

芦笋花药培养的研究进展

陈海媛, 乜兰春, 张学英

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071000)

摘要:该文综述了芦笋花药培养中材料的选择、培养基的种类及其添加物质、培养方法、再生植株染色体倍性等方面的国内外研究概况和进展。以期为进一步研究提供参考。

关键词:芦笋; 花药培养; 研究进展

中图分类号:S 644.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0219-03

芦笋(*Asparagus officinalis*. Linn)学名石刁柏, 以嫩茎供食, 具有极高的营养保健价值, 有防癌、抗癌、预防和治疗高血压、心脏病的功效。是国际公认的抗癌食品, 享有“蔬菜之王”的美称。在日本、东南亚、欧美各国被视为高级营养保健蔬菜。

20 世纪 90 年代以来, 绿芦笋及其速冻产品在国际市场上长期处于供不应求的状况。发达国家消费需求逐年上升, 但由于土地和劳动力价格昂贵等因素, 栽培

面积却在减少。在这种形式下, 我国芦笋生产迅速发展。全国种植面积已超过 10 万 hm², 为世界第一大芦笋生产国。

芦笋为雌雄异株植物, 雌株产量低, 雄株产量比同期同条件生长的雌株高 20%~30% 以上^[4-6], 而且雄株生长旺盛、品质好、产量高、寿命长、抗病性强, 因此, 培育全雄品种成为国内外芦笋育种的主要方向^[5]。石刁柏的性别是由一对等位基因控制的, 雄性是 Mm, 雌性是 mm, 基因型是 MM 的雄性株被认为是超雄株。超雄株(MM)与雌株(mm)杂交, F₁ 代全是雄株(Mm), 因此培育超雄株是全雄育种关键。花药培养是获得芦笋超雄株的重要途径之一^[7]。

1972 年, Pelletie^[7] 最早开展了石刁柏花药离体培养, 并从培养的花药中得到由花粉发育来的 n=10 的单倍性细胞团。同年, 日本人 Yakuwa 从芦笋花药再生的 6 棵植株中, 发现 2 棵雌株^[7]。之后法国人 Dore^[8] 利用

第一作者简介: 陈海媛(1985-), 女, 在读硕士, 现从事蔬菜生理及分子生物学研究工作。

通讯作者: 乜兰春(1966-), 女, 博士, 教授, 现主要从事蔬菜生理生态研究工作。

基金项目: 河北农业大学科学发展计划资助项目(2007020); 唐山市科技攻关资助项目(08120204A-7)。

收稿日期: 2010-06-21

[40] Vasil I K. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. In: Lurquin PF, Klein hofs A(eds) Genetic engineering in eucaryotes [M]. Plenum, New York, 1983: 233-252.

[41] Mercuri A, De Benedetti L, Bruna S, et al. Agrobacterium-mediated transformation with rol genes of *Lilium Longiflorum* T [C].

[42] Cohen A, Lipsky A, Arazi T, et al. Gera Bombardment-mediated transformation of ornithogalum dubium for ornithogalum mosaic virus resistance [C]. ISHS Acta Horticulturae 673: IX International Symposium on Flower

Bulbs.

[43] Mori S, Adachi Y, Horimoto S, et al. Callus formation and plant regeneration in various *Lilium* species and cultivars [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2005, 41(6): 783-788.

[44] 许洁婷, 王月, 唐克轩, 等. 麝香百合花部组织离体培养与植株再生 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2008, 26(1): 13-16.

[45] 廉美兰, 朴炫春, 白基烨. 应用生物反应器扩繁“Casa Blanca”百合鳞茎 [J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 479-481.

Recent Advances in Lily Somatic Embryogenesis Occurrence

SHI Jin-fang, SUN Ming, KONG Ying, ZHANG Qi-xiang

(School of landscape Achitecture, Beijing Forestry University, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083)

Abstract: A Summary had been done in the following areas. The methods of Lily somatic embryogenesis occurrence, influence factors of induction of embryogenic callus, culture conditions and modalities, And an analysis had been made of existing problems. It can provide a theoretical basis for the future somatic embryogenesis related research.

Key words: Lily; somatic embryogenesis; embryogenic callus

花药离体培养技术,首次获得超雄株(MM)和纯合的二倍体雌株(mm),并用组织培养的方法,对超雄株与纯系的雌株进行大量繁殖,再将2个纯系种植于田间进行杂交,从而获得全部是早熟高产的雄性植株Mm。Falarigna^[9](1986)得到的“全雄系”杂种比标准品种增产60%~100%。之后,许多国家相继开展了这方面的研究和探索。我国从1981年开始对利用花药培养培育超雄株技术进行了基础研究,对花药培养的接种时期,诱导方法及培养基配比,控制体细胞干扰,染色体自发加倍变化等方面进行了研究,已获得了花药培养的单倍体入地植株^[9-10]。该文就这一领域的研究概况和进展进行了综述,以期为进一步研究提供依据和参考。

1 材料的影响

1.1 基因型

不同基因型的材料,花药诱导率不同。花药培养力的大小是受多基因控制的数量性状^[14],芦笋花药培养产生愈伤组织的能力随着基因型的差异变化很大。范双喜等^[5]以10个栽培品种的雄株花药为试材进行离体培养,只有5个品种的花药诱导出愈伤组织,其适宜的诱导培养基均不同,表现出较大的基因型差异。林宗铿等^[13]对4个品种花药形成愈伤组织的研究表明,品种间以及同一品种不同单株间花药愈伤组织诱导率不同。丁鑫^[9]在对芦笋不同品种雄株花药诱导愈伤组织的试验中发现,诱导率为0的基因型大多在培养的开始阶段,花药稍稍膨大,但随后生长停滞,花药慢慢变白;还有一部分花药在培养开始阶段转变为黄褐色,随后停止生长、干瘪。

1.2 取材时期

花药培养时,花粉在接种时所处的发育时期可能比培养基更为重要,不同物种最适接种的花粉发育时期各异^[14]。周维燕^[7]指出,选取花蕾的长度为2~2.5 mm,花蕾中花粉的发育时期为单核期,此时的花粉诱导形成愈伤组织的频率是最高的;而朴在贤^[15]对不同时期花药进行横切面的解剖观察中,发现芦笋的花蕾长度达到1.5~2 mm时,花蕾颜色深绿、花药淡黄色时,大多数小孢子处于单核靠边期,这是接种花药最好的时期。

1.3 试材的生长状况

供体植株的生长环境条件对培养效果也产生影响。采集适宜环境条件下的供体植株花药进行培养,愈伤组织的诱导率和植株再生率高。从采集季节来看,林宗铿等^[13]对芦笋不同品种研究表明,每年的4月份采集芦笋花药进行培养,愈伤组织诱导率最高,8月份次之,11月份最低。供体植株的生长状态对培养效果也有影响。由于芦笋是宿根性草本植物,寿命可达20 a之久。一般在花药离体培养中应选取2~4 a生的幼龄植株上的花药^[4,9,16]。如果在衰老期植株上选取花药,会显著降低植

株的再生频率,而且小孢子发育反应迟缓^[12]。

2 培养基及其它添加物质的影响

2.1 基本培养基

基本培养基对花药离体培养及胚状体诱导频率有着重要的影响。目前,芦笋花药培养采用的基本培养基是MS培养基。培养基中的糖分,不仅是碳源,而且还起到了维持渗透压的作用。花药培养中常用的糖有蔗糖、麦芽糖和果糖。而在芦笋花药培养中,还未见有用麦芽糖或果糖作为碳源的报道。现有的研究中芦笋的花药培养基碳源采用的是蔗糖,不同浓度的蔗糖对芦笋组织诱导影响程度不同。彭新红^[4]等报道,高浓度的蔗糖对提高胚状体的诱导效果明显。

2.2 生长调节剂

生长调节剂在花药培养中起着关键性作用。生长调节剂的种类、浓度不同,影响花药的发育类型,也影响体细胞组织的生长。花药培养中常用的激素有二类:一类是生长素类物质,包括IAA、IBA、2,4-D等;另一类是细胞分裂素类物质,包括KT、6-BA、ZT等。芦笋花药离体培养中最常使用的是NAA与6-BA。对于诱导愈伤组织培养基,Yakuwa^[17]在MS培养基中添加NAA 1.0 mg/L、6-BA 1.0 mg/L可以诱导愈伤组织;Torrey认为添加NAA 5.0 mg/L、6-BA 1.0 mg/L诱导频率最高^[10];林宗铿^[13]等发现含有NAA 2.0 mg/L、6-BA 1.0 mg/L及6%蔗糖的1/2MS培养基上,可产生愈伤组织,朴在贤^[15]用该激素配比,得到的诱导率为56.0%;张磊^[18]等试验结果为NAA 0.1~0.5 mg/L、6-BA 1.0~2.0 mg/L、2,4-D 0.5~1.0 mg/L是适宜的。对于分化培养基,林宗铿^[13]等认为,愈伤组织转瓶培养于NAA 0.5 mg/L、6-BA 1.0 mg/L及3%蔗糖的MS培养基上,能分化出无根绿芽;张磊^[18]等将愈伤组织转接到MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L时分化芽;而朴在贤^[15]研究表示分化培养基是以MS为基本培养基附加6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L,最高分化率为60%。

3 培养方法

3.1 预处理

不同的预处理方法和培养条件对花药愈伤组织的诱导也产生较大的影响。在芦笋花药预处理方面,学者们进行了大量探索。林宗铿^[13]等发现在花药接种前进行离心处理(4 000 r/min)30 min,不能提高愈伤组织诱导率。丁鑫^[5]等研究表明,芦笋花药在4℃预冷处理4 d后经1 mol/L的高糖溶液中浸泡30 min接种于培养基,黑暗培养10 d后愈伤组织诱导率最高。而肖昌华^[19]等也证实,芦笋花药进行预处理所需的低温与时间的最佳搭配方案为4℃、4 d,其诱导频率高达83.75%,比对照提高了60.33%。

3.2 培养条件

温度、光照等培养条件也影响花药培养的效率。在黑暗条件下可以诱导芦笋花药产生愈伤组织。周维燕^[7]曾指出,芦笋花药离体培养的条件是温度为 $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度为 2 000 lx,光周期为 16 h 光照条件。而林宗铿^[13]等报道,芦笋花药培养在 1 000 lx 光照强度的条件下,可以得到更高的愈伤组织诱导率。

4 花药培养的染色体倍性及其影响因素

芦笋的花药离体培养产生的愈伤组织及分化出苗的染色体倍性已经有许多研究报道。张天翔^[20]等人对白芦笋花药培养的再生植株染色体倍性进行检测发现‘Thielim’品种再生植株的染色体变异率为 11.1%,单倍体占 1.8%,双倍体占 88.9%,三倍体占 4.2%,四倍体占 5.1%。‘硕丰’品种中再生植株的染色体变异率为 9.1%,双倍体占 90.9%,三倍体占 5.9%,四倍体占 3.2%,没有发现单倍体。单倍体频率低的原因可能是因为花粉植株染色体发生自然加倍或体细胞愈伤组织的干扰。在花粉发育过程中,特别是愈伤组织阶段,染色体的稳定性较差,容易发生染色体加倍和其它染色体变异。所以有的植株虽然是由花粉发育而来,但最终检测结果却并不是单倍体。在芦笋花药培养中还存在体细胞愈伤组织的干扰,体细胞愈伤组织的形成发生在花丝断裂处的体细胞(药壁细胞、药隔细胞或残存花丝细胞)。由体细胞愈伤组织产生的再生植株也不会出现单倍体的情况。沈光华也进行了倍性鉴别,并对芦笋 5 个品种花药离体培养的植株进行倍性鉴别,统计分析表明,花药培养植株群体倍性间的变异差异极显著($P < 0.01$)。其中,单倍体占 2.1%,二倍体占 67.0%,多倍体占 23.9%,非整倍体占 6.4%^[21]。所以,控制体细胞干扰是达到控制再生植株染色体倍性的方式。

5 存在的问题及解决方法

现阶段芦笋花药离体培养过程中,诱导胚状体及愈伤组织、减少体细胞的干扰以及根的分化,都是亟待解决的重点问题。关于激素之间的交互作用对愈伤组织诱导的影响,有待于进一步研究。而减少体细胞的干扰,目前尚无有效的方法解决,最直接的途径就是进行花粉粒的培养。芦笋组培苗移栽成活率主要受根的影响,因此利用花药愈伤组织直接诱导胚状体的发生是解

决生根难的一个有效途径。

参考文献

- [1] 沈火林,赵娜,韩清霞,等. 芦笋离体快速繁殖中嫩茎增殖培养对根分化的影响[J]. 华北农学报,2006,21:46-49.
- [2] 幸胜平,肖华志,冯健雄,等. 浅论我国芦笋加工利用现状及发展趋势[J]. 江西农业学报,2008,20(12):89-92.
- [3] 黄锡志. 不同采收季节栽培绿芦笋品质性状比较研究[D]. 杭州:浙江大学,2002:5-8.
- [4] 彭新红,周劲松,汤泳萍,等. 芦笋花药培养胚状体诱导条件优化的初探[J]. 江西农业大学学报,2006,28(1):39-43.
- [5] 丁鑫,范双喜,高遐虹,等. 石刁柏花药培养愈伤组织诱导影响因素的研究[J]. 北京农学院学报,2007,22(1):19-23.
- [6] 马凤桐,郭春慧,张巧绒,等. 芦笋优良雄株无性系的组织培养[J]. 西北农业学报,1993,4(3):40.
- [7] 周维燕. 芦笋组织培养及育种中的应用[M]. 北京:高等教育出版社,1989:64-91.
- [8] Dore C. Anther culture de a way towards F1 hybrids[C]. In Eucarpia, 5th asparagus symposium, under the auspices of the Nassian minister for agri-culture, 1979:87-90.
- [9] 丁鑫. 石刁柏离体培养成苗途径及胚状体发生的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007:17.
- [10] 张磊. 石刁柏花药培养的研究及其进展[J]. 天津农学院学报,1995,2(3):39-43.
- [11] 刘独臣,方超,刘小俊,等. 茄子花药培养研究进展[J]. 长江蔬菜,2006(7):42-44.
- [12] 刘晓荣,陶承光,吕书文,等. 番茄花药培养研究进展[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):31-33.
- [13] 林宗铿,张天翔,杨俊杰,等. 白芦笋花药愈伤组织诱导及绿芽分化[J]. 中国农学通报,2007,23(9):129-133.
- [14] 张慧琴,谢鸣,孙崇波,等. 草莓花药培养研究进展[J]. 浙江农业科学,2006(2):218-221.
- [15] 朴在贤. 石刁柏花药显微结构观察及花药培养研究[D]. 延吉:延边大学,2007:28-30.
- [16] 张磊,刘贵仁,严仁玲,等. 石刁柏花药培养再生单倍体植株和染色体数变异[J]. 天津农学院学报,1995,2(2):1-5.
- [17] YaKuwa T. Studies on the breeding of all-made cultivar in Asparagus[J]. J Fac Agric hokkaido Univ,1984,61(4):426-435.
- [18] 张磊,刘贵仁,严仁玲,等. 石刁柏花药培养与染色体倍性变化的探讨[J]. 中国蔬菜,1992(2):4-6.
- [19] 昌昌华,李治平. 石刁柏花药预冷冻对诱导频率的影响[J]. 长江蔬菜,1994(4):28-29.
- [20] 张天翔,林宗铿,蔡坤秀,等. 白芦笋花药培养再生植株染色体倍性检测研究[J]. 福建热作科技,2008,33(1):10-12.
- [21] 沈光华. 石刁柏花药培养植株群体的遗传多态性[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),1996,25(4):65-69.

Research Progress on Anther Culture of *Asparagus*

CHEN Hai-yuan, NIE Lan-chun, ZHANG Xue-ying

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: To further research in this area, this paper summarizes research situation and progress of materials, media types, additives, culture conditions, chromosome ploidy of regeneration on anther culture of *Asparagus*.

Key words: *Asparagus*; anther culture; research progress