

黄花菜不同外植体形成的 愈伤组织再生苗观察*

周朴华 何立珍

(湖南农学院, 长沙 410128)

提 要 研究了黄花菜不同外植体愈伤组织的形成与植株再生。结果表明, 出愈率是花柄 > 花茎 > 叶片。愈伤组织在 MS + 6-BA 2mg/L 的培养基上出现致密愈伤组织颗粒, 经增殖→分割→增殖的程序逐渐形成“球状体”似的愈伤组织。叶片、花茎形成的球状体经 20 代继代培养, 再生能力没有减退, 苗形态正常, 根尖细胞染色体数目为 $2n=2x=22$ 。该球状体经秋水仙素处理获得多种形态的四倍体苗和少数重复加倍现象。花柄球状体再生苗中出现了叶片花瓣状或类似花蕾状的形态异常苗, 其频率与花柄所处的花期及花蕾大小有密切关系。再生异常苗的球状体继代培养, 或者由异常苗叶片重新形成的球状体仍然再生异常苗。花柄球状体经秋水仙素处理, 获得的变异株其染色体数目类型较多。因而不宜用花柄作黄花菜快速繁殖的外植体。

关键词 黄花菜; 外植体; 愈伤组织; 染色体

我们以黄花菜 (*emerocallis citrina* Bar.) 为材料, 进行了植物细胞工程的应用基础研究^[1-3], 并在黄花菜良种试管苗工厂化生产的研究方面积累了一定的经验^[4]。观察到叶片、花茎所形成的球状体再生苗形态正常, 而以花柄为外植体形成的球状体再生苗出现了形态异常。为了建立可靠的快速繁殖程序, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

- 1.1 材料 供试材料为湖南省黄花菜栽培优良品种“长嘴子花”的花柄、叶片、花茎。
- 1.2 愈伤组织诱导、继代培养 取叶片、花茎, 并按始花期、盛花期、末花期取不同花蕾长度的花柄为外植体, 先用 70% 酒精擦洗表面, 再放入 0.1% 升汞溶液消毒 15 分钟, 在超净工作台上用无菌水冲洗 4—5 次, 并将外植体切成小段培养在 MS + 2,4-D 2mg/L + 6-BA 0.5mg/L + 蔗糖 3%, pH 5.8 的琼脂固体培养基上诱导愈伤组织。一定大小的愈伤组织转入 MS + 6-BA 2mg/L + 蔗糖 3%, pH 5.8 的琼脂固体培养基上继代培养。在继代培养中, 愈伤组织有芽的分化及似“球状体”的致密愈伤组织形成, 将球状体继代培养, 增殖、分化。培养温度 26℃ 左右, 光照 1500—2000lx。
- 1.3 再生四倍体苗的球状体继代培养 按周朴华等人^[5]的方法建立四倍体球状体, 并在 MS + 6-BA 2mg/L + 蔗糖 3%, pH 5.8 的琼脂固体培养基上继代培养, 增殖、分化。
- 1.4 再生苗生根及根尖染色体鉴定 再生苗生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.5—1mg/L

本文于 1992 年 1 月 30 日收到, 1992 年 5 月 19 日收到修改稿。

* 湖南省农业厅资助项目。

(或 IAA 0.5—1mg/L) + 蔗糖 2—3%, pH 5.8 的琼脂固体培养基或液体培养基。生根后, 移入水培练苗、移栽。

再生苗根尖细胞染色体数目鉴定, 用饱和对二氯苯预处理根尖, 0.075mol/L KCl 前低渗, 2.5% 纤维素酶和 2.5% 果胶酶去壁, 蒸馏水后低渗, 甲醇冰醋酸 (3:1) 固定, 制成细胞悬浮液, 在冰冻载玻片上制片, 火焰上微干, 醋酸洋红染色, 正丁醇脱水, 加拿大树胶封片, 在摄影显微镜下观察并摄影。

2 观察结果

2.1 愈伤组织的诱导及球状体的建立

外植体接种在 MS + 2,4-D 2mg/L + 6-BA 0.5mg/L 固体培养基上培养。一个星期左右, 伤面肿胀。20天后, 伤面上陆续出现愈伤组织。少数花柄外植体上还直接产生不定

表 1 不同外植体形成愈伤组织频率的差异

Table 1 The frequency differences of calli formation from different exdlants

材 料 Material	接种数 (块) No. of material plated	出 愈 数 No. of Calli induction	出 愈 率 % Frequency of Calli induction
花 柄 Flower stalk	40	30	75
叶 片 Leaf blade	40	13	30.24
花 茎 Flower stem	40	23	57.50

苗。表 1 所列资料说明, 不同外植体诱导愈伤组织的频率有明显差异, 出愈率是花柄 < 花茎 > 叶片。表 2 进一步说明, 黄花菜花柄诱导愈伤组织的频率与花蕾的花期及大小有密切关系。以盛花期取材最好, 其次是始花期, 最差是末花期。在始花期和盛花期, 以花蕾长度 1.0—1.5cm 的花柄作外植体培养, 诱导愈伤组织频率高。

愈伤组织转入到 MS + 6-BA 2mg/L 的固体培养基上培养, 有芽的分化。并在表面产生颗粒状或块状的致密愈伤组织。将该种致密愈伤组织转入新鲜的 MS + 6-BA 2mg/L 固体培养基上培养增殖, 按照分割 → 增殖 → 分割 → 增殖的程序继代培养形成“球状体”似的愈伤组织。球状体一般浅黄绿色, 不规则球形, 中间微凹, 多个结合在一起。有的球状体具环状轮纹, 从轮纹上多处再生不定芽, 芽纤细, 可在继代培养中将其淘汰。球状体继代培养时, 用手术刀切开, 继续从伤面增殖新球状体, 再生的芽健壮 (图版 I : 1)。

对球状体还进行了组织学观察。分生细胞分散在薄壁组织中, 它是由某些薄壁细胞脱分化而来, 进一步形成分生细胞团 (图版 I : 5), 并再分化形成芽原基 (图版 I : 6)。而比较多的分生细胞团细胞分裂, 分化为薄壁细胞, 加到原薄壁组织中, 使球状体体积增大。球状体的分生细胞团多分布在接近表皮以下数层细胞中, 芽的分化属外起源。在培养中球状体外层有一圈栓质化物质形成。及时切割球状体, 打破栓质的包围、封锁, 从伤面又增殖新的球状体。

2.2 叶片、花茎形成的球状体再生苗, 及秋水仙素的诱变处理和继代培养

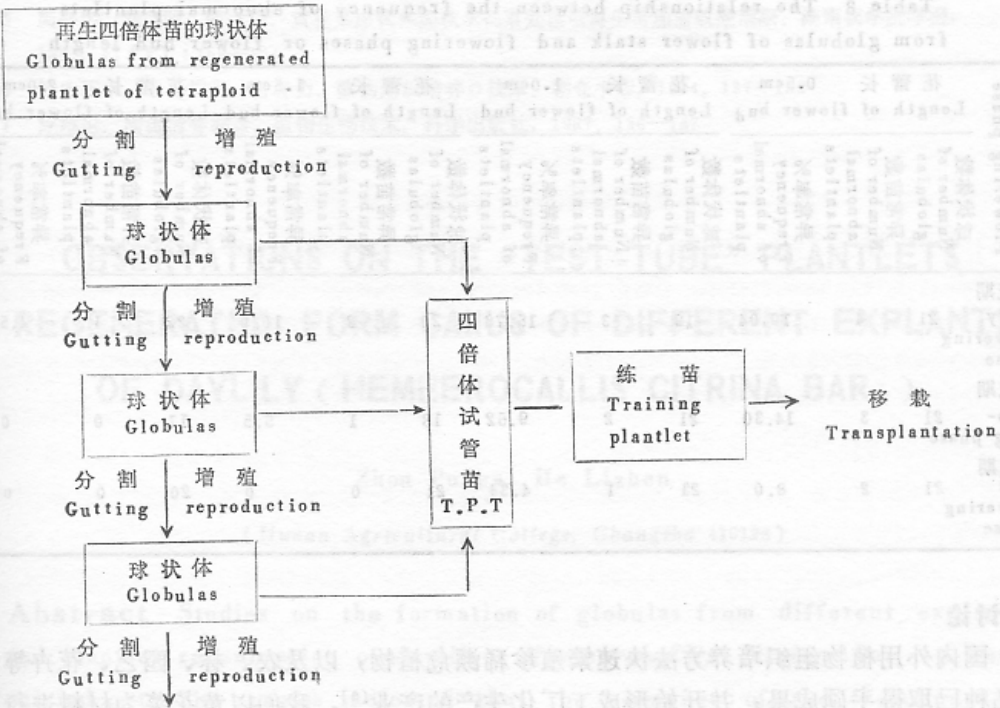
2.2.1 球状体的苗再生及继代培养 来自叶片、花茎的球状体在 MS + 6BA 2mg/L 培养基上培养, 再生苗形态正常 (图版 I : 7), 转入生根培养基生根; 在 MS + 6BA 2mg/L + IAA 0.5—1.0mg/L 培养基上既长芽又生根。根尖细胞染色体数目鉴定为 $2n = 2x = 22$

表 2 不同花期不同大小花蕾的花柄培养诱导愈伤组织频率的差异
Table 2 Frequency differences of calli induction from flower stalks in different flowering periods and different flower bud length

花 期 Flow- ering phase	花 蕾 长 0.5cm Length of flower bud 0.5cm			花 蕾 长 1.0cm Length of flower bud 1.0cm			花 蕾 长 1.5cm Length of flower bud 1.5cm			花 蕾 长 2.0cm Length of flower bud 2.0cm		
	花柄数 No. of flower stalk	出愈数 No. of calli induction	出愈率 % Frequency of calli induction	花柄数 No. of flower stalk	出愈数 No. of calli induction	出愈率 % Frequency of calli induction	花柄数 No. of flower stalk	出愈数 No. of calli induction	出愈率 % Frequency of calli induction	花柄数 No. of flower stalk	出愈数 No. of calli induction	出愈率 % Frequency of calli induction
始花期 Early flow- ering phase	25	14	56.0	27	19	70.3	20	12	60.0	23	13	56.5
盛花期 Blooming phase	25	19	76.0	25	21	84.0	25	23	92.0	23	14	60.8
末花期 Last flow- ering phase	25	7	28.0	22	7	35.0	20	3	15.0	20	2	10.0

(图版 I : 9)。球状体经20代的分割、增殖，苗的再生(20—25天为一代)植株形态正常。对第20代来自叶、花茎球状体再生苗进行了根尖细胞染色体数目初步检查，从中观察了来源于叶的11株再生苗的77个根尖细胞，来源于花茎的12株再生苗的94个根尖细胞，染色体数目均为 $2n = 2x = 22$ 。

2.2.2 再生四倍体苗的球状体继代培养 以秋水仙素诱变黄花菜叶片、花茎形成的球状体出现了稳定的四倍体再生苗(图版 I : 11)，约占83.1%，另外，还出现了少数重复加倍现象，约占16.9%(图版 I : 13)。经鉴定为四倍体苗后，即可用分割、继代培养的方法进行球状体快速增殖，其程序是：



定向选择再生宽叶型四倍体苗的球状体,连续10代继代培养后发现,仍为宽叶型四倍体苗,其根尖细胞染色体数目有待继续观察。

2.3 花柄培养形成的球状体再生苗及秋水仙素诱变处理

2.3.1 花柄球状体苗的再生及继代培养 花柄球状体再生苗大多数形态正常、健壮。少数再生苗形态异常,叶片花被状(图版 I : 2),或者花被状叶片丛生在一个类似花柄的棒状物上,心叶拳卷(图版 I : 3),叶片一般淡绿色或淡黄色。转入 $1/2MS + IAA 1mg/L$ 的生根培养基上能生根,移栽也能成活,叶片始终花被状,淡黄绿色,心叶拳卷,植株矮,呈莲座状。

花柄球状体还分化出形似花蕾的再生物(图版 I : 4),切开无雌蕊、雄蕊。培养一段时间凋萎死亡。

从表 3 可清楚看到,异常苗频率的高低与花柄外植体所处的花期及花蕾大小有密切关系。在始花期、盛花期,花蕾越小的花柄为外植体时,所形成的球状体再生异常苗的频率越高,始花期又比盛花期的花柄球状体产生异常苗的频率高。

我们还研究了再生形态异常苗的球状体继代培养,及以花被状叶片为外植体新形成球状体无性系的继代培养。经连续 10 代的分割、增殖、分化观察,均是再生形态异常苗,叶片花瓣状。这为选择、淘汰提供了客观标准。

2.3.2 秋水仙素诱变花柄球状的效果 该球状体经秋水仙素处理后,变异株除 $2n = 4x = 44$ 的四倍体苗外,还出现了染色体数目为 $2n = 3x = 33$ 和 $2n = 7x = 77$ 等多倍体类型(图版 I : 12, 13)。

表 3 花柄球状体异常苗的频率与花期及花蕾大小的关系

Table 3 The relationship between the frequency of abnormal plantlets from globulas of flower stalk and flowering phases or flower bud length

花期 Flowering phase	花蕾长 0.5cm Length of flower bud				花蕾长 1.0cm Length of flower bud				花蕾长 1.5cm Length of flower bud				花蕾长 2.0cm Length of flower bud			
	球状体数 Number of globulas	异常苗数 Number of abnormal plantlets	异常率% Frequency of abnormal plantlets		球状体数 Number of globulas	异常苗数 Number of abnormal plantlets	异常率% Frequency of abnormal plantlets		球状体数 Number of globulas	异常苗数 Number of abnormal plantlets	异常率% Frequency of abnormal plantlets		球状体数 Number of globulas	异常苗数 Number of abnormal plantlets	异常率% Frequency of abnormal plantlets	
始花期 Early flowering phase	21	4	19.04		19	3	15.78		20	2	10.0		22	1	4.54	
盛花期 Blooming phase	21	3	14.30		21	2	9.52		18	1	5.5		17	0	0	
末花期 Last flowering phase	21	2	8.0		23	1	4.34		21	0	0		20	0	0	

3 讨论

国内外用植物组织培养方法快速繁殖珍稀濒危植物,以及农、林、园艺、花卉等优良品种已取得丰硕成果,并开始形成工厂化生产的产业^[6]。我们以黄花菜为材料进行了

比较系统的细胞工程研究,观察到由它所形成的球状体似的愈伤组织增殖速度快,再生苗的繁殖系数高。经20代继代培养的初步观察,来自叶片、花茎形成的球状体再生能力没有降低,植株形态及根尖细胞染色体数目未见变化,为黄花菜优良品种的快速繁殖奠定了一定的基础。在植物组织培养中,体细胞无性系的变异现象十分普遍^[7],我们在黄花菜组织培养中所作的染色体鉴定工作还需进一步跟踪检查。

来自黄花菜花柄的球状体培养中,发现了叶片花瓣状的再生苗与类似花蕾的再生物。为确保再生苗质量,不宜以花柄作快速繁殖的外植体,应严格淘汰再生形态异常苗的球状体,建立再生形态正常苗的球状体无性系。

花柄外植体形成的球状体经秋水仙素处理后,变异株有四倍体、三倍体、七倍体等多种变异类型,说明花柄体细胞染色体和再生苗染色体的数目及其变化都有待进一步研究。

主要参考文献

- 1 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. 园艺学报, 1983, 10(4): 273—276
- 2 胡继金, 王凤翱, 周朴华, 范鸿芝. 黄花菜组织培养的快速繁殖及程序. 湖南农学院学报, 1984(4): 1—6
- 3 周朴华, 范鸿芝, 王凤翱, 何立珍. 从黄花菜未受粉子房培养出单倍体植株. 湖南农学院学报, 1986(4): 89—94
- 4 徐迪新, 王曼丽, 宋仁德, 胡秋英, 谢满玉. 黄花菜试管苗工厂化生产. 湖南农业科学, 1989, 103(4): 10—14
- 5 周朴华, 刘选明, 何立珍. 黄花菜球状体经秋水仙素处理后再生苗加倍效果观察. 湖南农学院学报, 1991, 17(2): 158—164
- 6 竹内正幸, 中岛哲夫, 古谷力. 植物组织培养の技术. 朝仓书店, 1984. 137—152
- 7 陈维伦, 陶国清等编著. 植物生物技术, 科学出版社, 1987. 136—147

OBSERVATIONS ON THE "TEST-TUBE" PLANTLETS REGENERATED FORM CAIUS OF DIFFERENT EXPLANTS OF DAYLILY (HEMEEROCALLIS CITRINA BAR.)

Zhou Puhua, He Lizhen

(Hunan Agricultural College, Changsha 410128)

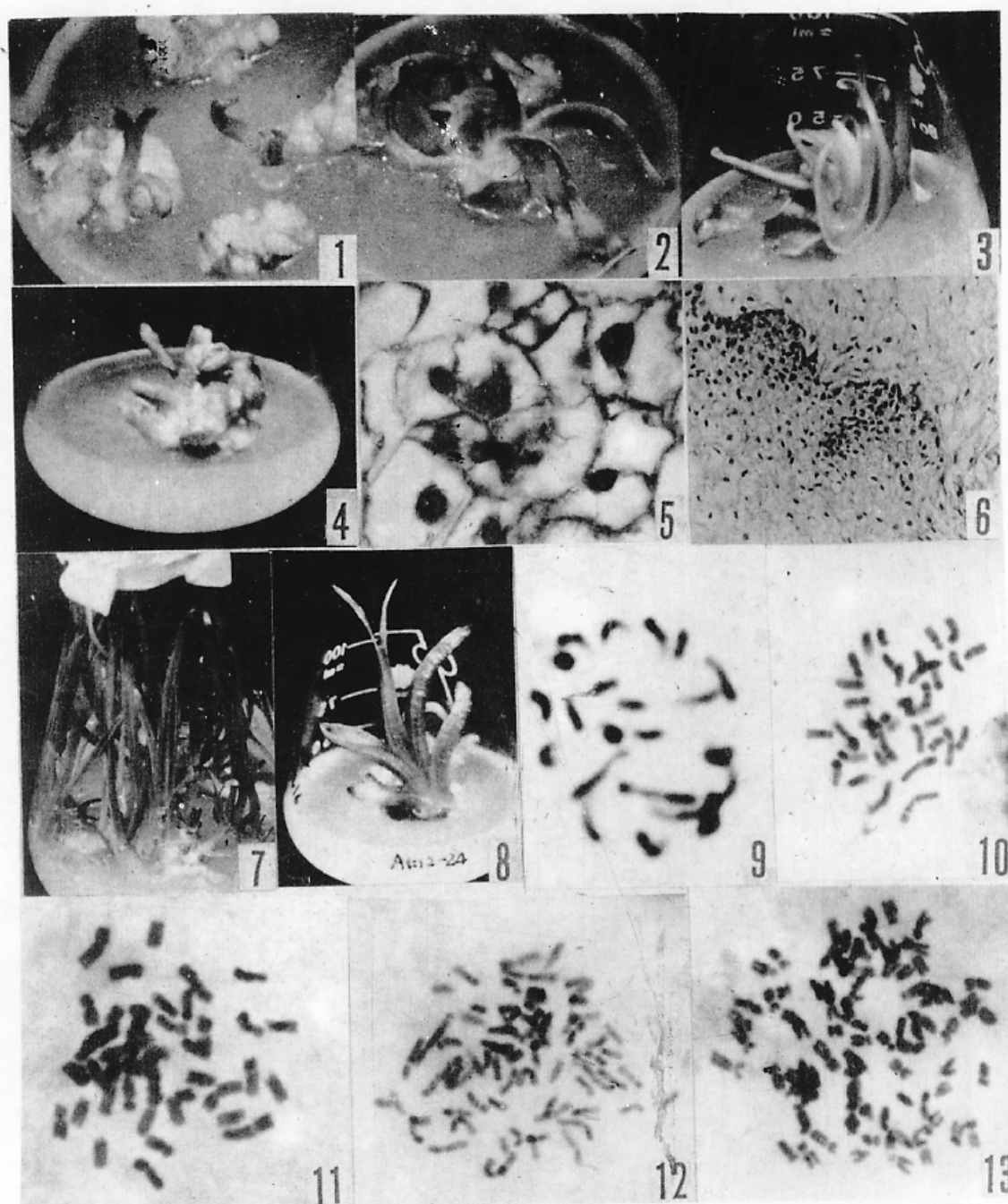
Abstract Studies on the formation of globulas from different explants and plantlet regeneration of daylily (*Hemeerocallis citrina* Bar.) were carried out. The results indicated that the sequence of the frequency of

callus induction, from high to low, was flower stalk, flower stem and leaf blade. Delicate granular calli were observed on MS with 2.0mg/L 6-BA medium, and globulas formed progressively through the procedure of reproduction-cutting-reproduction. Through 20 passages subculture of the globulas from leaf blade and flower stem explants, the regenerating ability kept stable, the morphology of plantlets were normal and the chromosome number of root apex cell was $2n=2x=22$. Many morphological types of tetraploid "test-tube" plantlets ($2n=2x=44$) were obtained and a few repeated-double plantlets ($2n=2x=88$) were observed after the globulas treated by colchicine. And the globulas of wide-leaf tetraploid plantlet regenerated by oriented select were subcultured, we obtained the some plantlet. In the plantlets from globulas of flower stalk, we found some abnormal ones whose leaves look like petal or flower. It was suggested that they were abnormal flower organ. The plantlets regenerated from globula or globula newly formed from the leaf of abnormal plantlet were still abnormal, and good relationship between the frequency of the globula formation and flowering period or size of explant were also observed. Many types of chromosome number of varied plants were obtained from the globulas of flower stalk treated by colchicine. Finally we suggested that flower stalk isn't suitable as explant during the rapid propagation of daylily.

Key words Daylily (*Hemerocallis citrina* Bar.); Explant; Callus; Chromosome

Explanation of plate I

1. The bud differentiation from globulas; 2. The perianthform leave of regenerative shoot; 3. The perianthform leave grow thickly and curllly; 4. The regenerative bud from globulas like flower bud; 5. The meristematic cells ($450\times$); 6. The bud primordium ($450\times$); 7. The normal diploid shoot; 8. The tetraploid shoot; 9. $2n=2x=22$ ($450\times$); 10. $3n=3x=33$ ($600\times$); 11. $2n=4x=44$ ($450\times$); 12. $2n=7x=77$ ($450\times$); 13. $2n=8x=88$ ($450\times$)



1. 球状体的芽分化。2. 再生苗叶片花被状。3. 花被状叶片丛生拳卷。4. 球状体再生苗，形似花蕾。5. 分生细胞团(450×)。6. 芽原基(450×)。7. 再生正常二倍体苗。8. 诱变四倍体苗。9. $2n=2x=22$ (450×)。10. $3n=3x=33$ (600×)。11. $2n=4x=44$ (450×)。12. $2n=7x=77$ (450×)。13. $2n=8x=88$ (450×)