

黄花菜组织培养再生系统研究

刘凤民¹, 张伟丽²

(1. 惠州农业学校, 广东 惠州 516023; 2. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093)

摘要:以黄花菜(*Hermerocalli citrina*)的茎尖为外植体,采用附加不同激素组合的培养基进行组织培养研究,结果表明:以黄花菜茎尖为外植体进行组培快繁,可采用诱导培养基 MS+BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、继代培养基 MS+BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、生根培养基 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 或 1/2MS+IBA 0.2 mg/L 的组织培养再生系统。

关键词:黄花菜; 茎尖; 组织培养; 诱导

中图分类号:S682.1⁺9; S604⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-874X(2006)02-0032-03

Study on plant regeneration by tissue culture of *Hermerocalli citrine*

LIU Feng-min¹, ZHANG Wei-li²

(1. Guangdong Huizhou Agricultural School, Huizhou 516023, China;

2. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The organogenesis and plant regeneration of *Hermerocalli citrine* was studied by using the shoot tip as initial explants. The calli, buds and roots were induced respectively on the various media got by adding different phytohormone in different proportional combination to MS medium. The optimum hormone combinations were selected and plant regeneration system was established. The results showed the best medium for explant induction was MS+BA3.0 mg/L + NAA0.1 mg/L, best for proliferating clump sprouts was MS+BA4.0mg/L + NAA0.1mg/L, and the best medium for the plantlet rooting was 1/2MS + NAA0.2 mg/L or 1/2MS+IBA0.2 mg/L.

Key words: *Hermerocalli citrine*; shoot tip; tissue culture; plant regeneration

黄花菜(*Hermerocalli citrina*)又称金针菜,为百合科萱草属多年生草本植物,原产于我国南部及日本。在我国,黄花菜已有 2000 多年的栽培历史,其中湖南、江苏、甘肃、陕西、浙江、四川、湖北等省为主产地,其他省份也有种植。黄花菜既是著名的观赏花卉,又是有名的佳蔬良药。近年来,欧美各地黄花菜栽培颇盛。随着农业产业结构的调整,我国黄花菜的种植面积越来越大,已成为一种独具特色的经济作物。目前,黄花菜种苗主要采取传统的分株、分芽和播种进行繁殖,这些繁殖方法由于受母株生长年限、自然生长条件及气候的限制,繁殖系数低、周期长。而将植物的组织培养技术用于黄花菜再生系统的研究,既能实现工厂化快繁,缩短种苗生产周期,又能较好地保持母本的优良性状,降低发生变异的几率,同时也为应用转基因等生物工程方法进行黄花菜优良品种的培育提供转化受体

系统研究打下基础。我国部分科技工作者曾在实验室条件下采用不同产地黄花菜的不同部位如根状茎、花梗等部位作外植体,对黄花菜的组织培养进行过相关研究^[1~6]。本试验以黄花菜茎尖为外植体,研究了一种早花型黄花菜组织培养的再生系统,以期引种、种质保存、快速繁殖和转基因研究等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的黄花菜品种属早花型。供试的植物激素包括生长素类的 NAA、细胞分裂素类的 6-BA 和 IBA。

1.2 试验方法

将新鲜采挖的黄花菜植株置于自来水线型小水流下冲洗 2~3 h 后,用毛刷轻轻刷去植株表面及叶片间的泥土并用刀削去根系和叶片,保留茎段 3~4 cm 长,晾干。将茎段移于超净工作台,用 70% 酒精浸泡 30 s,然后用灭菌蒸馏水冲洗 3 次,再用 0.1% 升汞(内加 0.02% 吐温)浸泡 5 min,用灭菌蒸馏水冲洗 5 次,最后

收稿日期:2005-09-26

作者简介:刘凤民(1968-),男,讲师

用灭菌滤纸吸干水分,并用手术刀剥去叶片,切出茎尖0.2~0.5 cm大小,接入诱导培养基中。

试验以MS(诱导培养和继代培养)和1/2MS(生根培养)作基本培养基,附加不同激素组合,设茎尖诱导培养基处理8个(表1)、继代培养基处理5个(表2)、生根培养基处理4个(表3)。各处理培养基均加入0.55%琼脂、3%蔗糖,pH5.8。每种培养基15瓶,每瓶接种4个外植体。接种后置于培养室内培养,培养温度为22~26℃,光照强度为2000~2500 lx,每天光照14 h。

诱导培养试验分别在培养后7天、18天和45天进行调查,记录启动情况、出愈伤和生芽情况以及愈伤和芽的生长状况。启动是指外植体有生长迹象,如现绿、皱缩卷曲、不同程度的加厚及伸长等。启动率=表现皱缩加厚的外植体数/接种的外植体总数×100%;诱导愈伤率=出现愈伤的外植体数/接种的外植体总数×100%;出芽率=出现芽或芽丛的外植体数/接种的外植体总数×100%。

继代培养试验于培养后35天调查愈伤及芽的增殖倍数。生根培养试验于培养后50天调查根数和根长。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对黄花菜诱导培养的影响

表1 不同培养基对黄花菜诱导培养的影响

处理号	培养基	培养后 7d		培养后 18d		培养后 45d	
		启动率 (%)	愈伤率 (%)	诱导愈伤率 (%)	愈伤生长情况	出芽率 (%)	芽生长情况
C1	MS+BA4.0mg/L+NAA0.4mg/L	60.0	20.0	20.0	浅黄色、紧实	20.0	苗势一般、稍畸形
C2	MS+BA4.0mg/L+NAA0.2mg/L	33.3	0	0		33.3	苗势一般、稍畸形
C3	MS+BA4.0mg/L+NAA0.1mg/L	33.3	66.6	66.7	浅黄色、紧实	33.3	芽壮、无畸形
C4	MS+BA3.0mg/L+NAA0.4mg/L	66.7	66.7	100	浅黄色、紧实	0	
C5	MS+BA3.0mg/L+NAA0.1mg/L	100	50.0	75.0	浅黄色、紧实	75.0	芽壮、无畸形
C6	MS+BA2.0mg/L+NAA0.4mg/L	100	50.0	50.0	浅黄色、松散	25.0	芽壮、无畸形
C7	MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L	100	75.0	75.0	浅黄色、松散	20.0	芽壮、无畸形
C8	MS+BA2.0mg/L+NAA0.1mg/L	50.0	50.0	100	浅黄色、松散	25.0	芽壮、无畸形

表2 不同培养基对黄花菜增殖培养的影响

处理号	培养基	愈伤增殖 (倍)	芽增殖 (倍)
D1	MS+BA4.0mg/L+NAA0.2mg/L	3.30	2.00
D2	MS+BA4.0mg/L+NAA0.1mg/L	5.50	4.50
D3	MS+BA3.0mg/L+NAA0.4mg/L	3.00	1.70
D4	MS+BA3.0mg/L+NAA0.1mg/L	0.35	0
D5	MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L	2.50	2.50

注:表中数据为培养35天后的调查结果。

将黄花菜茎尖接入8种诱导培养基中,诱导培养结果见表1。从表1可以看出,培养7天后所有培养基上的外植体都出现不同程度的皱缩、卷曲和加厚,说明8种培养基处理均能启动诱导,其中以C1、C4、C5、C6、C7培养基的启动率较高;培养18天后,除C2培养基外,其余7种培养基都有愈伤出现,其中C3、C4、C7培养基诱导的愈伤率较高;培养45天后,C3、C4、C5、C7、C8培养基诱导的愈伤率均较高,而C5培养基的出芽率则最高,为75.0%。

试验结果表明,外植体接入诱导培养基中培养1周左右开始萌动,其中在C3、C5、C7培养基中培养3周左右可形成明显的愈伤组织,随后分化出丛生芽,且愈伤与芽丛生较好,少数培养基处理不经愈伤直接出芽(如C2培养基)或只长愈伤不分化出芽(如C4培养基)。从培养45天后愈伤及芽丛的诱导结果及生长状况综合来看,MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L(C5培养基)培养基能诱导出质量高的愈伤及芽丛,且诱导的愈伤率和出芽率均较高,可以作为黄花菜茎尖诱导的最佳培养基。

2.2 不同培养基对黄花菜增殖培养的影响

黄花菜外植体继代培养35天后的生长情况见表2。从表2可以看出,除D4培养基外,其他培养基均有愈伤和芽丛发生,D1、D2、D5培养基的愈伤和芽增殖倍数均较高,其中D2培养基的愈伤和芽的增殖倍

数最高。说明在黄花菜增殖培养中,采用MS+BA 4.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基的效果最佳。

2.3 不同培养基对组培苗生根培养的影响

当黄花菜组培苗长至高约2 cm时接入4种生根培养基中,培养50天后组培苗的生根及生长情况调查结果见表3。从表3可以看出,4种培养基都能促进生根,其中以R2、R4培养基的组培苗表现较好,即生根数较多、根较长且粗壮、叶片宽大、苗较健壮。说明

表3 不同培养基对组培苗生根培养的影响

处理号	培养基	单株生根数(条)	每条根长(cm)	组培苗生长状况
R1	1/2MS+ NAA0.075mg/L	6.67	6.07	少量叶片发黄,根中等壮,苗较弱
R2	1/2MS+ NAA0.2mg/L	8.75	8.25	叶片宽大,根粗壮,苗健壮
R3	1/2MS+ NAA0.5mg/L	6.80	6.93	叶片较窄,根中等壮,苗较弱
R4	1/2MS+ IBA0.2mg/L	7.60	7.58	叶片宽大,根粗壮,苗健壮

注:表中数据为培养50天后的调查结果。

NAA(0.2 mg/L)和 IBA(0.2 mg/L)都能较好地促进黄花菜组培苗生根, NAA 浓度太高和太低都不适宜,其中以 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 或 1/2MS+ IBA 0.2 mg/L 作生根培养基较好。

3 结论与讨论

3.1 黄花菜组培再生系统的生长周期很明显,茎尖接入诱导培养基培养1周左右开始膨大、启动,约2周左右开始诱导出淡黄绿色愈伤组织,随后愈伤不断生长,至6周左右愈伤组织变绿开始分化增多、出现芽丛并长出许多新生芽点;带愈伤的芽丛接入继代培养基中进行增殖培养5周左右,愈伤及芽丛不断增多;生长较大的芽苗接入生根培养基中培养5周后能长出很好的根系,炼苗3~5天后移栽于栽培基质中,成活率达90%以上。本研究结果表明,黄花菜丛芽的增殖倍数达到4.5倍,通过反复继代,可达到大量繁殖的目的。

3.2 本研究结果初步表明,黄花菜以茎尖为外植体进行组培快繁,可采用诱导培养基 MS+BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、继代培养基 MS+BA 4.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、生根培养基 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 或 1/2MS+ IBA 0.2 mg/L 的组织培养再生系统。

3.3 据试验观察,黄花菜茎尖诱导愈伤过程中,初次出现的愈伤越紧实且表面有小颗粒状分布的,则增殖及生成芽丛的能力越强,而诱导的愈伤越松散则再生

能力越差。从茎段切成茎尖时,原则上苞叶剥离干净的则愈伤诱导早且生长快,可能是残留的苞叶继续生长会吸收激素而使愈伤诱导减慢。

3.4 据有关研究,黄花菜采用根状茎作外植体的再生效果很好^[3],但取材受时间限制。而采用花器官作外植体的研究结果显示花瓣的效果好于花茎^[7],但花器官作外植体取材也受到生长季节的限制。本试验取材不受季节限制,且能诱导愈伤及丛生芽共生体,出苗健壮易成活,是一种较实用的组培再生方法。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 朱靖杰,张桂和,赵叶鸿.黄花菜的离体培养中胚状体的发生和再生苗植株形成的研究[J].湖南大学学报(自然科学版),1996,12(4):321-324.
- [3] 苏承刚,张兴国,张盛林.黄花菜根状茎组织培养研究[J].西南农业大学学报,1999,21(5):427-429.
- [4] 赵国林,李师翁.黄花菜离体花梗愈伤组织发生与器官再生的细胞学观察[J].植物学报,1989,31(6):484-486.
- [5] 范银燕,崔根芳.黄花菜的无性系快繁技术研究[J].山西农业科学,1994,22(4):22-24.
- [6] 董雅茹,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(2):10-11.
- [7] 唐世建,刘杰,洪亚辉,等.黄花菜组织培养在工厂化繁殖中的应用[J].湖南大学学报(自然科学版),2003,29(6):492-495.

我国农作物新品种培育取得重大进展

国家863计划“优质超高产农作物新品种培育”重大专项目前已超额完成预期目标和任务,并完成总结验收。专项实施4年来,我国农作物新品种培育在5个方面取得了重大进展:(1)超级稻育种技术不断完善,研究成果继续保持国际领先;(2)小麦高产优质与杂优化育种进展迅速,实现了高产与优质的重大突破;(3)玉米杂种优势利用技术体系初步构建,奠定了我国玉米高效育种的技术基础;(4)油菜隐性上位互作核不育技术研究取得重要突破,解决了杂交油菜选育和制种技术中的世界性难题;(5)主要农作物分子标记辅助育种技术成功用于种质创新和新品种培育,显著提高了定向育种水平。

据科技部有关负责人介绍,通过专项研究,在建立作物现代育种创新技术体系的基础上,全面提升我国主要农作物育种水平,培育优质、高产、超高产新品种,不仅为国家粮食安全提供技术支撑,也为农民增收、农业增效、结构调整提供了优质、高产品种保障。

“优质超高产农作物新品种培育”是国家863计划支持的重大专项计划,专项投入经费总额1.4亿元,主要开展水稻、小麦、棉花、大豆、玉米、油菜、薯类、花生和蔬菜等农作物现代高效育种技术体系的构建、新品种繁育技术和产业化研究。

(本刊编辑部)