

芦笋组培快繁体系的建立

鹿志伟¹, 高建明^{1,2}, 刘巧莲², 侯晓婉², 易克贤²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101)

摘要:以芦笋高产品种“井岗 701”的无菌茎尖为试材, 采用正交实验设计方法, 研究噻啉醇、KT、2,4-D、脱落酸、6-BA 和 NAA 等不同植物激素浓度组合对愈伤组织、胚状体以及幼苗诱导的影响。结果表明: MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 诱导愈伤组织效果最好, 出愈率达到 80% 左右。MS+0.70 mg/L 噻啉醇+0.10 mg/L NAA+0.50 mg/L KT 诱导胚状体效果最好, 诱导率高达 95%。MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 诱导胚状体成苗率达到 60% 左右。室外移栽成活率高达 90%, 初步建立了芦笋由胚状体到幼苗的一步成苗体系。

关键词: 芦笋; 胚状体; 组培; 快繁

中图分类号: S 644.603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2015)09-0083-04

芦笋(*Asparagus officinalis*)属百合科天门冬属多年生宿根草本植物, 又称石刁柏、龙须菜^[1]。其嫩茎质地细腻、风味鲜美、纤维柔软, 能够促进消化、增进食欲, 是一种低热量高营养保健蔬菜, 被誉为世界十大名贵蔬菜之一。同时其又对高血压、心脏病、癌症有特殊的疗效^[2-3]。由于它的食用和药用价值俱佳, 在国际上出现了供不应求的现象, 而且其市场需求也呈现日益增加的趋势^[4-6], 在欧美各国、日本、东南亚等国际市场中芦笋已经成为不可替代的高级营养蔬菜和保健食品。但芦笋种子生产困难, 成本很高, 因此建立高效快速的芦笋组培快繁体系成为当前芦笋健康种苗生产的迫切需求。

目前芦笋无性繁殖主要是通过愈伤组织到芽, 然后生根, 最后成苗的诱导模式。董静等^[6]以芦笋无菌苗植株茎尖为材料, 发现 6-BA 和 NAA 对芦笋诱导和增殖具有良好的效果, 而使用 IBA 和 KT 诱导芦笋生根, 可达到 91.7% 的诱导率。曹岩坡等^[7]以 Apollo F₁ 代的雄株为材料进行组织培养, 发现 ancymidol 和 NAA 是影响芦笋组织培养中试管苗生根的主要因素。张元国等^[8]以芦笋全雄植株茎尖为材料进行组织培养, 发现 6-BA、NAA、KT 对芦笋生苗和生根具有明显作用。高建明等^[9]以芦笋茎枯病

高抗品种“格兰蒂”为材料, 使用 NAA、6-BA、IBA 等多种植物激素混合使用的方式建立了芦笋的快繁体系。Nataša^[10]以芦笋茎尖以及侧芽为外植体, 研究 6-BA、KT 和 ancymidol 等植物激素对芦笋不定芽和根的诱导作用。这些研究都是使用一般的成苗诱导模式, 步骤繁琐, 耗时较长, 繁殖效率不高。

该研究拟在前人研究的基础上^[6-11], 探索由芦笋愈伤组织经胚状体直接一步诱导生芽生根的新的苗诱导模式, 建立一个简便、快速、高效的芦笋无性繁殖体系, 它不仅能够快速地对芦笋进行无性繁殖, 而且还能够简化芦笋的转基因过程, 提高转基因苗的得率, 具有较高的生产价值和研究意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芦笋品种为江西农业科学院育成并推广的新品种“井岗 701”。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的制备 将“井岗 701”芦笋种子用 70% 酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 1 遍, 0.1% 升汞消毒(加 2~3 滴吐温 20)5 min, 无菌水冲洗 3 遍, 接种于 MS 基本培养基上, 待种子发芽, 幼苗高 4~5 cm 时, 取植株靠茎尖约 0.5 cm 部分作为无菌外植体。

1.2.2 愈伤组织诱导 取 1.2.1 中的无菌茎尖作为研究对象, 使用 MS+25 g/L 蔗糖+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8, 作为基础培养基, 使用 2,4-D 和 KT 这 2 种植物激素作为愈伤组织诱导因子, 设计 2 因素 3 水平的正交实验, 见表 1, 每处理茎尖 20 个, 重复 3 次。26℃, 暗培养 14 d 后统计愈伤组织诱导率。

第一作者简介: 鹿志伟(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为农业生物技术。E-mail: luzhiwei12@yahoo.com.

责任作者: 易克贤(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: yikexian@126.com.

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003074)。

收稿日期: 2015-01-30

表 1 愈伤组织诱导培养基正交设计

Table 1 The orthogonal test for callus induction

因素	水平 Level		
Factor	1	2	3
2,4-D/(mg·L ⁻¹)	1.0	2.0	3.0
KT/(mg·L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5

1.2.3 胚状体诱导 取 1.2.2 中诱导成功的愈伤组织作为研究对象,使用 MS+30 g/L 蔗糖+800 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L 酸水解酪素+7.0 g/L 卡拉胶, pH 5.8,作为基础培养基,使用噻啉醇、NAA 和 KT 这 3 种植物激素作为胚状体诱导因子,设计 3 因素 3 水平的正交实验,见表 2,每处理愈伤组织 20 块,重复 3 次。26℃,16 h/d 光周期培养 14 d 后统计胚状体诱导率。

表 2 胚状体诱导培养基正交设计

Table 2 The orthogonal test for somatic embryos induction

因素	水平 Level		
Factor	1	2	3
噻啉醇 Ancyimidol/(mg·L ⁻¹)	0.3	0.5	0.7
NAA/(mg·L ⁻¹)	0.1	0.2	0.3
KT/(mg·L ⁻¹)	0.1	0.3	0.5

1.2.4 苗诱导 取 1.2.3 中诱导成功的胚状体作为研究对象,使用 MS+30 g/L 蔗糖+卡拉胶 6.5 g/L, pH 5.8 作为基础培养基,使用 NAA 和 6-BA 这 2 种植物激素作为苗诱导因子,设计 2 因素 4 水平的正交实验,见表 3,每处理胚状体 20 块,重复 3 次。26℃,16 h/d 光周期培养 30 d 后统计苗诱导率。

表 3 苗诱导培养基正交设计

Table 3 The orthogonal test for plantlets induction

因素	水平 Level			
Factor	1	2	3	4
NAA/(mg·L ⁻¹)	0.1	0.3	0.5	0.7
6-BA/(mg·L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5	2.0

1.2.5 驯化与移栽 待芦笋幼苗生根数量在 3 条以上时,移至光照条件良好的室内培养 10 d 左右,然后拧开瓶盖敞口培养 2 d,小心取出芦笋组培苗,清水洗去残留培养基,移栽至含一定比例的黑土、蛭石和黄沙的基质中,使用保护膜封起来,注意保湿培养 20 d 左右,待幼苗长出新茎后,去掉保护膜便可进行大田定植。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 和 Excel 2007 软件进行统计分析^[12-14]。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导结果

由表 4 和图 1 可知,不同的试验处理组其愈伤组织诱导率不同,每个因素的 Sig 都小于 0.05,说明 2,4-D 和 KT 对芦笋愈伤组织诱导都具有显著作用,并且根据Ⅲ型平方和可知,2,4-D 对愈伤组织诱导的作用要大于 KT。最后根据每个诱导因素不同浓度水平的愈伤组

织平均诱导率可知,最佳的愈伤组织诱导激素组合为 2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT,愈伤组织诱导率可达 80%。

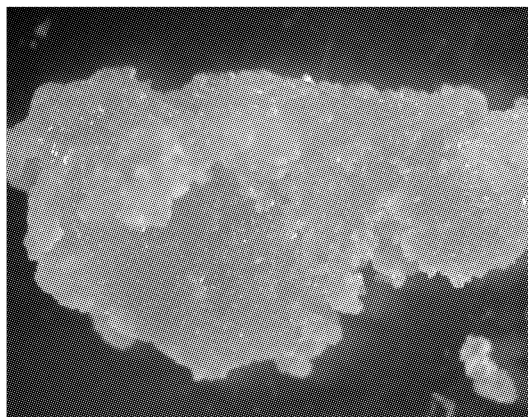
表 4 愈伤组织诱导结果

Table 4 The results for callus induction

序号	2,4-D	KT	诱导率 Induction rate/%		
Number	/(mg·L ⁻¹)	/(mg·L ⁻¹)	1	2	3
1	1(1.0)	1(0.5)	60.6	60.0	61.0
2	1	2(1.0)	68.4	68.7	68.8
3	1	3(1.5)	63.4	63.6	62.9
4	2(2.0)	1	67.8	68.0	68.0
5	2	2	78.6	80.0	79.8
6	2	3	70.3	71.0	70.5
7	3(3.0)	1	61.3	61.6	61.8
8	3	2	64.5	65.0	64.8
9	3	3	62.0	62.5	62.4
k1	64.156	63.344			
k2	72.667	70.956			
k3	62.878	65.400			
Ⅲ型平方和	509.682	279.056			
Sig	0.000	0.000			

注:SPSS 检验,Sig<0.05 表示差异达到显著水平,k 表示平均值。下同。

Note:SPSS test,if Sig<0.05,the difference was significant,k was average value. The same as below.



注:愈伤组织在体视显微镜下观察结果。

Note:Callus was observed in stereoscopic microscope.

图 1 愈伤组织诱导结果

Fig.1 The results for callus induction

2.2 胚状体诱导结果

由表 5 和图 2 可知,不同的试验组合其胚状体诱导率不同,每个因素的 Sig 都小于 0.05,说明噻啉醇、NAA 和 KT 对胚状体诱导都具有显著作用,并且根据Ⅲ型平方和可知对胚状体诱导作用大小依次为 KT、噻啉醇、NAA。根据每个诱导因素不同浓度水平的胚状体平均诱导率可知,最佳的胚状体诱导激素组合为 0.7 mg/L 噻啉醇+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L KT,胚状体诱导率可高达 95%。

2.3 苗诱导率

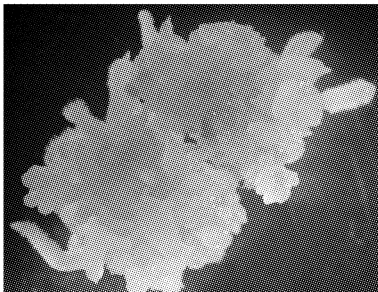
由表 6 和图 3 可知,不同的试验组合其芦笋组培苗

表 5 胚状体诱导结果

Table 5 The results for somatic embryos induction

序号 Number	噻啉醇 Ancyimidol /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	KT /(mg·L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%		
				1	2	3
1	1(0.3)	1(0.1)	1(0.1)	80.0	80.6	80.4
2	1	2(0.2)	2(0.3)	82.1	82.1	82.4
3	1	3(0.3)	3(0.5)	83.6	83.8	83.6
4	2(0.5)	1	2	87.5	86.5	87.0
5	2	2	3	87.8	87.5	88.0
6	2	3	1	80.6	80.6	80.1
7	3(0.7)	1	3	94.5	95.0	95.4
8	3	2	1	84.5	85.0	84.7
9	3	3	2	84.8	84.9	84.5
k1	82.067	87.433	81.833			
k2	85.067	84.900	84.644			
k3	88.144	82.944	88.800			
Ⅲ型平方和	166.236	91.176	221.116			
Sig	0.000	0.000	0.000			

的诱导率不同,每个诱导因素的 Sig 都小于 0.05,说明每个因素对芦笋组培苗诱导都具有显著作用,并且根据Ⅲ型平方和可知 NAA 对芦笋组培苗的诱导作用大于 6-BA。根据每个诱导因素不同水平的芦笋组培苗平均诱导率可知,最佳的芦笋组培苗诱导组合为 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA,诱导率可达 60%。



注:胚状体在体视显微镜下观察结果。
Note: Somatic embryos was observed in stereoscopic microscope.

图 2 胚状体诱导结果

Fig. 2 The results for somatic embryos induction

3 结论与讨论

该研究以芦笋作为研究对象,以各种不同浓度的植物激素作为诱导因子,设计了一系列的正交实验,最后通过 SPSS 19.0 软件进行结果方差分析,确定了最佳诱导芦笋愈伤组织、胚状体以及芦笋组培苗的激素浓度组合:最佳的芦笋愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+25 g/L 蔗糖+卡拉胶 6.5 g/L(pH 5.8);最佳的芦笋胚状体诱导培养基为 MS+30 g/L蔗糖+800 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L

表 6 苗诱导结果

Table 6 The results for plantlets induction

序号 Number	NAA /(mg·L ⁻¹)	6-BA /(mg·L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%		
			1	2	3
1	1(0.1)	1(0.5)	40.2	40.1	40.8
2	1	2(1.0)	45.5	45.0	44.9
3	1	3(1.5)	41.0	42.0	41.7
4	1	4(2.0)	38.5	38.0	38.6
5	2(0.3)	1	45.2	45.6	45.8
6	2	2	51.4	51.0	52.0
7	2	3	49.0	49.6	49.8
8	2	4	43.8	43.9	44.0
9	3(0.5)	1	52.1	52.0	52.9
10	3	2	60.0	60.4	60.1
11	3	3	57.4	57.6	58.0
12	3	4	52.0	52.6	52.4
13	4(0.7)	1	51.0	51.6	52.0
14	4	2	55.6	55.8	55.6
15	4	3	52.1	52.4	53.0
16	4	4	49.8	50.0	50.0
k1	41.300	47.125			
k2	47.350	53.125			
k3	55.375	49.875			
k4	52.125	46.025			
Ⅲ型平方和	1348.958	361.703			
Sig	0.000	0.000			

2.4 驯化与移栽

芦笋组培苗驯化移栽后,前期芦笋苗生长速率较慢,经过一定的适应期后,芦笋生长速率增加,生长状况良好,芦笋移栽大田后总的成活率可高达 90%。

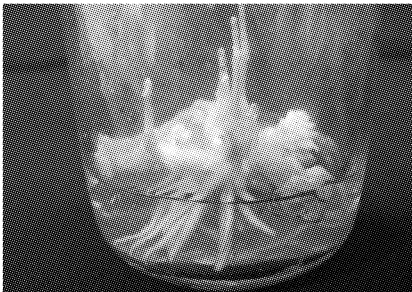


图 3 芦笋组培苗
Fig. 3 The results for asparagus plantlets



图 4 移栽 20 d 的室外苗
Fig. 4 Plantlets transferred to soil for about twenty days

酸水解酪素+0.7 mg/L 噻啉醇+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L KT+7.0 g/L 卡拉胶(pH 5.8);最佳的芦笋组培苗诱导培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+30 g/L 蔗糖+卡拉胶 6.5 g/L(pH 5.8)。

虽然目前已报道的芦笋组培的文章有许多,李凤玲等^[15]利用不同浓度水平的多种细胞生长素和分裂素对芦笋进行愈伤组织、体细胞胚(丛生芽)、根进行诱导,最终产生芦笋幼苗。陈振东^[16]通过对芦笋的启动培养基、增殖培养基以及生根培养基进行研究,建立了组培快繁技术体系。董静等^[6]利用芦笋无菌苗茎尖作为外植体,在不同培

培养基上诱导、增殖和生根,成功获得芦笋组培苗。曹岩坡等^[7]利用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计探讨芦笋试管苗生根的最佳配方。张元国等^[17]以紫芦笋茎尖作为外植体,对芦笋启动、增殖和生根培养基进行探究。高建明等^[9]以抗茎枯病芦笋品种为材料进行愈伤组织、不定芽和生根培养基的研究。这些研究都是经过愈伤组织到不定芽再到根的模式进行芦笋快繁组培体系的研究,而该研究则利用胚状体直接诱导成苗,中间省略了由不定芽到根的诱导,具有节省时间和操作简便的优点。同时将该组培体系应用于芦笋转基因操作时,只需进行一次转基因苗抗性筛选,从而可以获得更多的芦笋转基因苗。这与崔广荣等^[18]利用蝴蝶兰叶片诱导胚状体发生,进而生苗的报道相似。

另外,从愈伤组织、胚状体以及苗诱导的试验结果可以看出,在一定浓度范围内,诱导率随着植物生长素和细胞分裂素浓度的增加而增加,而当超过某一浓度时,诱导率就会下降。而且不同的诱导过程其各自的浓度阈值不同,这与植物激素的作用原理是相吻合的。但是在胚状体诱导的正交实验结果中可以看到胚状体诱导率是随着嘧啶醇浓度的增加而一直增加的,这说明在胚状体诱导的正交实验中,嘧啶醇设置的浓度梯度太小,没有确定其是否也存在浓度阈值。在下一步试验中应加大嘧啶醇的浓度梯度,以探索嘧啶醇对胚状体诱导的最佳作用浓度,完善胚状体的诱导试验。

总之,该试验使用胚状体这一特殊组织来进行芦笋组培苗的一步诱导,初步建立了芦笋的一步成苗体系。大大节省了芦笋无性繁殖的时间,使芦笋组培过程和芦笋转基因操作更加简便,具有重要的研究和生产意义。

参考文献

- [1] 袁仲,刘新社. 芦笋的保健功能与加工利用[J]. 食品研究与开发, 2008,29(8):158-160.
- [2] 关云静,周林燕,毕金峰,等. 绿芦笋不同部位营养成分及活性评价

- 研究[J/OL]. 食品工业科技, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1759.TS.20140923.1326.003.html>.
- [3] 陈春桦,高建明,刘巧莲. 芦笋四倍体诱导、倍性鉴定及生物学特性的研究[J]. 北方园艺,2014(11):88-92.
- [4] 王婧宇,张雪平,杨如,等. 生长素在芦笋组培扩繁体系中的影响[J]. 华南师范大学学报,2010(6):101-108.
- [5] 李姣,王珂,王瑞坡,等. 芦笋多糖提取纯化工艺及其抗氧化研究[J]. 食品科学,2011,32(8):65-69.
- [6] 董静,曹君迈,周根余,等. 芦笋组培快繁技术优化的研究[J]. 河南科技大学学报,2008,29(6):57-59.
- [7] 曹岩坡,代鹏,戴素英. 芦笋试管苗生根途径优化研究[J]. 河北农业科学,2010,14(1):54-55.
- [8] 张元国,李芳,包艳存,等. 芦笋全雄品种 WF-8 茎尖组培快繁技术研究[J]. 黑龙江农业科学,2012(12):22-24.
- [9] 高建明,代真真,杨峰,等. 抗茎枯病芦笋品种离体培养的研究[J]. 植物科学学报,2013,31(2):158-163.
- [10] Nataša Š. Protocols for micropropagation of selected economically important horticultural plants[M]. Humana Press,2013:341-351.
- [11] Li B C, Wolyn D J. Absciscic acid and ancymidol promote conversion of somatic embryos to plantlets and secondary embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 1996, 32(4):223-226.
- [12] 何秋月. SPSS 在 $L_9(3^4)$ 正交实验数据处理中的应用[J]. 中国中医药现代远程教育,2005,3(12):27-29.
- [13] 刘瑞江,张业旺,闻崇伟,等. 正交实验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理,2010,27(9):52-55.
- [14] 高忠江,施树良,李钰. SPSS 方差分析在生物统计的应用[J]. 现代生物医学进展,2008,8(11):2116-2120.
- [15] 李凤玲,刘世琦. 芦笋微体快繁试验研究[J]. 北方园艺,2005(6):81-83.
- [16] 陈振东. 芦笋组织培养及快繁技术体系的研究[J]. 西南农业学报,2007,20(3):470-473.
- [17] 张元国,刁家连,李芳,等. 紫芦笋茎尖组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2004,20(3):190-192.
- [18] 崔广荣,侯喜林,张子学,等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察[J]. 园艺学报,2007,34(2):431-436.

The Establishment of *Asparagus officinalis* Tissue Culture and Rapid Propagation System

LU Zhi-wei¹, GAO Jian-ming^{1,2}, LIU Qiao-lian², HOU Xiao-wan², YI Ke-xian²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Institute of Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Haikou, Hainan 571101)

Abstract: The sterile shoot tips of high-yielding varieties of 'Jinggang 701' *Asparagus officinalis* were used as experimental materials, using orthogonal design, the effect of different concentrations combinations of pyrimidinol, KT, 2,4-D, abscisic acid, 6-BA and NAA on the inductions for callus, somatic embryoids and seedlings were studied. The results showed that the optimum inducing medium for callus was MS+2,4-D 2 mg/L+KT 1.0 mg/L, the inducing rate reached to 80%; the optimum inducing medium for embryos was MS+0.70 mg/L ancymidol+0.10 mg/L NAA+0.50 mg/L KT, the inducing rate reached to 95%; the optimum inducing medium for plantlet was MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, the inducing rate reached to 60%; the survival rate of outdoor transplant could be about 90%. The system of one-step inducing into plantlet for asparagus was initially established.

Keywords: *Asparagus officinalis*; embryos; tissue culture; rapid propagation