

## 利用茎尖不定芽建立朝鲜蓟高效再生体系

王中美, 吴亚飞, 李树举, 覃磊, 刘小兵, 张平喜\*

(常德市农业科学研究所, 湖南 常德 415000)

**摘要:** 为建立稳定、高效的朝鲜蓟植株再生无性繁殖体系, 以农艺性状好、无病毒的朝鲜蓟茎尖为外植体, 研究消毒方法、培养基、植物生长调节剂对朝鲜蓟组培苗增殖及生根的影响。结果表明: 将朝鲜蓟的茎尖用 70% 乙醇消毒 10 s, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> (每 1 000 mL 该溶液加 2 滴吐温 80) 处理 8 min 的外植体消毒方式效果最好, 接种污染较小; 最适合朝鲜蓟离体培养的基本培养基为 EM 培养基, 6-BA 诱导朝鲜蓟丛芽增殖的效果比 KT 和 2-ip 好, 在 EM 中添加 1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基最适合朝鲜蓟茎尖初代培养; 在丛生芽的继代培养中, 以添加 0.5 mg/L NAA 的效果最佳, 以 GM 为基本培养基, 添加 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L β-CD 的生根效果好, 生根率达 99.3%, 且移栽后成活率达 90% 以上。

**关键词:** 朝鲜蓟; 不定芽; 再生; 生根

中图分类号: S339.4<sup>+1</sup>

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0612-05

## Establishment of efficient regeneration system on *Cynara scolymus* L. via direct adventitious buds *in vitro*

WANG Zhong-mei, WU Ya-fei, LI Shu-ju, Qin Lei, LIU Xiao-bin, ZHANG Ping-xi\*

(Changde Agricultural Science Research Institute, Changde, Hunan 415000, China)

**Abstract:** Shoot apex with excellent agronomic characters and disease-free planting materials, which were used as explants, were studied on different types of culture medium, and on the culture media treated by adding different species and concentrations of plant hormones after sterilization with different treatments for *Cynara scolymus* L.'s multiplication and rooting of tissue culture, to establish tissue culture seedling's propagation technology system. The results showed that the best method of sterilization was the second combination, that was, The *Cynara scolymus* L.'s shoot apex were sterilized by alcohol(70%) with 10 seconds firstly, then were sterilized by HgCl<sub>2</sub>(0.1%) for 8 minutes, and it showed the least pollution-induced infection. EM was the most suitable medium used in culturing *Cynara scolymus* L. *in vitro*, 6-BA was more effective than KT and 2-ip in the induction of artichoke bud proliferation. Regarding the primary culture, it recorded the best values of growth when the modified medium containing 1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA was used, while the fascicular buds grew best when the modified medium containing 0.5 mg/L 6-BA was used for the secondary culture. At the same time, by optimizing the rooting medium containing 1/2 EM, 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L β-CD, the rate of rooting reached to 99.3%. And these young shoots cultured using the methods were vigorous with dark green leaf, then the transplant survival rate was over 90%.

**Key words:** *Cynara scolymus* L.; adventitious buds; regeneration; rooting

朝鲜蓟(*Cynara scolymus* L.)又称法国百合、荷花百合、菜蓟、洋蓟、球蓟等, 是菊科菜蓟属中一种多年生莲座型草本植物<sup>[1-2]</sup>, 以未成熟的花蕾供人们食用, 剩余残渣被用作动物饲料<sup>[3]</sup>。朝鲜蓟营

养丰富, 含有多种对人体有益的成分, 具有促进消化、保护肝脏、调节脂质代谢、降血糖、抗氧化等功效<sup>[4-6]</sup>, 被誉为“蔬菜之王”<sup>[7-8]</sup>, 在国际市场上供不应求, 具有很好的发展前景<sup>[9]</sup>。朝鲜蓟的原产

收稿日期: 2012-09-22

基金项目: 常德市科技局科技特派员专项(20604)

作者简介: 王中美(1981—), 女, 湖南邵东人, 硕士, 主要从事作物组织培养研究, 253041141@qq.com; \*通信作者, 402047501@qq.com

地在地中海沿岸,是当地一种普通而重要的农作物<sup>[3]</sup>,在西班牙、法国、意大利及美国加利福尼亚栽培较多。19世纪由法国传入中国,在中国是一种新型蔬菜。湖南常德市于2005年引种朝鲜蓟,在试种成功后大面积栽种<sup>[10]</sup>,产品主要供出口,是目前该地区经济效益最好的冬季作物之一。

在中国,朝鲜蓟基本以种子繁殖。由于气候差异,朝鲜蓟在湖南、云南等主产区只开花不结果<sup>[11]</sup>,以致种子年年都需进口。这不仅成本高,而且经常因茬口接不上而延误农时。朝鲜蓟是异花授粉作物,繁殖率低,易变异,病害传播快。利用组织培养技术繁殖朝鲜蓟,不仅可以大量生产无病毒苗,而且在特定区域能快速释放选定的基因型<sup>[12]</sup>。已有关于朝鲜蓟离体植株再生和繁殖的尝试,但国内至今尚无研究成功的报道。本研究中利用朝鲜蓟易分蘖的特点,直接通过茎尖产生不定芽,对外植体消毒方式、基本培养基筛选和不定芽的初代培养、继代增殖以及生根等进行研究,旨在建立高效、稳定的朝鲜蓟离体培养无性繁殖体系,为产业化生产提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试品种为从西班牙引进的洋蓟一号。2008年10月到翌年4月,从常德市汇美食品有限公司基地采取农艺性状好、无病毒的朝鲜蓟宿根苗或分蘖芽作试验材料。

### 1.2 方法

试验在25℃和光照度50 μmol/(m<sup>2</sup>·s)的冷白色荧光灯管照射16 h的条件下进行。

#### 1.2.1 消毒方式的筛选

将从大田收集的材料用流水冲洗干净,用刀片削去茎尖周围的叶片和组织,留取3~4 cm的芽备用。设3种消毒方式。

方式一,用70%乙醇浸泡消毒10 s,再用1.05% NaClO处理20 min。

方式二,用70%乙醇浸泡消毒10 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理8 min。

方式三,用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理12 min。

以上提到的NaClO和HgCl<sub>2</sub>溶液每1 L加2滴吐温80,使用时摇匀。为避免组织褐变,将消毒后

的外植体移栽到100 mg/L抗坏血酸的培养基中培养。每处理接种30瓶,接种10 d后,统计结果。

#### 1.2.2 培养基的筛选

共设4种培养基处理:MS、EM(改良MS)、B<sub>5</sub>和White(不加任何激素,pH 5.5)。每处理接种30个茎尖,接种后观察外植体分化情况。

#### 1.2.3 细胞分裂素浓度的筛选

以EM为基本培养基,琼脂质量浓度为5 g/L,白糖质量浓度为40 g/L,pH 5.5。于基本培养基中分别添加不同浓度的NAA、6-BA、KT、ZT和2-ip,共设12个处理。NAA质量浓度为0.5 mg/L。6-BA、KT、ZT、2-ip各设1.00、2.00、3.00 mg/L 3个质量浓度。每个处理均接种30瓶,每瓶接种1个外植体。玉米素经过滤消毒(用美国Nalgene公司生产的孔径0.45 μm的分析过滤装置过滤)和高压灭菌后加入培养基,其他生长调节剂在高压灭菌前加入培养基。培养40 d后,统计丛生芽的诱导率。

#### 1.2.4 朝鲜蓟丛生芽增殖培养基的筛选

朝鲜蓟丛生芽增殖以EM为基本培养基,于EM中分别添加不同浓度的6-BA和NAA,共设10个处理。6-BA设0.50、1.00、2.00 mg/L 3个质量浓度,NAA设0、0.05、0.10 mg/L 3个质量浓度。将诱导出的丛生芽切割成带2~3片叶的芽块,剔除褐化的组织,并转入增殖培养基中,每个处理接种30瓶,每瓶接种2个丛生芽块。培养15 d后统计增殖倍数及小苗的发育情况。

#### 1.2.5 生根培养基的筛选

将1/2EM培养基添加适量肌醇和氨基酸后形成的培养基定名为GM。在GM培养基中分别添加不同浓度的NAA和β-CD,组成9个处理。每个处理NAA设0、1.00、2.00 mg/L 3个质量浓度,β-CD设0、1.00、2.00 mg/L 3个质量浓度。接入生长势好、叶色浓绿、苗高2~3 cm的试管小苗,每个处理接种30瓶。接种20 d后考查不同培养基对朝鲜蓟试管小苗生根的影响。

#### 1.2.6 试管小苗的驯化和移栽

采用常规方法对生根后的朝鲜蓟试管小苗进行驯化和移栽。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体消毒方式的筛选结果

因为环境复杂,且朝鲜蓟表面密布绒毛,所以从大田采取的材料较难消毒。由表1可知,方式二的消毒效果较好;方式一虽褐化死亡率低,但因NaClO的毒性较低,污染率高,其消毒不彻底;方

式三虽污染率较低,但未污染的茎尖逐渐褐变死亡,存活率很低,表明长时间消毒处理对幼嫩茎尖有毒害作用。HgCl<sub>2</sub>有剧毒,虽经反复冲洗,但仍难以彻底消除残留的HgCl<sub>2</sub>对茎尖的毒害。综合考虑污染率和存活率,朝鲜蓟茎尖消毒的较佳方式是方式二。

表1 不同消毒方式下外植体的接种效果

消毒方式	接种数/个	污染数/个	褐化、死亡数/个	污染率/%	褐化、死亡率/%	诱导发芽率/%
方式一	30	18	1	60.0	3.3	36.7
方式二	30	8	2	26.7	6.6	66.7
方式三	30	6	11	20.0	36.7	43.3

### 2.2 基本培养基的筛选结果

由表2可知,朝鲜蓟茎尖在MS和EM培养基上生长良好,各生长指标明显优于在B<sub>5</sub>和White上生长的植株,其中在EM上的植株更健壮,出芽更多。B<sub>5</sub>培养基因含有少量的铵,反而有利于植株生长,但叶色淡绿,植株弱小。White培养基因无机盐含量较低,茎尖生长慢,叶色蜡黄,植株瘦弱,部分植株死亡。EM培养基中磷酸盐和有机物含量大,所以,在EM上生长的植株健壮,叶色深绿。以上

结果表明朝鲜蓟是一种需肥量较大的作物,对N、P、K和有机物的需求都比较大,尤其对肌醇的需求比较大。

### 2.3 细胞分裂素浓度的优化结果

由表3、封三图1-A~H可见,4种分裂素都能诱导朝鲜蓟出芽,诱导发芽率为100%,而且4种分裂素都是浓度越高,诱导时间越短,增殖倍数就越大,但浓度过高易导致小苗簇生,植株脆、弱,且发黄,变异率高。同一浓度下,4种分裂素对朝鲜蓟的增殖效果从大到小依次为2-ip、KT、6-BA、ZT。从整体情况来看,EM+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA组合对朝鲜蓟茎尖的诱导时间虽较长,但增殖倍数尚可,最重要的是新芽正常,生长势好,叶色浓绿,有利于下一步的增殖(封三图1-A),因此,比较而言,这个组合的效果较佳。

表2 外植体在不同培养基上的接种效果

培养基	新芽数量	新芽的生长状况
MS	有	生长一般,叶色绿,植株一般
EM	多	生长快,叶色深绿,植株健壮
B <sub>5</sub>	少	生长较快,叶色淡绿,植株弱
White	无	生长慢,叶色黄有斑点,植株瘦弱,部分植株死亡

表3 不同细胞分裂素对朝鲜蓟丛生芽诱导的效果

序号	培养基	诱导时间/d	诱导发芽率/%	增殖倍数	小苗生长情况
1	EM+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	27	100	3.5	正常,叶深绿
2	EM+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	23	100	4.6	正常,叶浅绿
3	EM+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	21	100	5.8	簇生,不正常
4	EM+1 mg/L KT+0.5 mg/L NAA	22	100	4.4	簇生,不正常
5	EM+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA	18	100	5.5	簇生,不正常
6	EM+3 mg/L KT+0.5 mg/L NAA	16	100	6.0	簇生,不正常
7	EM+1 mg/L ZT+0.5 mg/L NAA	41	100	2.8	正常,叶绿
8	EM+2 mg/L ZT+0.5 mg/L NAA	33	100	3.6	正常,叶淡绿
9	EM+3 mg/L ZT+0.5 mg/L NAA	28	100	4.4	簇生,不正常
10	EM+1 mg/L 2-ip+0.5 mg/L NAA	20	100	5.6	簇生,不正常
11	EM+2 mg/L 2-ip+0.5 mg/L NAA	17	100	6.2	簇生,不正常
12	EM+3 mg/L 2-ip+0.5 mg/L NAA	15	100	7.0	簇生,不正常

### 2.4 丛生芽增殖NAA与6-BA浓度的优化结果

由表4可知,6-BA的浓度越高,增殖倍数越

大,但随着浓度的增加,小苗生长变差。当6-BA浓度相同时,随着NAA浓度的增加,增殖倍数

反而减少，小苗生长情况也逐渐变差。增殖倍数最高的组合是 EM+2 mg/L 6-BA，但此组合下生长的小苗黄、弱，植株异常。综合比较增殖倍数和小苗长势，较好的组合是 EM+0.5 mg/L 6-BA (封三图 1-a~b)。

表 4 NAA 和 BA 不同浓度组合对朝鲜蓟丛生芽的增殖效果

Table 4 Shoot multiplication response of *Cynara scolymus* on EM with various combinations of NAA and 6-BA

培养基	增殖倍数	小苗生长情况
EM	0.0	一般，绿
EM+0.5mg/L 6-BA	4.5	健壮，深绿
EM+1.0mg/L 6-BA	5.1	一般，淡绿
EM+2.0mg/L 6-BA	5.8	弱，黄
EM+0.5mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA	4.0	较好，绿
EM+1.0mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA	4.3	弱，黄
EM+2.0mg/L 6-BA+0.05mg/L NAA	4.7	脆，黄，植株异常
EM+0.5mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA	3.6	一般，淡绿
EM+1.0mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA	3.8	细弱，黄，植株异常
EM+2.0mg/L 6-BA+0.1mg/L NAA	2.7	脆，黄，植株异常

2.5 生根培养基筛选结果

由表 5、封三图 1-I ~IV 可见，培养基中不添加任何激素，朝鲜蓟几乎不生根；单独添加 NAA 或 β-CD 时，小苗有少量生根，且随着浓度的升高，生根率也升高，但单独添加 β-CD 的生根率较单独

添加 NAA 的明显提高；同时添加一定量的 NAA 和 β-CD 后，生根率较其单独添加时显著提高，当 NAA 和 β-CD 质量浓度均为 1.0 mg/L 时生根率最高，可达 99.3%。

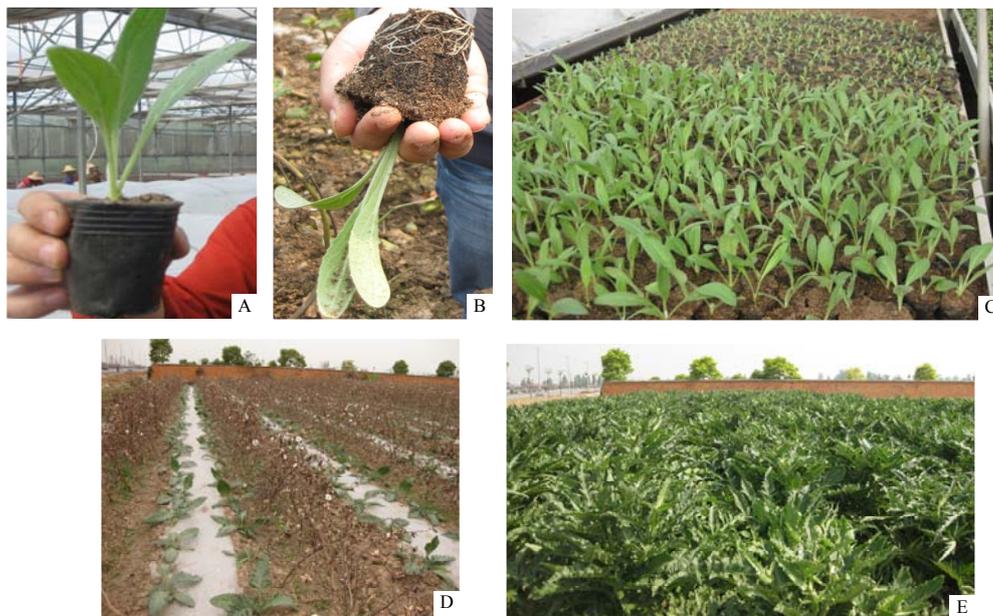
表 5 NAA 与 β-CD 不同浓度组合下朝鲜蓟的生根率

Table 5 Effect of various combinations of NAA and β-CD on rooting

NAA 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	β-CD 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	生根率/%
0	0	1.1
0	1.0	36.5
0	2.0	46.2
1.0	0.0	5.3
1.0	1.0	99.3
1.0	2.0	83.6
2.0	0.0	7.3
2.0	1.0	76.9
2.0	2.0	67.5

2.6 驯化及移栽

以接种 15~20 d、根长 0.5~1.0 cm 的幼苗进行移栽为宜。根太长反而易遭损伤，不利生长。移栽前炼苗 2~3 d，随后转移到苗床。苗床基质为质量比 1:1:1 的蛭石、珍珠岩、细沙的混合物。栽后必须通风、保湿。温度太高时揭开膜两端降温。待 7~10 d 后有效叶达 3 片以上时移栽到大田，成活率一般达 90% 以上(图 3)。



A 1 株驯化成功的朝鲜蓟组培苗；B 根系发育良好的朝鲜蓟组培苗；C 大批驯化成功的朝鲜蓟组培苗；D 移栽到棉田的朝鲜蓟组培苗；E 长势茂盛的朝鲜蓟组培苗。

图 3 驯化及移栽成活的朝鲜蓟组培苗

Fig.3 *Cynara scolymus* L.'s survival tissue culture seedlings tamed and trantsplanted

### 3 结论与讨论

无菌材料的建立是朝鲜蓟组培快繁最关键的一步,也是较难的一步。用朝鲜蓟的茎尖为外植体材料,先用70%乙醇浸泡消毒10s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理8min的接种污染较小,效果好,成功率较高。

一般来说,MS培养基适合于大多数双子叶植物,B<sub>5</sub>培养基适合于许多单子叶植物,White培养基适合于根的培养。朝鲜蓟是双子叶草本植物,前人的研究用的都是MS培养基<sup>[3,11-14]</sup>,但结果并不理想,这表明或许存在更合适的培养基。本研究中对MS培养基稍加改良的EM培养基较适合朝鲜蓟组培,培育出的小苗较其他培养基的更健壮,这可能与有机物具有的调节植物细胞抗逆、修饰生长素、参与细胞壁组成等作用有关。

芽的增殖培养速率是组培快繁中最重要的一环,增殖系数大,在生产中才有应用价值<sup>[15-16]</sup>。Lauzer等<sup>[16]</sup>在1990年发现6-BA诱导栽培种绿球离体种苗丛芽增殖的效果比KT与2-ip强,本试验结果与其一致,因此,朝鲜蓟茎尖离体增殖培养宜用6-BA。

本研究中,在丛生芽继代培养时,添加NAA可减少腋芽的增生扩繁,且以添加0.5 mg/L NAA的效果最好。文献<sup>[17]</sup>报道的结果也证实了这一点,但文献<sup>[17]</sup>中以添加1 mg/L NAA的效果最佳。另外,在继代培养接种时切除嫩茎的顶端,可解除顶端对腋芽的控制作用,有利于芽的生长,可提高增殖系数。

对于朝鲜蓟这种莲座型植物,诱导生根较其他作物更难,这在许多研究<sup>[12,18]</sup>中被多次报道。J.M. Morzadec等<sup>[11]</sup>通过GA<sub>3</sub>刺激生根,反复培养几次,生根率方能达到92.3%<sup>[12]</sup>。在生根之前,微芽转移到无激素的培养基培养一段时间后再生根,对生根很关键<sup>[18]</sup>。本研究中依托GM培养基,在添加1.0 mg/L NAA的同时添加1.0 mg/L β-CD,生根效果显著,一次性生根率能达到99.3%,且须根多,根系发达,移栽后成活率高。

#### 参考文献:

[1] Basnizki I, Goldschmidt E E. Further examination of gibberellin A<sub>3</sub> effects on flowering of globe artichokes

(*Cynara scolymus* L.) under controlled environment and field conditions[J]. *Isr J Plant Sci*, 1994, 42: 159-166.

- [2] 曹慧娟. 植物学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1981: 240-258.
- [3] El-Bahr M K, Okasha K h A, Bekheet S A. *In vitro* morphogenesis of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.)[J]. *Plant Sci*, 2000, 11: 345-351.
- [4] Adzet T. Action of an artichoke extract against CC<sub>14</sub>-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Acta Pharm Jugosl*, 1987, 37: 183-187.
- [5] Brown J E, Rice-Evans C A. Luteol in-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*[J]. *FreeRadic Res*, 1990, 29(3): 247-255.
- [6] Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells by artichoke extracts is reinforced by glucose dase pretreatment[J]. *Phytother Res* 2002, 16(4): 368-372.
- [7] 白雪, 张建丽, 何洪巨. 朝鲜蓟的营养与保健功能[J]. *中国食物与营养*, 2005(11): 47-49.
- [8] 樊伟芳, 唐忠厚, 陆国权. 高营养保健蔬菜——朝鲜蓟[J]. *中国种业*, 2006(8): 56-57.
- [9] 周红艳, 武绍启, 魏世杰. 菜蓟(朝鲜蓟)产业发展现状及展望[J]. *中国蔬菜*, 2008(2): 10-11.
- [10] 尤龙威, 夏继国. 洞庭湖区朝鲜蓟高产栽培技术[J]. *长江农业*, 2008(9): 10-11.
- [11] Morzadec J M, Hourmant A. *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA<sub>3</sub> [J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 72: 59-62.
- [12] 白明生, 何丽颖. 朝鲜蓟外植体诱导研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(26): 11230-11231.
- [13] 李明福, 赵正龙. 朝鲜蓟组培繁殖技术初探[J]. *江西农业学报*, 2007, 19(3): 66-68.
- [14] 邱运亮, 阚文靖. 翅荚木的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 1992, 28(6): 434-435.
- [15] 苏梦云. 美国枫香茎段组织培养与植株再生[J]. *林业科学研究*, 2005, 18(1): 98-101.
- [16] Lauzer D, Vieth J. Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv. 'Green Globe'[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1990, 21: 234-237.
- [17] Giovanni Lapichino. Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) from underground dormant buds ("OVOLI")[J]. *Dev Biol-Plant*, 1996, 32: 249-252.
- [18] Rossi V, De Paoli G. Micropropagation of artichoke (*Cynara scolymus*) [J]. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1992, 131: 118-134.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠