

天门冬组培快繁体系研究

全妙华^{1,2,3}, 欧立军^{1,2,3}, 贺安娜^{1,2,3}, 孙榕¹, 于广游¹

1. 怀化学院 生命科学系, 湖南 怀化 418008

2. 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南 怀化 418008

3. 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008

摘要: **目的** 建立天门冬组培快速繁殖体系, 保护和合理利用天门冬资源。 **方法** 采用不同基本培养基和不同种类及质量浓度的植物生长调节剂对天门冬不同外植体进行愈伤组织诱导、丛生芽诱导及生根培养研究。 **结果** 愈伤组织诱导的最适培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, pH 5.8; 丛生芽诱导的适宜培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA, pH 5.8; 生根的适宜培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L IAA, 其中培养基中铁盐的质量浓度降低到 6.95 mg/L, 蔗糖的质量浓度降低至 20 g/L, pH 值为 5.8。 **结论** 天门冬不同外植体均可诱导出愈伤组织, 其中嫩芽诱导愈伤率最高, 为天门冬最适组织培养的外植体; 利用组织培养技术能够实现天门冬快速繁殖, 为其人工扩大栽培奠定了良好基础。

关键词: 天门冬; 快繁体系; 外植体; 组织培养; 愈伤组织诱导

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1599-05

Rapid propagation system for tissue culture of *Asparagus cochinchinensis*

QUAN Miao-hua^{1,2,3}, OU Li-jun^{1,2,3}, HE An-na^{1,2,3}, SUN Rong¹, YU Guang-you¹

1. Department of Life Science, Huaihua College, Huaihua 418008, China

2. Key Laboratory of Hunan Higher Education for Hunan-Western Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua 418008, China

3. Key Laboratory of Hunan Province for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources, Huaihua 418008, China

Abstract: Objective Establishing the rapid propagation for plant tissue culture of *Asparagus cochinchinensis* in order to rationally protect and utilize the medicinal plant resources of *A. cochinchinensis*. **Methods** Different media and plant growth regulators at different concentration were used to *A. cochinchinensis* explants for callus induction, cluster buds induction, and rooting. **Results** The best medium for callus induction was 1/2 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA with pH 5.8; The optimal medium for cluster buds induction was MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA with pH 5.8; The optimal medium for rooting was 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.5 mg/L IAA with pH 5.8 (iron salt in MS medium reduced to 6.95 mg/L and sucrose decreased to 20 g/L). **Conclusion** Different explants could be induced for tissue culture and tender bud is the optimal tissue culture explants with the highest induction rate. An effective approach for rapid propagation has been provided, which could promote the artificial cultivation of *A. cochinchinensis*.

Key words: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.; rapid propagation system; explants; tissue culture; induction of callus

天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 为常用中药材品种之一, 药用历史悠久, 在《神农本草经》和《千金方》等中均有记载, 其块根有养阴润燥、清肺生津的功效, 常用于治疗肺燥干咳、咽干口渴、肠燥便秘等症^[1]和作滋补品使用^[2]。近年来由于天门冬出口量大增, 野生天门冬资源逐年减少, 货源紧缺, 价格逐年攀升。2004年至2008年每公斤价格上涨了近30元。自2001年以来, 天门冬的种植开始起步, 但由于其种植周期较长和技术不成熟,

且天门冬种子常规条件下很难萌发, 发芽率极低, 因此天门冬种源不足成为制约其种植规模扩大的重要因素之一。

1958年, Steward和Reinert建立了胡萝卜愈伤组织, 为植物组织培养技术奠定了理论基础, 目前已有600多种植物能用组织培养方法形成芽、胚状体及完整的植株^[3]。很多药用植物种子发芽率低, 依靠传统的制种、育苗方法难以满足大规模种植的需求, 组织培养技术是解决这一难题的重要手段^[4-7]。

收稿日期: 2012-02-01

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目(09K106); 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室资助项目(HHUW2011-54)

作者简介: 全妙华(1971—), 男, 湖南沅陵人, 硕士, 副教授, 主要研究方向为植物生理生化。Tel: (0745)2851055 E-mail: hhqmh@126.com

网络出版时间: 2012-06-04 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120604.1053.001.html>

采用组织培养技术育苗能否成功一方面取决于外植体的选择,另一方面则是培养基质和培养条件。MS是组织培养重要的基础培养基,但由于不同植物需要不同的培养条件,因此对不同的植物在培养过程中需要对培养基进行必要的改良。此外,植物激素种类和质量浓度是影响愈伤组织诱导和分化的关键,吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)和2,4-D是诱导愈伤组织的常用生长素,激动素(KT)和6-苄氨基嘌呤(6-BA)是植物组织培养中最常用的细胞分裂素类物质,吲哚丁酸(IBA)对胚胎愈伤组织的发生有良好作用及有利于愈伤组织的诱导和再生能力的保持^[8-10]。本实验对天门冬进行组织培养条件的探讨,为快速繁殖天门冬提供理论基础,同时为天门冬的大规模种植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

天门冬 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 采收于怀化学院,由怀化学院曾汉元教授鉴定,分别以其种子、叶片、嫩芽、嫩茎、块根作为外植体进行试验。

1.2 方法

1.2.1 消毒方法 采用常规消毒法,将采集的嫩枝和块根先用水冲洗过夜,包括种子在内的所有外植体用升汞(0.1%)和75%乙醇分别浸泡8 min和5 min,然后无菌水漂洗3~4次,最后用无菌滤纸吸干水分。将嫩枝上的幼叶、嫩芽和茎分离,分别作为外植体接种。

1.2.2 培养条件 培养基在121 ℃、131 kPa的条件下灭菌15 min。培养室温度(26±1) ℃,光照强度设置为4 000 lx,光周期为16 h光照/8 h黑暗,采用的培养环境为RXZ型人工气候箱。

1.2.3 基本培养基的筛选以及对芽生长的影响 以嫩芽外植体进行基本培养基筛选。在附加物(1.5 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA)相同的条件下,将外植体在MS、1/2 MS、1/3 MS和1/4 MS的培养基上培养30 d,重复3次,每次继代培养5次。

1.2.4 愈伤组织的诱导 外植体(块根和嫩茎)切成长1~1.5 cm小段,将种子、嫩芽、幼叶和其他切段外植体接种到附加不同质量浓度6-BA、NAA的最佳的基本培养基上,进行愈伤组织的诱导培养。培养到50 d时观察统计培养结果。重复3次,每次继代培养5代。

1.2.5 丛生芽的诱导 将继代培养45 d生长一致的

愈伤组织颗粒分散成独立的颗粒后,接种到筛选得到的最佳基本培养基上,分别附加不同质量浓度的6-BA和NAA、IAA的培养基中,进行丛生芽诱导。每种培养基接种100个愈伤组织颗粒,30 d后统计观察分化率和分化不定芽的生长状况。

1.2.6 生根的诱导 把上述继代培养的丛生状、生长旺盛及高0.5 cm以上的丛生芽接种到经筛选得到的最佳基本培养基上,附加不同质量浓度的IBA和IAA的培养基,进行生根培养。重复3次,每次接种200个不定芽。30 d后统计生根率(生根率=有生根现象数/原接种数)和生根系数(生根系数=生根条数/有生根现象数)。

1.2.7 移栽驯化 在生根培养基中10~25 d,待出现一定数量的白根、形成幼苗后,将带根幼苗的培养瓶取出进行炼苗。首先加入少量双蒸水并覆盖封口膜,以防组培苗失水,继续置培养箱中光照4 d后移出培养箱,加入少量自来水,放在室内自然光照20~28 ℃下培养2~3 d,然后去封口膜培养。待瓶内长出新鲜的嫩叶后,取出苗,洗净培养基,移栽到表面分别铺厚为6~7 cm的河沙、珍珠岩、山皮土、园土、炉灰渣(小颗粒状)5种基质中(下为肥沃园土)。移栽后前15 d保持相对湿度为95%左右、温度20~28 ℃、无直射光的条件。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的筛选

对4种培养基筛选的结果表明,1/2 MS培养基诱导愈伤率高于其他培养基,后期有短小的白根形成,说明1/2 MS培养基在加入合适的生长调节剂后适合诱导愈伤组织的形成和根的生成,是最适的愈伤诱导和生根培养基。MS培养基诱导愈伤率较高,且后期出现较多的丛生芽,为最适分化的基本培养基。盐浓度进一步降低导致诱导率降低,基本培养基浓度为1/3 MS时,会导致外植体的死亡;1/4 MS时生长极其缓慢(表1)。

表1 培养基对天门冬愈伤诱导的影响

Table 1 Effect of media on callus induction of *A. cochinchinensis*

培养基	接种体 个数	愈伤诱导 率 / %	生长状况
MS	100	43	长势较好,后期出现较多丛生芽
1/2 MS	100	51	长势好,后期有短小白根形成
1/3 MS	100	22	前期较好,后期部分死亡
1/4 MS	100	15	长势缓慢

2.2 植物生长调节剂对不同外植体愈伤诱导的影响

比较不同质量浓度植物生长调节剂对外植体诱导的影响, 生长调节剂的配比见表2。

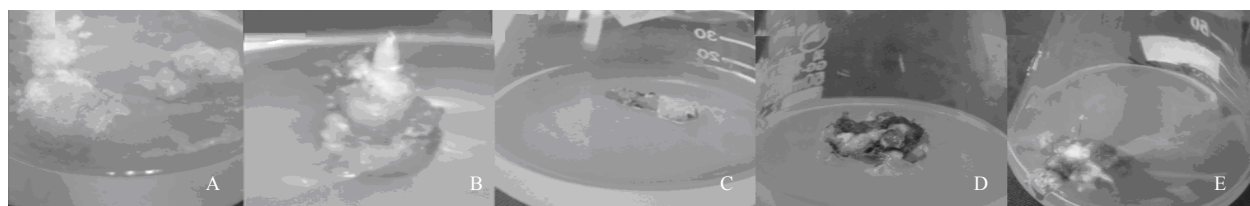
结果表明: 在 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养条件下, 外植体的愈伤诱导率最高, 愈伤颜色淡黄, 较大, 平均愈伤诱导率可达

79.2%, 且褐化率低, 生长速度快, 所以愈伤组织诱导的最适培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, pH 5.8。比较不同外植体的愈伤诱导率发现, 嫩芽的愈伤诱导率最高, 其次为嫩叶, 茎和种子的诱导率则较低, 嫩芽为天门冬最适组织培养的外植体(表2, 图1)。

表2 不同植物生长调节剂对天门冬外植体愈伤诱导的影响

Table 2 Effect of different plant growth regulators on explants callus induction of *A. cochinchinensis*

培养基	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	愈伤诱导率 / %				
			嫩叶	嫩芽	块根	茎	种子
1	0.5	0.5	55.0	63.0	17.0	29.0	40.0
2	1.0	0.5	89.5	92.8	79.2	55.3	52.0
3	1.5	0.5	49.0	53.0	28.0	25.6	38.0
4	0.5	1.0	26.7	33.0	19.0	23.0	26.0
5	1.0	1.0	54.6	76.3	53.2	43.0	40.0
6	1.5	1.0	32.0	68.0	48.0	36.0	39.0



A-嫩叶 B-嫩芽 C-茎 D-种子 E-块根
A-tender leaf B-tender bud C-stem D-seed E-root tuber

图1 不同外植体的愈伤组织

Fig. 1 Calli of different explants

2.3 植物生长调节剂对丛生芽诱导的影响

以 MS 为基本培养基, 对继代培养的愈伤组织进行丛生芽诱导。结果显示, 3、9 号培养基中, 第 28 天枝条基部边缘有少量黄绿色愈伤组织产生且有较短的不定芽长出, 但生长速度缓慢。5、11 号培养基产生丛生芽较迟, 第 25 天才开始出现较小的不定芽, 但基部愈伤组织颜色发黄, 有

褐化现象, 生长缓慢。2、8、10 号培养基的丛生芽诱导较好。4 号培养基中, 第 25 天基部边缘有大量长势好的不定芽出现, 丛生芽分化率最高。1、6、7、12 号培养基中的愈伤组织有褐化现象, 生长缓慢。通过比较不同培养基上的丛生芽诱导得出, 丛生芽诱导的最适培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA, pH 5.8 (表3)。

表3 植物生长调节剂对天门冬丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of plant growth regulators on cluster bud induction of *A. cochinchinensis*

培养基	激素水平 / (mg·L ⁻¹)			愈伤组织数 / 个	分化率 / %	死亡率 / %	愈伤组织生长发育状况
	6-BA	NAA	IAA				
1	0.5	0	0.5	50	45	43	后期易褐化死亡
2	1.0	0	0.5	50	73	11	增长分化较快
3	1.0	0	1.0	50	62	16	增长分化缓慢
4	1.5	0	0.5	50	89	8	增长分化最快
5	1.5	0	1.0	50	55	20	增长分化缓慢
6	1.5	0	1.5	50	32	46	后期易褐化死亡
7	0.5	0.5	0	50	39	50	后期易褐化死亡
8	1.0	0.5	0	50	71	11	增长分化较快
9	1.0	1.0	0	50	59	18	增长分化缓慢
10	1.5	0.5	0	50	75	11	增长分化较快
11	1.5	1.0	0	50	56	32	增长分化缓慢
12	1.5	1.5	0	50	26	61	后期易褐化死亡

2.4 组培苗生根的诱导

以 1/2 MS 为基本培养基对组培苗进行生根诱导发现, 1.0 mg/L IAA 和 0.5 mg/L IBA 时部分生根, 茎基无愈伤组织形成; 1.5 mg/L IAA 和 1.0 mg/L IBA 时, 生根系数与生根率相对较高, 且茎基生成愈伤组织; 0.5 mg/L IAA 和 0.5 mg/L IBA 时, 生根

率和生根系数均达最高, 根长, 有愈伤组织产生。因此生根培养基的最适配方为 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.5 mg/L IAA (表 4); 同时通过对天门冬组培苗生根的其他影响条件的对比研究发现, 蔗糖为 20 g/L 且培养基中铁盐的质量浓度降低至 6.95 mg/L 为最宜的生根条件 (表 5)。

表 4 生长素对天门冬生根的影响
Table 4 Effect of auxins on rooting of *A. cochinchinensis*

培养基	IAA / (mg·L ⁻¹)	IBA / (mg·L ⁻¹)	生根系数	生根率 / %	生根情况
1	1.0	0.5	3.7	33.6	茎基无愈伤组织形成
2	0	0.5	4.0	45.7	茎基生成愈伤组织
3	0.5	0.5	6.3	88.1	根长且粗壮, 茎基生成愈伤组织
4	1.5	1.0	4.9	66.5	根细长且茎基生成愈伤组织

表 5 不同质量浓度铁盐和蔗糖对天门冬生根的影响
Table 5 Effect of iron salt and sucrose at different concentration on rooting of *A. cochinchinensis*

Fe ²⁺ / (mg·L ⁻¹)	生根率 / %	蔗糖 / (g·L ⁻¹)	生根率 / %
13.90	78.2	0	12.5
9.27	83.4	10	52.3
6.95	93.0	20	88.4
5.56	47.8	30	46.2

2.5 移栽驯化

移栽后 10 d 可见成活生长, 25 d 时观察统计结果表明, 以河沙和炉灰渣为移栽基质平均成活率分别为 68%和 74%, 移栽成活后 15 d 左右开始正常生长。该方法相比传统的移栽驯化方法更为优越, 长大的苗枝干粗壮, 有利于生产的推广和后续利用。

3 讨论

在植物组织培养中起重要作用的激素主要是生长素和细胞分裂素, 初培养使用较高质量浓度的生长素, 以诱导脱分化和促进愈伤组织, 若生长素质量浓度过低, 则表现为组织块不能生长, 颜色逐渐变淡, 时间过长, 植物组织会死亡; 若生长素质量浓度过高, 则表现为愈伤组织生长旺盛, 细胞团松散, 几乎不可能分化出苗^[11]。细胞分裂素水平一般高于生长素水平, 但是过高水平的细胞分裂素倾向于诱导不定芽的形成, 也使侧芽增生加速, 结果形成过于细密的不定芽; 同时嫩芽的质量下降, 不利于下一步的生根和种植到介质中。因此, 在力求提高嫩茎质量和数量的情况下, 应减少细胞分裂素的用量^[12-13]。在本实验天门冬愈伤组织的诱导过程中,

细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 的质量浓度分别为 1.0 mg/L 和 0.5 mg/L 时, 愈伤组织生长量多且浅黄带绿, 表面突起, 松软。若细胞分裂素浓度过高, 组织块后期会出现“玻璃化”, 导致组织块不能分化生长, 最后死亡; 若细胞分裂素浓度过低, 则表现为组织块生长缓慢, 不久后会出现褐化的情况, 导致组织死亡。

根的形成可以分为两个阶段: 根原基的诱导和根分化, 在第一阶段激素诱导是不可缺少的, 在此阶段可适当使用低糖、低盐刺激根原基的形成提高生根率; 第二阶段对激素是不敏感的, 甚至持续在具有激素的培养基生长会影响根的分化及伸长, 此阶段需要提供植物生长必须的营养成分如糖、无机盐等^[14-15]。郑平等^[16]认为, 离体培养的根具有两种起源, 其一, 起源于茎基部节处, 根维管束与茎维管束连接, 具这类根的再生植株, 移栽成活率高; 其二, 起源于茎基部的切口处愈伤组织, 其根维管束与茎维管束不连接, 具此类根的再生植株, 移栽成活率低。本研究的结果表明, 高盐浓度的 MS 培养基抑制了天门冬组培苗的离体生根, 当使用 1/2 MS 培养基并降低盐质量浓度至 6.95 mg/L、蔗糖质量浓度降低至 20 g/L 时, 生根效果较好, 且生出的根较细、长、向下生长, 呈束状, 与自然根形态较接近, 有利于水分及营养物质的吸收, 这与赵洁等^[17]在石刁柏愈伤诱导分化过程中的结果是一致的。总之, 1/2 MS 培养基中铁盐的质量浓度降低至 6.95 mg/L、20 g/L 的蔗糖有利于生根率的提高。

天门冬药材主要利用野生天门冬资源, 近年来由于需求量越来越大, 野生资源日益枯竭, 必

须依靠人工栽培种植,而人工栽培品种主要靠异地引种。为了持续开发利用该植物,很有必要对其进行组织培养的研究^[18-19]。本实验中以天门冬当年萌发的新梢上的嫩叶、嫩芽、茎和种子为外植体进行组织培养都诱导出了愈伤组织,但不同外植体的诱导率不同,其中嫩芽诱导愈伤率最高,为天门冬最适组织培养的外植体。本实验成功地建立了天门冬组织培养与植株再生技术体系,这对快速繁殖天门冬优良品种和种质资源的离体保存具有重要意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 姚念环, 孔令义. 天门冬属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然药物研究与开发, 1999, 11(2): 67.
- [3] 罗士伟, 许智宏. 经济植物组织培养 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [4] 汪 洋, 韩 婷, 朱 昱, 等. 番红花组织培养及快速繁殖研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 807-809.
- [5] 张忠池, 耿明建, 杨特武, 等. 林荫银莲花组织培养研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1168-1172.
- [6] 栗孟飞, 李 唯. 桃儿七组织培养体系的建立及鬼臼毒素的检测 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1366-1370.
- [7] 洪森荣, 尹明华. 知母组织培养的初步研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1886-1889.
- [8] 梁一池, 杨 华. 植物组织培养技术的研究进展 [J]. 福建林学院学报, 2002, 22(1): 1-3.
- [9] Narayanans S L, Ibrahim S M, Ashok S, *et al.* Effect of abscisic acid in enhancing plant regenerability in rice [J]. *Rice Biotechnol Quart*, 2000, 41: 10-16.
- [10] 赵建萍, 柏新富, 蒋小满, 等. 北高丛越桔芽器官离体培养与快繁体系的建立 [J]. 林业科学, 2007, 43(5): 111-116.
- [11] 陈桂信, 谢文龙, 潘东明, 等. 木奈幼胚胚性愈伤组织诱导的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 44-49.
- [12] 韦三立, 李丽虹. 球根花卉 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [13] 刘云龙, 王本昌. 组织培养中植物生长调节剂的调控 [J]. 农业与技术, 1996(2): 23-25.
- [14] 陈穗云, 陈永哲, 任 群. 石刁柏花药培养再生植株的生根研究 [J]. 植物学报, 1998, 40(5): 425-429.
- [15] 陈福如, 郑元梅, 贺建波, 等. 石刁柏组织培养技术及其无性系建立 [J]. 福建农业科技, 1990(1): 23-25.
- [16] 郑 平, 周维燕. 石刁柏自然条件下和离体培养条件下根和芽形成的比较解剖学研究 [J]. 西北植物学报, 1994, 14(3): 174-177.
- [17] 赵 洁, 程井辰. 生长调节物质对石刁柏愈伤诱导及其根芽分化的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(4): 253-255.
- [18] 余启高, 梁 频. 天门冬的栽培与加工 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(4): 79-80.
- [19] 朱立强. 天门冬的药用价值及栽培 [J]. 特种经济动植物, 2008(12): 34.