

大花萱草不定芽直接诱导和植株再生的研究

王艺程^{1,2},张永春¹,蔡友铭¹,杨玲^{1,2},杨柳燕¹

(¹上海市农业科学院林木果树研究所,上海 201403;²上海源怡种苗有限公司,上海 201314)

摘要:本研究旨在不通过愈伤途径,直接诱导大花萱草不定芽,并建立相应的植株再生技术体系。实验以大花萱草‘32-1’幼芽为外植体,配制不同激素和活性炭的培养基,考察各因素对大花萱草植株再生的影响。结果表明:不同激素配比对大花萱草‘32-1’初代培养、继代增殖和生根培养影响差异显著。最适初代培养基为MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L,启动率和增殖系数分别是100.00%和5.60,可直接诱导出不定芽;最适增殖培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,增殖系数为3.47;最佳生根培养基为1/2MS+NAA 1 mg/L+AC 2 g/L。

关键词:大花萱草;不定芽;初代培养;继代增殖;生根培养

中图分类号:S682.1+9

文献标志码:A

论文编号:casb17090078

Hemerocallis fulva: Direct Induction of Adventitious Bud and Plant Regeneration

Wang Yicheng^{1,2}, Zhang Yongchun¹, Cai Youming¹, Yang Ling^{1,2}, Yang Liuyan¹

(¹Forestry and Pomology Research Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201403;

²Shanghai Yuanyi Seedling Co., Ltd, Shanghai 201314)

Abstract: The purpose of this study is to induce adventitious buds directly from young shoots rather than callus, and establish the regeneration system of *Hemerocallis fulva*. The young shoots of *Hemerocallis fulva* ‘32-1’ were used as explants, the culture medium with different hormones and activated carbon was prepared. The effects of every factor on plant regeneration of *Hemerocallis fulva* were studied. The results showed that different matching of hormones had significant difference on primary culture, multiplication and rooting culture of *Hemerocallis fulva* ‘32-1’. The optimum initiation medium was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L, the initiation rate and proliferation coefficient was 100.00% and 5.60, respectively, and this medium could induce the adventitious buds directly. The optimal multiplication medium was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, and the multiplication coefficient was 3.47. The appropriate rooting medium was 1/2MS+NAA 1 mg/L+AC 2 g/L.

Keywords: *Hemerocallis fulva*; adventitious bud; primary culture; multiplication; rooting culture

0 引言

萱草(*Hemerocallis*)又称金针、忘忧草、黄花菜、宜男草、疗愁等,是百合科萱草属多年生宿根草本花卉^[1]。因其形态优美、花色繁多、生长健壮、适应广泛等优点,是庭院、花坛、以及街道绿化中重要的花卉^[2]。大花萱草

(*Hemerocallis fulva*)也称多倍体萱草、一日花^[3],是在萱草的基础上,经过处理的多倍体矮生品种^[2]。萱草的繁殖方法主要有种子育苗法、茎芽扦插繁殖法、分株繁殖法、组织培养法^[4]。播种繁殖出的实生苗更能适应较寒冷的气候^[4],但生产周期长,且后代容易发生分

基金项目:上海市科委子课题“大花萱草与玉簪资源筛选和组培快繁关键技术研究”(14391900303);上海市农委项目“垂直绿化植物繁育与规模化生产”(沪农科种字(2015)第13号);上海市花卉产业技术体系建设专项(沪农科产字(2017)第8号);上海市科委研发平台专项“上海市植物种苗组培专业技术服务平台”(15DZ2291000)。

第一作者简介:王艺程,男,1990年出生,江苏徐州人,研究实习员,本科,研究方向为花卉规模化繁育。通信地址:201403 上海市奉贤区金齐路1000号, Tel:021-52231163, E-mail:1361236284@qq.com。

通讯作者:杨柳燕,女,1981年出生,浙江台州人,副研究员,博士,研究方向为花卉育种。通信地址:201403 上海市奉贤区金齐路1000号, Tel:021-52231163, E-mail:yangliuyan61@163.com。

收稿日期:2017-09-13, **修回日期:**2017-10-28。

离、变异、退化,目前主要用于新品种选育^[5]。茎芽扦插繁殖方法操作简单,成本低,周期也较短,但各品种的生根率存在较大的差异,其整体的生根数量较少^[4]。分株繁殖法是传统最常用的方法,后代植株能保持母本性状,但1株萱草每年只能繁殖4~5株^[6],整体繁殖系数较低,不适应大规模的商业生产。而利用植物组织培养法,仅需用少量的植物材料,就可以在短时间内获取大量的、保持繁殖品种本身所具有的优良性状的种苗,是工厂化育苗的重要途径。

目前,国内外很多学者对大花萱草离体培养进行了研究,其中外植体材料选择相当丰富,有花茎^[7-9]、子房^[10]、花瓣^[11]、花托^[12]、花丝^[13]、花蕾^[14-16]、叶片^[17-19]、原生质体^[20]等,一般通过诱导愈伤组织的途径再生完整植株,建立其再生体系。但愈伤组织途径获得的植株,随着继代次数增加,染色体数目、DNA含量、DNA多态性片段比例会出现不同程度的变异,在白桦^[21]、柑橘^[22]、小麦^[23]等植物上都有报道。因此,直接利用外植体诱导不定芽,并建立一套稳定的植株再生体系,是大花萱草品种保持优良种性,并进行工厂化生产的有效途径。而利用大花萱草组织直接诱导不定芽的相关报道极少,活性炭对大花萱草生根的影响研究也还未见报道。本试验主要研究了激素对大花萱草幼芽诱导不定芽、不定芽增殖的影响,以及萘乙酸(NAA)和活性炭对大花萱草生根的影响。

1 材料与方

1.1 材料

本试验于2017年2月初—5月底在上海市植物种苗组培专业技术服务平台实验室进行。供试材料为上海市农业科学院种质资源圃提供的大花萱草大田苗,代号为‘32-1’。

1.2 方法

1.2.1 大花萱草离体诱导不定芽

(1)外植体的处理。于2017年的2月份取萱草尚未展叶的幼芽,大小在1~2 cm左右,洗净泥土,切去所有的根系,剥除最外层2~3层叶片,用洗洁精清洗浸泡20 min左右,流水下冲洗2~3 h。经上述处理后,将外植体放进超净工作台,待用。

在超净工作台上,先用75%的酒精对外植体处理30 s,无菌水冲洗3遍,无菌滤纸擦干;再用0.1%的升汞溶液灭菌10~12 min,无菌水浸洗5次,每次1~2 min;然后用无菌滤纸吸干外植体表面的水分,切去基部最外层组织,根据外植体大小将其等分成2~4小块,待用。

(2)大花萱草不定芽诱导。根据预实验的结果,以

MS+蔗糖30 g/L+琼脂4 g/L为基本培养基,添加不同浓度的6-BA(1.0,3.0,5.0 mg/L)和NAA(1.0,2.0,3.0 mg/L),组成9种不同激素浓度配比的培养基(见表1)。将经1.2.1处理后的外植体垂直接种于9种培养基中,每处理接种15个外植体,重复3次。

表1 大花萱草不定芽诱导培养基

BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)		
	1.0	2.0	3.0
1.0	Y ₁	Y ₂	Y ₃
3.0	Y ₄	Y ₅	Y ₆
5.0	Y ₇	Y ₈	Y ₉

培养条件:pH 5.8,温度为(25±2)℃,光照强度为1500~2500 lx,光照时间为12 h/d。

培养35天后,调查试管苗启动个数、外植体个数、产生愈伤外植体个数等,计算启动率、增殖系数等。计算方法如公式(1)~(4)。

$$\text{启动率} = \left(\frac{\text{启动外植体个数}}{\text{接种外植体个数}} \right) \times 100\% \dots\dots (1)$$

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{试管苗个数}}{\text{启动外植体个数}} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{平均愈伤面积} = \frac{\sum \text{各愈伤面积}}{\text{发生愈伤外植体数}} \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{平均根数} = \frac{\sum \text{各苗根数}}{\text{生根苗个数}} \dots\dots\dots (4)$$

1.2.2 大花萱草增殖培养 供试材料为初代诱导产生的无菌试管苗。

选取分化良好、生长基本一致并且株高在2 cm左右的无菌试管苗。将供试外植体单株分开,切去多余的基部组织以及愈伤组织,然后垂直接种于MS+6-BA(1.0、2.0、4.0 mg/L)+NAA(0.5、1.0、2.0 mg/L)+蔗糖30 g/L+琼脂4 g/L的9种增殖培养基(见表2)。每处理接种40个外植体,共接种90瓶,重复3次。培养条件为:温度(25±2)℃,12 h/d光照培养,1500~2500 lx光照强度,pH 5.8。

表2 大花萱草增殖培养基激素配比

BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)		
	0.5	1.0	2.0
1.0	G1	G2	G3
2.0	G4	G5	G6
4.0	G7	G8	G9

培养21天后,调查试管苗个数及愈伤生长情况,计算增殖率(2)、平均株高和平均愈伤面积。计算方法

如公式(5)~(6)。

$$\text{平均株高} = \frac{\sum \text{各苗高}}{\text{试管苗总数}} \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{平均愈伤面积} = \frac{\sum \text{各愈伤面积}}{\text{发生愈伤外植体数}} \dots\dots\dots (6)$$

1.2.3 大花萱草生根培养 选取分化良好、大小均匀(株高≥3 cm)的无菌试管苗,将外植体分成单株,切去多余的底盘和所有的不定芽及愈伤组织,然后垂直接种于1/2MS+NAA(0.2、0.5、1.0 mg/L)+AC(0、1.0、2.0 g/L)+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L的9种生根培养基(见表3)。每处理每瓶接种4个外植体,转接10瓶,重复3次。培养条件为(25±2)℃,12 h/d光照培养,1500~2500 lx光照强度,pH 5.8。

表3 大花萱草生根培养基

NAA/(mg/L)	AC/(g/L)		
	0	1.0	2.0
0.2	S1	S2	S3
0.5	S4	S5	S6
1.0	S7	S8	S9

21天后,调查统计生根试管苗个数、生根条数,测量根长;计算生根率、平均根数、平均根长等。计算方法如下公式(7)~(9)。

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根苗个数}}{\text{接种个数}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

$$\text{平均根数} = \frac{\sum \text{各苗根数}}{\text{生根苗个数}} \dots\dots\dots (8)$$

$$\text{平均根长} = \frac{\sum \text{各根长}}{\sum \text{各苗根数}} \dots\dots\dots (9)$$

2 结果与分析

2.1 不同浓度6-BA和NAA培养基不定芽诱导情况

选取‘32-1’大花萱草的幼芽作为外植体分别接种到9种培养基上。外植体在5天左右开始启动,部分外植体伸长生长(见图1-A)。2周左右,部分外植体的基部开始膨大,再经过1周左右的时间,其中一部分外植体基部周边长出嫩黄色的小芽(见图1-B);一部分外植体基部周围出现乳白色块状物,随时间推移,白色块状物颜色也逐渐转为黄绿色形成致密的愈伤组织(见图1-C)。

35天后,统计相关数据。由表4可以看出,BA和NAA浓度的不同配比对外植体的启动无显著性影响。在BA相同的条件下,Y₁-Y₃都没有产生愈伤组织,增殖系数随着NAA的浓度的增加明显呈下降趋势,3个激素配比都产生根系,平均根数显著高于其他处理,其中Y₂、Y₃出现扁平的畸形根,畸形根所占比例比较高。Y₄~Y₆中,Y₄长出大量愈伤组织,增殖系数最低,生根量很少;Y₅的增殖系数最大,达到5.60,有少量愈伤产生,且有根系生长;Y₆激素配比不产生愈伤,但生长出畸形根。Y₇~Y₉增殖系数都偏低,愈伤发生率高,且愈伤面积远大于其他处理组,未见根系生长。在NAA浓度相同时,随着BA浓度的增加愈伤生长量显著增加。综合启动率、增殖系数、平均愈伤面积和平均根数等因素,大花萱草‘32-1’不定芽诱导,最适培养基是Y₅:MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L。

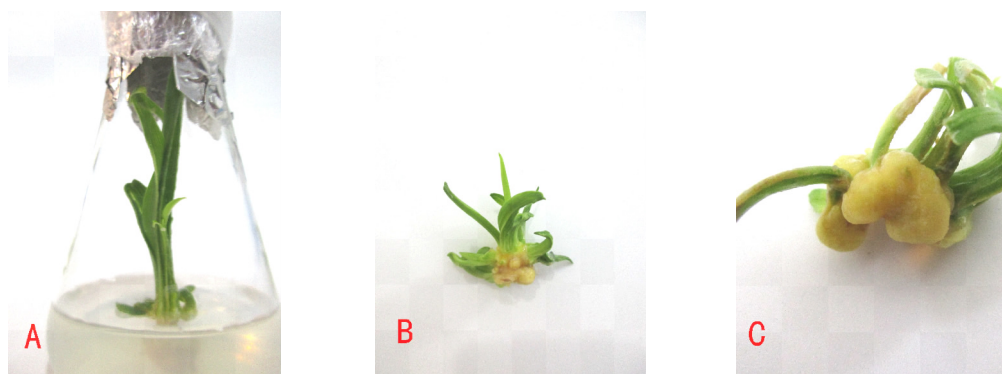
2.2 不同浓度6-BA和NAA培养基大花萱草增殖情况

表5所示,G₇处理的增殖系数达到最大值3.60,且显著高于其他处理,形成的平均愈伤面积也是最大的,达到84.26 mm²,且显著高于其他处理。G₃处理的增殖

表4 不同浓度6-BA和NAA对不定芽诱导情况

处理	启动率/%	增殖系数	平均愈伤面积/mm ²	平均根数/条
Y1	100.00a	4.20bc	0.00d	1.67ab
Y2	100.00a	2.60bc	0.00d	2.33a
Y3	100.00a	2.00c	0.00d	2.33a
Y4	100.00a	2.60bc	27.50b	1.00b
Y5	100.00a	5.60a	11.00cd	1.33b
Y6	100.00a	4.80b	4.33cd	1.33b
Y7	100.00a	2.80bc	78.33a	0.00b
Y8	100.00a	2.20c	67.67a	0.00b
Y9	100.00a	3.20bc	39.67b	0.00b

注:使用SPSS 20.0对数据进行分析,同列中不同的小写字母表示在5%水平上差异显著(即P<0.05)。下同。



A: 试管苗伸长生长; B: 诱导出的不定芽; C: 诱导出的愈伤组织

图1 大花萱草诱导情况

表5 不同浓度6-BA和NAA培养基大花萱草增殖情况

处理	增殖系数	平均株高/mm	平均愈伤面积/mm ²
G1	3.18ab	36.83bc	49.44bc
G2	2.92b	32.09c	48.15bc
G3	2.35c	41.00bc	32.00d
G4	3.47ab	45.75ab	54.90bc
G5	2.99b	55.44a	41.15bc
G6	2.40bc	37.70bc	35.37c
G7	3.60a	38.50bc	84.26a
G8	3.00b	33.10c	67.11b
G9	2.80b	45.30ab	63.33b

系数最小为2.35,且显著低于其他处理,平均愈伤面积也是最小的,大小为96.00 mm²,且显著低于其他处理;G₅处理的平均株高最高,达到55.44 mm,且显著高于其他处理。在NAA浓度相同的情况下,增殖系数和平均愈伤面积随着6-BA浓度的增加呈递增趋势;在6-BA浓度相同的情况下,增殖系数和平均愈伤面积随着NAA浓度的增加成递减趋势。综合增殖系数、平均株高和平均愈伤面积等因素考虑,增殖培养基以G₄:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L为宜。

2.3 不同浓度NAA和AC大花萱草生根情况

由表6可知,各处理生根率都为100.00%,说明大花萱草极易生根,对NAA和活性炭浓度要求不高。在不含活性炭的培养中,根系黄白色,粗壮,但水分含量高,极易折断(见图3-A);而在含有活性炭的培养基中,根系乳白色,细软(见图3-B)。其中,S₇处理,平均根数最多,达到11.80条,显著高于其他处理,但是平均根长最短,显著小于其他处理,且产生扁平的畸形根。S₉处理下的平均根长最长,达到56.29 mm,并且显著高于其他处理。S₁、S₄、S₇随着NAA浓度的增加平均生根数呈递增趋势,但平均根长呈现递减趋势。当NAA浓度相同时,平均根长随着活性炭浓度的增加而成递增趋势,而平均根数呈递减趋势,无显著性差异,且所有添加活性炭的处理组都不产生畸形根。综合生根率、平均生根数、平均根长以及根系生长情况等因素考虑,最佳生根培养基为S₉:1/2MS+NAA1 mg/L+AC2 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 4 g/L。

3 结论

大花萱草‘32-1’离体培养的再生方式是器官发生型。其离体培养体系的基本流程是:选取幼芽作为外植体,采用75%的酒精(30 s)和0.1%的升汞溶液(10~12 min)对外植体进行消毒灭菌处理;处理后将外植体接种于MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L的培养基上

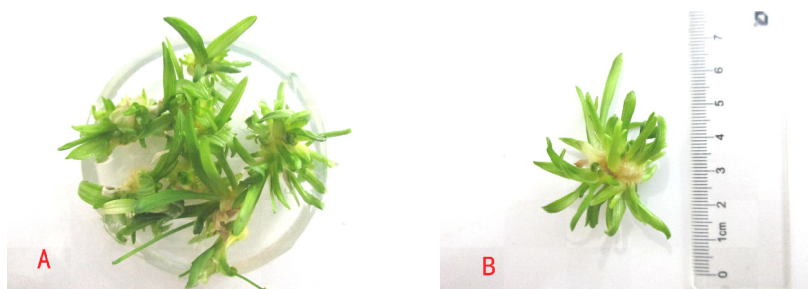


图2 试管苗增殖培养

表6 不同浓度NAA和AC对大花萱草生根的影响

处理	生根率/%	平均生根数/条	平均根长/mm	根系生长情况
S1	100.00a	6.80b	29.17bc	黄白色,粗壮,脆
S2	100.00a	6.60b	29.77bc	乳白色,细,柔软
S3	100.00a	6.40b	41.57ab	乳白色,纤细,柔软
S4	100.00a	8.00b	21.32c	黄白色,粗壮,脆
S5	100.00a	7.40b	36.81b	乳白色,细,柔软
S6	100.00a	7.00b	42.38ab	乳白色,细,柔软
S7	100.00a	11.80a	14.68d	黄白色,粗壮,脆
S8	100.00a	7.80b	37.21b	乳白色,纤细,柔软
S9	100.00a	7.40b	56.29a	乳白色,纤弱,柔软



A: 生根培养基不添加活性炭; B: 生根培养基添加活性炭

图3 大花萱草生根情况

进行不定芽的诱导;然后将不定芽分成单株接种至MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基上进行试管苗增殖;最后将单株接种至1/2MS+NAA 1.0 mg/L+AC 2.0 g/L培养基进行生根培养。

4 讨论

在离体诱导不定芽的过程中发现,BA浓度为1 mg/L时,NAA浓度在1、2、3 mg/L时,均未产生愈伤组织;而BA浓度提高,产生了愈伤组织。认为大花萱草‘32-1’不定芽与愈伤组织的产生并不一定相伴发生的,低浓度的BA不产生愈伤组织。这一结果与兰丽婷等^[1]的研究结果不符。在增殖培养过程中发现,大花萱草‘32-1’不定芽的增殖存在个体差异,这与郭达初等^[24]的研究结果类似;低浓度的NAA有利于大花萱草‘32-1’不定芽的增殖,这与兰丽婷等^[1]的研究结果相同。

孙占育认为活性炭对植物组织培养的生根主要表现在以下方面:可提供生根的暗环境,可防止褐变有利生根,有利于提高培养体内可溶性蛋白和总糖的含量,能吸附植物生长调节剂与其他有机物等有利生根的物

质。在植物组织培养生根中,选择合适的活性炭浓度有利于生根^[25]。在大花萱草‘32-1’生根培养的过程中发现,NAA浓度不变,平均根长随着活性炭的增加成递增趋势,因此活性炭对根长有一定影响,这一结果与刘根林等^[26]的报道相同。本研究采用1/2MS培养基添加NAA 1.0 mg/L+AC 2.0 g/L对试管苗进行生根培养,根系生长速度快,且洁白富有弹性,21天后,平均根长可达5.6 cm。而在栽培过程中,多以根长在2~3 cm的试管苗进行炼苗、移栽,成活率高且较易种植。因此可通过减少生根培养天数,来控制根长。具体培养时间需进一步研究。

参考文献

- [1] 兰丽婷,李冲,任爽英,等.萱草新品种组培再生体系的建立[J].东北林业大学学报,2011,39(4):14-17.
- [2] 杨丽莉,王德平,张晓,等.以子房为外植体的‘金娃娃’萱草组织培养技术的研究[J].中国农学通报,2012,28(25):184-190.
- [3] 刘志洋,李海涛,朱祥春,等.大花萱草组织培养研究[J].东北农业大学学报,2008(1):43-45.
- [4] 朱华芳,胡永红,瞿蒙滔.萱草园艺品种繁殖技术研究[J].安徽农业科学,2007,35(16):4833-4834.
- [5] 李登绚,韩睿.黄花菜优良品种快速扩繁技术[J].北方园艺,2005(5):28.
- [6] 陈丽飞,董然.萱草属植物研究进展[J].北方园艺,2007(6):66-69.
- [7] 周朴华,何立珍,刘志明.组织培养中用秋水仙素诱发黄花菜同源四倍体的研究[J].中国农业科学,1995,28(1):49-55.
- [8] Peng G L, Xin X C, Che Y Y, et al. Tissue Culture and Rapid Propagation of Pedicels of *Hemerocallis hybrida*[J]. Agricultural Biotechnology,2012,1(3):20-22.
- [9] 李秀华,杜贞,武银玉,等.大花萱草组培快繁体系的研究[J].植物研究,2009,29(6):757-762.
- [10] 胡世宽,李雅英,段普凡,等.大花萱草快速繁殖技术研究[J].河北省科学院学报,1987(2):71-76.
- [11] 姜凤英,栾邵武,吴志刚,等.多倍体萱草“金娃娃”的离体培养研究

- [J]. 辽宁农业科学, 2007(1): 51-52.
- [12] 王晓军, 吴亚辉, 刘艳霞, 等. 大花萱草的组织培养快繁技术研究[J]. 园林科技, 2013(3): 31-34.
- [13] 田野, 李毅. 大花萱草扩繁技术研究及管理[J]. 科技视界, 2013(4): 182-184.
- [14] 魏进莉, 许浩, 蔡进军, 等. 两种大花萱草组织培养繁殖的研究初探[J]. 农村经济与科技, 2010, 21(5): 144-145.
- [15] 于晶波. 多倍体萱草—金娃娃的组织培养繁殖方法[J]. 园林科技信息, 2003(1): 15-16.
- [16] 孙月剑, 车冬梅. 欧洲矮化大花萱草组织培养的研[J]. 大连民族学院学报, 2006, 32(3): 44-46.
- [17] Li Z W, Mize K, Campbell F. Regeneration of daylily (*Hemerocallis*) from young leaf segments [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Culture (PCTOC)*, 2010, 102(2): 199-204.
- [18] 周朴华, 何立珍. 黄花菜不同外植体形成的愈伤组织再生苗观察[J]. 武汉植物学研究, 1993(3): 253-258.
- [19] 解有利, 陈兰芬, 石进朝. 大花萱草组织培养研究[J]. 北京农业职业学院学报, 2007, 21(5): 25-27.
- [20] Krikorian A D. Regeneration of Plants from protoplasts of *Hemerocallis* (*Dalily*) [J]. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1995, 34(1): 70-78.
- [21] 郝爱平. 白桦愈伤组织再生系统的体细胞无性系变异研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [22] 张俊娥, 刘继红, 邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J]. 遗传学报, 2003(2): 169-174.
- [23] 李士生, 张玉玲. 小麦愈伤组织及再生植株的染色体变异[J]. 遗传学报, 1991(4): 332-338, 388.
- [24] 郭达初, 刘克斌, 柴明良, 等. 大花萱草组织培养快速繁殖[J]. 浙江农业学报, 1990(3): 137-141.
- [25] 孙占育, 孙志强, 曹斌. 活性炭在促进组培苗植物生根中的作用[J]. 湖南农业科学, 2010(7): 3-5.
- [26] 刘根林, 梁珍海, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述[J]. 江苏林业科技, 2001(5): 46-48.