

大花萱草‘莎蔓’的组织培养技术研究

杨丽莉¹, 张晓², 杨睿¹, 张彦琴¹

(1. 山西省农业科学院 旱地农业研究中心, 山西 太原 030006; 2. 山西省襄垣县第二中学, 山西 襄垣 046200)

摘要:以大花萱草‘莎蔓’子房为外植体, 对其组织培养中愈伤组织诱导分化、试管苗繁殖的激素配比对繁殖效率的影响以及生根培养基的设置和驯化栽培方法等关键技术参数进行系统研究。结果表明:‘莎蔓’子房愈伤组织诱导最佳培养基为 MS+4 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+1 mg/L 2,4-D, 不定芽分化率可达 49.2%; 在 3 mg/L 6-BA、(0.3~0.5)mg/L IBA 时, 繁殖系数可达 5.8~6.4 倍。适宜的生根培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA+20 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂, 平均试管苗生根数达 5.7 条。组培过渡苗栽培基质为粗河沙、蛭石+泥炭土、泥炭土均可, 条件控制在温度 24~28℃, 相对湿度 85%~90%, 移栽成活率可达到 90%。

关键词:萱草; 外植体; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0134-04

萱草(*Heemerocallis hybrida*)为百合科萱草属多年生宿根草本植物。主要分布于亚洲温带至亚热带地区, 欧洲南部有少量分布, 我国是世界上萱草属植物种类最多、分布最广的国家。野生品种的大花萱草广泛分布于我国南方和北方大部分地区, 适应性非常广, 适合于各种土壤, 花多为黄色, 并可食用, 俗称“黄花菜”, 是重要的保健食品。

大花萱草(*Heemerocallis fulva* var. *flore-pleno*)通常也称为多倍体萱草。大花萱草品种繁多, 花型丰富多彩, 花色繁多艳丽, 既可观花又可观叶, 可广泛用于切花、盆栽及园林绿化等。大花萱草的短根状茎和肉质肥厚的纺锤状块根表现出较强的抗旱、抗寒、抗盐碱、抗病虫害等优点。‘莎蔓’是 20 世纪 90 年代初从欧美引进的多倍体品种。叶修长似兰草叶, 丛生; 株丛高 35~45 cm。花葶高 50 cm, 粗壮, 抗倒伏能力强; 每花葶可着花十几朵, 陆续开放; 花瓣外卷呈金黄色, 直径可达 10 cm。花期 6 月中旬至 9 月中旬。其特点是耐寒性极强, 在北方地区绿期可持续到 11 月, 长江以南地区可以常绿过冬, 是园林绿化中重要的花境植物品种, 目前鲜见应用于园林绿化和景观建设。

‘莎蔓’的自然繁殖方式是分蘖繁殖, 每年分蘖 2~3 株, 而且不结实或很少结实, 繁殖效率低, 需要利用植物组织培养技术对引进的萱草品种进行种苗的大量繁

殖, 以满足园林市场需求, 解决限制‘莎蔓’繁殖速度的瓶颈问题。大花萱草的组织培养研究已有部分报道^[1-6], 但是, 通过文献检索和研究发现不同大花萱草品种、不同外植体的培养方法、愈伤组织诱导分化培养基配方对萱草启动培养效果和繁殖效率存在较大差异。该试验对大花萱草‘莎蔓’组织培养技术中的愈伤组织诱导分化、试管苗繁殖的激素配比对繁殖效率的影响以及生根培养基的设置和驯化栽培方法等关键技术参数进行了比较系统的研究, 以期为实现‘莎蔓’组织培养工厂化育苗提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于山西省农业科学院旱地农业研究中心(山西太原)苗圃种植的 2~3 a 生分蘖苗, 取样时间为每年 5~8 月的盛花期。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导分化培养 取大田发育正常的花蕾, 用自来水冲洗干净外部的灰尘。用 75%(v/v)的乙醇浸泡 3~5 min 后, 再用 0.1%(w/v)HgCl₂ 灭菌 15 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 吸干水分备用。无菌条件下剪切外部花瓣, 剥离出子房, 分切成薄片状, 接种于不同的愈伤组织诱导培养基上, 每个培养皿接 20~30 个子房切片, 每种培养基接 60~80 块左右。25℃暗培养 30 d, 统计愈伤组织数, 计算愈伤组织诱导率, 愈伤组织诱导率=(愈伤组织数/接种外植体数)×100%。愈伤组织诱导培养基见表 1。选择生长状况比较一致的不同诱导培养基上的愈伤组织 60 块分别转接入相同的分化培养基, 置于培养箱中 25℃条件下, 光照培养 12 h/d, 光照强

第一作者简介:杨丽莉(1964-), 女, 河北唐山人, 本科, 副研究员, 现主要从事花卉苗木繁育及农业生物技术研究工作。E-mail:lylylele@yahoo.com.cn.

基金项目:山西省科技攻关资助项目(041012-3)。

收稿日期:2012-06-11

度 2 000~3 000 lx, 30 d 统计再生不定芽的愈伤数, 计算愈伤组织再生频率, 愈伤组织再生频率 = (分化愈伤组织数/接种愈伤组织数) × 100%。分化培养基 MS+1 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH 5.8。

表 1 愈伤组织诱导培养基 mg/L

培养基号	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
6-BA	1	1	2	2	3	3	4	4	5	6
2,4-D	—	1	—	1	—	1	—	1	—	—

注: 基本培养基: MS+0.3 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH 5.8。

1.2.2 试管苗的增殖培养 选取以上分化良好、大小均匀的无菌苗剪切叶片, 留 2~3 cm 的小苗转接到用于不同研究内容的培养基上(表 2), 每瓶 7 株, 每种培养基 10 瓶。25℃光照培养 24~28 d, 分别统计增殖苗的数量, 计算繁殖系数。增殖倍数 = 繁殖系数 = 增殖苗数/原接种小苗数。

表 2 不定芽增殖激素培养基 mg/L

培养基号	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈
6-BA	3	3	3	3	2	2	2	2
NAA	0.5	0.3	—	—	0.5	0.3	—	—
IBA	—	—	0.5	0.3	—	—	0.5	0.3

注: 基本培养基: MS+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉, pH 5.8。

1.2.3 生根培养 无根试管苗接种在不同的生根培养基上(表 3)进行光培养, 光照强度 2 000~3 000 lx, 温度 (25±1)℃。每瓶接 7 株无根苗, 每种培养基接种 5 瓶, 共 35 株。第 10 天开始观察、记录生根状况。27 d 测量根长, 统计生根数, 计算生根率。生根率 = 生根苗数/接种小苗数 × 100%。

表 3 生根培养基 mg/L

培养基号	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
IBA	0.2	0.4	0.6	—	—	—
NAA	—	—	—	0.2	0.4	0.6

注: 基本培养基: 1/2MS+20 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂, pH 5.8。

1.2.4 驯化移栽 在温室内打开瓶盖, 自然光下练苗 3 d 后, 取出小苗洗净根部的培养基; 再用 0.1% 多菌灵药水浸泡根部, 移植在温室内不同基质的营养钵中浇透水。每周用 0.1% 的百菌清或多菌灵喷雾消毒 2 次。前 1 周遮盖 60% 的遮荫网, 并保持一定的温度、湿度和光照。

2 结果与分析

2.1 子房切块愈伤组织的诱导、分化培养

在 10 种不同激素配比的愈伤组织诱导培养基上分别接种子房切片, 1 周后子房切片的边缘开始膨大, 形成边缘隆起、中间凹陷成凹饼状, 20 d 开始在中间凹陷部分出现白色、松散状愈伤组织。30 d 时逐渐形成淡黄绿色半透明愈伤组织块。愈伤组织诱导率及愈伤组织色

泽、结构和状态在不同培养基上的表现存在很大差异。由表 4 可知, 在只有 6-BA 的培养基上, 随着 6-BA 浓度的升高, 愈伤组织的生长量增大。6-BA 为 2 mg/L(F₂) 和 3 mg/L(F₅) 时, 愈伤组织的生长状态最好, 呈黄绿色, 结构较紧密, 6-BA 达到 4~6 mg/L 时愈伤组织呈黄白色松散结构。同时添加 6-BA 和 2,4-D 的培养基上子房切块产生的愈伤组织比单纯 6-BA 培养基上的量大, 其中 2~3 mg/L 6-BA 和 1 mg/L 2,4-D, 愈伤组织状态最好, 呈黄绿色, 结构致密。

将愈伤组织分别转接入配方相同的分化培养基进行光照继代培养, 观察发现: 第 5 天起, 愈伤组织的颜色由黄绿色变成绿色(图 1), 愈伤组织表面出现大量小米粒大小的绿色突起, 继而分化出不定芽(图 2)。在低细胞分裂素浓度 1~2 mg/L 6-BA 时, F₁~F₄ 诱导的愈伤组织分化频率较低。6-BA 浓度为 3 mg/L 时, F₅~F₆ 诱导的愈伤组织分化率最高, 为 47.4%~49.2%。6-BA 浓度为 4 mg/L 时, F₇~F₈ 诱导的愈伤组织分化率开始下降; 随着 6-BA 浓度的继续升高至 5~6 mg/L 时, F₉~F₁₀ 分化率下降到最低, 只有 15.6%。有 1 mg/L 2,4-D 存在的培养基诱导的愈伤组织分化率比单纯 6-BA 高。因此, ‘莎蔓’子房的愈伤组织诱导分化最适宜的培养基是: MS+3 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D+0.3 mg/L IBA, 诱导分化率最高, 为 49.2%。

表 4 ‘莎蔓’萱草子房愈伤组织的诱导分化率

培养基号	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
接种数/个	60	63	79	67	76	69	82	75	78	64
分化数/个	14	16	27	24	36	34	32	28	21	10
分化率/%	23.3	25.4	34.2	35.8	47.4	49.2	39.0	37.3	26.9	15.6

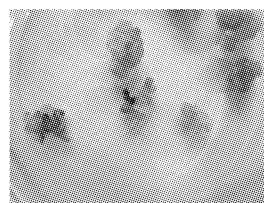


图 1 愈伤组织诱导

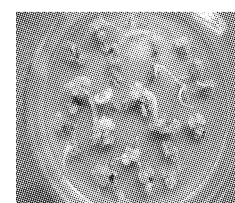


图 2 愈伤组织分化不定芽

2.2 不同激素对比对不定芽增殖的影响

将上述诱导分化的不定芽切下, 接种在不同激素配比的培养基上, 光照培养 28 d, 从表 5、图 3 可知, 3 mg/L 6-BA(Y₁~Y₄) 培养基上的不定芽繁殖系数高于 2 mg/L 6-BA(Y₅~Y₈) 培养基, 繁殖系数可达到 5.8~6.4。相同浓度 6-BA, 不同浓度 NAA 或 IBA, 试管苗的生长状态没有明显的变化。但是, 在分别含 NAA 和含 IBA 的培养基上, 苗的生长状态有明显的差别。含 IBA 的培养基上, 试管苗高、叶窄、生长整齐, 有利于后期生根培养; 含 NAA 的培养基上, 试管苗矮小、叶宽, 分切后单苗基部粗大, 对后期的生根不利。因此, 试管苗继代

繁殖最适培养基为 MS+3 mg/L 6-BA+0.3~0.5 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂粉,繁殖系数最高,为 5.8~6.4。

表 5 不同激素培养基对‘莎蔓’试管苗繁殖系数的影响

培养基号	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈
接种苗数/株	70	70	70	70	70	70	70	70
繁殖苗数/株	385	371	448	406	308	238	329	294
繁殖系数	5.5	5.3	6.4	5.8	4.4	3.4	4.7	4.2

2.3 再生植株的生根培养

将继代培养得到的 2~3 cm 高、生长健壮的试管苗接种到生根培养基上,观察、记录,统计不同时间生根数、27 d 测量根长。由表 6 可知,IBA 和 NAA 均能使试管苗生根,生根率达 100%。但不同种类、不同浓度对试管苗生根的效果不同。观察发现,‘莎蔓’试管苗的根出现比较早,9 d 时就开始出现乳白色根状突起,而后迅速伸长。添加 NAA 的培养基 G₄~G₆,试管苗生根比 IBA 早,前期生根数多,27 d 时,根粗且短;但 IBA 培养基 G₁~G₃ 上的试管苗的根普遍比 NAA 长。根的多少是影响试管苗移栽成活率的主要因素,根多成活率高,根少成活率低。G₅ 培养基平均生根数最多可达 5.7 条,最佳生根培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA+20 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂(图 4)。

表 6 ‘莎蔓’在不同培养基、不同时间内生根数、根长统计(35 株、27 d)

培养基	生根数/条				平均根数/条	平均根长/cm
	9 d	14 d	18 d	23 d		
G ₁	14	52	87	98	2.8	4.17
G ₂	23	83	122	132	3.8	4.28
G ₃	27	94	116	121	3.5	3.98
G ₄	52	112	152	160	4.6	3.55
G ₅	64	145	183	199	5.7	3.41
G ₆	37	125	176	184	5.3	3.39



图 3 试管苗继代繁殖



图 4 试管苗的生根状况

2.4 试管苗的驯化与栽培

试管苗的过渡栽培环节是植物组织培养最后一个重要环节。首先移栽前必需清洗根部琼脂,再用 0.1% 多菌灵药水浸根,每周喷施 2 次 0.1% 的百菌清抑制杂菌的危害;温室温度控制在 24~28℃,相对湿度 85%~90% 适合大花萱草的驯化栽培。将‘莎蔓’组培苗移栽到 3 种介质:粗河沙、蛭石+泥炭土(3:1)和泥炭土,成活率均能达到 90% 以上,并在短时期内生长良好。

3 结论

以高 6-BA 浓度 4 mg/L 诱导‘莎蔓’萱草子房组织脱分化产生愈伤组织,低 6-BA 浓度 1 mg/L 诱导愈伤组织分化再生植株,2,4-D 对愈伤组织的诱导起到一定的促进作用。最适宜的愈伤组织诱导培养基为:MS+4 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂,愈伤组织分化率可达 49.2%。

在不定芽继代增殖培养的过程中,6-BA 的浓度对增殖效率起着决定性的作用;生长素 NAA 和 IBA 对试管苗的生长状态的影响效果不同。以 MS+3 mg/L 6-BA+(0.3~0.5)mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂的培养基最适合增殖培养,繁殖系数最高可达 5.8~6.4 倍,试管苗生长健壮、整齐。

试管苗适宜的生根培养基为 1/2MS+0.4 mg/L NAA+20 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂,平均试管苗生根数为 5.7 条。组培过渡苗栽培基质为粗河沙、蛭石+泥炭土、泥炭土均可,条件控制在温度 24~28℃,相对湿度 85%~90%,移栽成活率可达到 90%。

参考文献

- [1] 杨乃博. 杂种大花萱草的试管繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1985(5):39.
- [2] 王汉海,程贯召,杜延飞. 大花萱草新品种“金娃娃”的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2002,38(5):458.
- [3] Chen C H, Holden D J. Organogenesis in daylily callus[J]. Proc S D Acad Sci, 1972,51:141-149.
- [4] 刘先芳,罗军,吴铁明. 重瓣大花萱草组织培养快速繁殖的研究[J]. 湖南林业科技, 2001,28(4):41-43.
- [5] 王晓娟,金樑,陈家宽. 大花萱草不同外植体诱导愈伤组织的比较研究[J]. 生命科学研究, 2005,9(3):242-246.
- [6] 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.

Study on Tissue Cultivation Technique in the *Hemerocallis hybrida* ‘Shaman’

YANG Li-li¹, ZHANG Xiao², YANG Rui¹, ZHANG Yan-qin¹

(1. Research Centre of Arid Farming, Shanxi Academy of Agricultural Science, Taiyuan, Shanxi 030006; 2. Second Middle School in Xiangyuan County, Xiangyuan, Shanxi 046200)

石榴叶片蛋白提取方法研究

田忠景, 康美玲, 王秀文

(枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160)

摘要:以“大红袍”石榴叶片为试材,研究比较了三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法、Tris-HCl 提取法和酚-甲醇/醋酸铵沉淀法对石榴叶片总蛋白质的提取效果间的差异。结果表明:TCA/丙酮沉淀法所得电泳图谱背景不清晰;酚-甲醇/醋酸铵沉淀法步骤繁琐,蛋白质信息量少;Tris-HCl 提取法为最适方法,所得图谱背景清晰,蛋白质信息量最大。

关键词:石榴;蛋白质组;垂直板电泳;考马斯亮蓝染色

中图分类号:Q 51 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0137-03

石榴(*Punica granatum* Linn)为石榴科石榴属落叶灌木或小乔木,又名若榴、安石、丹若^[1],原产伊朗、阿富汗等中亚地带。山东枣庄峄城为了更好地利用石榴资源,建立了冠世榴园风景区和国家级石榴种质资源圃。蛋白质组学可以通过对蛋白质性质、结构和丰度的考察来揭示其功能^[2-5],进而找到不同品种、不同组织和部位等的差异蛋白,使之成为筛选的靶分子,指导基因组的分析。如今与蛋白质相关的研究技术取得了突飞猛进的发展并开始在很多领域得到广泛应用。蛋白质组的研究在农作物和果树方面也取得了较大的进展,但果树方面有关石榴的蛋白质组研究仍鲜见报道,而获得高质量的蛋白质是进一步研究的基础,该研究对石榴叶片蛋白质的提取条件进行了探索,以获得高效、丰富的蛋白质,进而为更好的研究石榴蛋白质组奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以“大红袍”石榴叶片为材料,样品采自驿城石榴国

家种质资源圃。采取时间 2011 年 7 月 28 日,采摘后即放入冰盒,带回实验室后于液氮中保存备用。

1.2 试验方法

采用 3 种不同的方法从石榴叶片中提取蛋白质并采用 PAGE 电泳进行分析鉴定。

1.2.1 三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀法 取“大红袍”冷冻叶片,利用液氮进行研磨,研磨完毕准确称取 0.5 g“大红袍”叶片粉末至 10 mL 离心管中,加 3 mL 预冷 10% TCA/丙酮^[6],冰箱内沉淀过夜,4 000 r/min 离心 10 min,加入 5 mL 冷丙酮充分震荡至沉淀完全溶解,4 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次,以便完全去除叶绿素等杂质,再加入 5 mL 80%冷丙酮充分溶解沉淀,4 000 r/min 离心 10 min,室温风干,待丙酮挥发完后(在通风橱内),加入蛋白质裂解液^[7] 2 mL(12 mL 冰醋酸,18 g 尿素加蒸馏水溶解,再加 4 mL TEMED,0.05 g 甲基绿定容至 100 mL),振荡器震荡 2~4 h,以使蛋白质充分溶解于蛋白质裂解液中,3 800 r/min 离心 10 min,取上清即为待测蛋白质上样液。

1.2.2 酚-甲醇/醋酸铵沉淀法 取“大红袍”冷冻叶片,利用液氮进行研磨,然后快速称取 0.5 g 叶片粉末至 10 mL 离心管中,加入 3 mL 预冷的丙酮(含少量 β -巯基

第一作者简介:田忠景(1978-),男,硕士,讲师,研究方向为生化与分子生物学。E-mail:jingzt03@163.com.

收稿日期:2012-05-16

Abstract: Using ovary of *Hemerocallis hybrida* ‘Shaman’ as explant, callus induction and differentiation, the effect of hormone combinations on reproductive efficiency of plantlets, setting of rooting medium, the key technical parameters of domestication and cultivation in the process of its tissue culture were systematically studied. The results showed that the best culture medium of ‘Shaman’ callus differentiation was MS+4 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA+1 mg/L 2,4-D and adventitious bud differentiation rate reached 49.2%. When 6-BA concentration was 3 mg/L and (0.3~0.5)mg/L IBA, propagation coefficient would be possible to reach 5.8~6.4 times. The suitable rooting medium included 1/2 MS+0.4 mg/L NAA+20 g/L sucrose+6.5 g/L agar, the average rooting number reached 5.7 roots. The substrate for transitional cultivation of tissue culture seedling was thick riversand, vermiculite+peat soil, peat soil, when the temperature was 24~28℃, the relative humidity was 85%~90%, survival rate of tube seeding reached 90%.

Key words: *Hemerocallis hybrida*; explant; callus; tissue culture