/L,1.0 mg/L,1.5 mg/L,2.0 mg/L四个水平,具体的激素配比组合及结果见表1(诱导率%)=出愈伤数(个)/接外植体数(个)×100%。

3.2.3 全雄芦笋愈伤组织再分化培养

不同外植体诱导形成的愈伤组织,形态和颜色不一,将生长状态好,颜色浅黄到黄绿的愈伤进行再分化培养。所用培养基中NAA为NAA 0.5 mg/L和NAA 1.0 mg/L两个水平,6-BA设置6-BA 0 mg/L,6-BA 0.1 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,6-BA 1.0 mg/L四个水平,2,4-D为2,4-D 2.0 mg/L不变,而激动素(KT)设置为0 mg/L,0.5 mg/L两个水平,具体的激素配比组合及结果见表2(分化率%)=(出芽愈伤数/接种愈伤数)×100%。

3.2.4 全雄芦笋茎段诱导侧芽增殖培养

芦笋组培苗形成的另一条途径是直接由带侧芽的嫩茎,抑制顶端优势,诱导侧芽增殖。所用培养基中NAA设置为NAA 0.5 mg/L,NAA 1.0 mg/L,NAA 1.5 mg/L三个水平,6-BA设置6-BA 0.1 mg/L,6-BA 0.25 mg/L,6-BA 0.5 mg/L,6-BA 0.75 mg/L和6-BA 1.0 mg/L五个水平,2,4-D为2,4-D 0 mg/L,2,4-D 1.0 mg/L两个水平,而激动素KT设置为0 mg/L,0.5 mg/L两个水平,具体的激素配比组合及结果见表3(增殖系数=新芽数(个)/接种数(个))。

3.2.5 全雄芦笋试管苗生根培养

采用增殖培养后产生的健壮丛生的不定芽,长度0.5~5 cm,接种在生根培养基中,诱导芦笋试管苗生根。所用培养基(MS,1/2MS)中NAA设置为NAA 0 mg/L,NAA 0.1 mg/L,NAA 0.5 mg/L三个水平,6-BA设置6-BA 0 mg/L,6-BA 0.1 mg/L,6-BA 0.25 mg/L,6-BA 0.5 mg/L四个水平,IBA设置为0 mg/L,0.5 mg/L两个水平,而激动素KT设置为0 mg/L,0.05 mg/L,0.1 mg/L三个水平,具体的激素配比组合见表4(生根率%)=生根苗(株)/接种外植体数(个)。

3.2.6 全雄芦笋试管苗炼苗、移栽

试管苗生根后,待根生长到2~3 cm时,将试管苗在移栽前一周打开瓶盖,使小苗逐步适应周围环境的湿度;再通过一定强度日光锻炼,使小苗从异养状态过度到自养状态。炼苗3~5 d,小心取出试管苗,洗净根部的培养基和轻轻拽去没能与不定芽维管束连通的愈伤组织根,移栽到消毒过的营养基质中并保持一定的温度和湿度。所用的移栽基质为腐殖土、蛭石、沙。三种基质的不同配比对苗试管移栽成活率的影响结果见表5(成活率%)=成苗数(株)/移栽数(株)×100%。

作者贡献

董玉梅和王云海是本研究的方案设计和直接实施者, 其中王云海完成实验数据的收集分析及部分论文的撰写, 董玉梅完成前期的预试验和论文初稿的写作及修改工作; 毛自朝为项目负责人, 指导该研究并负责论文修改与定稿; 尹金阳, 程丹, 邱钦荣参与了本研究的设计, 并承担了其中的部分研究工作; 林春参与了方案设计与讨论。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢


本研究由农业部公益性行业专项(201003074)资助。作者感谢云南农业大学农学院实验中心提供开放的实验平台供研究完成, 感谢刘雅婷教授在本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢编辑的耐心和辛勤劳动, 感谢匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

- Chaturvedi H.C., Jain M., and Kidwai N.R., 2007, Cloning of medicinal plants through tissue culture-a review, *Indian J. Exp. Biol.*, 45(11): 937-948
- Chen Z.D., 2007, Studies of technology systems for tissue culture and rapid proagation of *Aspapagus officinalis*, *Xi'nan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 20(3): 470-473 (陈振东, 2007, 芦笋组织培养及快繁技术体系的研究, *西南农业学报*, 20(3): 470-473)
- Huang L.F., and Chen B., 2006, Determination and extraction of rutin from asparagus, *ShipinKeji (Food Science and Technology)*, 7: 244-248 (黄雷芳, 陈波, 2006, 本地芦笋中芦丁的提取及其反相色谱鉴定, *食品科技*, 7: 244-248)
- Kong M.M., and Zhou G.Y., 2006, The rooting technique of *Asparagus* in vitro, *Shanghai Shifan Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences))*, 35(2): 91-94 (孔萌萌, 周根余, 2006, 芦笋组织培养生根技术, *上海师范大学学报(自然科学版)*, 35(2): 91-94)
- Liddycoat S.M., Greenberg B.M., and Wolyn D.J., 2009, The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on asparagus seedlings and germinating seeds subjected to water stress under greenhouse conditions, *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4): 388-394
- Pontaroli A.C., and Camadro E.L., 2005, Plant regeneration after long-term callus culture in clones of *Asparagus officinalis* L., *Biocell.*, 29(3): 313-317
- Saxena S., and Bopana N., 2009, In Vitro Clonal Propagation of *Asparagus racemosus*, a high value medicinal plant, *Methods in molecular biology*, 547: 179-189
- Wang D., Zhang S.C., Wang L.Q., and Ma B.H., eds, 2003, *Cell engineering*, China agriculture press, Beijing, China, pp.57-66 (王蒂, 张士瑾, 马立群, 马保华, 编著, 2003,

细胞工程学, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.57-66)

- Xu H.L., and Chen J.X., 2009, Research of Quick Cultivate Technology on Salt-torlerent *Asparagus Officinalis*, *Beifang Yuanyi*, 2: 92-94 (徐化凌, 陈纪香, 2009, 耐盐芦笋的组培快繁技术研究, *北方园艺*, 2: 92-94)
- Zhao J., An L.G., Zhang F.M., Zhang F., and Yang G.W., 2007, Quantitative analysis of flavones (Rutin) in *Asparagus officinalis* L. by RP-HPLC, *Zhongguo Yesheng Zhiwu Ziyuan (Chinese Wild Plant Resources)*, 26(3): 61-63 (赵静, 安利国, 张福森, 张凤, 杨桂文, 2007, RP-HPLC法测定芦笋中黄酮类化合物芦丁的含量, *中国野生植物资源*, 26(3): 61-63)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>