

芦笋微体快繁试验研究

李凤玲¹, 刘世琦²

(1. 山东省东营职业学院, 257091; 2. 山东农业大学园艺学院, 泰安 271000)

摘要: 试验利用芦笋嫩尖进行组织培养, 通过大量试验, 研究出了最佳配方, 克服了芦笋组织培养生根难的问题, 并形成了芦笋快繁的整套技术。这次试验的成功, 对新选育的芦笋品系快速繁殖推广及生产中保持优良种性具有重要意义。

关键词: 芦笋; 嫩尖; 微体快繁; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: S644. 603. 6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2005)06-0081-03

芦笋主要靠实生繁殖, 易出现不同品系的杂交和后代性状分离现象, 而用组织培养的方法可在较短的时间内获得大量整齐一致的优良植株, 是进行芦笋扩繁的好方法。目前国内外研究最多的是进行芦笋花药离体培养的研究, 此方法只有在花期才能进行, 受时间限制, 而利用芦笋嫩尖进行组织培养, 不受时间限制, 且对新选育的芦笋品系扩繁制种意义重大。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新萌发的芦笋嫩芽

1.2 试验设计

1.2.1 外植体处理 剪取新萌发的芦笋嫩茎, 先用自来水冲洗 2~3 遍, 再取 1 cm~1.5 cm(厘米)长的茎尖, 在超净工作台上用 75% 的酒精浸 20 s(秒), 再于 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中消毒 4 min(分钟)之后, 用无菌水漂洗 4~5 次, 最后用无菌滤纸吸干水分^[1]。消毒后的芦笋外植体在接种前还须用无菌剪刀剪去旧切口, 创造一个新切口, 以利于脱分化过程中养分的吸收。

表 1 不同培养基的激素组合

试验号	NAA(mg/L)	2,4-D(mg/L)	BA(mg/L)
L1	0.5	0.0	0.2
L2	1.0	0.0	0.2
L3	1.5	0.0	0.2
L4	2.0	0.0	0.2
L5	0.0	0.5	0.2
L6	0.0	1.0	0.2
L7	0.0	1.5	0.2
L8	0.0	2.0	0.2

1.2.2 脱分化试验 培养条件: 温度 27℃±2℃, 光照强度 1 800 Lx(勒克斯), 光照时间每天 12 h(小时), MS 培养基+蔗糖(30 g/L(克/升))+活性炭(0.5 g/L(克/升))+激素, 培养基的灭菌: 121℃, 0.1~0.14 Kpa 下 17 min(分钟)高压灭菌。试验设计: 将处理好的芦笋外植体接种于不同激素组合的培养基中, 观察愈伤组织生长情况, 以期选择对诱导芦笋嫩茎愈伤组织最适合的激素组合。

1.2.3 体细胞胚的诱导及增殖 体细胞胚的诱导: 由于在愈

伤组织分化成丛生芽的过程中, 丛生芽的形成不仅取决于激素的浓度, 还取决于两种激素的相对比例, 芦笋愈伤组织体细胞的诱导, 以 MS 为基本培养基, 蔗糖 30 g/L(克/升), 活性炭 0.5 g/L(克/升), 取细胞分裂素 BA 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L(毫克/升), 生长素 NAA 浓度为 0.0、0.4、0.8、1.2 mg/L(毫克/升), 用 L₁₆(2⁴) 安排试验, 选取培养好的愈伤组织移植于上述方案配置的培养基中, 观察丛生芽分化情况。继代培养: 由愈伤组织分化的芦笋不定芽生长迅速, 5 周左右平均高可达 5.0 cm(厘米), 需要进行继代培养, 继代培养时将芦笋茎剪成 1 cm~2 cm(厘米)长的茎段, 水平放置到培养基的表面, 最初的继代培养以 MS+BA1.8 mg/L+NAA0.2 mg/L+糖 30 g/L+琼脂 5.8 g/L+活性炭 0.5 g/L(克/升), 既可实现高增殖率, 又能保证分化出的芽粗壮, 生长较好。培养室温度保持在 25℃~30℃, 空气相对湿度 60%, 光照强度 1 800 Lx(勒克斯), 光照时间每天 12 h(小时), 40 d(天)左右便可以继代一次, 每次继代增殖倍数达 6.8 倍, 这个繁殖速度大大超过了芦笋的有性繁殖速度。

1.2.4 生根培养 根的诱导: 将继代培养成的小苗, 剪切成 2 cm~3 cm(厘米)的带芽茎段, 转入生根培养基中进行生根诱导, 生根培养基选用 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的激素, 通过试验评选出较优的生根培养基。炼苗及移栽: 经过生根培养的芦笋, 当根长达到 2 cm(厘米), 并有少许侧根长出时便可进行移栽, 在移栽前要先进行炼苗, 打开培养瓶, 让芦笋苗暴露在空气中, 并适当遮荫, 炼苗 3 d~5 d(天)后, 将组培苗移植到配好的营养土中, 并进行适当遮荫、保湿。当根茎部抽生出 1~2 条新茎时, 便可进行大田定植。试管苗从开瓶炼苗到大田定植这一过程, 约需 30 d(天), 成活率可达 85% 以上。

2 结果与分析

2.1 脱分化实验结果

将处理好的芦笋外植体接种于表 1 所列培养基中, 观察愈伤组织生长情况, 接种 10 d(天)后, 茎段均能轻度膨大, 15 d(天)后除 L1 外均能产生少量愈伤组织, 25 d(天)后, 除 L1 外均能产生较多愈伤组织, 但 L7、L8 愈伤组织有轻度水渍状, 也略显松散, L3、L4 形成的愈伤组织质量较好。这说明激素组合在 NAA 浓度 1.5 mg/L~2.0 mg/L(毫克/升)和 BA 浓度 0.2 mg/L(毫克/升)时, 对芦笋嫩茎愈伤组织的形成效

收稿日期: 2005-06-12

果好。

表2 不同激素组合对诱导芦笋茎段愈伤组织的影响

处理	NAA (mg/L)	2, 4-D (mg/L)	BA (mg/L)	愈伤 组织	愈伤组织 形态
L1	0.5	0.0	0.2	+	白色
L2	1.0	0.0	0.2	++	浅绿
L3	1.5	0.0	0.2	+++	浅绿、细密
L4	2.0	0.0	0.2	+++	浅绿、细密
L5	0.0	0.5	0.2	++	白色
L6	0.0	1.0	0.2	++++	白色
L7	0.0	1.5	0.2	++++	白色
L8	0.0	2.0	0.2	+++	白色

2.2 体细胞胚的诱导及增殖实验结果

2.2.1 体细胞胚的诱导 愈伤组织接种 10 d(天)后, 开始出现浅绿色瘤状突起, 20 d(天)后逐渐伸长产生丛生芽, 但是不同的激素浓度及配比的分化率和丛生芽数不同。从表3可以看出, 分化率和丛生芽数较高的试验分别为 L10 号和 L14 号, 由于分化率还不够理想, 我们又围绕 L10 号和 L14 号对激素浓度进行了调整。详细试验见表4。

表3 不同激素组合对芦笋体细胞胚的诱导试验

处理	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	分化率 (%)	平均丛生芽 个数
L1	0.5	0.0	0.0	0.0
L2	0.5	0.4	0.0	0.0
L3	0.5	0.8	0.0	0.0
L4	0.5	1.2	0.0	0.0
L5	1.0	0.0	6.7	1.5
L6	1.0	0.4	16.7	2.6
L7	1.0	0.8	6.7	1.0
L8	1.0	1.2	0.0	0.0
L9	1.5	0.0	33.3	2.9
L10	1.5	0.4	80.0	5.0
L11	1.5	0.8	33.3	2.6
L12	1.5	1.2	3.3	2.0
L13	2.0	0.0	50.0	3.3
L14	2.0	0.4	73.0	5.5
L15	2.0	0.8	66.7	4.1
L16	2.0	1.2	16.7	1.6

结果表明: 适宜芦笋愈伤组织分化成芽的激素浓度分别为 BA: 1.8 mg/L(毫克/升), NAA: 0.2 mg/L(毫克/升), 因此可以认定 MS+BA1.8 mg/L+NAA0.2 mg/L(毫克/升)+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.8 g/L+活性炭 0.5 g/L(克/升), 是芦笋愈伤组织分化的最佳培养基。

2.2.2 继代培养 试验发现, 芦笋经过长期的继代培养, 容易产生玻璃化的现象, 一般通过降低培养温度, 延长光照时间, 降低激素浓度等的方法, 可使玻璃化程度缓解, 特别是把 BA 浓度降为 1.6 mg/L(毫克/升), NAA 浓度降为 0.1 mg/L(毫克/升)时, 既能缓解玻璃化程度, 又能保证增殖倍数, 曾尝

试通过变换激素的办法来消除玻璃化, 如把 NAA 换成 IBA 及 2, 4-D, 但未能成功, IBA 与 2, 4-D 甚至有加重玻璃化的趋势。根据我们的试验, 在芦笋的长期继代培养过程中, 最好每隔一定时间如 2 年, 重新构建一次再生体系, 以保证芦笋组培苗的健康增殖。

表4 芦笋体细胞胚的诱导优化试验

处理	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	分化率 (%)	平均丛生芽 个数
L1	1.4	0.1	46.7	2.1
L2	1.4	0.2	56.7	2.4
L3	1.4	0.3	56.7	1.8
L4	1.4	0.5	30.0	1.7
L5	1.6	0.1	66.7	3.6
L6	1.6	0.2	73.3	4.0
L7	1.6	0.3	63.3	3.5
L8	1.6	0.5	53.3	3.1
L9	1.8	0.1	80.0	4.3
L10	1.8	0.2	90.0	6.8
L11	1.8	0.3	76.7	4.6
L12	1.8	0.5	66.7	3.3
L13	2.2	0.1	63.3	3.4
L14	2.2	0.2	73.3	3.6
L15	2.2	0.3	70.0	3.7
L16	2.2	0.5	73.3	3.7

2.3 生根培养

表5 不同浓度激素培养基对生根的影响

处理	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根 苗数	生根率 (%)	备注
S1	0.0	0.1	2	7.1	每处理接种 28 棵苗
S2	0.0	0.2	3	10.7	
S3	0.0	0.4	12	42.9	
S4	0.02	0.1	20	71.4	
S5	0.02	0.2	8	28.6	
S6	0.02	0.4	10	35.7	
S7	0.04	0.1	2	7.1	
S8	0.04	0.2	7	25	
S9	0.04	0.4	1	3.6	

表5说明, 经过继代培养的芦笋幼苗茎段在 1/2 MS+BA 0.02+NAA0.1 的培养基中, 培养 40 d(天), 生根率可达 71.4%。另外, 我们在芦笋多倍体诱导试验中发现, 添加秋水仙碱的培养基中, 芦笋试管苗生根率普遍高, 当然这还有待于进一步的实验证实。

3 讨论

目前国内外研究最多的是利用花药离体培养、诱导愈伤组织、分化成试管苗。本次试验研究参考了他们的经验, 重新进行了试验设计, 通过大量实验, 研究出了利用芦笋嫩尖进行组织培养的最佳配方, 克服了芦笋组织培养生根难的问题, 并形成了芦笋快繁的整套技术。在芦笋嫩尖组织培养脱分化试

验中, 诱导愈伤组织选用 MS 培养基+蔗糖(30 g/L(克/升))+活性炭(0.5 g/L(克/升))+激素, 试验证明: 激素配比 NAA1.5 mg/L(毫克/升)~2.0 mg/L(毫克/升)+BA0.2 mg/L(毫克/升)时, 形成愈伤组织最好。这一结论与花药离体培养中的激素配比略有不同: 在花药离体培养中, Yakuwa (1972)认为添加激素 NAA1.0 mg/L(毫克/升)+BA1.0 mg/L(毫克/升)诱导愈伤组织, Torrey (1983)认为添加激素 NAA5.0 mg/L(毫克/升)+BA1.0 mg/L(毫克/升)诱导频率最高, 张磊等试验结果为 NAA0.1~0.5 mg/L(毫克/升)+BA1.0~2.0 mg/L(毫克/升)+2, 4-D0.5~1.0 mg/L(毫克/升)是适宜的(张磊, 1996)^[2]。在芦笋嫩尖组织培养愈伤组织分化的诱导试验中, 选用 MS 培养基+蔗糖(30 g/L(克/升))+活性炭(0.5 g/L(克/升))+激素, 结果表明: 适宜芦笋愈伤组织分化成芽的激素浓度分别为 BA: 1.8 mg/L(毫克/升), NAA: 0.2 mg/L(毫克/升), 因此可以认定 MS+BA1.8 mg/L+NAA0.2 mg/L(毫克/升)+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.8 g/L+活性炭 0.5 g/L(克/升), 是芦笋愈伤组织分化的最佳培养基。张磊(1990)^[3]则认为添加 BA1.0 mg/L(毫克/升)可促使愈伤组织分化发芽。在芦笋嫩尖组织培养根的诱导试验中, 芦笋试管苗生根比较困难, 根的分化主导因子是植物激素

和植株本身基因型。我们经过反复实验, 结果表明: 经过继代培养的芦笋幼苗茎段在 1/2 MS+BA0.02+NAA 0.1 的培养基中, 培养 40 d(天), 生根率可达 71.4%。另外, 我们在芦笋多倍体诱导试验中发现, 添加秋水仙碱的培养基中, 芦笋试管苗生根率普遍高, 当然这还有待于进一步的试验证实。

4 结论

由于芦笋嫩尖微体快繁在接近理想的条件下生长分化, 已不受季节限制, 有人为提供的外源植物激素的促进, 增殖的速度很快, 加之配套有效的育苗移栽技术, 完全可以使芦笋的年出苗率达到一个理想的水平, 以满足生产所需。因此, 这次试验的成功, 对新选育的芦笋品系快速繁殖推广及生产中保持优良种性具有重要意义。

参考文献:

- [1] 汤章城主编. 现代植物生理学试验指南[M]. 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编著. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 张磊. 石刁柏花药培养研究及其进展[J]. 北方园艺, 1996(6): 44~46.
- [3] 张磊, 刘贵仁等. 石刁柏花药培养与染色体倍性变化的探讨[J]. 中国蔬菜, 1990(4): 4~6.

哈密瓜花药胚的诱导

马刘峰, 辛建华, 付振清

(新疆石河子大学园艺系, 石河子 832000)

1 植物名称

哈密瓜(Cucumis melo)品种“新蜜杂9号(黄醉仙)”。

2 材料类别

哈密瓜单核靠边期的花药。

3 培养条件

花药愈伤组织诱导培养基: (1)MS+KT1.5 mg/L(毫克/升)(单位下同)+NAA0.5+6-BA0.5+4%蔗糖。培养温度 30℃, 光照 14 h/d(小时/天), 光照强度 3 000 Lx(勒克斯)。花药胚分化和形成培养基: (2)MS+2, 4-D1.0+6. BA0.5+3%蔗糖, (3)MS+2, 4-D0.3+6. BA0.5+3%蔗糖, 培养温度 28℃, 自然光照。以上培养基均含琼脂 0.6%, pH5.8。

4 生长和分化情况

4.1 愈伤组织的诱导与增殖 取纵径长 3.5 cm(厘米)左右的单核靠边期的幼小花蕾, 在 2℃~4℃下预处理 48 h(小时)后, 浸入 75%酒精消毒 0.5 min(分钟), 再用 0.1%HgCl₂ 灭菌 8 min(分钟), 并用无菌水冲洗 3 次。在无菌培养皿中取

出淡绿色幼嫩花药接种在(1)MS+KT1.5+NAA0.5+6-BA0.5+4%蔗糖培养基上, 并用镊子夹碎, 将花粉挤出。每 50 mL(毫升)三角瓶接 10 枚。10 d(天)后花药表面出现大量白色颗粒, 生长迅速, 25 d(天)左右产生大量颗粒团状愈伤组织, 增殖 3~5 倍, 晶白色并带有绿点。30 d(天)后继代一次, 但是继代后增殖不明显。继代 3 次以上愈伤组织开始大量褐化老化。将愈伤组织转移至花药胚诱导培养基中的最佳时间一般是愈伤组织生长 20 d(天)以后。

4.2 花药胚的诱导 将生长 25 d(天)的健壮愈伤组织转入(2)MS+2, 4-D1.0+6-BA0.5+3%蔗糖的诱导培养基进行诱导。13 d(天)后愈伤组织表面开始出现少量直径 1 mm(毫米)的淡黄色胚性颗粒, 进行石蜡切片观察, 显示为多细胞胚和球形胚。一个月左右大量出现淡黄色胚颗粒。但是如果将诱导培养基中的 2, 4-D 浓度降低至 0.3 mg/L(毫克/升)时, 即接入(3)培养基时, 则接入的愈伤组织没有观察到胚性颗粒。另外, 如果将这种淡黄色胚性颗粒在光照 12 h/d(小时/天), 光照强度 2 000 Lx(勒克斯)的条件下培养, 其颜色会有少量绿色出现。但是胚性颗粒会继续分化, 45 d(天)后经切片观察出现子叶胚。

5 意义与进展

哈密瓜是病害最严重的瓜类作物之一, 通过花药胚进行遗传育种, 不但能快速得到单倍体, 从而加速选育进程, 而且较非胚性的诱导途径而言, 进一步简化了花药培养过程, 缩短了培养时间, 因此对单倍体育种有一定的参考价值。