

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.01.029

# “三月花”黄花菜的组织培养研究

王 静, 胡冬梅, 侯 静, 白 洁

(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘 要:** 采用单因素和正交实验方法对“三月花”黄花菜的组织培养技术进行了探索. 结果显示: 幼叶用 0.1 % 升汞灭菌 12 min 时效果最佳, 外植体污染率、死亡率均为 0, 14 d 后外植体启动率为 62.5 %. 最佳愈伤诱导培养基为 MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA, 外植体出愈率为 86.67 %; 愈伤组织最适分化培养基为 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA, 愈伤组织分化率达到 80 %, 平均每块愈伤组织不定芽个数为 1.72. 最佳生根培养基为 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA, 生根率达到 93.33 %, 平均每个芽苗生根数为 5.83 条, 试管苗炼苗移栽后, 成活率达 95 %. 利用该组织培养技术, 幼叶外植体通过愈伤组织途径获得“三月花”黄花菜再生苗.

**关键词:** “三月花”黄花菜; 幼叶; 愈伤组织途径; 快繁

**中图分类号:** Q94-331      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2019)01-0167-06

## Study on tissue culture of *Hemerocallis citrine* Baroni ‘March Flower’

WANG Jing, HU Dong-Mei, HOU Jing, BAI Jie

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Single factor and orthogonal experiment methods were used to explore the tissue culture technique of *Hemerocallis citrine* ‘March Flower’. The results showed that the best effect was when the young leaves were treated with 0.1 % mercuric chloride for 12 min with no pollution and death and the activation rate was 62.5 % after 14 days. MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA was the optimal induction medium with the 86.67 % recovery rate, MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA was the best differentiation medium with the 80 % differentiation rate, and the average number of adventitious buds per block was 1.72. 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA was the best rooting medium, the rooting rate was 93.33 %, the average number of rooting per shoot was 5.83. The survival rate of transplanted test tube seedling was 95 %. Using the tissue culture technique, the young leaf explants obtained the “March flower” daylily regeneration seed through the callus pathway.

**Keywords:** *Hemerocallis citrine* Baroni ‘March Flower’; Young leaves; Callus pathway; Tissue culture

收稿日期: 2017-02-03

基金项目: 黄花菜早熟新品种“三月花”种苗标准化繁育和规模化种植示范科技合作专项资金(20826041A4117); “三月花”黄花菜快繁技术横向(16H0487)

作者简介: 王静(1994-), 女, 山西人, 硕士研究生, 研究方向为资源植物学. E-mail: 15196698158@163.com

通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

## 1 引言

黄花菜 (*Heremacallis citrine* Baroni) 又名金针菜, 为百合科多年生宿根草本植物<sup>[1]</sup>, 是我国特有的重要经济植物. 黄花菜以其花香、色黄亮、味美、营养丰富而闻名, 属于典型的高蛋白、低热量、富含维生素及矿物质的保健蔬菜<sup>[2,3]</sup>, 具有较高的市场价值<sup>[4]</sup>. 目前, 在黄花菜种苗繁殖中, 多采用分株、切片、芽块等方法, 速度慢, 难以满足种苗批量生产的需求<sup>[1,5,6]</sup>. 为了解决黄花菜种苗的产业化生产, 许多学者研究了黄花菜的组织培养技术<sup>[7]</sup>. 周朴华取其各种长度的雄蕊<sup>[8]</sup>、近成熟蒴果、花药和幼叶<sup>[9]</sup>培育出完整的植株. 祝朋芳取金娃娃萱草与黄花菜杂交授粉后 1~8 d 的子房中的胚珠诱导出植株<sup>[10]</sup>. 岳青、王果萍分别采用短缩茎、心叶、花茎、花蕾为材料诱导植株, 发现心叶可以长出愈伤组织, 但很难进一步分化成植株, 花茎、花蕾在培养基上均能不同程度地产生愈伤组织, 但条件相同时, 花蕾的诱导率高于花茎<sup>[11]</sup>. 董推茹<sup>[12]</sup>采用多倍体黄花菜的幼叶、花蕾和花茎 3 种外植体发现仅有花茎形成愈伤组织, 而花蕾、幼叶无分化迹象. 这些研究表明相同组织或器官诱导愈伤组织的效果存在差异, 不同品种间由于基因型的差异对诱导条件的反应也存在差异. “三月花”黄花菜早花品种, 具有花期早于市场其他品种的优势. 本研究以较易获得的幼叶为外植体, 建立其培养体系, 以满足生产需要.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

“三月花”黄花菜由四川德阳市明润农业开发有限公司提供.

### 2.2 方法

2.2.1 外植体最佳灭菌条件的优化 取“三月花”黄花菜的幼叶(丛生枝顶中心周围肉眼可见的幼叶, 颜色为淡黄绿色, 长宽 1~8cm×0.5~1cm), 流水冲洗后, 采用以下流程灭菌. 无菌水 1~2 次 70%酒精 30 s 无菌水 1~2 次 0.1%HgCl<sub>2</sub> 无菌水 5~6 次. 将灭菌后的幼叶切成约 1.0×0.5cm<sup>2</sup>大小, 接种于 MS<sup>[7]</sup>+0.2 mg/L 6-BA+

2 mg/L 2,4-D 培养基中, 每瓶接种 4 个幼叶外植体, 每个处理接种 15 瓶. 放置于暗培养箱中培养, 控制室温为 25±2℃. 记录 14 d 后外植体启动率、污染率及死亡率.

(1) 污染率=(被污染的外植体数/接种的总外植体数)×100%

(2) 死亡率=(非因污染造成的死亡的数量/接种的总外植体数)×100%

(3) 启动率=(启动的外植体数/接种的总外植体数)×100% (外植体膨大视为启动)

2.2.2 植物激素对幼叶外植体出愈率的影响 以 MS 为基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 5.8~6.2, 在 121℃ 的高压蒸汽灭菌锅中灭菌 20min, 冷却后加入过滤灭菌的植物激素配制不同浓度培养基, 将最佳灭菌条件下处理的幼叶外植体接种于培养基上进行愈伤组织诱导. 每瓶接种 4 个幼叶外植体, 每个处理接种 15 瓶. 放置于暗培养箱中进行培养, 控制室温为 25±2℃, 分别在 7、30 d 观察启动率和出愈率(外植体膨大并形成细胞团).

2.2.3 正交实验探究植物激素对幼叶外植体出愈率的影响 根据单因素结果, 选取对幼叶启动和出愈影响较大的激素进行二因素三水平的正交试验, 以选择最佳的激素组合配比, 实验方法与材料同上.

2.2.4 愈伤组织的分化培养 将愈伤组织切成 0.6 cm<sup>3</sup> 的小块, 接种于 MS 添加 6-BA (2 mg/L) 以及不同浓度的 IBA、IAA、NAA 分化培养基中, 光照 1500 lx, 光照时间 12 h/d. 30 d 后统计结果.

2.2.5 生根及炼苗移栽 将芽苗转接到添加不同浓度激素的 1/2 MS 生根培养基上, 观察根的长势. 当根长至 5~7 cm 时即可打开瓶塞, 炼苗 2~3 d 后, 洗掉根部培养基, 移入腐殖质: 沙=1:1 基质中栽培.

## 3 结果与分析

### 3.1 最佳灭菌条件

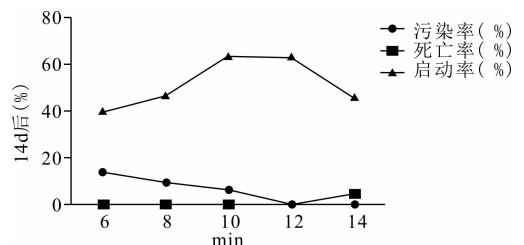


图 1 14d 后不同灭菌时间对幼叶外植体生长的影响

Fig. 1 Effect of different sterilization time on the growth of explants of young leaves after 14 days

14 d 后幼叶外植体的污染、死亡和启动状况见图 1, 结果显示外植体启动率表现出会随着灭菌时间的延长先升后降, 综合污染率、死亡率和启动率三者的情况, 幼叶外植体灭菌 12 min 为最佳效果, 此时外植体污染率和死亡率都最低, 幼叶外植体 14 d 后启动率则接近最高值为 62.5%。

### 3.2 植物激素种类对幼叶外植体诱导率的影响

观察幼叶外植体启动率和 30 d 后的出愈率(表 1), 发现单独的 6-BA 不能使幼叶外植体启动, 但是和生长素配合使用则有助于诱导幼叶外植体启动或出愈. NAA 无论单独还是和 6-BA 配合使

用都可以使幼叶外植体膨大, 但并无愈伤组织生长, 并且褐化死亡. 2, 4-D 无论单独使用还是和 6-BA 配合使用都可以诱导幼叶外植体启动和出愈, 但是单独的 2, 4-D 诱导愈伤组织, 会使愈伤组织松散, 不利于后面的转接和分化, 添加一定的 6-BA 会使愈伤组织变得紧实, 产生更多的芽点(图 2-a), 利于愈伤分化. 但是过低或者过高的 6-BA 反而会抑制幼叶外植体的诱导, 并且启动率和出愈率之间有一定的正相关性. 因此选取 2, 4-D 和 6-BA 两个因素进行二因素三水平的正交实验.

表 1 不同激素浓度对幼叶外植体愈伤组织诱导率的影响

Tab. 1 Effects of different hormone concentrations on callus Induction of explants of young leaves

2,4-D(mg/L)	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	启动率(%)	出愈率(%)
0	0.1	0	0	0
0	0.3	0	0	0
0	0.5	0	0	0
0	0.8	0	0	0
0	1	0	0	0
0.5	0	0	53.57	35.00
1	0	0	68.75	60.00
2	0	0	67.86	68.33
3	0	0	68.75	76.67
4	0	0	58.24	70.00
2	0.1	0	70.00	83.00
2	0.3	0	50.00	65.83
2	0.5	0	43.33	53.75
2	0.8	0	40.00	45.00
2	1	0	36.67	32.50
0	0.1	1	29.17	0
0	0.3	1	45.83	0
0	0.5	1	33.33	0
0	0.8	1	25.00	0
0	1	1	16.70	0
0	0	0.1	32.14	0
0	0	0.3	34.71	0
0	0	0.5	39.29	0
0	0	0.8	42.86	0
0	0	1	42.86	0

### 3.3 正交实验探究植物激素对幼叶外植体出愈率的影响

从表 2 的极差结果(R)可以看出, 幼叶外植体出愈率的影响因素中 6-BA 大于 2,4-D. 外植体

出愈率最高的培养基为 MS + 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA. 在此激素浓度配比下, 外植体启动率和出愈率都最高, 分别达到 68.33% 和 86.67%。

表 2 二因素三水平  $L_9(3^2)$  对幼叶外植体愈伤组织诱导率的影响Tab. 1 Effects of two factors and three levels of  $L_9(3^2)$  on callus induction of young leaf explants

实验序号	2,4-D(mg/L)	6-BA(mg/L)	启动率(%)	出愈率(%)
1	2	0.1	68.33	86.67
2	2	0.3	55.83	61.18
3	2	0.5	47.50	61.67
4	3	0.1	55.83	66.67
5	3	0.3	55.83	75.56
6	3	0.5	55.83	60.00
7	4	0.1	68.33	75.00
8	4	0.3	60.00	74.17
9	4	0.5	51.67	65.00
K1	192.49	228.34		
K2	171.66	210.91		
K3	154.93	186.67		
k1	64.16	76.11		
k2	57.22	70.30		
k3	51.64	62.22		
R	37.56	41.67		

### 3.4 愈伤组织的分化培养

将愈伤组织接种到 IBA/NAA/IAA 配合 6-BA 的诱导分化培养基上,30 d 后观察结果(表 3)。结果显示 IBA 的诱导分化效果显著高于 NAA

和 IAA。最佳分化培养基为 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA,愈伤组织分化率达到 80 % (图 2-b),平均每块愈伤组织不定芽个数为 1.72。

表 3 不同激素对幼叶外植体愈伤组织诱导分化效果的影响

Tab. 3 Effect of different hormones on callus induction of explants of young leaves

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IAA (mg/L)	IBA (mg/L)	接种愈伤组织数 (块)	分化愈伤组织数 (块)	不定芽总数 (个)	分化率 (%)	平均不定芽 (个/块)
2	0.1	0	0	40	8	8	20.00	0.20
2	0.3	0	0	44	2	2	4.55	0.05
2	0.5	0	0	42	6	24	14.29	0.57
2	0	0.1	0	40	9	6	22.50	0.15
2	0	0.3	0	44	8	15	18.18	0.34
2	0	0.5	0	38	16	25	42.11	0.66
2	0	0	0.1	44	16	56	36.37	1.27
2	0	0	0.3	48	12	58	25.00	1.21
2	0	0	0.5	50	40	86	80.00	1.72

### 3.5 生根及炼苗移栽

将诱导出的芽苗(图 2-c)接种到添加 NAA/IBA/IAA 的 1/2 MS 培养基上, 20 d 后观察结果(表 4). 发现 IBA 和 NAA 都可以很好的诱导生根, 综合考虑生根率和平均生根数, NAA 诱导生根的效果更好, 芽苗平均生根数为 5.83(图 2-d)多于 IBA 的平均生根数 2.17, 因此 1/2MS +

0.5mg/L NAA 为最佳生根培养基. 当根长至 5~7 cm 时即可炼苗 3~5 天后移栽. 由于植株吸收能力与根中根毛成正比, 因此先把根毛少或无的再生苗移入湿滤纸或湿纱布中诱发根毛, 根毛长出后再进行栽植. 移栽基质用腐殖质: 沙=1:1, 成活率达 95%(图 2-e).

表 4 不同激素比对植株生根诱导效果的影响

Tab. 4 The effect of different hormone ratios on rooting of plants

NAA(mg/L)	IAA(mg/L)	IBA(mg/L)	生根率(%)	平均生根数(条/个)
0	0.1	0	50.00	0.50
0	0.3	0	33.33	0.50
0	0.5	0	50.00	0.67
0	0	0.1	100.00	2.17
0	0	0.3	33.33	1.50
0	0	0.5	66.67	1.67
0.1	0	0	83.00	3.45
0.3	0	0	80.00	3.67
0.5	0	0	93.33	5.83

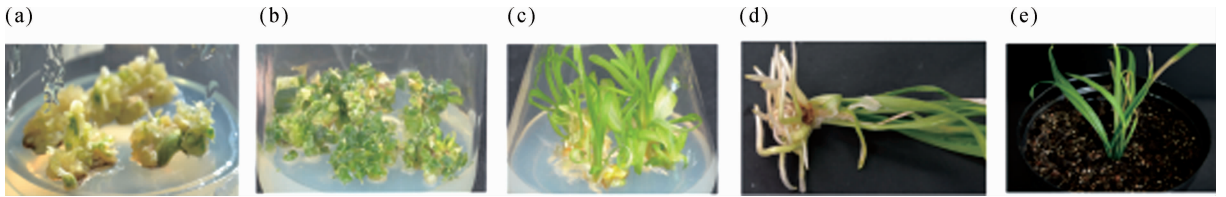


图 2 “三月花”黄花菜的组织培养

a. 愈伤组织, b. 愈伤组织分化, c. 芽苗, d. 生根, e. 移栽

Fig. 2 The tissue culture of *Hemerocallis citrine* Baroni ‘March Flower’

a. Callus, b. Callus differentiation, c. Sprouts, d. Rooting, e. Transplanting

## 4 讨论

“三月花”黄花菜是明润农业开发有限公司自主培育的新品种. 该品种 3 月开花, 早于其他品种 2 个月, 不仅有市场优势, 而且由于开花时温度较其他品种开花时低, 有利于花蕾的采摘和保存. 为推广该品种的种植, 需要建立高效的组织培养技术为其产业化生产提供种苗. 由于黄花菜的幼芽生长于地下, 数量少, 且很难与根茎上其他附属组织分开, 难以获取和灭菌, 不能满足生产需求, 而黄花菜的幼叶材料丰富, 容易获得. 幼叶经愈伤组织途径获得的组培苗虽然有变异的可能性, 但常常发生在多次继代之后, 研究表明在继代 5 代之内遗传稳定性极高<sup>[13-15]</sup>. 后期将进一步利用 ISSR 技术<sup>[16]</sup> 检测分析其遗传稳定性. 因此本研究中采用二步法进

行组织培养.

本研究中利用组织培养技术 3 个月后即可形成组培苗大大缩短育苗时间, 增值系数约为 4, 为该品种产业化发展奠定了基础. “三月花”黄花菜的其他外植体由于受季节的约束, 研究中只对花梗、花蕾、花丝、花被筒、花药、种子、根进行了初步的实验, 发现同等条件下花梗、花蕾有愈伤组织形成, 但最佳的诱导条件仍需探究.

### 参考文献:

- [1] Yang T I. A list of Plants in Taiwan [M]. Taipei: Natural Publishing Company, 1982.
- [2] Zhang Z, Niu L, Li D, *et al.* Low intensity ultrasound as a pretreatment to drying of daylilies: Impact on enzyme inactivation, color changes and nu-

- trition quality parameters [J]. *Ultrason sonochem*, 2017, 36: 50.
- [3] 洪亚辉, 张永和, 屠波, 等. 不同品种的黄花菜鲜干花营养成分比较 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2003, 29: 503.
- [4] Que F, Mao L C, Zheng X J. In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16: 196.
- [5] 张和义, 唐爱均. 黄花菜繁殖技术综述 [J]. *中国农学通报*, 2003, 19: 205.
- [6] 刘凤民, 张伟丽. 黄花菜组织培养再生系统研究 [J]. *广东农业科学*, 2006, 32.
- [7] 江华波, 杨峰, 江家荣, 等. 黄花菜组织快繁技术综述 [J]. *北京农业*, 2014, 124.
- [8] 周朴华, 胡继金, 范鸿芝. 从黄花菜诱导出胚状体并发育成植株的研究 [J]. *园艺学报*, 1983, 10: 273.
- [9] 周朴华, 胡继金, 范鸿芝. 黄花菜 (*Hemerocallis flava* Linn) 组织培养的初步研究 [J]. *湖南农学院学报*, 1980(4): 47.
- [10] 祝朋芳, 张利欣, 刘莉. 大花萱草与黄花菜杂交亲和性及其幼胚离体培养 [J]. *北方园艺*, 2008, 190.
- [11] 岳青, 王果萍, 童德中, 等. 大同黄花菜组织培养繁殖技术的研究 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995, 500.
- [12] 董推茹, 王瑞库, 王法政. 多倍体黄花菜离体培养繁殖技术 [J]. *作物杂志*, 1995, 10.
- [13] 邱婧, 樊洪泓, 秦自清, 等. 利用分子标记检测霍山石斛不同继代次数试管苗的遗传稳定性 [J]. *分子植物育种*, 2008, 6: 532.
- [14] 高丽, 杨波, 李洪林. 叶艺春兰组培苗遗传稳定性的 ISSR 研究 [J]. *亚热带植物科学*, 2007, 36: 13.
- [15] Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls [J]. *P Nat Acad Sci USA*, 1994, 91: 5222.
- [16] Rubluo A, Kartha K K, Mroginski L A, *et al.* Plant regeneration from pea leaflets cultured in vitro and genetic stability of regenerants [J]. *J Plant Physiol*, 1984, 117: 119.
- [17] 马腾蛟, 陈杰, 丁显平, 等. 重庆南川区道地药材玄参遗传多样性 ISSR 分析 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1119.

#### 引用本文格式:

- 中文: 王静, 胡冬梅, 侯静, 等. “三月花”黄花菜的组织培养研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 167.
- 英文: Wang J, Hu D M, Hou J, *et al.* Study on tissue culture of *Hemerocallis citrine* Baroni ‘March Flower’ [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 167.