

欧洲矮化大花萱草组织培养的研究

孙月剑¹ 车冬梅²

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 2. 大连市第二十六中学, 辽宁 大连 116013)

摘 要: 以不同时期的花蕾为外植体, 研究了影响丛生芽诱导、增殖、壮苗生根的主要因素。结果表明: 处于原芽期的花蕾是诱导丛生芽的最佳时期; 适合诱导丛生芽的培养基是 MS + BA 0.1~2.0 mg/L + 2.4-D 0.2~1.0 mg/L + GA 0.5 mg/L + LH 500 mg/L + 3% 蔗糖, 适合丛生芽增殖成苗的培养基是 MS + 6-BA 1.0~1.5 mg/L + 2.4-D 0.2~0.5 mg/L + 3% 蔗糖, 适合壮苗生根的培养基是 1/4MS + IBA 0.1 mg/L + 1% 蔗糖。愈伤分化过程中的生理变化: 可溶性糖与可溶性蛋白的含量有着相同的变化趋势, 先增加再减少, 然后再增加。叶绿素含量则呈上升趋势, 这说明叶绿素的适量形成有利于分化。

关键词: 欧洲矮化大花萱草; 组织培养; 生理变化

中图分类号: S682.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-315X (2006) 03-0044-03

大花萱草 (*Heimerocallis fulva* L) 又称金针花、忘忧草, 是百合科萱草属的多年生草本花卉, 我国南北均可种植, 根状茎可在 -20℃ 低温冻土中越冬, 对盐碱土壤有特别的耐性。欧洲矮化大花萱草具有植株矮、花期长等特点, 可布置花坛、马路隔离带、疏林草坡等处, 更适宜做地被植物。其花蕾可食用, 根可入药, 是极为珍贵的植物资源^[1]。本试验的特点是以不同发育时期的花蕾为外植体, 进行丛生芽诱导、芽苗增殖及生根成苗的研究, 为快速大量生产优质种苗提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

欧洲矮化大花萱草品种 (黄色和红色) 由辽宁师范大学省重点实验室提供。取材时分别取 3 个不同发育时期的花蕾, 即花原基、幼小花苞和成熟花苞, 用自来水冲洗后, 70% 酒精表面消毒 30 s, 0.1% 升汞消毒 7 min, 接种到丛生芽培养基上诱导。

1.2 MS 培养基

按文献[2]配制 MS 培养基, 附加琼脂 6 g/L、蔗糖 30 g/L, pH 5.8; 1/4 MS 培养基是在 MS 基础上大量元素减为 1/4, 其余元素减为 1/2, 附加

琼脂 6 g/L、蔗糖 10 g/L, pH 5.8。

1.3 丛生芽诱导培养基

以 MS 为基本培养基, 分别添加适宜浓度的 NAA、2.4-D、6-BA、GA、乳白蛋白水解物 (CH)^[3-8]。每处理接 10 瓶, 每瓶接 1 枚花蕾。将诱导出的丛生芽放入芽增殖培养基中进行增殖培养, 待幼苗长至 3 cm 时, 移入生根培养基中。

1.4 方法

选取具有分化潜力的黄色颗粒状愈伤 (I), 黄色愈伤上出现绿色芽点 (II), 小苗已长出的愈伤 (III), 按张志良等^[9]实验方法提取可溶性糖、可溶性蛋白与叶绿素, 并分别在波长 625、620、663、645 nm 下测定其吸收值。

2 结果与分析

2.1 花蕾发育时期对分化的影响

本试验共接种花蕾 100 枚, 花原基 30 枚, 幼小花苞 40 枚, 成熟花蕾 30 枚。试验结果表明, 花原基与幼小花苞均能诱导出丛生芽, 诱导率分别为 70.3% 和 51.5%, 成熟花蕾则不能分化形成丛生芽。可见花蕾的发育时期是丛生芽能否诱导成功的关键因素。

2.2 激素对丛生芽诱导的影响

不同种类的植物生长调节激素 (PGH) 配比

收稿日期: 2005-07-12。

作者简介: 孙月剑 (1980-), 女, 辽宁大连人, 辽宁师范大学生命科学学院 2003 级研究生。研究方向: 植物学。

2006年第3期(总第32期)
5月15日出版

孙月剑,等:欧洲矮化大花萱草组织培养的研究

对丛生芽诱导的影响见表1. 低浓度的BA与高浓度的2.4-D配合使用,有利于外植体的分化,此分化途径为愈伤再分化途径. 团状、黄色的愈伤12 d开始形成,25 d时其表面出现绿色芽点,40 d长出小苗. 在诱导愈伤分化时,2.4-D优于NAA,且GA和LH的加入有助于分化. 高浓度的BA与低浓度的2.4-D不利于诱导分化,但有利于芽增殖及成苗. 此外,本试验还用KT

代替6-BA进行分化诱导,但实验效果明显不好,仅有少数分化. 在本试验中,1号培养基最利于分化丛生芽(如图1所示).

2.3 激素对芽增殖的影响

在分化培养基的基础上,制定出BA与2.4-D配合使用的6种增殖培养基,激素对芽增殖的影响见表2. 结果表明:E号培养基最好,增殖率高达7.0,且长势也好(如图2所示).

表1 不同种类植物生长调节激素(PGH)配比对丛生芽诱导的影响

序号	处理/(mg·L ⁻¹)	愈伤情况	接种块数	成苗数	繁殖系数 (成苗数/接种块数)
1	BA0.1+2.4-D1.0+GA0.5+LH500	大,团状黄色	100	235	2.35
2	BA0.1+2.4-D1.0	大,黄色略带绿	100	201	2.01
3	BA0.1+NAA1.0+GA0.5+CH500	大,黄绿	100	171	1.71
4	BA1.0+2.4-D0.2	中,黄色	100	109	1.09
5	BA2.0+2.4-D0.2	小,黄色	100	26	0.26
6	BA3.0+2.4-D0.2	—	100	0	0

表2 激素对芽增殖的影响

序号	苗状态	处理/(mg·L ⁻¹)	接种数	增殖数	增殖率 (增殖数/接种数)
A	长势较弱	BA1.0+2.4-D0.1	10	56	5.6
B	长势中等	BA1.0+2.4-D0.2	10	50	5.0
C	长势中等,愈伤多	BA1.0+2.4-D0.5	10	45	4.5
D	长势较弱	BA1.5+2.4-D0.1	10	63	6.3
E	长势强,分化多,愈伤少	BA1.5+2.4-D0.2	10	70	7.0
F	长势较强,基部愈伤多	BA1.5+2.4-D0.5	10	60	6.0

2.4 IBA与NAA对生根的影响

以1/4MS为基本培养基,分别添加IBA 0.1、0.5、1.0 mg/L, NAA 0.1、0.5、1.0 mg/L. 10 d开始有根原基发生. 半个月统计,附加IBA 0.1生

根较多,约5~10条,且根部无愈伤(如图3所示). IBA 0.5、1.0生根条数2~3条,根部有少量愈伤. 附加NAA,其生根较少,1~2条,有愈伤,根粗壮且脆.



图1 丛生芽的诱导



图2 芽的增殖

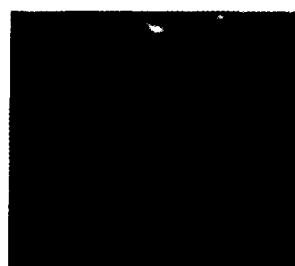


图3 试管苗的生根

2.5 分化过程中可溶性糖与可溶性蛋白含量的变化

研究发现,I型愈伤的可溶性糖与可溶性蛋白的含量最高,II型愈伤中两者含量降低,III型愈伤中两者含量又开始回升(如图4所示). 这说明,可分化的I型愈伤正处于分化的物质准备阶段,细胞分裂与蛋白的合成正处于旺盛时期,II型愈伤已开始分化,并利用了前期的储备

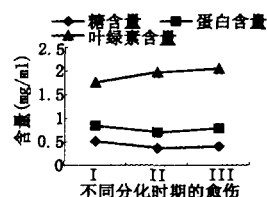


图4 分化过程中不同时期愈伤组织的可溶性糖、可溶性蛋白和叶绿素含量的变化

物质,小苗长出后,又可自身合成新的蛋白质,

所以其含量又开始回升。

2.6 分化过程中叶绿素含量的变化

按 I、II、III 型愈伤排列, 其叶绿素含量呈上升趋势 (如图 4 所示), 说明叶绿素的适量形成对于分化是有利的。实验中发现, 只有出现绿色小点的愈伤才能形成小芽, 白色疏松和绿色致密的愈伤均不能形成丛生芽。可见, 叶绿素的含量与芽的形成有关。

3 结 论

本试验以不同发育时期的花蕾为研究材料, 建立了欧洲矮化大花萱草的高效再生体系, 为萱草的转基因研究提供了很好的基础。试验表明, 未成熟的花蕾才能诱导出丛生芽, 欧洲矮化大花萱草的分化最适培养基为 BA 0.1 mg/L + 2.4 - D 1.0 mg/L + GA 0.5 mg/L + CH 500 mg/L + 3% 蔗糖, 芽增殖的最适培养基为 BA 1.5 mg/L + 2.4 - D 0.2 mg/L + 3% 蔗糖, 最佳生根培养基为 1/4 MS + IBA 0.1 mg/L + 1% 蔗糖。此外, 本试验初步研究了愈伤分化过程中的生理变化。在分化过程中, 可溶性糖与可溶性蛋白呈增加 - 减少 - 增加的变化趋势, 其不同阶段还可能有特异性蛋白,

详细情况还有待于进一步研究。分化过程中, 叶绿素的含量呈上升趋势, 可见叶绿素的适量形成有助于分化。

参考文献:

- [1] 赵宝江, 周 亮. 大花萱草: 盐碱绿地排头兵[J]. 中国花卉园艺, 2004, (10): 30 - 31.
- [2] 安利佳, 姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 辽宁: 辽宁师范大学出版社, 1996.
- [3] 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, 1993, (3): 137 - 141.
- [4] 杨乃博. 杂种大花萱草的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1985, (6): 39.
- [5] 倪 新, 马 毓. 多倍体萱草的组织培养及其繁殖[J]. 园艺学报, 1984, 11(3): 202.
- [6] 吴铁明, 于晓英, 彭尽辉, 等. 野生重瓣大花萱草的选育研究 II 组织培养快速繁殖[J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2002, 28(4): 305 - 307.
- [7] 王晓娟, 金 樑, 陈家宽. 萱草的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 234.
- [8] Carter J, Seema Dhir, Dhir S. Effect of flower bud size on regeneration in daylily (*Heimerocallis fulva* L.) via somatic embryogenesis. *The Camellia Journal*, 1999, 54(3): 24 - 25.
- [9] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 上海: 华北师范大学出版社, 1998.

Study on Tissue Culture of *Hemerocallis fulva*(L)

SUN Yue - jian¹ CHE Dong - mei²

(1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian Liaoning 116029, China;

2. Dalian No.26 middle school, Dalian Liaoning 116013, China)

Abstract: The main factors of crowd shoot induction, propagation and rooting of *Hemerocallis fulva*(L) were studied by using different growth period of bud. The results showed that the primary bud is better explants than others. The suitable medium for crowd shoot induction is MS + BA 0.1 ~ 2.0 mg/L + 2.4 - D 0.2 ~ 1.0 mg/L + GA 0.5 mg/L + LH 500 mg/L + 3% sucrose. The best medium for shoot propagation is MS + 6 - BA 1.0 ~ 1.5 mg/L + 2.4 - D 0.2 ~ 0.5 mg/L + 3% sucrose. The proper medium for rooting is 1/4MS + IBA 0.1mg/L + 1% sucrose. The physiological change were studied in callus during the differentiation; The condition of soluble sugar and soluble protein had the same trend, up - down - up. The condition of chlorophyll was upward trend, which might have some thing with differentiation.

Key words: *Hemerocallis fulva*(L); tissue culture; physiological change

(责任编辑 邹永红)