

芦笋试管苗茎段组培生根的关键技术初探

包艳存, 李保华, 牟萌, 牛晓雪, 路远, 李霞

(潍坊市农业科学院芦笋研究所 山东潍坊 261071)

摘要:为实现芦笋组培苗茎尖、茎段同步生根,提高组培快繁效率,在试管苗茎尖生根的基础上,以4个不同的芦笋组培继代增殖试管苗为试验材料,研究了茎段部位、茎段直径大小、不同激素配比对芦笋试管苗茎段生根的影响。结果表明,经过4代以上继代培养的增殖试管苗可通过茎段生根获得完整植株,移栽成活率最高可达85.3%。茎段选取部位以茎尖下1~4节的茎段为宜,对于常规的试管苗,宜选取直径1.5~2.5 mm的茎段;对于特别细的试管苗,宜选取直径1.0~2.0 mm的茎段。在生根培养基中添加适当浓度的Ancymidol能显著提高试管苗的生根率,添加质量浓度以0.10 mg·L⁻¹为宜。

关键词:芦笋;组培试管苗;茎段;生根

中图分类号:S644.6

文献标识码:A

文章编号:1673-2871(2023)08-099-06

Key techniques of stem segment rooting in tissue culture of *Asparagus officinalis* L.

BAO Yancun, LI Baohua, MU Meng, NIU Xiaoxue, LU Yuan, LI Xia

(*Asparagus Research Institute, Weifang Academy of Agricultural Sciences, Weifang 261071, Shandong, China*)

Abstract: In order to realize simultaneous rooting of shoot tip and stem segment in tissue culture of asparagus, and to improve the efficiency of tissue culture and rapid propagation, the four different subculture proliferation plantlets of asparagus were used as the experimental materials, the stem segment position, stem diameter and different hormone proportion on rooting was studied in this experiment. The results showed that asparagus subculture proliferation seedlings after four or more generations can be obtained by rooting the stem segments, the survival rate of transplanting can reach 85.3%. The stem segments with 1-4 nodes below the tip should be selected. For conventional asparagus tube seedlings, the stem segments with diameter of 1.5-2.5 mm should be selected. For asparagus tube seedlings with very thin stems, the stem segments with diameter of 1.0-2.0 mm should be selected. Adding the appropriate concentration of Ancymidol to the rooting medium, the availability rooting rate was significantly improved. The appropriate concentration is 0.10 mg·L⁻¹.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; Tissue culture plantlets; Stem segment; Rooting

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)学名石刁柏,属百合科天冬门属多年生草本宿根性植物,被誉为“蔬菜之王”“世界十大名菜”之一^[1-2]。芦笋雌雄异株,亲本繁殖比较困难,单靠无性分株法繁殖速度太慢。随着组织培养技术的不断发展和应用,加快了芦笋优良单株的扩繁速度,新品种的选育进入了新的阶段,芦笋育种因此取得了较大成就^[3-5]。但在芦笋组织培养快繁中普遍存在着生根率低、移栽不易成活的难题,制约着芦笋新品种的推广与应用^[6-8]。芦笋属遗传杂合型蔬菜,在组培快繁过程中

不同芦笋品种,甚至同一个品种的不同单株的培养基各个成分的配比浓度各不相同。Wilmar等^[9]最早通过单细胞培养对芦笋的生长发育和器官发生进行了研究,由此培养出了完整的芦笋植株。近年来,国内外学者对芦笋茎尖分生组织培养、离体腋芽培养、愈伤组织培养等做了相关研究^[10-13],但是对芦笋茎段生根培养的研究较少。笔者为了进一步提高芦笋亲本组培快繁及育种效率,对芦笋茎段组培生根的关键技术进行了研究,以期通过茎尖、茎段同步生根,从而提高亲本组培快繁效率,加快新

收稿日期:2022-12-28;修回日期:2023-04-06

基金项目:山东省重点研发计划(农业良种工程)项目(2022LZGC024);潍坊市科技发展计划(2021ZJ1128);潍坊市科技发展计划(2022ZJ1084)

作者简介:包艳存,女,高级农艺师,研究方向为芦笋育种与栽培。E-mail:bycnky@163.com

通信作者:路远,女,农艺师,研究方向为芦笋遗传育种与栽培。E-mail:lyuan2012@163.com

李霞,女,副研究员,研究方向为芦笋遗传育种与栽培。E-mail:55654687@qq.com

品种选育进程。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料来源于潍坊市农业科学院芦笋组培实验室,分别为GF(荷兰全雄,优异雄株)、CM(鲁芦笋七号,优异雌株)、FD(丰岛一号,优异雄株)、LC(荷兰全雄,自交一代超雄株)。

1.2 方法

试验于2021年在潍坊市农业科学院芦笋组培实验室进行。

1.2.1 培养基及培养条件 在无菌培养室内,生根培养基以1/2 MS为基本培养基,琼脂质量浓度 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,蔗糖质量浓度 $35\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值5.8,添加不同浓度的NAA、KT、IBA、PP₃₃₃、Ancymidol等激素,培养温度恒温 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养光线以自然光为主,辅以日光灯,光照度 3000 lx 左右,光照时间 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.2.2 不同部位茎段对生根的影响 将4份供试材料去除茎尖,切分成带1~2个腋芽的茎段,依据茎段所处的位置,分为茎尖下1~2节、茎尖下3~4节、茎中段、茎基部4个不同部位的材料,接种在课题组多年经验筛选的茎尖生根培养基($1/2\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PP}_{333}$)上,每个处理的茎段数为70个,每瓶装14个,共5瓶,3次重复,具有5条以上优质根的完整植株计为生根苗,培养28 d后统计生根率,生根率/%=生根株数/试验株数 $\times 100$ 。

1.2.3 不同茎段直径大小对生根的影响 将4份供试材料切取茎尖下1~4节部位茎段,依据茎段的直径大小(Φ)将材料分为 $1.0\text{ mm}\leq\Phi\leq 1.5\text{ mm}$ 、 $1.5\text{ mm}<\Phi\leq 2.0\text{ mm}$ 、 $2.0\text{ mm}<\Phi\leq 2.5\text{ mm}$ 、 $\Phi>2.5\text{ mm}$ 4个级别,接种在课题组多年经验筛选的茎尖生根培养基($1/2\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{PP}_{333}$)上,每个处理的茎段数为70个,每瓶装14个,共5瓶,3次重复,培养28 d后统计其生根率(统计方法同1.2.2)。

1.2.4 不同激素浓度对比对生根的影响 在现有芦笋茎尖生根培养体系的基础上,查阅相关文献资料^[14-17],将NAA(质量浓度分别为 0.05 、 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、IBA(质量浓度分别为 0.50 、 $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、KT(质量浓度分别为 0.05 、 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、PP₃₃₃(质量浓度分别为 1.00 、 1.50 、 $2.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、Ancymidol(质量浓度分

别为 0.05 、 0.10 、 $0.15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)多种不同质量浓度的激素随机配比,组配成不同的生根培养基,切取适宜的茎段,接种在生根培养基上进行生根培养。每个处理的茎段数为60个,每瓶接种12个茎段,每个处理5瓶,3次重复。培养28 d后统计其生根率(统计方法同1.2.2)。

1.2.5 茎段生根苗与茎尖生根苗过渡移栽比较试验 马秀兰等^[18]提出,芦笋试管苗的根系分为3种类型,第1种类型的根粗细适宜,是直接从基部增生出来的,与茎部维管束相通,根系吸收的水分和养分可直接提供地上部,移栽成活率高;第2种类型的根多是从愈伤组织增生出来的非正常的肥大贮藏根,与茎部的维管束脱离,输导渠道不畅通,移栽成活率很低;第3种类型的根也是从基部增生出来的,但根系较细弱,吸收能力差,移栽不易成活。将过渡培养21 d的每个品种2种试管苗各150株,在大棚内闭瓶炼苗3 d,再开瓶炼苗2 d,移栽至30%泥炭+30%土+30%椰糠+10%珍珠岩的基质中,覆盖保湿、保温,保持昼夜温差,1~7 d空气相对湿度100%,8~14 d空气相对湿度80%以上,15~21 d空气相对湿度60%以上,以后逐渐降低湿度。试验设3次重复,每个重复50株,60 d后比较2种芦笋试管苗的成活率,成活率/%=成活株数/试验株数 $\times 100$ 。

1.3 数据处理

采用Excel 2010进行数据整理,采用SPSS 20对试验数据进行Duncan法方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同部位茎段对生根的影响

将4种不同部位茎段的试管苗接种在生根培养基上,培养14 d左右(图1-A),发现茎段明显变粗、变长,原先鳞片包裹处分生出嫩茎,茎段基部也已膨大;有些茎尖下1~2节、3~4节茎段的基部开始露出白点。培养20 d左右就陆续生出白色的肉质根。培养28 d左右有些组培苗已经形成完整的植株(图1-B)。

对每个材料不同部位生根率进行统计分析(图2),发现4个材料茎尖下1~2节、3~4节与中段和基部的生根率存在明显差异,而且均呈现出茎尖下1~2节的生根率最高,3~4节次之,基部生根率最低的现象。基部生根率均低于10%,其中CM的基部生根苗符合统计条件的一共只有4株。材料CM和FD茎尖下1~2与3~4节的生根率差异不显著,材料

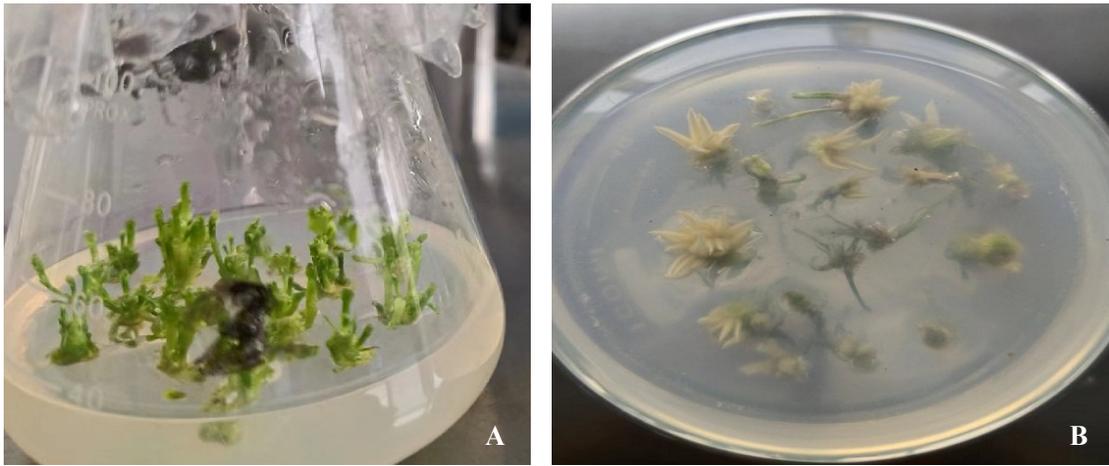
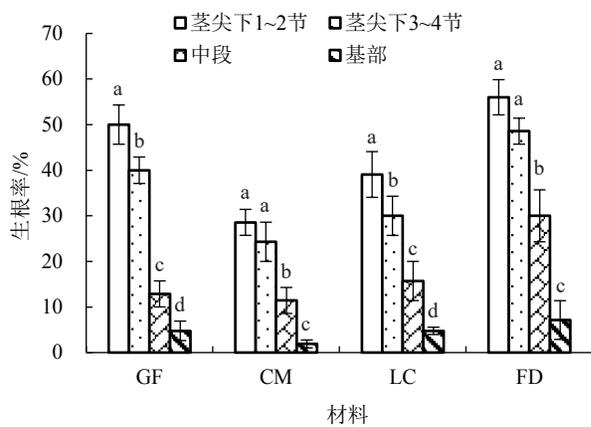


图1 茎段接种培养 14 d(A)及 28 d(B)时的生长情况

Fig. 1 Growth of stems inoculated for 14 days (A) and 28 days (B)



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

图2 不同部位茎段的生根率比较

Fig. 2 Comparison of rooting rate of stem segments of different parts

GF 和 LC 茎尖下 1~2 节的生根率显著高于茎尖下 3~4 节。为此,在后续试验中,将选择茎尖下 1~4 节茎段作为生根材料。

2.2 不同直径大小对茎段生根的影响

对每个材料不同直径大小茎段的生根率进行统计分析(图 3),不同粗细的茎段之间生根率存在差异,GF、CM 和 FD 的茎段直径为 1.5~2.5 mm 的生根率显著高于 1.0~1.5 mm 和 2.5 mm 以上的生根率。只有 LC 表现出茎段直径为 1.0~2.0 mm 时生根率显著高于 2.0 mm 以上的生根率,LC 属于株型特别细类型的特异材料。此外,当茎段直径大于 2.5 mm 时,4 份材料均出现部分生根苗的生根条数在 5 条以上,但生出的根多在膨大基部的边缘,与茎部维管束不相通,予以舍弃。

2.3 不同激素配比对生根的影响

适宜的芦笋茎段在生根培养基上培养 20 d,就

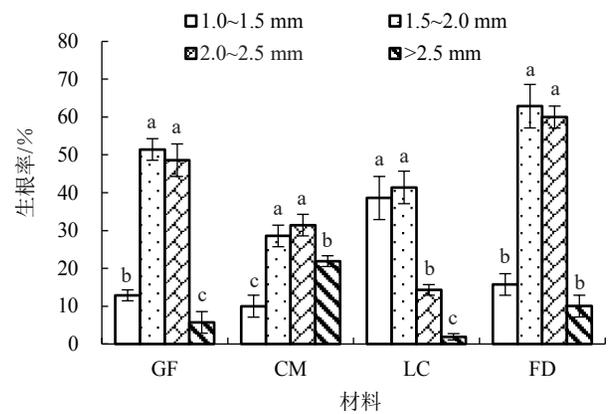


图3 不同直径大小的茎段生根率比较

Fig. 3 Comparison of rooting rate of stem segments of different diameter

开始陆续生根,28 d 调查统计,结果见表 1 和图 4。结果显示,在培养基中添加 PP₃₃₃ 能促进试管苗茎段生根,当添加质量浓度为 1.00~1.50 mg·L⁻¹ 时,生根率较高,在 31.67%~68.33%。CM、LC 和 FD 材料在 PP₃₃₃ 的质量浓度为 1.50 mg·L⁻¹ 时的生根率高于 1.00 mg·L⁻¹ 时的生根率;而 GF 在 PP₃₃₃ 的质量浓度为 1.00 mg·L⁻¹ 时生根率显著高于 1.50 mg·L⁻¹ 时生根率,当 PP₃₃₃ 添加质量浓度为 2.00 mg·L⁻¹ 时,生根率显著降低。

在生根培养基中添加 Ancymidol (0.10~0.15 mg·L⁻¹) 较添加 PP₃₃₃ (1.00~2.00 mg·L⁻¹) 的 4 份材料茎段生根率都显著提高。GF、LC 和 FD 材料在 Ancymidol 添加质量浓度为 0.10 mg·L⁻¹ 时,生根率最高,其中 FD 在 N_{0.05}I_{0.50}K_{0.10}A_{0.10} 培养基上的生根率能达到 96.11%。CM 在 Ancymidol 质量浓度为 0.15 mg·L⁻¹ 时,生根率比 0.10 mg·L⁻¹ 时略高,均值达到了 83.06%。4 份材料在 Ancymidol 添加质量

表 1 不同激素配比对 4 份材料生根率的影响

Table 1 Effect of different hormone ratio on rooting rate for four materials

不同激素配比培养基	GF	CM	LC	FD	%
I _{0.50} K _{0.05} P _{1.00}	45.00±3.33 d	31.67±1.67 d	35.56±2.55 e	51.11±2.55 f	
I _{1.00} K _{0.10} P _{1.50}	38.33±5.00 e	35.00±5.00 d	37.78±4.19 e	56.67±3.33 e	
N _{0.05} I _{0.50} K _{0.10} P _{2.00}	11.67±3.34 f	10.00±1.67 e	10.00±1.67 f	11.67±1.67 h	
N _{0.05} I _{1.00} K _{0.05} P _{2.00}	15.56±2.55 f	8.89±0.96 e	13.89±2.55 f	17.78±2.55 g	
N _{0.10} I _{0.50} K _{0.10} P _{1.50}	53.89±0.96 c	46.11±4.19 c	56.11±4.19 c	68.33±3.33 cd	
N _{0.10} I _{1.00} K _{0.05} P _{1.00}	60.56±2.55 b	41.67±1.67 c	47.22±4.19 d	65.00±5.00 d	
I _{0.50} K _{0.10} A _{0.05}	47.78±2.55 d	35.00±1.67 d	38.89±4.19 e	53.89±2.55 ef	
I _{1.00} K _{0.05} A _{0.10}	92.22±4.19 a	76.11±4.19 b	80.56±4.19 b	90.56±2.55 b	
N _{0.05} I _{1.00} K _{0.05} A _{0.15}	90.56±3.47 a	86.11±2.55 a	82.22±2.55 ab	91.11±0.96 b	
N _{0.05} I _{0.50} K _{0.10} A _{0.10}	92.78±4.19 a	77.78±2.55 b	86.67±1.67 a	96.11±0.96 a	
N _{0.10} I _{0.50} K _{0.05} A _{0.15}	91.11±3.47 a	80.00±1.67 b	82.78±2.55 ab	93.33±1.67 ab	
N _{0.10} I _{1.00} K _{0.10} A _{0.05}	65.00±3.33 b	43.89±4.19 c	52.78±2.55 c	72.22±2.55 c	

注: I_{0.50}K_{0.05}P_{1.00}表示 0.50 mg·L⁻¹ IBA+0.05 mg·L⁻¹ KT+1.00 mg·L⁻¹ PP₃₃₃。后同。

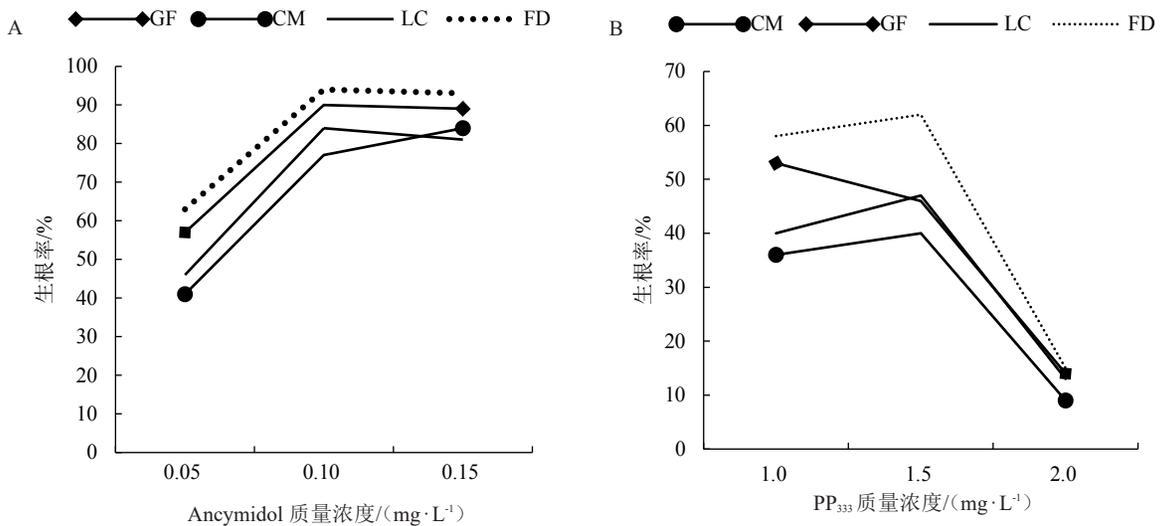


图 4 不同质量浓度的 Ancyimidol(A)和 PP₃₃₃(B)对生根率的影响

Fig. 4 Effect of Ancyimidol(A)and PP₃₃₃(B)of different mass concentrations on rooting rate

浓度为 0.10 mg·L⁻¹和 0.15 mg·L⁻¹时生根率差异不显著。综合 2 种激素的添加效果和试验成本等因素,芦笋试管苗茎段生根培养宜选择添加 0.1 mg·L⁻¹的 Ancyimidol。

2.4 茎段生根苗和茎尖生根苗移栽成活率的比较

笔者在本研究中发现,在试管苗生根和过渡培养过程中,茎段生根试管苗与茎尖生根试管苗从外形上看,存在明显差异,茎段生根试管苗的基部明显比茎尖试管苗粗大,株型矮壮,生出的根也比茎尖试管苗粗且短(图 5)。

基于此现象,做了 2 种试管苗的过渡移栽比较试验,比较 2 种试管苗的移栽成活率。结果表明(图 6),2 种试管苗移栽成活率没有显著差异,GF、

CM 和 FD 表现出茎段生根苗成活率稍低于茎尖生根苗,LC 的茎段生根苗比茎尖生根苗成活率高 7.7%。以上结果证明茎段生根这种方式具有可操作性,完全可以和茎尖生根同步进行,这样将大大提高芦笋亲本快繁率,降低工作强度。

3 讨论与结论

Ancymidol 是一种重要的生长调节物质,它能够通过抑制 GA 合成的中间反应,延缓植物生长^[19-20]。Yang 等^[10]采用芦笋继代试管苗的基部茎段作为生根材料,培养 90 d,生根率为 62%。Desjardins^[21]用 Ancymidol(0.50 mg·L⁻¹)9 周后生根率达到 90%。郭春慧等^[16]在生根培养基中添加 1.00 mg·L⁻¹



注:A、B 两图中左为茎段生根苗,右为茎尖生根苗

图5 茎段生根苗与茎尖生根苗对比(A,B 的培养时间分别为 14 d, 28 d)

Fig. 5 Comparison of rooting seedlings between stem segment and stem tip(The culture time of A and B was 14 days and 28 days, respectively)

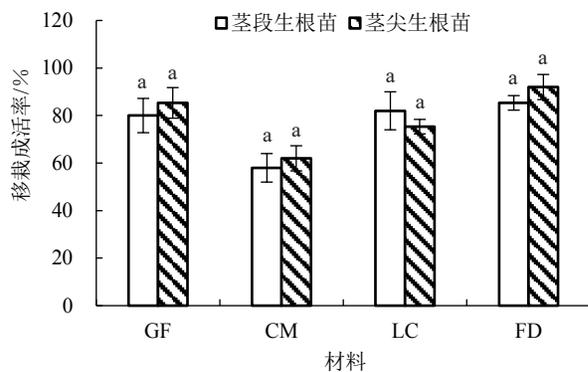


图6 2种试管苗移栽成活率比较

Fig. 6 Comparison of survival rate of transplanting for two cuvette plantlet

的 PP₃₃₃, 芦笋芽苗平均生根率达到了 90%。笔者试验的前期参照郭春慧等^[16]的方法,以 1/2 MS 添加 1.00 mg·L⁻¹ PP₃₃₃ 的培养基作为生根培养基做了不同茎段部位和茎段直径大小试验,平均生根率最高的仅为 56%。后期通过不同激素配比试验,4 份材料均表现为在生根培养基中添加 0.10~0.15 mg·L⁻¹ 的 Ancymidol 茎段生根率显著高于添加 1.0~1.5 mg·L⁻¹ 的 PP₃₃₃。当 Ancymidol 的质量浓度为 0.10 mg·L⁻¹ 时,GF、LC、FD 3 份材料的平均生根率都达到了 83% 以上,最高达 93%;当 Ancymidol 的质量浓度为 0.15 mg·L⁻¹ 时,材料 CM 的生根率也达到了 83% 以上。分析其原因,这可能与试验所用材料的基因型不同或前期的继代增殖激素配比不同等因素有关。

在不同直径大小对茎段生根率影响和 2 种试管苗移栽成活率比较试验中,材料 LC 都表现出了与其他 3 个材料不一样的特性。在直径大小对茎段生根率影响的试验中,LC 表现为直径为 1.0~

2.0 mm 时生根率显著高于 2.0 mm 以上的;在试管苗移栽成活率比较试验中,LC 表现为茎段生根成活率略高于茎尖生根成活率,这可能与 LC 材料株形有关,下一步将开展芦笋不同株型材料组培快繁比较试验,研究株型与芦笋快繁之间的关系。

虽然茎段生根试管苗较茎尖生根苗从外形上看存在显著差异,但通过移栽成活率比较试验,发现两者成活率没有显著差异,GF、CM 和 FD 茎段生根苗成活率稍低于茎尖生根苗,LC 却是茎段生根苗比茎尖生根苗成活率高 7.7%。在这 4 个材料中,GF、CM 和 FD 从株型粗细上来说,是属于常规类型,只有 LC 是属于分枝多、株型细的类型。茎段生根试管苗成活率与株型粗细有无直接关系,还有待进一步验证。

综上所述,经过 4 代以上继代培养的增殖芦笋试管苗可以通过茎段生根培养获得完整植株。取材部位、直径大小和激素浓度是影响其生根的关键因素。对于常规芦笋材料,选取直径 1.5~2.5 mm 茎段;对于一些茎条特别细的材料,选取直径 1.0~2.0 mm 茎段,取茎尖下 1~4 节茎段,接种于添加 1.00 mg·L⁻¹ Ancymidol 的生根培养基中,28 d 能生成具有 5 条以上优质根的完整植株,移栽成活率高。

参考文献

- [1] 马永刚,裴艳茹. 芦笋标准化栽培技术[M]. 河北农业, 2017 (9):21-23.
- [2] GONG Q J, YANG H Y, GUO G Z. Determination of trace elements in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [J]. Medicinal Plant, 2010, 1 (4):24-26.
- [3] 刘小琅,白小娟,妙爱玲,等. 芦笋新品种临芦 1 号离体快繁技

- 术[J]. 农业开发与装备, 2016(7):132-133.
- [4] 施建军, 张旭娟, 杨涵, 等. 芦笋优系 T2-32-6 组培快繁技术[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(12):2552-2554.
- [5] 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):21-23.
- [6] 包艳存, 李书华, 李保华, 等. 芦笋“冠军”亲本组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2016(7):98-103.
- [7] 张慧. 芦笋组织培养快繁技术[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(2):14-16.
- [8] 张贵生, 李素珍. 芦笋试管培养诱导时间和培养基成分对试管苗生根的影响[J]. 浙江农业学报, 1998, 10(3):136-139.
- [9] WILMAR C, HELLENDORF M. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro* [J]. Nature, 1968, 217:369-370.
- [10] YANG H J, CLORE W J. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture[J]. Hortscience, 1973, 8(2):141-143.
- [11] 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.
- [12] 詹立平, 张建军, 赵鑫. 芦笋组培快繁技术研究[J]. 辽宁林业科技, 2020(5):35-37.
- [13] 杨海萍, 毛自朝, 苏世强, 等. 影响芦笋离体快繁关键因子的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2016, 31(4):664-669.
- [14] DESJARDINS Y, TIESSEN H, HARNEY P M. The effect of sucrose and ancymidol on the *in vitro* rooting of nodal sections of asparagus[J]. Hortscience, 1987, 22(1):131-133.
- [15] 张园, 刘正杰, 林春, 等. 芦笋茎尖遗传转化体系的建立与优化[J]. 西北农业学报, 2020, 29(1):109-116.
- [16] 郭春慧, 马凤桐, 张巧绒, 等. PP₃₃₃诱导芦笋试管苗生根效果的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 1993, 21(3):32-36.
- [17] 柳寒, 谢婷婷, 徐君, 等. 噻啉醇对马铃薯种质试管苗保存遗传稳定性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4):398-403.
- [18] 马秀兰, 于继庆, 李芳, 等. 提高芦笋试管苗移栽成活率的途径[J]. 山东农业科学, 1993(5):26-27.
- [19] LANGE M J P, LANGE T. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development[J]. Plant Biology, 2006, 8(3):281-290.
- [20] 王鑫, 韩志刚, 张贺兰, 等. 噻啉醇对马铃薯试管苗离体保存的影响[J]. 分子植物育种, 2020, 18(17):5820-5825.
- [21] DESJARDINS Y, TIESSEN H, HARNEY P M. The effect of sucrose and ancymidol on the *in vitro* rooting of nodal sections of asparagus[J]. Hortscience, 1987, 22(1):131-133.