

# ‘紫泉’萱草的组培快繁技术研究

李丹, 吴海红, 邢桂梅, 胡新颖 (辽宁省农业科学院花卉所, 辽宁沈阳 110161)

**摘要** [目的] 建立一套完整的‘紫泉’萱草组织培养快繁技术体系。[方法] 选取‘紫泉’萱草的花托及幼嫩的茎段为外植体, 旨在建立‘紫泉’萱草离体培养的有效再生体系。[结果] 适合花托愈伤组织产生的培养基是 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L, 适合茎段愈伤组织产生的培养基是 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。诱导不定芽分化与增殖的最佳培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 最佳生根培养基为 1/2MS + NAA 0.4 mg/L。[结论] 为‘紫泉’萱草的大规模生产提供基础数据。

**关键词** 紫泉’萱草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)23-07723-03

## Study on the Techniques of Fast Multiplication for the Tissue Culture of ‘Ziquan’ *Hemerocallis fulva*

LI Dan et al (Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agri-cultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** [Objective] The aim was to establish a complete set of the techniques of fast multiplication for the tissue culture of ‘Ziquan’ *Hemerocallis fulva*. [Method] The receptacle and young floral stems of ‘Ziquan’ *Hemerocallis fulva* as explants, a effective micropropagation system of daylily in vitro was established. [Result] The results were as follows: MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L was the best medium for inducing callus of receptacle. MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L was the best medium for inducing callus of floral stems. The best medium for regeneration and proliferation of adventitious shoots was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L. The best rooting medium was 1/2 MS + NAA 0.4 mg/L. [Conclusion] The study provided basic data for mass production of ‘Ziquan’ *Hemerocallis fulva*.

**Key words** ‘Ziquan’ *Hemerocallis fulva*; Tissue culture; Fast multiplication

萱草(*Hemerocallis*) 又称忘忧草、金针菜、黄花菜等, 属百合科萱草属多年生草本宿根花卉。萱草姿态优美, 品种繁多, 生长强健, 适应性强, 是庭园、花坛及街头绿化的理想花卉, 同时, 其花可食用, 根可入药, 已成为现代人们生活中不可缺少的重要花卉。萱草基因高度杂合, 种子繁殖难以保持母本的优良性状, 采用分株的方式进行繁殖时, 繁殖系数较低, 难以实现规模化的生产, 无法达到萱草商品化生产需求<sup>[1]</sup>。目前, 市场需求日益增加, 利用组织培养方法进行萱草种苗的繁育, 既可保持优良性状又可在短时间内获得大量种苗, 是实现萱草产业化快速发展的有效途径。

国内外很多植物学专家先后对萱草组织培养进行了研究, 但结果不尽相同。这说明萱草品种间差异性大、品种特异性强, 因此针对每一萱草品种进行组培快繁研究都很有必要<sup>[2-4]</sup>。为此, 笔者针对‘紫泉’萱草的组织培养技术进行研究, 旨在建立一套完整的‘紫泉’萱草组织培养快繁技术体系。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 供试材料为‘紫泉’萱草, 由辽宁省农科院花卉所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体消毒和接种。** 选取生长势旺盛、强壮的植株, 以花托和幼嫩的花茎为外植体。将外植体用洗衣粉清洗, 流水冲洗 30~40 min。在超净工作台上用 75% 乙醇将外植体浸泡 30 s, 再用 0.1% 的氯化汞溶液消毒 10 min。然后用无菌水冲洗 3~5 次后备用。在无菌培养皿上将花托切成小段, 幼嫩花茎切成 1 cm 左右的茎段接种在愈伤组织诱导培养基中。

**1.2.2 愈伤组织诱导。** 采用 MS 基本培养基, 利用不同浓度的 6-BA、NAA 设计试验, 6-BA 的浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L, NAA 浓度为 0.01、0.10 mg/L, 共 8 个组合(表 1)。添加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 5.8。

将外植体消毒后, 分别接种至 6-BA、NAA 以上组合, 每处理接种 30 瓶外植体。

表 1 不同基本培养基及激素浓度对比对‘紫泉’萱草愈伤组织诱导的影响

试验号	培养基类型//mg/L		不同外植体的愈伤诱导率//%	
	NAA	6-BA	花托	茎段
1	0.01	1.0	28.02	34.25
2	0.01	2.0	67.08	55.06
3	0.01	3.0	18.07	40.31
4	0.01	4.0	8.03	21.77
5	0.10	1.0	22.06	26.54
6	0.10	2.0	14.03	69.32
7	0.10	3.0	25.12	41.69
8	0.10	4.0	5.32	12.18

**1.2.3 不定芽诱导与增殖培养基筛选。** 采用 MS 基本培养基, 利用 6-BA、NAA 2 因素进行试验设计, 6-BA 的浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L, NAA 浓度为 0.01、0.10、0.50 mg/L, 共 9 个组合(表 2)。添加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 5.8。

**1.2.4 生根培养。** 基本培养基采用 1/2MS, NAA 的浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L。添加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 5.8。14 d 后统计生根率、生根数、根的长度等。

**1.2.5 试管苗炼苗及移栽。** 当瓶苗的根长 3~4 cm 时, 进行炼苗移栽。扦插前打开瓶盖, 在自然散射光条件下炼苗 2~3 d, 然后用镊子小心地从培养瓶中取出苗, 并用自来水冲掉根在根上的培养基。而后移栽到蛭石、细河沙、草炭: 沙子 = 1: 1 和蛭石: 珍珠岩 = 1: 1 4 种不同基质中, 温室内保持温度在 20~25 ℃, 相对湿度在 80% 左右, 并用遮阴网遮阴, 喷水 2

次/d,待幼苗挺直、叶片展开时,可去掉遮荫网,28 d后调查 不同炼苗天数和不同基质中试管苗的成活率及生长情况。

表2 不同激素浓度对比对‘紫泉’萱草不定芽诱导与增殖的影响

试验号	培养基类型//mg/L		接种愈伤组织块数	诱导出不定芽块数	诱导率/%	增殖系数
	NAA	6-BA				
1	0.01	0.5	30	0	0	0
2	0.01	1.0	30	0	0	0
3	0.01	2.0	30	0	0	0
4	0.1	0.5	30	16	53.3	3.5
5	0.1	1.0	30	26	86.7	4.1
6	0.1	2.0	30	30	100.0	5.3
7	0.5	0.5	30	10	33.3	2.8
8	0.5	1.0	30	7	23.3	2.1
9	0.5	2.0	30	12	40.0	3.0

## 2 结果与分析

**2.1 愈伤组织的诱导** 选取‘紫泉’萱草的花托及幼嫩的茎段作为外植体分别接种到8种培养基上。花托在接种14 d后产生愈伤组织,愈伤组织呈淡绿色,形成瘤状突起(图1),

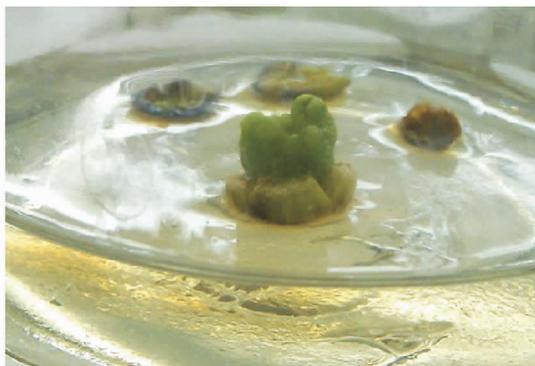


图1 ‘紫泉’萱草花托诱导出的愈伤组织

花托于MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L培养基上诱导率较高,可见6-BA浓度为2.0 mg/L,NAA浓度为0.01 mg/L的激素比例适合花托愈伤组织的产生。

幼嫩的茎段接种于培养基上20 d后,与培养基接触部位开始膨大,30 d左右开始出现愈伤组织(图2),茎段在8种培养基中均能诱导出愈伤组织,但不同激素对比对愈伤组织的

诱导率有很大影响,在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基中的诱导率最高,说明茎段是初代培养较适宜的外植体,合适的激素浓度为6-BA 2.0 mg/L,NAA 0.1 mg/L有利于诱导茎段产生愈伤组织。

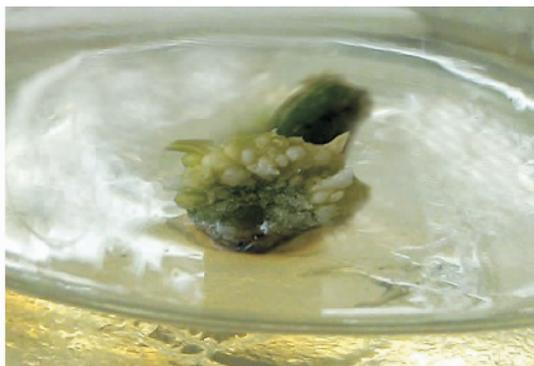


图2 ‘紫泉’萱草花茎诱导出的愈伤组织

**2.2 不同激素浓度对比对‘紫泉’萱草不定芽诱导与增殖的影响** 将上述诱导出的愈伤组织转接到9种不定芽诱导培养基上,14 d后愈伤组织上可见不定芽,继续培养,不定芽可长成具有明显茎叶结构的小植株(图3)。将长至5 cm左右的小苗切下接种到生根培养基上生根,将带有不定芽的愈伤组织切块接种到分化培养基,不定芽可不断增殖。



图3 ‘紫泉’萱草愈伤组织分化不定芽

由表2可知,‘紫泉’萱草不定芽诱导与增殖得最佳激素配比为6-BA浓度为2.0 mg/L,NAA浓度为0.1 mg/L。

**2.3 不同NAA浓度对‘紫泉’萱草试管苗生根的影响** 从表3可以看出,不同NAA浓度对‘紫泉’萱草生根情况的影

响,所设置的4个浓度之间存在差异,生根率和根长均随着NAA浓度增加而增加,当NAA浓度为0.1 mg/L时,虽然根有一定的长度,但生根率和平均根数较低,NAA浓度为0.2 mg/L与NAA浓度为0.3 mg/L各项指标之间差异均不显

著,当 NAA 浓度达到 0.4 mg/L 时生根率、平均根数和根长都达到较好状态,综上所述,适合‘紫泉’萱草不定芽生根的培养基为 1/2MS + NAA 0.4 mg/L(图 4)。

**2.4 炼苗与移栽** 试验表明,炼苗时间短,试管苗对外界环境不适应,严重影响了移栽成活率,试管苗炼苗 1 d 的移栽成活率极低,炼苗 2、3 d 的移栽成活率均达到 90% 以上,因此萱草试管苗炼苗时间应以 2~3 d 为宜。细河沙或蛭石:草炭 = 1:1 较适合作为‘紫泉’萱草的移栽基质。



图 4 ‘紫泉’萱草生根苗

### 3 结论

(1) 茎段和花托适合作为‘紫泉’萱草组培快繁的外植体。

(2) ‘紫泉’萱草不同部位的外植体都可以以 MS 作为基本培养基使用,但不同外植体对激素配比的要求不同,这就要求根据不同类型的外植体配置不同的激素浓度,才能达到更好的培养效果。

(上接第 7702 页)

进程和减少不必要的工作量,降低成本。由于材料数量较少,还需要扩大材料数量,并通过精确测定,建立相关模型,应用 LEC1 基因相对表达量对含油量进行准确预测。

油菜籽油分的形成积累是一系列基因调控的结果。随着分子生物学和基因组学的飞速发展以及对脂肪酸合成和代谢酶系的研究逐步深入,对关键酶如 DGAT、转录因子如 LEC1 的研究一定程度上揭示植物种子油脂形成的普遍机制,但植物的物质代谢是一个复杂的过程,酶的作用不是独立的,各个代谢间存在联系,生物的基因表达也是一个繁复的过程。目前,对油菜含油量合成关键酶的研究还未完全、透彻,提高含油量的相关转录因子还未对油菜进行实践证实。因此该研究结果还有待于进一步研究、证实、实践。

### 参考文献

[1] 王汉中. 中国油菜品种改良的中长期发展战略[J]. 中国油料作物学报,2004,26(2):98-101.

表 3 不同 NAA 浓度对‘紫泉’萱草不定芽生根的影响

NAA 浓度 mg/L	生根率 %	平均根数	平均根长 cm
0.1	84a	2.3a	4.3bc
0.2	89b	3.6b	3.6a
0.3	91b	3.8bc	3.9ab
0.4	98c	4.1c	4.5c

注:观察株数为 100;不同小写字母表示采用 SPSS 新复极差法在 0.05 水平上差异显著。

### 参考文献

- [1] 高凤,王雪. 萱草引进新品种“Forgotten Dreams”的组织培养技术[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):60-62.
- [2] 何月秋,祝志勇. 大花萱草新品种“御衣黄”组织培养及植株再生[J]. 江苏林业科技,2011,38(3):12-15.
- [3] 姜凤英,栾绍武. 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.
- [4] 兰丽婷,李冲,任爽英,等. 萱草新品种组织再生体系的建立[J]. 东北林业大学学报,2011,39(4):15-17.

- [2] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000:214-225.
- [3] 胡中立,刘后利. 甘蓝型油菜品质性状的配合力分析及低硫种质新开发的理论探讨[J]. 作物学报,1989,15(3):221-229.
- [4] 韩继祥. 甘蓝型油菜含油量的遗传研究[J]. 中国油料,1990(2):1-6.
- [5] MU J, TAN H, ZHENG Q I, et al. LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 2008,148(2):1042-1054.
- [6] WANG C, TODD J, VODKIN L O. Chalcone synthase mRNA and activity are reduced in yellow soybean seed coats with dominant I alleles[J]. Plant Physiol, 1994,105:739-748.
- [7] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008,3(6):1101-1108.
- [8] 杨怡姝,孙晓娜,王小利,等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索,2011,30(7):15-19.
- [9] PONCHEL F, TOOMES C, BRANSFIELD K. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions[J]. BMC Biotechnology, 2003,3:18.
- [10] 官春云. 油菜品质改良和分析方法[M]. 长沙:湖南科技出版社,1985:61-120,194-202.