

抗茎枯病芦笋品种离体培养的研究

高建明^{1*}, 代真真^{1*}, 杨峰¹, 张世清¹, 陈河龙¹, 郑金龙², 易克贤^{1,2**}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101;

2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737)

摘要: 选用芦笋(*Asparagus officinalis*)茎枯病高抗品种格兰蒂为材料, 研究各种生长素及细胞分裂素对其茎尖诱导的愈伤组织、不定芽增殖和生根的效果。实验结果表明, 最适芦笋茎尖诱导愈伤组织的培养基为: MS + 6-BA 0.3 mg/L + 2,4-D 1.5 mg/L + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8; 最适愈伤组织增殖诱导、分化不定芽的培养基为: MS + NAA 0.3 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8; 最适生根培养基为: 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 1 mg/L PP₃₃₃ + 0.3 mg/L 6-BA + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8。

关键词: 芦笋; 茎尖; 愈伤组织; 生根; 离体培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)02-0158-06

Regeneration System Establishment of Disease-resistant *Asparagus* Variety

GAO Jian-Ming^{1*}, DAI Zhen-Zhen^{1*}, YANG Feng¹, ZHANG Shi-Qing¹,
CHEN He-Long¹, ZHENG Jin-Long², YI Ke-Xian^{1,2**}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: *Asparagus officinalis* Geland is highly resistant to stem blight and was used to study the effect of different auxins and cytokines on callus induction and multiplication of buds and rooting. Results showed that the best culture medium for callus induction was MS + 6-BA 0.3 mg/L + 2,4-D 1.5 mg/L + Sucrose 25 g/L + Agar 7 g/L, pH 5.8. The best culture medium for callus proliferation and shoot induction was MS + NAA 0.3 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + Sucrose 30 g/L + Agar 7 g/L, pH 5.8. The best culture medium for root induction was 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 1 mg/L PP₃₃₃ + 0.3 mg/L 6-BA + Sucrose 30 g/L + Agar 7 g/L, pH 5.8.

Key words: *Asparagus*; Stem tip; Callus; Rooting; *In vitro* culture

芦笋(*Asparagus officinalis*)又名石刁柏, 是多年生宿根性草本植物, 具有世界“十大名菜”、“蔬菜之王”之美名^[1]。台湾研究者和国际癌症研究机构都曾对芦笋抗多种癌症效果的报道。此外芦笋还具有增强免疫能力、抗疲劳^[2]、保肝^[3,4]、降血脂^[5,6]等功效。目前我国芦笋的出口量和种植面积都占世界第一, 并且2010年9月在山西运城召开的中国第

四届芦笋大会报告指出, 芦笋的栽培面积已经超过12万hm², 芦笋种植具有极大的发展潜力和经济效益。因此高质量的芦笋新品种培育已成为一种现时需求。

茎枯病是芦笋生产上的一种毁灭性真菌病害, 由拟茎点霉属(*Phomopsis aspasagi* (Sacc) Bubak)引起, 以气流、雨水传播为主, 在全世界广泛

收稿日期: 2012-04-12, 修回日期: 2012-11-05。

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003074)。

作者简介: 高建明(1967-), 男, 海南海口人, 博士, 副研究员, 研究方向为芦笋生物技术育种; 代真真(1988-), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向为芦笋生物技术育种。

* 同等贡献作者。

** 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: yikexian@21cn.com)。

发生。主要发病部位为茎秆和枝条,有时也发生在叶上,主要症状是茎叶枯黄直至死亡。在我国,每年的6月到8月,几乎所有的芦笋种植区都有此病害发生,造成芦笋大面积枯死。病原菌在芦笋生长季节反复侵染,在生长季结束时,病原菌可以在被感染的茎秆和土壤中越冬,并可以存活2~3年。由于芦笋是一种多年生植物,随着病原菌的逐年积累,同一地块的芦笋被反复侵染,一旦感染将很难根除^[7,8]。现多采用综合防治措施,但耗时费力、收效甚微,因此芦笋茎枯病被称为“芦笋癌症”。芦笋茎枯病严重制约着我国芦笋的产量和质量,成为我国芦笋产业发展的瓶颈。多年的抗病实践证明,开展芦笋抗茎枯病遗传育种研究是防治芦笋茎枯病的根本途径。一种较好的途径是,广泛收集种质资源,进行抗茎枯病鉴定,而后对抗病种质进行组培快繁。

近年来,国内外学者在芦笋组织培养方面进行了许多研究,并取得了很大发展,但芦笋组培苗生根难、生根率不稳定和移栽成活率低仍然是芦笋试管苗实现工厂化生产的制约因素^[9,10]。曹岩坡等^[10]以 Apollo F₁ 代的雄株为材料进行组织培养,发现 Ancym 和 NAA 是影响芦笋组织培养中试管苗生根的主要因素,其次是 KT,而 6-BA 和蔗糖的影响较弱,最高生根率达到 57.7%。马凤桐等^[11]以玛丽华盛顿及 UC157 为试材,用价廉易购的 PP₃₃₃ 诱导芦笋试管苗生根,并证明与国外应用嘧啶醇的效果相似,生根率分别是 85% 和 86.7%。于继庆等^[12]以玛丽华盛顿、西德全雄和 Uc72 为试材进行研究,发现改良的 MS + IBA 0.5 mg/L 或改良的 MS + IBA 0.5 mg/L + KT 0.05~0.1 mg/L 为适宜生根培养基,IBA 的生根效果优于 NAA。由此可见,不同的芦笋品种所需的生长调节物质及浓度都有所不同。

我们在参考前人实验结果的基础上,对可能影响组培各环节包括植物激素浓度在内的各种因素进行优化,以本实验室筛选出的抗茎枯病品种格兰蒂作为实验材料,探索建立了格兰蒂的组织培养体系,为将来进行组培快繁和研究基因功能、基因工程育种等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用芦笋 (*Asparagus officinalis*) 品种格兰蒂取自海南儋州光村基地。

1.2 方法

1.2.1 芦笋茎尖消毒及愈伤组织诱导

先用中性洗洁精浸泡芦笋茎尖 15 min,冲洗干净,细微流水洗 30 min 左右,在干净工作台上用吸水纸吸净芦笋茎尖上的水分,转移到已经紫外消毒的超净台上,用 75% 酒精浸 30 s,再用 0.1% 升汞溶液浸泡 13 min,无菌水洗 5 次,每次 1.5 min,期间用消毒镊子轻微搅拌,凉干后剥去茎尖上的腋芽,切成 1 mm 左右薄片,作为诱导愈伤的外植体。

根据前人研究结果^[13-15] 和我们的预实验结果,诱导芦笋愈伤组织是以 MS + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 7 g/L (pH 5.8)、2,4-D + 6-BA 为基础,设置 9 个培养基配方(表 1),将外植体接种在所设置的愈伤组织诱导培养基上。每个配方接 20 皿,设 3 次重复。培养温度 26℃,光照 16 h/d,光照强度 2500 lx。每隔 10 d 左右检查一次出愈情况并记录。

表 1 2,4-D 与 6-BA 共同作用对芦笋嫩茎愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of 2,4-D and 6-BA quality concentration on callus induction of asparagus stem

培养基编号 Culture medium No.	激素(mg/L) Hormone		外植体块数 No. of explants	愈伤块数 No. of calli	出愈率(%) Callus rate
	2,4-D	6-BA			
I	1.0	0.1	75	50	66.7 Ff
II	1.0	0.2	75	45	60 Fg
III	1.0	0.3	75	51	68 EFf
IV	1.5	0.1	75	68	90.7 BCc
V	1.5	0.2	75	71	90.7 BCc
VI	1.5	0.3	75	75	100 Aa
VII	2.0	0.1	75	60	80 Dd
VIII	2.0	0.2	75	57	76 DEe
IX	2.0	0.3	75	70	93.3 ABb

注：经 SAS 检验,不同组合之间不同的字母代表差异达到显著水平($p < 0.05$,小写字母)或极显著水平($p < 0.01$,大写字母)。下同。

Notes: The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$) and the different capital letters indicate extremely significant difference ($p < 0.01$) by SAS test. The same below.

1.2.2 愈伤组织的继代及不定芽诱导培养

选择结构疏松、白色雪花状且生长旺盛的芦笋愈伤,转接到广口瓶中进行继代培养,并进行诱导出芽实验。培养基以 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L (pH 5.8) 为基础,添加 2,4-D (1.0、1.5、2.0 mg/L) 和 6-BA (0.1、0.2、0.3 mg/L) (表 2)。继代和出芽都是同一培养基,并且 3 周转接一次,培养温度 28℃,光照 14 h/d,光照强度 2800 lx。出芽继代之前每隔 10 d 观察记录愈伤组织生长及出芽情况,继代 15 d 后直接进行出芽实验。

表 2 NAA 与 6-BA 共同作用对芦笋嫩茎愈伤组织诱导不定芽及增值系数的影响

Table 2 Effect of NAA and 6-BA quality concentration on <i>in vitro</i> shoot and value-added coefficient induction of asparagus					
培养基编号 Culture medium No.	激素(mg/L) Hormone		愈伤块数 No. of calli	出芽率 Budding rate	增值系数 Value-added coefficient
	NAA	6-BA			
I	0.1	0.1	60	80 Cde	5.76 Ee
II	0.1	0.3	60	78 Ce	4.95 Ff
III	0.1	0.5	60	80 Cde	6 Ee
IV	0.3	0.1	60	100 Aa	8 Bbc
V	0.3	0.3	60	92 Ab	8.24 Bb
VI	0.3	0.5	60	100 Aa	9.40 Aa
VII	0.5	0.1	60	83 Bc	8.04 Bb
VIII	0.5	0.3	60	90 Bc	7.38 CDd
IX	0.5	0.5	60	82 Bc	6 Ee

1.2.3 生根培养

我们在借鉴他人工作的基础上^[16-21],获知生根培养基需要较多的生长调节剂,不仅需要 IBA、6-BA、PP₃₃₃ 三种调节物质,还要调节基本培养基 MS 的质量浓度,在蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L、pH 5.8 的基础上,以 MS + IBA + 6-BA + PP₃₃₃ 四个因子、四个水平设置正交实验表(表 3)。当芦笋芽苗长到 5 cm 左右时,切取 3 个芽为一束,接种于不定根分化培养基上,培养温度为 28℃,光照 14 h/d,光照强度 2800 lx。每隔 20 d 左右观察记录根的发生及生长情况。

1.2.4 数据统计分析

统计分析实验数据所用软件为 Excel 和 SAS 9.0。

表 3 生根正交实验表
Table 3 Root growth orthogonal table

水平 Levels	因子 Factors			
	A	B	C	D
1	0.1	0.1	0.5	MS
2	0.5	0.2	1.0	1/2 MS
3	1.0	0.3	1.5	1/3 MS
4	1.5	0.4	2.0	1/4 MS

Note: A – PP₃₃₃ (mg/L); B – 6-BA (mg/L); C – IBA (mg/L); D – MS (mg/L). The same below.

2 结果与分析

2.1 芦笋愈伤组织的诱导

接种 10 d 左右,芦笋切片边缘处可见膨胀及少量愈伤(图 1:a),20 d 左右,芦笋切片膨胀消失,全部转变为蛋黄色愈伤(图 1:b),30 d 左右,愈伤组织增大,愈伤块疏松且可以进行继代及分化培养(图 1:c)。根据表 1 数据分析可知:VI 号培养基(2,4-D 1.5 mg/L,6-BA 0.3 mg/L)的出愈率最高达到 100%,且与其他培养基的差异均显著,即该激素配比诱导芦笋嫩茎愈伤组织的效率显著高于其他配比;2,4-D 在 1.5 mg/L 水平上的出愈率均较高,可能是因为 2,4-D 在芦笋嫩茎愈伤组织诱导中所起作用大于 6-BA。愈伤组织结构疏松,白色雪花状且生长旺盛(图 1:c)。

因此,芦笋愈伤组织诱导的最佳培养基为:MS + 6-BA 0.3 mg/L + 2,4-D 1.5 mg/L + 蔗糖 25 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8。

2.2 芦笋愈伤组织增殖与不定芽出芽诱导

愈伤在接种到继代培养基 10 d 时,愈伤块在继代过程中继续增大且颜色变绿(用已消毒镊子轻轻碰触愈伤块较先前稍硬),而后冒出白色芽点,最后芽点变绿长成芽苗(图 2:a);20 d 时芽苗全部转为绿色并且生长茂盛,平均芽苗长 2.5 cm 左右(图 2:b);继代 30 d 时芦笋芽苗变大变粗,平均芽苗长 4 cm 左右(图 2:c),此时可以进行诱导生根实验。通过表 2 数据可以看出,IV、V、VI 号培养基的增值系数显著高于其他几个培养基;当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时,出芽诱导率显著高于其他处理($p < 0.05$)。

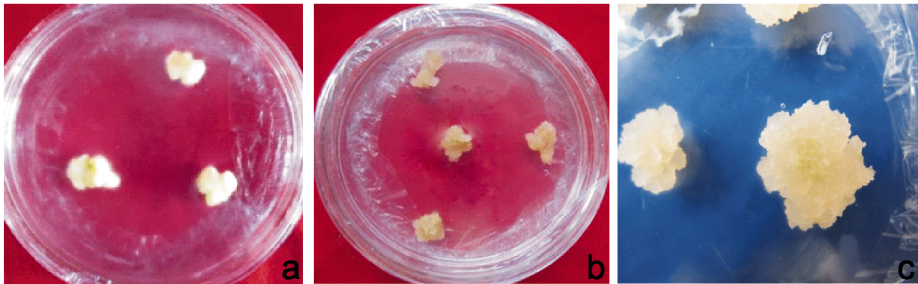
综合考察各项指标后得出,VI 号培养基的出芽率和增值系数均较高,为最佳诱导培养基,即:MS +

NAA 0.3 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8。

2.3 芦笋生根培养

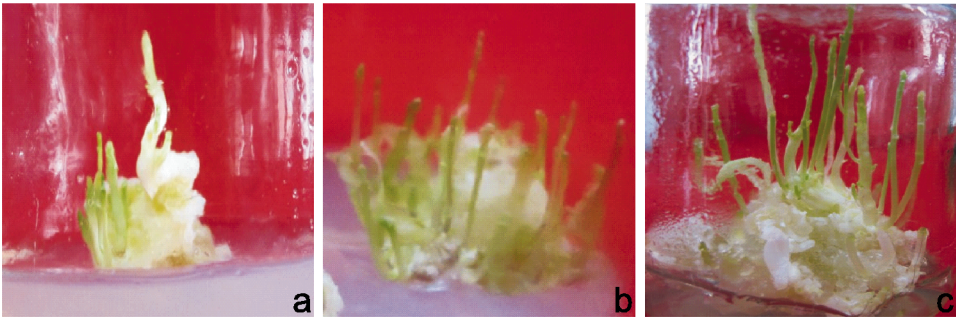
生根培养 1 周时,愈伤的芽上出现根尖状白色小点,15 d 时出现许多 1 cm 长的白色须状根,30 d 时根系已长到约 5 cm,并且都是粗细适中的

正常根(图 3),可以进行炼苗培养。从表 4 可知, XI、XII 号培养基的诱导生根率最高,均达到了 94%。若从经济角度考虑,以 XI 为佳,即最适生根培养基为: 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA + 1 mg/L PP₃₃₃ + 0.3 mg/L 6-BA + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L, pH 5.8。



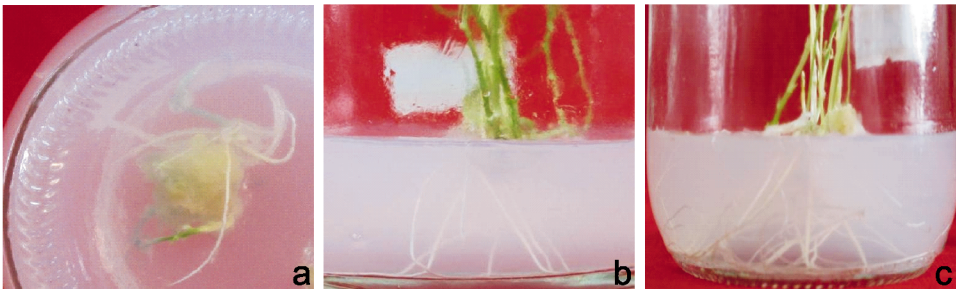
a: 10 d 时的愈伤情况; b: 20 d 时的愈伤情况; c: 30 d 时的愈伤情况。
a: Calli states in ten days; b: Calli states in twenty days; c: Calli states in thirty days.

图 1 培养不同天数愈伤组织的诱导情况
Fig. 1 Callus induction on different days



a: 10 d 时的不定芽情况; b: 20 d 时的不定芽情况; c: 30 d 时的不定芽情况。
a: *In vitro* shoots states in ten days; b: *In vitro* shoots states in twenty days; c: *In vitro* shoots states in thirty days.

图 2 培养不同天数不定芽的生长情况
Fig. 2 *In vitro* shoot induction on different days



a: 培养 15 d 时的生根情况; b: 培养 30 d 时的生根情况; c: 培养 40 d 时的生根情况。
a: *In vitro* roots states in fifteen days; b: *In vitro* roots states in thirty days; c: *In vitro* roots states in forty days.

图 3 培养不同天数生根诱导情况
Fig. 3 Root induction on different days

表 4 PP₃₃₃、6-BA、IBA 和 MS 对植株生根的影响

Table 4 Effect of PP₃₃₃, 6-BA, IBA and MS quality concentration on root growth

编号 No.	因素 Factors				接种的无根苗数 No. of rootless shoots inoculated	生根率 (%) Root induction rate
	A	B	C	D		
I	1	1	1	1	60	80 BCc
II	1	2	2	2	60	80 BCc
III	1	3	3	3	60	76 BCde
IV	1	4	4	4	60	68 Dg
V	2	1	2	3	60	84 Bb
VI	2	2	1	4	60	84 Bb
VII	2	3	4	1	60	72 CDf
VIII	2	4	3	2	60	82 Bbc
IX	3	1	3	4	60	82 Bbc
X	3	2	4	3	60	78 BCcd
XI	3	3	1	2	60	94 Aa
XII	3	4	2	1	60	94 Aa
VIII	4	1	4	2	60	74 CDef
XV	4	2	3	1	60	80 BCc
XV	4	3	2	4	60	78 BCcd
XVI	4	4	1	3	60	84 Bb

2.4 芦笋再生植株的炼苗及移栽

生根培养至 40 d 左右时(图 4),进行炼苗培养。首先在室温条件下置放 3 d,然后在室内开瓶置放 3 d,去掉芦笋再生植株根系附着的培养基,移至微湿的泥炭土中(泥炭土里面参入少许黄沙,使其具有良好的通气性),然后用保护膜覆盖。试管苗在最初的一周是关键时期,从异养转变为自养,再生植株能否成活,这是关键时期,要加强护理。芦笋属耐旱型植物,隔一天浇水 1 次,隔天打开保护膜透气1次,从光照、湿度等方面得到良好的养护,

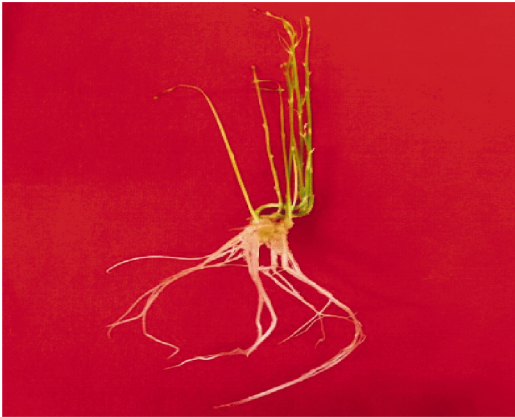


图 4 生根培养 40 d 的芦笋再生植株
Fig.4 Rooted plantlets for 40 days

待到芦笋再生植株长出新的叶片时,可去掉保护膜,浇水适中,苗长 10 cm 左右时即可移植到大田,1 个月左右即可长成健康植株(图 5)。



图 5 移栽 1 个月左右的芦笋植株
Fig.5 Plantlets transferred to soil for one month

3 讨论

关于芦笋再生体系的研究已有不少报道^[12,22,23],不同的芦笋品种所需的生长调节物质及浓度都有所不同。但是,根据芦笋茎枯病抗性鉴定结果,选用高抗品系格兰蒂进行组培的研究,至今未见报道。本实验中,我们以芦笋品种格兰蒂茎尖为材料,对组培各环节进行了优化。由于芦笋侧芽和其嫩茎紧紧挨在一起,利用茎尖进行愈伤诱导时,应尽量切净芦笋嫩茎两侧的侧芽;诱导愈伤时对各种激素浓度要进行优化,浓度过低可能诱导不出愈伤组织,浓度过高对诱导愈伤可能起抑制作用,鲁旭东等^[24]在对石刁柏愈伤组织诱导的研究中提到,2,4-D 浓度对诱导的影响,本实验在诱导芦笋愈伤组织时也发现,当 2,4-D 浓度低于 1.5 mg/L 时出愈率不高,相反高于此浓度时出愈率下降。

愈伤组织可以继代多次后,再进行不定芽诱导培养,以增加植株数量;生根培养时,尽量将三到四个芽苗(带少部分愈伤组织)接种在一起进行诱导生根,这样诱导出来的根系数目多且根系发达。

芦笋诱导生根目前仍然是一个棘手的难题^[25], Desjardins 等^[26]在关于蔗糖和嘧啶醇对芦笋试管苗影响的研究中,认为嘧啶醇具有破坏顶端优势的作用从而可以促进生根。PP₃₃₃ 与嘧啶醇有相似效

果,我们用 PP₃₃₃在促进生根的实验中取得了较好的结果,这与郭春慧等^[20]用 PP₃₃₃诱导芦笋不定芽生根研究的结果一致。因此可以认为 PP₃₃₃对诱导芦笋格兰蒂生根具有重大作用。

通过试验研究,我们建立了对芦笋毁灭性病害茎枯病具有较强抗性的格兰蒂品种的再生体系,为今后通过组培技术扩大该品种在生产上的推广运用奠定了良好基础。试验中总结出的培养基配方,也可为将来对其它芦笋品种进行组培块繁提供参考。

参考文献:

- [1] 于继庆. 芦笋栽培及加工新技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 1-9.
- [2] 李冬华, 袁瑞荣, 孙燕, 等. 中药芦笋的实验和临床研究: 芦笋抗肿瘤作用和免疫调节功能的初步试验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 1989, 4(1): 32.
- [3] 郭兵, 杨蕤. 芦笋对四氯化碳性肝损伤的保护作用[J]. 贵阳医学院学报, 1994, 19(1): 10-12.
- [4] 段巧玲, 石莹. 芦笋对四氯化碳肝损害的保护作用[J]. 蚌埠医学院学报, 1996, 21(4): 217-218.
- [5] 孙春艳, 赵伯涛, 郁志芳, 等. 芦笋的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 1-5.
- [6] 冯翠萍, 常霞, 卢耀环. 芦笋皮对实验性高脂症大鼠血脂水平的影响[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(3): 265-267.
- [7] 叶晓辉, 陈学荣, 朱亚波, 等. 芦笋主要病虫害的发生及防治[J]. 现代农业科技, 2009(7): 153.
- [8] 马利平, 郝变青, 秦曙, 乔雄梧. 芦笋茎枯病的生物防治及机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1229-1233.
- [9] 沈火林, 赵娜, 韩清霞, 戴凡炜. 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.
- [10] 曹岩坡, 代鹏, 戴素英. 芦笋试管苗生根途径优化研究[J]. 河北农业科学, 2010, 14(1): 54-55.
- [11] 马凤桐, 郭春慧, 张巧绒, 李敏侠, 朱象三. 芦笋优良雄株无性系的组织培养[J]. 西北农业学报, 1994(3): 40.
- [12] 于继庆, 马秀兰, 陈桂英, 李芳, 李少勇. 芦笋茎尖组织培养技术的研究[J]. 山东农业科学, 1991(4): 16-20.
- [13] Kei-ichiro Mishiba, Kei-ichi Tawada, Masahiro Mii. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2006(42): 83-88.
- [14] 徐华凌, 陈纪香. 耐盐芦笋的组织培养快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 92-94.
- [15] Limanton-Grevet A, Jullien M. Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* can be an *in vitro* selection process leading to habituated and 2,4-D dependent embryogenic lines [J], *Plant Physiol Biochem*, 2000, 38(7): 567-576.
- [16] Shigeta J I, Sato K, Tanaka S, et al. Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal roots from *in vitro* multiplied shoot explants using gellan gum and glucose [J]. *Plant Science*, 1996, 113(5): 99-104.
- [17] 范双喜, 解淑贞. 石刁柏组织培养中根诱导的研究[J]. 华北农学报, 1995(10): 51-54.
- [18] Pontaroli A C, Camadro E L. Plant regeneration after long term callus culture in clones of *Asparagus officinalis* L. [J]. *Biocell*, 2005, 29(3): 313-317.
- [19] 母锡金. 用茎段快速繁殖石刁柏 [J]. 植物杂志, 1986(4): 28.
- [20] 郭春慧, 马凤桐, 张巧绒, 李敏侠. PP₃₃₃诱导芦笋试管苗生根效果的研究[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(3): 36-39.
- [21] Chen Guangyu, Conner A J, Christey M C, et al. Culture and regeneration of protoplasts from shoots of asparagus cultures [J]. *Int J Plant Sci*, 1997, 158(5): 543-551.
- [22] 范双喜, 解淑贞, 谷建田. 石刁柏离体培养快速繁殖的研究[J]. 北京农学院学报, 1995, 10(1): 49-53.
- [23] 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, 44-49.
- [24] 鲁旭东, 萧浪涛, 刘素纯, 等. 2,4-D 对石刁柏愈伤组织诱导的影响 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21): 5546-5548.
- [25] 奚锡. 组织培养中不定根的分化 [J]. 植物生理生化研究进展, 1987(5): 54-64.
- [26] Desjardins Y, Tiessen H, Harney P M. The effect of sucrose and ancymidol on the *in vitro* nodal sections of asparagus [J]. *Hortscience*, 1987, 22(1): 131-133.