

黄花菜组织培养常见问题及建议

左高雅¹, 程宵婧¹, 遇洁¹, 阴立锦¹, 侯非凡¹, 邢国明^{1,2}, 李森^{1,2}

(1. 山西农业大学园艺学院, 山西 太谷 030801; 2. 大同黄花产业发展研究院, 山西 大同 037004)

摘要: 黄花菜兼具食用价值、观赏价值和药用价值, 现今越来越受到人们的广泛关注。长期以来, 黄花菜新优品种缺乏、繁殖手段单一, 限制了产业健康快速发展。组织培养拥有繁殖系数大、周期较短、不受季节约束、苗整齐度高以及节省育苗用地等优点, 因此, 利用组培技术快速扩繁对黄花菜的市场开发、应用和推广具有重要意义。旨在为应对黄花菜的组培中出现的各类问题、提高黄花菜组培苗成活率提供一定的参考, 为黄花菜遗传转化以及新优品种工厂化育苗提供理论依据, 以黄花菜为研究对象, 阐述了在组织培养过程中存在的各项内在影响因素, 包括植物材料的基因型、选取的外植体类型; 以及外在影响因素, 包括外植体取材时期、基本培养基类型、植物生长调节剂以及培养条件。结果发现, 黄花菜的组织培养体系仍不成熟, 存在着外植体及其采集标准的不确定、愈伤组织诱导困难、最优培养基配方不统一、再生植株移栽成活率低等问题。为优化这样的问题, 仍需摸索一套适合黄花菜的再生体系, 并加强对组培苗的移栽后管理。此外, 对组织培养过程中存在的污染、褐化及玻璃化问题作出归纳总结, 并对黄花菜组织培养未来的发展趋势进行了展望。

关键词: 黄花菜; 组织培养; 愈伤组织; 再生

中图分类号: S644.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)02-0145-08

Common Issues and Suggestions of Tissue Culture of *Hemerocallis citrina* Baroni

ZUO Gaoya¹, CHENG Xiaojing¹, YU Jie¹, YIN Lijin¹, HOU Feifan¹, XING Guoming^{1,2}, LI Sen^{1,2}

(1. College of Horticulture, Shanxi Agricultural university, Taigu 030801, China;

2. Datong Daylily Industrial Development Research Institute, Datong 037004, China)

Abstract: Daylily (*Hemerocallis citrina* Baroni) had been increasingly widely focus on duo to its exceptional edible, ornamental, and medicinal plant. The lack of new superior cultivars and the single breeding methods have limited the healthy and rapid development of the daylily industry in long time. Tissue culture offers a range of benefits, including a high propagation coefficient, short growth cycle, unrestricted by seasons, uniform seedling quality, and reduced nursery land usage. Therefore, the use of tissue culture technology for rapid expansion is of great significance on its market development, application, and promotion. In this paper, aiming to provide a reference for dealing with various problems in the tissue culture of daylily, improve the survival rate of daylily seedlings, and provide a theoretical basis for the genetic transformation of daylily and the factory breeding for new superior varieties of daylily, daylily was taken as the research object to describe the intrinsic influencing factors in the tissue culture process, including the genotype of plant material and the type of selected explants, and the extrinsic influencing factors, including the period of explant sampling, the type of basic medium, plant growth regulators, and culture conditions. It was found that the tissue culture system for daylily was currently in an immature state, characterized by uncertainties regarding explants and their collection standards, challenges in inducing callus tissue, lack of consistency in optimal culture medium formulations, and low survival rates for transplanted regenerated plants. To address these issues, further exploration is needed to develop a suitable regeneration system for daylily and enhance the management of transplanted tissue-cultured seedlings. Furthermore, the challenges of contamination, browning, and vitrification in tissue culture were outlined in this paper, the future prospects of tissue culture for daylily was also delved into.

Key words: daylily (*Hemerocallis citrina* Baroni); tissue culture; callus; regeneration

黄花菜 (*Hemerocallis citrina* Baroni) 来源于阿福花科萱草属, 是一种多年生宿根草本植物, 又名

收稿日期: 2023-06-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1600301-2); 山西农业大学生物育种工程项目(YZGC122); 2022年大学生创新创业训练计划项目(国家级)(202210113149)

作者简介: 左高雅(1997-), 女, 山西临汾人, 硕士, 主要从事园艺植物生物技术与遗传改良研究工作。

通信作者: 李森(1982-), 男, 山西高平人, 教授, 博士, 主要从事园艺植物种质资源创新与生物技术应用研究工作。

忘忧草、金针菜^[1]。黄花菜的花蕾中含有丰富的维生素、蛋白质、糖类、纤维素、卵磷脂、钙、铁、磷、硒等物质,是一种药食兼用的特色蔬菜^[2-3]。一直以来,黄花菜以其优美的花型、对环境较好的适应性广泛应用于园林景观中,具有较高的观赏价值。

黄花菜种质资源丰富,广泛分布于世界各地。目前来看,分芽、切片等分株繁殖仍为黄花菜的普遍繁殖方式^[3],这种传统的繁殖方法存在着培育周期长、繁殖系数低、种性退化以及易感染病虫害等问题^[4],利用组织培养技术可在一定程度上克服以上缺点。本文以黄花菜为研究对象,介绍了目前其组织培养研究概况,以及组织培养过程中的主要影响因素和存在的常见问题,针对这些因素和问题提出了相应建议,以为黄花菜的快速繁殖提供理论依据,进而对黄花菜优良种质的扩大有重要生产实践意义。

1 黄花菜组织培养概况

植物组织培养以细胞的全能性为理论基础,将植物离体器官、组织、细胞、胚胎或原生质体等外植体^[5],通过适当的培养基、生长条件和培养技术,在体外环境下维持其生长、增殖和分化的过程^[6],从而形成完整再生植株^[7],整个过程实现了细胞的全能性表达。由于外植体是在完全无菌的离体条件下进行培养,因此,组织培养又被称为离体培养。1902年著名德国植物学家 Haberlandt 首次提出“细胞具有全能性”这一学说^[8];1937年 White 发现,植物细胞的全能性表达往往受到限制,需要某种因素的激发才能打破这样的状态,即细胞的脱分化和再分化的能力成为决定植物组织培养成败的重要因素^[9];此后直到1948年,Skog 和 Tsui 以烟草的茎段作为外植体,成功获得了烟草离体再生植株^[10],这是植物组织培养上的巨大突破;1958年 Steward 等以胡萝卜根为外植体建立了细胞悬浮培养体系,完全验证了细胞全能性这一学说^[11]。随着国内外学者不断对组织培养技术上的创新改良,至今已有1 000多种植物利用组织培养技术成功获得离体再生植株,并在科研和产业化生产方面得到了广泛的应用^[12]。

黄花菜组织培养研究在20世纪70年代开始出现,HEUSER 等^[13]率先从黄花菜及其种间杂种组织中获得了愈伤组织和不定苗。黄花菜的再生途径有多种,主要包括4种类型:从外植体直接分化出芽器官得到无根苗,再生根获得完整植株,称为器官型;从外植体脱分化形成愈伤组织,进而再分

化出不定芽然后生根获得完整植株^[14-15],称为器官发生型;外植体经愈伤组织形成类胚体结构,由胚状体诱导不定芽生根发育成苗^[16-17],称为胚状体发生型;外植体诱导愈伤组织,而后形成球状体再分化不定芽进而形成试管苗生根^[18],称为球状体发生型。目前来看,虽然有学者不断地研究黄花菜离体快繁技术,但仍然没有一个完整的体系来实现黄花菜的工厂化快繁,对于什么是适宜黄花菜组培的最佳外植体,组培的最佳再生方式还是没有一个定论,实质上黄花菜的组织培养研究仍旧处于探索阶段^[19]。

2 黄花菜组织培养的主要影响因素

在黄花菜的组织培养中,愈伤组织能否正常分裂分化,不定芽是否能正常生长发育,以及根的形成至炼苗移栽后组培苗的成活等等各项技术要点都会受到各种各样因素的影响。主要有内在因素包括植物材料的基因型、选取的外植体类型等;外在因素包括外植体取材时期、基本培养基类型、植物生长调节剂以及培养条件等^[20]。

2.1 内在因素

2.1.1 基因型 不同物种或同一物种的基因型不同,导致形态发生能力不同,往往分化能力也不同,这就证明了组织培养的难易程度依赖于基因型的影响。不同基因型植物的细胞受到创伤后,其脱分化和再分化的能力及所用的时间也不同。在黄花菜的不同个体间分化能力同样存在着基因型的差异,周朴华等^[21]发现同源四倍体黄花菜的愈伤组织繁殖能力和分化能力都较二倍体黄花菜强,张超美等^[22]通过对同源四倍体黄花菜的愈伤组织继代培养发现,形成致密的球状体愈伤组织与二倍体黄花菜培养结果类似,繁殖和分裂能力较强;黄花菜的基因型还影响着胚状体的发生,如王荣梅^[23]对黄花菜未受精胚珠离体培养得出结论,黄花菜的单倍体培养中,供体植株的基因型是影响雌核离体诱导的主要因素,姜华武等^[24]则发现了胚状体细胞内部基因的选择性表达与外部形态发生之间存在联系。但值得考虑的是,培养材料如果在亲缘上或遗传上相接近的话,其组织培养的条件往往也是相类似的^[25]。目前来看,单倍体及多倍体的黄花菜离体培养研究较少,通过筛选有更佳培养效果的基因型,对推动黄花菜的育种进程有实践意义。

2.1.2 外植体选择 外植体的选取也是组织培养中需要考虑的一大因素。通常外植体的取材器官和组织的不同、外植体大小不同、生理年龄不同等

都会影响植物体的再生能力。根据前人研究,黄花菜组织培养的外植体有很多,包括种子、叶片、短缩茎、花萼(花茎)、花梗(花柄)、花蕾、花药、花丝、子房、胚珠等,但不同的外植体一旦接种后,其再生方式、愈伤组织的诱导能力以及芽的分化能力等都是有所差异的。前人研究表明(表1),除黄花菜的种子可在短期内直接诱导出胚芽,其他类型外植体均能在20~40 d内诱导出愈伤组织,不同外植体的愈伤组织诱导率有所差异。褚焕宁等^[26]以黄花菜种子为外植体进行了无菌播种试验,经诱导的种子发芽率为80.00%,后直接分化成为再生苗。LI等^[27]以黄花菜叶片为外植体,研究了愈伤组织增殖和分化,发现起重要作用的植物生长调节剂6-BA与NAA是黄花菜离体再生的必要条件。徐迪新等^[18]研究以黄花菜的幼叶、花药、子房、花茎、花梗和花蕾作为外植体,发现均可诱导愈伤,分化成苗,但花梗的愈伤组织诱导率最高为100.00%,培养效果最

好。还有研究表明,通过比较心叶、短缩茎、花蕾和花茎4种外植体的组培效果,得出的结论为花蕾的出愈率较高为75.00%,而心叶得到非胚性的愈伤组织,质地疏松且很难形成再生植株^[28]。黄花菜外植体的大小也会影响组培情况,如外植体过大,会使消毒灭菌不彻底而引起污染,但适合组培快速繁殖;如外植体过小,会降低其分化能力,延长培养周期,存在较高死亡率,但这在离体脱毒中或在胚胎培养中较为常见,因此,要根据培养目的来确定黄花菜外植体的大小^[29]。在黄花菜的一生中,一般情况下,幼年期植物组织要比老年期植物组织有更高的分化能力,更易诱导愈伤组织,且生根能力会更强^[30]。而生理年龄越大的组织,在发育上相对来说更加成熟,因而就越容易形成花器官^[31]。目前来看,前人对黄花菜各种外植体类型均有所研究,如从取材上来看,叶片和花萼数量丰富,易于取材,可为黄花菜工厂化扩繁的理想材料。

表1 黄花菜不同外植体诱导效果
Tab.1 Induction effect of different explants of daylily

外植体 Explant	培养时间/d Culture time	诱导率/% Induction rate	参考文献 Reference	外植体 Explant	培养时间/d Culture time	诱导率/% Induction rate	参考文献 Reference
种子 Seed	3	87.50	[14]	花梗 Pedicel	20~30	100.00	[18]
幼叶 Young leaf	30	86.67	[15]	花茎 Scape	30	73.00	[28]
花瓣 Petal	35	82.36	[17]	花蕾 Bud	30	75.00	[28]
花柄 Flower stalk	35	72.89	[17]	花丝 Filament	40	76.67	[32]
心叶 Lobus cardiacus	35	25.75	[17]	根状茎 Rhizome	40	46.67	[32]

2.2 外在因素

2.2.1 取材时期 植物组织培养中外植体的取材不是随时可以进行的,在黄花菜开始萌动生长的季节可以说是采样的最佳时期,此时外植体分裂旺盛,离体培养成功率较高^[33]。如果过了生长期或是在休眠期取样,则外植体的诱导能力弱或已经失去了诱导能力^[34]。黄花菜的田间采样挑选晴天的中午比较好,因为中午阳光直射有一定的杀菌作用,此时外植体及时接种不易产生污染^[35],而上午或是阴天采样的外植体易引发污染,下午由于长时间曝晒可能会影响植株的分化能力。在取材季节上,一般取黄花菜的短缩茎或心叶外植体可在早春2—3月,而花萼外植体由于受到花期的限制,一般在6—7月取材^[36]。

2.2.2 基本培养基类型 按照培养基状态,可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基3种培养基类型,常见的基本培养基有MS、1/2 MS、B5、N6、LS等。通常我们直接将黄花菜外植体接种于固体

培养基表面即可诱导再生,琼脂是最常用的凝固剂^[37]。在已报道的黄花菜组织培养研究中,MS培养基和N6培养基是愈伤组织诱导和芽分化的常用基本培养基。唐世建等^[17]用MS和N6作为基本培养基对4种黄花菜外植体愈伤组织诱导,诱导效果没有明显的差别;董雅茹等^[38]则认为MS培养基适合愈伤的诱导,而N6培养基促进芽的分化。在黄花菜组培苗生根研究中,帅娜娜等^[32]使用1/2 MS培养基生根速度快,根系发达;苏承刚等^[39]则在不添加任何激素的MS培养基中也得到了较为理想的生根率。半固体培养基常用来培养菌类,更适用于观察菌类的运动能力,一般不适于黄花菜器官或组织的离体培养。液体培养基通常用于细胞悬浮培养。FIDEMANN等^[40]通过植物细胞悬浮培养优化了培养基成分,且利用植物生物反应器细胞悬浮培养技术得到飞速发展^[41]。目前,国内外有关黄花菜的细胞悬浮培养仍没有建立起完整的体系,建议利用液体培养基的手段进行细胞大规模培养,从而

有利于在黄花菜细胞水平上进行各种遗传操作和生理生化活动的研究。

2.2.3 植物生长调节剂 植物生长调节剂是植物离体形态发生的最关键因素,又称为植物激素,生长素与细胞分裂素是组培中常用的两种植物激素^[42]。目前,被广泛用于诱导体细胞胚胎发生的生长素类似物有 2,4-D、NAA 等,除玉米素(ZT)、激动素(KT)、外,具有同样作用的 6-BA、TDZ 等都是常用的细胞分裂素。MATAND 等^[43]研究 TDZ 的添加对黄花菜组织培养的影响,证明了 10 mg/L TDZ 对黄花菜愈伤组织的强诱导分裂能力,诱导率最高为 95.70%;蔡宣梅等^[44]研究发现,适宜黄花菜花蕾愈伤组织诱导的激素条件为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L,生根激素条件为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L;韩志平等^[14]采用 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 作为种子诱导、继代培养基,1/2MS+NAA 0.2 mg/L 作为生根培养基进行组织培养,获得了完整植株;张秀珊等^[45]以野生黄花菜无菌苗的茎段为材料,在 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上诱导愈伤组织及不定芽,并用这种培养基进行快速繁殖,最后在 1/2MS+NAA 0.2 mg/L 的生根培养基上壮苗生根形成完整植株;刘凤民等^[46]以黄花菜茎尖为外植体进行组培快繁,研究采用了诱导培养基 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。国内大多数学者采用的是 6-BA 与 NAA 或 6-BA 与 2,4-D 配合的方法来诱导黄花菜愈伤和不定芽,单独使用低浓度的 NAA 或 2,4-D 即可有良好的生根效果。赤霉素和脱落酸等有时也被用于植物组织培养。GA₃对器官的形成表现出了良好的促进作用,张馨悦^[47]在研究萱草花粉离体培养中发现,添加 GA₃的培养基中萱草花粉具有良好的萌发效果,这对于萱草属植物黄花菜的花粉离体培养研究有一定借鉴。ABA 抑制植物生长、促进休眠,对植物生长与表征和对逆境过程的响应发挥重要作用^[48],且解除抑制后的组培苗容易恢复生长^[49]。GHANATI 等^[50]通过研究组织培养中脱落酸 ABA 与过量 6-BA 互作对芽形成的影响,得出 ABA 的施加抑制球形胚和心形胚分化成芽,但培养基中高浓度 6-BA 的添加并不能改善 ABA 的作用。在超低温冷冻保存植物资源时,脱落酸甚至可以使植物停

止生长,这是由于它促使植物体抗寒力的形成,从而使材料得以顺利保存。因此,在植物组织培养中,脱落酸对黄花菜愈伤组织的离体保存可能有一定促进作用。

2.2.4 培养条件 同其他植物组织培养的共性培养条件一样,黄花菜的组织培养全过程需要在一个密闭无菌的环境条件下进行,培养环境的优劣与否关系到组培苗的生长好坏,培养间主要的环境条件包括温度、光照、气体情况、湿度等^[51]。温度影响着植物细胞的生长速度,也影响着愈伤组织分化增殖以及器官建成等发育进程,通常情况下黄花菜组织培养的常设温度为 20~30℃,一般采用(25±2)℃为佳。温度过低时,植物组织停止生长,常用超低温冷藏法来保存愈伤组织和胚状体。有研究发现,愈伤组织在保存温度为 8℃或 10℃时,1 a 后仍具有较高的生存能力,在新鲜培养基中按最佳条件培养时可恢复正常生长^[52]。温度过高,植物容易产生褐化、玻璃化现象^[53]。由于培养基中有足够的碳源,因此光照在黄花菜的离体培养中并不作为提供光合作用的能源,仅作为一种诱导因子来影响外植体脱分化和再分化,一般伤口产生愈伤组织的过程不需要光照或仅需弱光,因为光照过强会抑制伤口周缘细胞的增殖,使伤口迅速褐化^[54],而愈伤组织在光照条件下才会变绿产生芽点进而分化器官。

培养容器中由于有培养基的存在湿度相对较高,培养环境中的湿度一般在 70%~80%,环境的相对湿度对培养基水分的蒸发有一定影响,进而影响培养基渗透势,以至于影响植株的生长^[55]。外植体通过呼吸作用、物质交换、能量代谢等过程才能生长^[56],因此,在黄花菜的组培过程中需提供适宜气体环境。无糖组培技术是应用了外源二氧化碳来代替碳源为植物提供能量,实质是植物的光合自养,在植物壮苗、生根、炼苗、防止污染和玻璃化等方面具有重要作用。例如在黄花菜的组织培养上前期传统有糖诱导试管苗,后期新型无糖壮苗生根,2 种组培技术相互配合,可以在一定程度上提高其生产效率、节约成本,商业化高效生产试管苗。

3 黄花菜组织培养的常见问题

3.1 污染

植物组织培养中,污染关系着植物体能否正常生长发育和后续操作能否正常进行。污染的原因有多种,如接种人员操作不当引起的污染、操作环境不清洁造成的污染、培养环境不清洁造成的污染以

及预处理下外植体消毒灭菌不彻底引起的污染源^[57-58]。在黄花菜的组织培养中,外植体的预处理即消毒灭菌处理往往是最重要的一项工作,外植体不同,污染情况也不同,且消毒剂的使用和消毒时间均有所不同(表2),根据以往的研究,70%或75%酒精溶液、0.1%升汞是最常用的2种消毒剂,新洁尔灭溶液和漂白粉溶液也曾被用作黄花菜花蕾和种子的消毒,也能在一定程度上减少污染。且在多数研究中,使用酒精溶液浸泡一般不超过30 s,使用0.1%升汞溶液浸泡时间为5~15 min,如用短缩茎作为外植体,由于短缩茎属于地下部分或接近地

表,常常含有多种内生菌,预处理下很难消除,因而消毒灭菌时间可能更长。有些植物内生菌隐藏较深,预处理时表面消毒无法彻底去除,通常在初代培养中体现不出来,而经过多次继代培养,菌量累积才得以出现在培养基表面^[59]。黄小荣等^[60]则认为,植物组织培养中休眠菌芽孢萌发是造成菌类污染的结果。因此,为减少黄花菜组织培养过程中的污染,除了选择合适的消毒剂和控制在处理时间外,还可以在培养基添加抗生素、规范接种过程中的各项操作流程以及定期对培养室杀菌消毒等。

表2 黄花菜的消毒灭菌处理
Tab.2 Disinfection and sterilization treatment of daylily

外植体 Explant	消毒剂及消毒时间 Disinfectants and disinfection time				参考文献 Reference
	70%或75%酒精溶液 70% or 75% alcohol solution	0.1%升汞溶液 0.1% HgCl ₂ solution	新洁尔灭溶液 Bromogeramine solution	漂白粉溶液 Bleach solution	
种子 Seed	30 s	10 min			[14]
幼叶 Young leaf		12 min			[15]
花蕾、种子 Bud, seed			15 min	15 min	[16]
花梗、幼叶 Pedicel, young leaf		15 min			[18]
心叶、花茎、花蕾 Lobus cardiacus, scape, and bud	30 s	6~8 min			[28]
花茎 scape	擦拭表面	11 min			[38]
花丝 Filament	20 s	8~10 min			[32]
短缩茎(根状茎) Dwarf stem (rhizome)	5 min	8~10 min			[39]
鳞茎、根尖、花柄、花丝、花蕾 Bulb, root tip, flower stalk, filament, and bud	30 s	8~12 min			[44]
茎尖 Stem tip	30 s	5 min			[46]

3.2 褐化

在植物组织培养技术实现之前,褐化问题已经在园艺产品及其加工制品中带来了许多不利影响^[61]。高等植物中的酚类物质有着抵抗菌类侵染、抗氧化作用、抗逆境条件等重要的生理作用^[62],同时它也是引起组织培养褐变的关键底物^[63]。在黄花菜的离体培养中,外植体的生理状态、植物生长调节剂、继代次数和培养基状态等多种因素都会引起褐化。程宵婧等^[64]研究花药离体培养诱导出的黄白色愈伤组织,后期出现褐化;王静^[15]以幼叶作为外植体,未产生愈伤组织的幼叶会慢慢褐化死亡;在姜华武等^[24]的研究中,愈伤组织继代培养后,在其下部周围有褐化产生。贾荟芹等^[65]以黄花菜的愈伤组织为试验材料,研究发现,培养基中添加活性炭在培养初期对褐变有一定抑制作用,但不能从源头上解决问题,若能与低温的培养条件相结合,则能显著减少褐变的发生。由此可见,可以在

培养基中添加常见的抗褐变剂:活性炭(AC)、抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)等,以及在培养过程中调控培养温度,从而在一定程度上预防褐化的产生。

3.3 玻璃化

黄花菜再生苗玻璃化的表现形式有植株矮小、叶片卷曲失绿、角质层蜡质含量缺少以及苗含水量高等特点,导致植物体玻璃化的原因包括温度过高、瓶内湿度大、通气不佳等^[66]。目前,有关黄花菜的玻璃化研究较少。离体植物一旦出现玻璃化,会直接导致植物死亡,结果将是不可逆转的。韩志平等^[67]研究发现,黄花菜离体培养生根阶段由于温湿度较高,光照较弱,培养基中植物材料的光合作用等原因,有部分植株叶片呈透明或半透明状态,出现玻璃化现象,这时将玻璃化植株从所在的组培环境中转移到自然光照下,叶片颜色逐渐回绿,但1周后地上部仍然萎蔫直至死亡。事实证明,玻璃

化现象在黄花菜组织培养中影响很大,植株一旦出现玻璃化将无法挽救。为减少或避免黄花菜再生植株的玻璃化,我们可以通过调整培养基的配方、降低环境的温湿度、增加光照等使其有更好的生根环境,从而后续的移栽炼苗才能易于成活。

4 展望

随着黄花菜在我国栽培面积的不断扩大,越来越多的黄花菜产品出现在人们的生活中,如即食黄花、黄花榨菜、代餐粉、风味糕点、黄花茶等^[68]。证明了黄花菜产业成为我国特色农业的代表,具有巨大的发展潜力。长期以来,不少学者对黄花菜的组织培养进行探索,在外植体的选择、培养基的配方、培养条件等方面都有一定的研究,但培养过程中存在的各项问题层出不穷,仍没有一个完整的黄花菜组培快繁体系,以支撑其周年生产及规模化生产。因此,技术与成本问题成为目前生产上必须解决的现实问题。另外,黄花菜的组培技术结合单倍体育种、多倍体育种、基因工程育种、筛选突变体等的研究都较少,且处于起步阶段,建立和优化黄花菜的离体再生体系,并将其应用于育种、种质资源的保存等方面,具有广阔的研究前景。

参考文献:

- [1] 杜崑,李森,公菲菲,等.光照处理对‘大同黄花’开花节律及光周期关键基因 *HcCOL14* 表达特性的影响[J].河北农业大学学报,2020,43(5):46-53.
DU W, LI S, GONG F F, et al. Effects of light treatment on the flowering rhythm of *Hemerocallis citrina* cv. 'DatongHuanghua' and the expression characteristics of photoperiod key gene *HcCOL14*[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2020, 43(5):46-53.
- [2] 韩志平,张海霞,王丽君,等.黄花菜组织培养研究进展[J].山西农业科学,2019,47(12):2213-2218.
HAN Z P, ZHANG H X, WANG L J, et al. Research progress on tissue culture of daylily[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(12):2213-2218.
- [3] 张一帆,侯非凡,高阳,等.黄花菜花器官发育生理指标及碳水化合物含量的动态变化[J].山西农业科学,2023,51(8):879-887.
ZHANG Y F, HOU F F, GAO Y, et al. Dynamic changes of physiological indexes and carbohydrate content in flower organ development of *Hemerocallis citrina*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(12):2213-2218.
- [4] 褚焕宁.萱草属植物快繁体系构建及杂种胚拯救研究[D].太原:山西农业大学,2017.
CHU H N. Construction of rapid propagation system and rescue of hybrid embryo on *Hemerocallis* spp.[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2017.
- [5] 王子逸.浅谈植物组织培养技术[J].农家参谋,2017(16):203.
WANG Z Y. Discussion on plant tissue culture technology[J]. The Farmers Consultant, 2017(16):203.
- [6] 李聪聪,李艳提.植物组织培养概论[J].现代园艺,2013(20):142-144.
LI C C, LI Y T. Introduction to plant tissue culture[J]. Modern Horticulture, 2013(20):142-144.
- [7] 杨寻.植物组织培养研究进展[J].现代化农业,2021(12):31-33.
YANG X. Research progress of plant tissue culture[J]. Modernizing Agriculture, 2021(12):31-33.
- [8] LAIMER M. Plant tissue culture:100 years since Gottlieb Haberlandt[M]. Wien: Springer Science and Business Media, 2003:1-25.
- [9] 梁一池,杨华.植物组织培养技术的研究进展[J].福建林学院学报,2002,22(1):93-96.
LIANG Y C, YANG H. Advances of plant tissue culture[J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2002, 22(1):93-96.
- [10] CROES A F, HESEN P L G M, VAN DE LOO A A J, et al. Protein synthesis during *in vitro* flower bud formation in tobacco[J]. Acta Botanica Neerlandica, 1986, 35(3):161-167.
- [11] SMITHERS A G, SUTCLIFFE J F. The influence of external concentration on sodium ion absorption by carrot root tissue 4[J]. Journal of Experimental Botany, 1967, 18(4):752-757.
- [12] 王承海.影响植物组织培养生产次生代谢产物的因素[J].农村经济与科技,2020,31(4):34-48.
WANG C H. Factors affecting the production of secondary metabolites by plant tissue culture[J]. Rural Economy and Science-Technology, 2020, 31(4):34-48.
- [13] HEUSER C W, APPS D A. In vitro plantlet formation from flower petal explants of *Hemerocallis* cv. Chipper Cherry[J]. Canadian Journal of Botany, 1976, 54(7):616-618.
- [14] 韩志平,李进,王丽君,等.大同黄花菜组织培养试验初报[J].种子,2018,37(11):69-72.
HAN Z P, LI J, WANG L J, et al. Preliminary report on the tissue culture experiment of Datong daylily[J]. Seed, 2018, 37(11):69-72.
- [15] 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(1):167-172.
WANG J, HU D M, HOU J, et al. Study on tissue culture of *Hemerocallis citrina* Baroni 'March Flower'[J]. Journal of Sichuan University(Natural Science Edition), 2019, 56(1):167-172.
- [16] 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(4):273-276.
ZHOU P H, HU J J, FAN H Z. Studies on inducing embryoid and plant from stamens and unripe seeds of long yeiiow day-lily *in vitro*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1983, 10(4):273-276.
- [17] 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].湖南农业大学学报(自然科学版),2003,29(6):492-495.
TANG S J, LIU J, HONG Y H, et al. Application of tissue culture of daylily to the industrialized propagation[J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2003, 29(6):492-495.
- [18] 徐迪新,王曼丽,宋仁德,等.黄花菜试管苗工厂化生产[J].湖南农业科学,1989(4):10-14.
XU D X, WANG M L, SONG R D, et al. Industrial production of test-tube seedlings of daylily[J]. Hunan Agricultural Sciences, 1989(4):10-14.
- [19] 张琨,周渊,单晓菲,等.黄花菜组织培养研究进展[J].北方园艺,2020(2):130-137.
ZHANG K, ZHOU Y, SHAN X F, et al. Research progress on tissue culture of *Hemerocallis citrina*[J]. Northern Horticulture, 2020(2):130-137.
- [20] 杜尚广,盛文涛.影响植物组织培养生产次生代谢产物的因

- 素[J]. 园艺与种苗, 2018(11):30-33.
- DU S G, SHENG W T. Influencing factors of the production of secondary metabolites in plant tissue culture[J]. Horticulture & Seed, 2018, 38(11):30-33.
- [21] 周朴华, 何立珍, 刘选明. 组织培养中用秋水仙素诱发黄花菜同源四倍体的研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28(1):49-55.
- ZHOU P H, HE L Z, LIU X M. Study on inducing autotetraploid of daylily by colchicine in tissue culture[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1995, 28(1):49-55.
- [22] 张超美, 张再君, 张杏芝, 等. 同源四倍体黄花菜的继代培养[J]. 湖北农学院学报, 1995(3):49-50.
- ZHANG C M, ZHANG Z J, ZHANG X Z, et al. Subculture of homologous tetraploid daylily[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 1995(3):49-50.
- [23] 王荣梅. 萱草属植物组培快繁体系优化及单倍体培养研究[D]. 太谷:山西农业大学, 2019.
- WANG R M. Optimization of tissue culture and rapid propagation system of *Hemerocallis* spp. and haploid culture study[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019.
- [24] 姜华武, 汪琳, 张杏芝. 四倍体黄花菜胚状体发育过程中过氧化物酶的变化[J]. 湖北农学院学报, 1998(1):90-91.
- JIANG H W, WANG L, ZHANG X Z. Changes of peroxidase during embryoid development of tetraploid daylily[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 1998(1):90-91.
- [25] 宋雪莲. 5个新品种多倍体萱草离体快繁技术的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2011.
- SONG X L. Research on rapid propagation technique of *Hemerocallis hybrida* polyploid of 5 new species[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.
- [26] 褚焕宁, 侯非凡, 贾焱, 等. 黄花菜无菌播种试验[J]. 山西农业科学, 2017, 45(4):587-590.
- CHU H N, HOU F F, JIA Y, et al. Study on the aseptic seeding of *Hemerocallis citrina baroni*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(4):587-590.
- [27] LI Z W, MIZE K, CAMPBELL F. Regeneration of daylily (*Hemerocallis*) from young leaf segments[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 102(2):199-204.
- [28] 岳青, 王果萍, 董德中, 等. 大同黄花菜组织培养繁殖技术的研究[C]//中国科学技术协会第二届青年学术年会园艺学论文集. 北京:北京农业大学, 1995:511-514.
- YUE Q, WANG G P, TONG D Z, et al. Tissue culture reproductive technique of Datong daylily[C]//Horticultural proceedings of the 2nd Youth Academic Annual Conference of China Association for Science and Technology. Beijing: Beijing Agricultural University, 1995:511-514.
- [29] 曹璐瑶, 李晶, 宋来庆, 等. 外植体差异对植物组培苗无性快繁的影响[J]. 烟台果树, 2021(3):1-5.
- CAO L Y, LI J, SONG L Q, et al. Effect of explant difference on asexual rapid propagation of plant tissue culture seedlings[J]. Yantai Fruits, 2021(3):1-5.
- [30] KENRICK P. How land plant life cycles first evolved[J]. Science, 2017, 358(6370):1538-1539.
- [31] 王钦美, 张志宏, 崔建国. 无性繁殖植株的生理年龄:由端粒长度引发的思考[J]. 林业科学研究, 2017, 30(5):866-870.
- WANG Q M, ZHANG Z H, CUI J G. The physiological age of asexual plants-thinking arise from telomere length[J]. Forest Research, 2017, 30(5):866-870.
- [32] 帅娜娜, 穆妮妮, 张秀丽, 等. 航天黄花菜组织培养繁殖技术研究[J]. 甘肃科技, 2021, 37(12):185-188.
- SHUAI N N, MU N N, ZHANG X L, et al. Study on tissue culture and propagation technology of space day lily[J]. Gansu Science and Technology, 2021, 37(12):185-188.
- [33] LI S M, ZHENG H X, ZHANG X S, et al. Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response[J]. Plant Cell Reports, 2021, 40(2):271-282.
- [34] KRASINSKAYA T, ZMUSHKO A. Morphogenetic potential of grape explants at initiation stage of *in vitro* culture during the active plant growth and dormancy periods[J]. Acta Horticulturae, 2021(1324):111-116.
- [35] 汪灵丹, 张日清, 金晓玲. 外植体的选择和消毒对大叶榉组织培养的影响[J]. 湖南林业科技, 2008, 35(2):21-23.
- WANG L D, ZHANG R Q, JIN X L. Effect of selection and disinfection processing on explant of tissue culture of *Zelkova schneideriana*[J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2008, 35(2):21-23.
- [36] 吕秀立, 施季森, 吕光明, 等. “双玫瑰”萱草的离体培养和快速繁殖[J]. 杂草科学, 2009, 27(1):31-33.
- LÜ X L, SHI J S, LÜ G M, et al. Tissue culture and *in vitro* rapid propagation of *hemerocallis* "Rose Doublebloom"[J]. Journal of Weed Science, 2009, 27(1):31-33.
- [37] 赵元增, 杨靖, 孙海燕. 植物组培试验中“培养基不匀”问题分析与对策[J]. 实验室科学, 2020, 23(3):67-70.
- ZHAO Y Z, YANG J, SUN H Y. Problems and solutions of inhomogeneity of medium existed in plant tissue culture solid medium preparation[J]. Laboratory Science, 2020, 23(3):67-70.
- [38] 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.
- DONG Y R, WANG R K, WANG F Z. Polyploid *Hemerocallis citrine* *ex vivo* culture propagation technique[J]. Crops, 1995(2):10-11.
- [39] 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):33-35.
- SU C G, ZHANG X G, ZHANG S L. Studies on tissue culture of daylily rhizomes [J]. Journal of Southwest University, 1999, 21(5):33-35.
- [40] FIDEMANN T, DE ARAUJO PEREIRA G A, HELUY T R, et al. Handling culture medium composition for optimizing plant cell suspension culture in shake flasks[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2018, 133(1):137-146.
- [41] 杨晶, 杜林娜, 王法微, 等. 新型植物生物反应器研究进展[J]. 生物产业技术, 2018(5):104-109.
- YANG J, DU L N, WANG F W, et al. Research on novel plant bioreactors[J]. Biotechnology & Business, 2018(5):104-109.
- [42] 张义, 刘云利, 刘子森, 等. 植物生长调节剂的研究及应用进展[J]. 水生生物学报, 2021, 45(3):700-708.
- ZHANG Y, LIU Y L, LIU Z S, et al. The research and application progress of plant growth regulators[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3):700-708.
- [43] MATAND K, SHOEMAKE M, LI C X. High frequency *in vitro* regeneration of adventitious shoots in daylilies (*Hemerocallis* sp.) stem tissue using thidiazuron[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1):31.
- [44] 蔡宣梅, 郭文杰, 张洁, 等. 黄花菜外植体初代培养比较及快繁技术研究[J]. 东南园艺, 2020, 8(5):21-25.
- CAI X M, GUO W J, ZHANG J, et al. Comparison of primary culture using different explants of *hemerocallis citrine* and study of rapid propagation technology[J]. Southeast Horticulture, 2020, 8(5):21-25.

- [45] 张秀珊,柴向华,朱饱卿,等. 黄花菜的组织培养和快速繁殖[J]. 中国农村小康科技,2006(6):59.
ZHANG X S, CHAI X H, ZHU B Q, et al. Tissue culture and rapid propagation of daylily[J]. Journal of Agriculture, 2006(6): 59.
- [46] 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,2006,33(2):32-34.
LIU F M, ZHANG W L. Study on plant regeneration by tissue culture of *Hemerocallis citrine*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2006, 33(2): 32-34.
- [47] 张馨悦. 萱草花粉的离体萌发、贮存及遗传转化研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2020.
ZHANG X Y. *In vitro* germination, storage and genetic transformation of *Hemerocallis fulva* pollen[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [48] 芦禹冰,万鲁河. 脱落酸对植物生长的作用研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2021,37(6):84-88.
LU Y B, WAN L H. Study on the effect of abscisic acid on plant growth[J]. Natural Science Journal of Harbin Normal University, 2021, 37(6): 84-88.
- [49] 房慧勇,朱虹,尧建勋,等. 药用植物组织培养与脱落酸[J]. 中国中药杂志,2013,38(1):14-18.
FANG H Y, ZHU H, YAO J X, et al. Tissue culture of medicinal plant and abscisic acid[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(1): 14-18.
- [50] GHANAATI F, RAHMATI I M. Investigation of the interaction between abscisic acid (ABA) and excess benzyladenine (BA) on the formation of shoot in tissue culture of tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. International Journal of Plant Production, 2009, 3(4): 7-14.
- [51] 王政,张春玲,何松林,等. LED不同反光及照光方式对非洲菊组培苗生长的影响[J]. 河南农业科学,2022,51(4):120-129.
WANG Z, ZHANG C L, HE S L, et al. Effects of different LED reflecting and lighting methods on the growth of tissue culture seedlings of *Gerbera jamesonii*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(4): 120-129.
- [52] DIMITROVA D, MARCHEVA M P. Maintenance and *in vitro* conservation of potatoes[J]. Acta Horticulturae, 2009(830): 71-76.
- [53] AZIZI A, MOHD HANAFI N, BASIRAN M N, et al. Evaluation of disease resistance and tolerance to elevated temperature stress of the selected tissue-cultured *Kappaphycus alvarezii* Doty 1985 under optimized laboratory conditions[J]. Biotech, 2018, 8(8): 321.
- [54] TSIPOURIDIS C, THOMIDIS T. An investigation into the effects of closure type, light and pH on the development of shoots and roots and subsequent establishment of micropropagated cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) plants[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2005, 45(10): 1331.
- [55] HONEGGER P. Overview of cell and tissue culture techniques [J]. Current Protocols in Pharmacology, 2001(12): Unit 12.1.
- [56] 任如意,司徒琳莉,纪萍. 提高芦荟繁殖系数的四种方法[J]. 北方园艺,2008(2):208-209.
REN R Y, SITU L L, JI P. Four methods to improve the reproductive coefficient of aloe[J]. Northern Horticulture, 2008(2): 208-209.
- [57] 张朕,马艳丽. 植物组织培养中污染防控方法研究[J]. 山西农经,2018(1):66-67.
ZHANG Z, MA Y L. Study on pollution prevention and control methods in plant tissue culture[J]. Shanxi Agricultural Economy, 2018(1): 66-67.
- [58] 李群,杜文平,王米力,等. 植物组织培养中控制污染技术研究[J]. 四川林业科技,1999,20(4):22-26.
LI Q, DU W P, WANG M L, et al. Studies of controlling contamination during plant tissue culture[J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 1999, 20(4): 22-26.
- [59] KRITZINGER E M, VAN VUUREN R J, WOODWARD B, et al. Elimination of External and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia Aethiopic* with commercial fungicides and antibiotics[M]//CASSELLS A C. Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Dordrecht: Springer, 1997: 161-167.
- [60] 黄小荣,杨开太. 香水白掌的组织培养[J]. 广西林业科学, 2001, 30(1): 39-40.
HUANG X R, YANG K T. Tissue culture of *Anthurium perfume*[J]. Guangxi Forestry Science, 2001, 30(1): 39-40.
- [61] 吕国昊,赵杰堂. 植物组织培养中褐化现象的控制措施[J]. 农村经济与科技,2021,32(13):50-52.
LÜ G H, ZHAO J T. Control measures of browning phenomenon in plant tissue culture[J]. Rural Economy and Science-Technology, 2021, 32(13): 50-52.
- [62] AZOFEIFA Á. Oxidation and browning of problems in explants grown *in vitro*[J]. Agronomía Mesoamericana, 2009, 20(1): 153-175.
- [63] 高洁,张萍,薛璟祺,等. 酚类物质及其对木本植物组织培养褐变影响的研究进展[J]. 园艺学报,2019,46(9):1645-1654.
GAO J, ZHANG P, XUE J Q, et al. Advances in phenolic substances and their effects on browning in woody plant tissue culture[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(9): 1645-1654.
- [64] 程宵婧,王荣梅,翟毕娇,等. 萱草属植物小孢子发育与花蕾长度相关性及其花药培养初探[J]. 山西农业科学,2021,49(2):170-174.
CHENG X J, WANG R M, ZHAI B J, et al. Preliminary study on correlation between microspore development and bud length of *Hemerocallis* and anther culture[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(2): 170-174.
- [65] 贾荟芹,高龙梅,李薇,等. 黄花菜组织培养褐变研究[J]. 农业开发与装备,2015(8):69.
JIA H Q, GAO L M, LI W, et al. Study on browning in tissue culture of daylily[J]. Agricultural Development & Equipments, 2015(8): 69.
- [66] 那倩,韩琳. 浅谈植物组织培养技术及应用[J]. 广东蚕业, 2021, 55(5): 23-24.
NA Q, HAN L. The discussion about the tissue culture technology and application of plants[J]. Guangdong Sericulture, 2021, 55(5): 23-24.
- [67] 韩志平,王丽君,张海霞,等. 大同黄花菜茎段组织培养研究[J]. 种子,2021,40(10):135-140,149.
HAN Z P, WANG L J, ZHANG H X, et al. Study on tissue culture of stem segments of daylily of Datong[J]. Seed, 2021, 40(10): 135-140, 149.
- [68] 杨晨昱,彭雪,李阳,等. 我国黄花菜发展现状及其加工产业存在问题分析[J]. 中国果菜,2021,41(12):74-78.
YANG C Y, PENG X, LI Y, et al. Analysis on industrial development of daylily and its dry products processing status in China[J]. China Fruit & Vegetable, 2021, 41(12): 74-78.