

耐盐芦笋的组培快繁技术研究

徐化凌¹, 陈纪香²

(1. 东营市农业科学研究所 山东 东营 257091; 2. 东营市林业局 山东 东营 257091)

摘要: 东营市农业科学研究所立足于黄河三角洲实情,以新萌发的芦笋嫩茎为试材,研究不同激素组合对诱导芦笋茎段愈伤组织的影响、对细胞胚的影响试验及对细胞胚的优化诱导试验,培育出2个耐盐能力强、产量高、品质优,适合广大盐碱地区种植的耐盐芦笋系号,开发前景极好。

关键词: 芦笋;组织培养;快速繁殖;盐碱地
中图分类号: S 644.603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0092-03

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)又名石刁柏,是百合科天门冬属植物,其嫩茎是人们喜食的蔬菜,营养价值高,并具防癌、抗癌作用,国际市场畅销不衰,是高效创汇作物。东营市农业科学研究所立足于黄河三角洲实际,培育出2个耐盐能力强、产量高、品质优,适合广大盐碱地区种植的系号,开发前景极好。为了加速其推广繁殖,为进一步深化育种进行技术储备,对耐盐芦笋的组培快繁技术进行了研究,试验取得了成功。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3~5月份取新萌发的耐盐芦笋嫩茎。

1.2 外植体处理

嫩茎剪回后,先用自来水冲洗2~3遍,再取1~1.5 cm长的茎尖,4 min之后,用无菌水漂洗4~5次,最后用无菌滤纸吸干水分。

在超净工作台上用75%的酒精浸20 s,再于0.1%的HgCl₂溶液中消毒,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。

2 脱分化试验

2.1 培养条件

温度(27±2)℃,光照强度1 800 lx,光照时间每天12 h,MS培养基+蔗糖(30 g/L)+活性炭(0.5 g/L)+激素,培养基的灭菌:121℃,0.1~0.14 kPa下17 min高压灭菌。

2.2 试验设计

如表1,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后,茎段均能轻度膨大,15 d后除L1外均能产生少量愈伤组织,25 d后,除L1外均能产生较多愈伤组织,但L7、L8的愈伤组织有轻度的水渍状,也略显松散,L3、L4形成的愈伤组织质量较好。

表1 不同激素组合对诱导芦笋茎段愈伤组织的影响

试验号	NAA /mg·L ⁻¹	2 4-D /mg·L ⁻¹	BA /mg·L ⁻¹	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

3 体细胞胚的诱导及增殖

3.1 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2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,活性炭0.5 g/L,取细胞分裂素BA浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L,生长素NAA浓度为0.0、0.4、0.8、1.2 mg/L,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。

愈伤组织接种10 d后,开始出现浅绿色瘤状突起,20 d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2可以看出,分化率和丛生芽数较高的试验分别为10号和14号,由于分化率还不够理想,又围绕10号和14号对激素浓度进行了调整(见表3)。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, NAA:0.2 mg/L,因此可以认定MS+BA 1.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L+糖30 g/L+琼脂5.8 g/L+活性炭0.5 g/L,是芦笋最佳分

第一作者简介:徐化凌(1976-),男,硕士,讲师,主要从事耐盐及盐生植物研究工作。E-mail: yszw2007@sina.com。
基金项目: 国家“863”计划资助项目(2007AA091701)。
收稿日期: 2008-09-23

化培养基。

表 2		不同激素组合对芦笋体细胞胚的诱导试验															
试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
BA/ mg · L ⁻¹	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0	
NAA/ mg · L ⁻¹	0.0	0.4	0.8	1.2	0.0	0.4	0.8	1.2	0.0	0.4	0.8	1.2	0.0	0.4	0.8	1.2	
分化率/ %	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	16.7	6.7	0.0	33.3	80.0	33.3	3.3	50.0	73.0	66.7	16.7	
平均丛生芽数	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.6	1.0	0.0	2.9	5.0	2.6	2.0	3.3	5.5	4.1	1.6	

表 3		芦笋体细胞胚的诱导优化试验															
试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
BA/ mg · L ⁻¹	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8	2.2	2.2	2.2	2.2	
NAA/ mg · L ⁻¹	0.1	0.2	0.3	0.5	0.1	0.2	0.3	0.5	0.1	0.2	0.3	0.5	0.1	0.2	0.3	0.5	
分化率/ %	46.7	56.7	56.7	30.0	66.7	73.3	63.3	53.3	80.0	90.0	76.7	66.7	63.3	73.3	70.0	73.3	
平均丛生芽数	2.1	2.4	1.8	1.7	3.6	4.0	3.5	3.1	4.3	6.8	4.6	3.3	3.4	3.6	3.7	3.7	

3.2 继代培养

由于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 6.0 cm, 需要进行继代培养, 继代培养时将芦笋茎剪成 1~2 cm 长的茎段, 水平放置到培养基的表面, 最初的继代培养以 MS+BA 1.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L+糖 30 g/L+琼脂 5.8 g/L+活性炭 0.5 g/L, 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, 光照时间每天 12 h, 40 d 左右便可以继代一次, 每次继代增殖倍数达 6.8 倍。因此从理论上讲, 由一个芦笋茎段开始培养, 培养周期为 40 d, 年增殖次数为 9 次, 每周增殖倍数为 6.8 那么 1 a 后可获得芦笋茎段 3.1×10⁷ 个, 这个繁殖速度大大超过了芦笋的有性繁殖速度。

实践中发现, 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, 降低激素浓度等方法, 可使玻璃化程度缓解, 特别是把 BA 浓度降为 1.6 mg/L, NAA 浓度降为 0.1 mg/L 时, 既能缓解玻璃化程度, 又能保证增殖倍数, 课题组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 a, 重新构建一次再生体系, 以保证芦笋组培苗的健康增殖。

4 生根培养

4.1 根的诱导

将继代培养成的小苗, 剪切成 2~3 cm 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, 通过试验选出较优的生根培养基(见表 4)。

结果表明, 经过继代培养的芦笋幼苗茎段在 1/2MS+BA 0.02+NAA 0.1 的培养基中, 培养 40 d, 生根率可达 71.4%。另外, 在耐盐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, 这还有待于进一步的试验证实。

表 4 不同浓度激素培养基对生根的影响

试验号	BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	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	

4.2 练苗及移栽

练苗: 经过生根培养的芦笋, 当根长达到 2 cm 以上, 并有少许侧根长出时便可进行移栽, 但为了提高成活率, 在移栽前要先进行练苗, 方法是拣取根系完整, 植株健壮的芦笋组培苗, 打开培养瓶, 让芦笋苗暴露在空气中, 并置于全日照下, 在上午 9:00 至下午 16:00 用 50% 的遮荫网适当遮荫, 练苗 3~5 d 后, 将组培苗从瓶中取出, 并用大量自来水冲洗干净根部附着的培养基, 然后移植到配好的营养土中。

营养土的配置: 选用腐殖土或草炭土为基质, 按体积比 1:1 混入细砂, 移栽前用 1/800 的多菌灵溶液消毒。

管护: 试管苗移栽后, 要进行适当遮荫、保湿。另外由于试管苗的根吸收养分的能力比较弱, 因此为了提高试管苗的移栽成活率并促进其健壮生长, 在移栽后当天可结合浇水喷洒一遍 1/4 的大量元素, 以后每 10 d 喷洒一次, 当试管苗根茎部抽生出 1~2 条新茎时, 便可进行大田定植。试管苗从开瓶练苗到大田定植这一过程, 约需 30 d, 成活率可达 85% 以上。

5 结论

由于试管苗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, 微体快繁技术的成功有利于迅速增加杂交组合中纯合父母本的数量, 缩短育种周期; 对于耐盐芦笋新品系的前期快速繁殖推广也极有意义。

两种石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶酶谱分析

秦公伟^{1,2}, 曹小勇^{1,2}, 赵慧¹, 王斌¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室 陕西 汉中 723000)

摘要: 对2种石蒜用3种方法提取酶液, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱分析, 同时对提取酶液在白色点滴板上显色。结果表明: 从酶谱分析可知, 石蒜酯酶有1条谱带, 相对迁移率(R_f)为0.17; 苹果酸脱氢酶有2条谱带, R_f 值分别为0.51和0.69。忽地笑酯酶有1条谱带, R_f 值为0.17; 苹果酸脱氢酶有4条谱带, R_f 值分别为0.43, 0.47, 0.51和0.69。从显色试验可知, 3种提取方法对酶提取的充分性、活性有差异; 研磨后, 经60%超声的提取方法对酶能够充分提取, 而且能更好地保持酶的活性。

关键词: 石蒜; 酯酶; 苹果酸脱氢酶; 同工酶

中图分类号: S 682.2⁺ 9; Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0094-03

石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物既是一种药用植物, 又是优良的观赏植物^[1-3]。石蒜的鳞茎含有10多种生物碱, 具有祛风消肿、解毒抗癌等功效, 因此石蒜具有巨大的市场前景和社会效益。现今许多制药公司及园林部门大规模收购石蒜资源, 野生种质资源遗传多样性遭到一定程度破坏, 进行石蒜种质资源收集及保存工作显得日益迫切和重要^[2]。

同工酶是生物体基因结构差异的外在表现, 在进化中有一定的保守性, 其分析可以为石蒜属的分类和进化提供分子水平佐证。试验通过对石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶的谱带分析, 研究酶液提取方法, 希望为

石蒜属的分类和进化及相关研究提供一些参考和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

忽地笑(*Lycoris aurea*)和石蒜(*L. radiata*) 2种石蒜。

1.2 仪器与试剂

垂直板电泳仪 DYY-12 型、KQ5200DE 型数控超声波清洗机、冰冻离心机。

三羟甲基氨基甲烷(Tris), 聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA), N-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS), 氯化硝基四氮唑蓝(NBT), 辅酶I(NAD), 双蒸水。

1.3 方法

1.3.1 酶液提取 提取液: 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.8% TritonX-100, pH 6.8。挖取石蒜鳞茎, 洗净去外鳞片后, 3种方法提取酶液。方法1, 称取1.5g石蒜鳞茎, 加

第一作者简介: 秦公伟(1980-), 男, 陕西蒲城人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生理学及仪器分析教学科研工作。

收稿日期: 2008-10-20

Research of Quick Cultivate Technology on Salt-tolerant *Asparagus Of ficinalis*

XU Hua-ling¹, CHEN Ji-xiang²

(1. Agricultural Scientific Research Institute of Dongying City, Dongying, Shandong 257091, China; 2. Forestry Bureau of Dongying City, Dongying, Shandong 257091, China)

Abstract: Based on the Yellow River Delta reality, Dongying Agricultural Science Research Institute cultivated two *Asparagus of ficinalis* strains, with strongly Salt-tolerant ability, high output, superior quality, suits the general salt alkaloid regions to plant, extremely good prospect of the development. In order to accelerate its promotion to reproduce, and for technical reserve of further deepen breeding works, we studied the quick cultivate technology of the Salt-tolerant *Asparagus of ficinalis* and have obtained the success.

Key words: *Asparagus of ficinalis*; Tissue culture; Fast reproduction; Salt alkaloid