

黄花组织培养研究进展

铁曼曼¹, 杨 峰¹, 谭华强², 江家荣¹, 邱亨池¹, 江华波¹, 涂 健¹

(1. 达州市农业科学研究所, 四川 达州 635000; 2. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘要:黄花具有较高的观赏价值、营养价值以及药用价值,组织培养技术在其新品种的培育及工厂化育苗生产上较为适用,研究综述了黄花组织培养的现状,介绍了黄花组织培养的方法,包括获得再生苗的途径、外植体的选择、基本培养基的应用、植物生长调节剂的使用等,提出黄花组织培养中存在的问题,并对今后黄花的育种方向及组培技术在黄花生产中的应用进行展望。

关键词:黄花;组织培养;研究进展

中图分类号:S644 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)09-0147-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0147

黄花(*Hemerocallis citrina* Baroni)在我国古代记载最早名为萱草,又名萱草、忘忧草、丹棘、宜男、金针菜等,在日本称其为健脑菜、绿葱茶,属百合科萱草属多年生宿根草本植物,原产于亚洲和欧洲^[1]。现存黄花记载最早出现于《诗经》,其栽培历史在我国已超过 2 500 a,明代中期作为蔬菜广泛栽培^[2]。黄花在我国南北方各省均有栽培,主产区有湖南、江苏、浙江、湖北、江西、四川、甘肃、陕西、广东等省。黄花花型优美、色泽怡人,花蕾富含糖类、蛋白质、卵磷脂,也含有多种维生素和钙、磷、铁等矿物质,有增强大脑机能、抗衰老、消炎、清热等辅助功效,既可作观赏用,也可食用、药用,具有较高的观赏价值、营养价值和药用价值^[3]。

黄花繁殖主要以分株、分芽和切片等无性繁殖方式为主。但存在繁殖系数低、种苗成本高、生长周期长、易带病虫害等缺陷,不利于黄花新品种的区域化、规模化发展。采用种子繁殖方法,由于黄花基因型杂合,且属于异花授粉植物,无论是进行人工自交或是异交,后代的基因型都会发生很大变化,难以维持品种的优良性状^[4]。许多栽培品种由于长期采摘花蕾,以根状茎进行营养繁殖,其有性生殖作用得不到很好的发挥^[5]。且黄花存在一定的败育现象,繁殖系数更低。传统的繁殖方法在大面积推广黄花优良品种方面存在很大限制。通过组织培养方式既能保持品种的优良性状,又能达到快速繁殖的效果,为引种、实现工

厂化育苗、扩大黄花的种植规模打下基础^[6]。

黄花是一种营养价值很高的蔬菜,深受人们喜爱,但是黄花种植的规模还非常有限。组织培养在黄花新品种培育和工厂化育苗生产上非常适用,在品种改良和发展优质、高产、高效农业上具有重要意义。本文就黄花组织培养的现状进行综述,以为后续研究提供参考。

1 外植体的选择

选择合适的外植体是组织培养成功的关键。黄花组织培养选用的外植体有叶片、花茎(花萼)、花梗、子房^[7-8]、花瓣、花药、花丝、种子^[9]、种子获得的无菌苗^[10]、根状茎^[11]、茎尖等。不同组织或器官作为外植体诱导愈伤组织的效果存在差异。王凤翔等^[12]以幼叶、花萼、花梗、花丝等接种在相同的培养基上,均能产生愈伤组织,但花萼、花梗诱导的频率高。徐迪新等^[13]以黄花的幼叶、花药、子房、花茎、花梗、花蕾等为外植体均可以诱导再生苗,其中花梗的效果最好。范银燕和崔根芳^[14]取心叶、花被筒、花茎、花丝作外植体,花茎的愈伤组织诱导率最高,其次是心叶,花丝和花被筒的出愈率均较低。周朴华和何立珍^[15]以黄花的花柄、花茎、叶片作外植体,发现花柄的愈伤组织诱导率高于其它两种外植体,但是以花柄为外植体的愈伤组织容易产生变异苗,而叶片和花茎形成的愈伤组织经 20 代继代培养后,再生能力没有降低,且形成的植株形态和根尖染色体数目未见变化。朱靖杰等^[16]以花梗、花瓣、花轴、心叶为外植体比较诱导反应,结果显示花梗和花瓣均能诱导出大量胚状体,花轴和心叶诱导少量或不能诱导出胚状体。唐世建等^[17]以花瓣、花柄、心叶、花茎为外植体,愈伤组织诱导率为花瓣最高,花茎

收稿日期:2015-04-09

第一作者简介:铁曼曼(1987-),女,河南省巩义市人,硕士,研究实习员,从事蔬菜育种研究。E-mail: mhcy2010@163.com。

最低,原因可能是所取的花茎为已经开花的花茎,其木质化、纤维化程度较高,诱导愈伤组织困难。周朴华等^[18]取黄花的雄蕊和未成熟的种子诱导胚状体,均达到较好的效果。胡继金以叶片、花药、花梗、花茎、种子为外植体,均能成功的获得再生苗^[19-20],认为黄花植株各部分的幼嫩组织均能较易诱导、分化成苗。一般来说,具有分生能力的幼嫩部位均可作为外植体建立再生体系,研究中使用的外植体有些未能成功诱导出愈伤组织或者胚状体,可能与所使用的植物生长调节剂的种类和浓度以及配比等有关。

同一组织或器官的不同部位诱导也存在差异,取花茎的上、中、下三部分接种在相同的培养基,结果只有上部茎段产生愈伤组织^[21]。带花药的花丝接种在培养基,在花丝基部可直接形成不定芽,并在不定芽上诱导获得胚状体^[22]。就花瓣而言,越靠近基部诱导效果越好,且内层花瓣比外层花瓣诱导效果好,心叶同样如此,花柄的诱导效果是靠近两端诱导效果好,中间差^[17]。外植体的接种方式也会产生不同的诱导效果,将切成 0.5 cm 的茎段采用平放、正插、反插 3 种方式接种,平放的茎段两端都可以产生愈伤组织,其它两种方式没有或只产生少量愈伤组织。切段的大小影响愈伤组织诱导率,适宜的切块大小有利于愈伤组织的诱导,其原因可能与切口面积和总体积的比值存在一定关系,比值越小,愈伤组织诱导率和形成量越低^[21]。叶片、花茎、花梗等作外植体时,一般消毒后将其切成 0.5 cm 或 0.8 cm 大小的片段比较合适^[14,16,17,21,23],也有的切成 3~4 cm 大小^[12]。

在外植体的不同生长期或器官的不同成熟期取材,对离体培养产生不同的影响。祝朋芳等^[8]对大花萱草与黄花杂交获得的幼胚进行胚挽救,结果表明授粉后 5~6 d 的胚珠发育为小粒种子的能力最强,可作为最佳取材时间。心叶和花瓣越幼嫩诱导效果越好,花茎作外植体最好选择开花之前的幼嫩花茎,已开花的花茎组织老化,诱导效果不理想^[17]。但是也并非所有的取材部位都是越幼嫩越好,以花柄作外植体时,花蕾越小的花柄再生异常苗的频率越高,而且始花期高于盛花期^[15]。以未受粉的子房为外植体时,蕾长 2~3 cm 的子房,柱头不伸长并逐渐萎缩,而蕾长 5~9 cm 的子房,子房已经形成成熟或接近成熟的胚囊,在培养基上培养到一定时候,子房能够膨大形

成愈伤组织,可诱导出单倍体植株^[7]。

以黄花的花茎和叶片为外植体,取材容易,如果能提高诱导率就能为黄花的快繁奠定良好的基础。以花器官和根状茎作外植体取材在季节上受限制,但诱导效果较好,若能保证多次继代后不发生变异,也应该作为一种重要的增殖方法。组织培养时,应选择容易培养且培养后不容易发生变异的材料作外植体。

2 黄花的再生途径

通过组织培养获得黄花再生植株的途径一般有 3 种。一是从外植体直接诱导不定芽,这种方法要求选用的外植体具有较强的分生能力,一般选在细胞分裂旺盛的节点处,Churikova^[24]用黄花和玉簪未开花的花茎顶端为外植体能直接诱导出不定芽;二是外植体诱导愈伤组织,从愈伤组织处长出不定芽;三是外植体诱导胚状体,胚状体发育成苗。目前使用较多的是第二种,愈伤组织的诱导,在不同的培养条件下,诱导的愈伤组织通常出现两种形态,一种是致密的愈伤组织,呈黄绿色或者绿色,表面有小颗粒状突起,增殖能力和形成不定芽的能力都较强。有些研究中提到的球状体或圆球体^[13]也是一种结构致密的愈伤组织,细胞学观察显示,球状体的基本结构是薄壁细胞,细胞排列紧密,分裂旺盛^[25],球状体苗具有数量多、苗壮、质量好、周期短、繁殖速度快等特点^[20]。另外一种疏松的愈伤组织,黄白色,组织结构松散,再生能力差。结构致密型愈伤组织比疏松型愈伤组织分化芽的能力强,这种现象在其它观赏及食用的萱草属植物组培中也有类似报道^[26-27]。胚状体途径,由胚状体形成的再生苗结构完整,与母体植株或外植体的维管束系统无直接联系^[18],容易从母体分离,但胚状体发生的频率不高,且胚状体需要经历不同的形态才能转化成苗。

也有研究者利用黄花的茎可进行无性繁殖的特点,把茎切块^[28]或切片^[29]进行组织培养,和常规组织培养相比,不需要高成本的培养基和无菌的操作环境,在苗圃中即可进行,繁殖系数又比分株繁殖提高 8~10 倍。但是这种不完全组织培养技术的繁殖系数和常规组织培养相比还是小很多,繁殖季节也仅限于春季和秋季。这种繁殖方式在小规模扩繁或组培条件不完备的情况下可以使用,对于黄花的工厂化生产仍然不是最佳的选择。

3 基本培养基

黄花组培中用到的基本培养基有 MS^[30]、N₆^[31]、1/2MS、C₁₇^[32]、癸氏培养基^[33]等。这些培养基都含有植物生长所必须的大量元素、微量元素、有机物等,不同培养基成分含量相差比较大。MS 和 N₆培养基在愈伤组织诱导、增殖和芽分化上用的较多,1/2MS 一般用作生根培养基^[10]。黄花在有或无激素的 MS、N₆培养基上均能产生不定芽、愈伤组织或胚状体,并可分化成苗;小苗在 1/2MS 培养基上就能顺利生根。董雅茹等^[21]的研究认为诱导愈伤组织在 MS 培养基上效果好,愈伤组织分化出芽在 N₆培养基上效果好,诱导不定芽生根使用 1/2MS 培养基就能满足生根所需的营养,比较固体和液体培养基对生根的影响,发现液体培养基生根量大,有根毛,植株健壮,移栽成活率高,且液体培养基制作简单,成本低,但是液体培养基的生根率不如固体培养基高。周朴华用雄蕊和未成熟的种子作外植体,以 MS 为基本培养基能诱导出胚状体^[18]。而朱靖杰等^[16]比较了黄花叶片外植体在 MS 和 N₆培养基诱导胚状体的效果,结果发现在 MS 培养基上能诱导出愈伤组织却未能诱导出胚状体,同样条件的 N₆培养基上较易诱导出胚状体,认为 N₆培养基成分更适于黄花胚状体的诱导和增殖。可能不同的外植体分化所需的最适营养成分不同。姜华武等^[34]将四倍体黄花的愈伤组织培养在癸氏培养基上,能够诱导出胚状体,并分化出芽、根,发育成小植株。张超美等^[35]以黄花花梗为外植体诱导同源四倍体,得到的愈伤组织在 C₁₇和癸氏培养基上均能成功诱导出球状体并分化出大量的丛生芽。

4 植物生长调节剂的影响

4.1 愈伤组织或胚状体的诱导

外植体在培养基上一般 7 d 左右开始萌动。NAA 与 6-BA 在诱导愈伤组织上效果良好,NAA 的适宜浓度在 0.1~0.5 mg·L⁻¹,在附加 6-BA 的培养基中,诱导的愈伤组织呈淡绿色,表面有许多小突起^[36],这种愈伤组织属于致密型愈伤组织,分生能力和分化不定芽的能力较强,苗粗壮。KT 诱导愈伤组织的效果和 6-BA 相似,但是愈伤组织略呈褐色,表面光滑。2,4-D 对诱导愈伤组织也有较好的效果,范鸿芝等^[25]以 2.0 mg·L⁻¹的 2,4-D 配合 1.0 mg·L⁻¹KT 诱导愈伤组织,范银燕和崔根芳^[14]以添加不同浓度 2,4-

D 的培养基诱导愈伤组织,结果显示 2.0 mg·L⁻¹的用量具有最高的出愈率。与周朴华等^[22]得出的结论相同,认为诱导愈伤组织的浓度以 2,4-D 为 2 mg·L⁻¹为宜,且生长素诱导的愈伤组织比细胞分裂素诱导的愈伤组织更有利于后期芽分化。苏承刚等^[11]的试验以 2,4-D 和 6-BA 组合诱导愈伤组织,2,4-D 的浓度在 0.5~1.0 mg·L⁻¹,6-BA 的浓度在 0.1~0.5 mg·L⁻¹合适,浓度过高或过低都不利于愈伤组织的形成。以未受粉子房为外植体,当 2,4-D 浓度低于 6-BA 浓度时,形成致密型愈伤组织,相反,2,4-D 浓度高于 6-BA 浓度,则形成松散型愈伤组织^[7]。

4.2 增殖和分化

愈伤组织增殖和分化阶段,不同的植物生长调节剂单独或组合使用都可以达到增殖和分化的效果,种类和浓度不同增殖和分化的效果也不同。2,4-D 用量越高,愈伤组织就越紧密,6-BA 用量越高,愈伤组织就越容易分化^[17],6-BA 是愈伤组织增殖和不定芽分化的重要因素。范鸿芝等^[25]的研究得出,松散型愈伤组织培养在只添加 2,4-D 或不含激素的培养基上,经多次继代仍然不能转化为球状体,而添加 1.0 mg·L⁻¹6-BA 的愈伤组织容易转化成球状体并诱导出不定芽。胡继金等^[20]的研究也认为,在培养基内添加适量的 6-BA 而不用或少用生长素类调节剂是形成球状体、取得大量不定芽的关键。王凤翔等^[12]的结论与此一致,愈伤组织在只添加 6-BA 的培养基上就能较好的繁殖和分化,IAA 的添加使愈伤组织松散苗纤细,移栽成活率低。分化培养基中 6-BA 1.0 mg·L⁻¹和 NAA 0.01 mg·L⁻¹组合芽分化效果优于 6-BA 浓度为 0.5 和 2.0 mg·L⁻¹^[11]。愈伤组织结构紧实,呈颗粒状是继代和分化成苗的最佳材料。但唐世建等^[17]研究认为,松散的愈伤组织更适合于工厂化育苗,松散的愈伤组织诱导出的苗细弱,但苗的数量多,可以通过生根壮苗使苗健壮。从花丝基部得到的不定芽培养在不含激素的培养基上,形成胚状体,并且胚状体增殖的速度很快^[22]。姜华武等^[34]将愈伤组织接种在不含激素的癸氏培养基上,能够发育成胚状体,张超美用不添加任何激素的癸氏培养基也能诱导愈伤组织形成球状体,并产生大量丛生芽,认为外源激素在黄花愈伤组织形成和分化上并非必需^[35]。但是激素的添加必定会对细胞的生长和分化产生一定影响,可能是促进作用也可能是抑制作用,要针对

具体的生长阶段选择使用生长素或者细胞分裂素以及选用合适的浓度。

4.3 生根

生根阶段,细胞分裂素对根的形成有抑制作用,在繁殖培养基上小苗一般不易生根,或生根时间较长。当小苗长到 2~4 cm 时可分株转到生根培养基。生长素促进根的形成,ABT、IBA、IAA、NAA 对不定芽生根都有促进作用,但所需的最适浓度不同,ABT 最佳浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,IBA 和 NAA 均为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,IAA 为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14]。不同生长调节剂组合浓度下,根的生长速度及启动生根的时间不同。胡继金等^[20]认为 NAA 诱导根的效果比 IAA 好,NAA 和 IAA 组合效果不如单独使用 NAA,但比单用 IAA 好,可能是生长素 NAA 更有利于单子叶植物外植体或愈伤组织分化根^[37]。但是董雅茹等^[21]的实验得出 NAA 和 IAA 组合效果优于 NAA。小苗在不添加任何激素的培养基上也能较好的生根^[11],生长素的浓度过高,对生根也会产生抑制作用。

5 其它条件的影响

5.1 外植体消毒

外植体的消毒是组培成功与否的第一步,若消毒不彻底,污染率高,耗费多余的物力和时间。黄花组培选用的外植体种类比较多,若从地下部分取材,最好先用流水冲洗,洗去表面泥土再进行常规消毒。消毒常用的试剂有漂白粉、新洁尔灭、酒精、升汞等。灭菌效果以升汞最好,升汞和 75%酒精配合使用效果好于单独使用^[14]。消毒时间的确定因选用的外植体类型、取材时期不同等有所差异。消毒时间太短,达不到好的杀菌效果,时间太长,会对外植体造成伤害,影响愈伤组织诱导。一般先将材料在酒精中浸泡 30 s 左右,在升汞中消毒 8~15 min,再用无菌水冲洗 3~5 次洗去表面的消毒液。若材料幼嫩,可适当缩短消毒液浸泡的时间以减小对外植体的伤害,反之可适当延长时间以达到更好的消毒效果。

5.2 光照和温度

黄花的组织培养培养温度一般在 26°C 左右。黑暗和光照条件下均能诱导出愈伤组织,暗培养更有利于形成愈伤组织,黄花胚状体诱导中,光照是必需的。黄花种子在培养基上暗培养使种子萌发,光照 10 d 后小苗基部周围形成一些胚状体^[20]。花梗在暗培养条件下可诱导大量愈伤组织,但不能进一步分化产生胚状体,光照培养下的

愈伤组织可进一步分化形成胚状体^[16]。分化出的小苗需要光照,光照强度 $2\,000 \sim 2\,500 \text{ lx}$,每天光照 10~16 h^[6],光照强度太弱或湿度太高,容易形成玻璃苗。与诱导和增殖培养相比,生根对光照也有要求^[13]。

5.3 炼苗移栽

试管苗移栽成活率的高低是关系到快速繁殖成败的关键问题之一。小苗转入生根培养基后 5~7 d 启动生根,7 d 左右长出白色的幼根,幼苗生根后应及时炼苗移栽,根生长的时间久,根组织老化,移栽容易伤根。幼苗移出瓶子之前先将瓶盖逐渐打开 2~3 d,使苗适应外界的环境,移栽时洗去根部的培养基以减少感染。试管苗长出的根细而长,一般没有根毛,移栽后应提供良好的生根环境,使尽快适应并长出新根。炼苗过程中促使根毛的发生能有效提高试管苗移栽成活率,将试管苗取出洗去根部培养基,放在湿润的吸水纸或纱布上 3~4 d,能使根部产生大量的根毛,且试管苗得到锻炼具有较强的适应能力,移栽后能较快地从土壤中吸收水分和养料,从而提高成活率^[20]。移栽的基质最好经过灭菌处理,大田管理期间,要注意遮荫、保湿。

6 问题与展望

虽然萱草属植物种质资源丰富,但是仍然存在一些需要改进的特质。例如对除草剂的耐性,虽然有些栽培品种表现出对除草剂不同程度的抗性,但是不存在完全抗除草剂的品种,培育出抗除草剂的黄花新品种将会节约大量劳动力,降低农民生产成本^[27]。另外一个比较重要的特性是对病害的抗性,黄花常见的病害有叶枯病、叶斑病、锈病、炭疽病、茎枯病等^[38],尤其是由真菌引起的黄花锈病,一旦发生传播很快,近年来已经造成对黄花产业的最大威胁,选育抗锈病的黄花品种是黄花产业的迫切需求。利用组织培养也可诱导黄花多倍体,创造新材料,提高种植产量,如周朴华等^[39]利用秋水仙素诱导愈伤组织获得黄花的同源四倍体,与普通二倍体相比,表现出植株长势强,花茎粗壮,花枝数增加,花蕾大等特点,也为黄花高产奠定基础。

对选育出的优良新品种需进行扩大生产,然而传统的繁殖方式速度较慢,要经过几年时间才能达到生产规模。目前,已有一些黄花组织培养成功的报道,但是大规模的生产还受到一定限制,主要还是黄花的快繁技术还不成熟,黄花组培中

用到的外植体种类比较多,对最佳外植体的选择有待进一步探索;地上部分外植体取材多数受季节限制,取材季节对再生是否有影响未见相关报道;黄花的再生途径有多种,但最适合于黄花快繁的途径不同的研究者观点不同。要实现黄花高效、性状稳定、大规模、低成本的生产还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王宝殿,姜坤. 金针菜栽培技术[J]. 吉林蔬菜,2009(1): 52-53.
- [2] 何新广,李文华,逯克安,等. 金针菜的栽培与加工[J]. 青海农林科技,1998(1):49-50.
- [3] 安娜. 干制黄花的保藏及防虫研究[J]. 食品工业科技,2009,30(1):293.
- [4] 沈美娟,刘永庆,李录明,等. 黄花菜组培苗性状的鉴定[J]. 湖南农学院学报,1987(2):69-76.
- [5] 郝建华,曹安庆,李瑛,等. 金针菜和萱草花药育性与透性的关系[J]. 西北植物学报,1994,14(6):134-137.
- [6] 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(2):32-34.
- [7] 周朴华,范鸿芝,王凤翔,等. 从黄花菜未受粉子房培养出单倍体植株[J]. 湖南农学院学报,1986(4):89-94.
- [8] 祝朋芳,张利欣,刘莉. 大花萱草与黄花菜杂交亲和性及其幼胚离体培养[J]. 北方园艺,2008(8):190-191.
- [9] 黄纯真. 应用组织培养方法获得四种花木试管植物的初步试验[J]. 植物生理学通讯,1980(6):37-40.
- [10] 张秀珊,柴向华,朱饱卿,等. 黄花菜的组织培养和快速繁殖[J]. 农业生物技术,2006(6):59-60.
- [11] 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):428-429.
- [12] 王凤翔,范鸿芝,胡继金,等. 黄花菜组织培养快速繁殖技术与球状体解剖观察的研究[J]. 湖南农业科学,1987(3):22-23.
- [13] 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):11-14.
- [14] 范银燕,崔根芳. 黄花菜无性系快速繁殖技术研究[J]. 山西农业科学,1994,22(4):22-24.
- [15] 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,1993,11(3):254-259.
- [16] 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植株形成的研究[J]. 海南大学学报:自然科学版,1996,14(4):321-324.
- [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.
- [18] 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):273-278.
- [19] 胡继金,周朴华,范鸿芝,等. 黄花菜组织培养及其在快速繁殖上的应用[J]. 湖南农业科学,1982(6):24-26.
- [20] 胡继金,王凤翔,周朴华,等. 黄花菜组织培养的快速繁殖及程序[J]. 湖南农学院学报,1984(4):93-98.
- [21] 董雅茹,王瑞库,王法政. 多倍体黄花菜离体培养研究技术[J]. 作物杂志,1995(2):10-11.
- [22] 周朴华,胡继金,范鸿芝. 黄花菜组织培养的初步研究[J]. 湖南农学院学报,1980(4):47-50.
- [23] 李祖鑫,葛斌,曾知富,等. 黄花菜组织培养快速繁殖研究[J]. 江西农业科技,1989(4):19-20.
- [24] Churikova O A. Microclonal propagation and some regularities of morphogenesis of daylily and hosta *in vitro* [J]. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008,63: 89-94.
- [25] 范鸿芝,周朴华,王凤翔,等. 黄花菜组织培养中球状体的诱导及细胞学初步观察[J]. 湖南农学院学报,1984(4): 99-103.
- [26] Chen J X, Hall D E, Luca V D. Effect of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.) [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2005,41:58-62.
- [27] Li Z W, Mize K, Campbell F. Regeneration of daylily (*Hemerocallis*) from young leaf segments [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2010,102:199-204.
- [28] 付强. 黄花菜切茎繁殖技术研究与应用[J]. 北京农业,2009(15):9-10.
- [29] 李登绚,韩睿. 黄花菜优良品种快速扩繁技术[J]. 北方园艺,2005(5):28.
- [30] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [J]. Physiol Plant, 1962,15:473-497.
- [31] 朱至清,王敬驹,孙敬三,等. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J]. 中国科学,1975(5):484-490.
- [32] 王培,陈玉蓉. C₁₇培养基在花药培养中应用的研究[J]. 植物学报,1986,28(1):38-45.
- [33] 王金兰,和现昌,刘文轩. 适于小麦花药培养的癸培养基[J]. 植物杂志,1991(1):21-22.
- [34] 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,1998,18(1): 89-90.
- [35] 张超美,张再军,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,1995,15(3):208-209.
- [36] 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组织学观察[J]. 植物学报,1989,31(6): 484-486.
- [37] 王凯基,倪德祥,张丕芳,等. 植物激素对驳骨丹茎愈伤组织生长和器官再生的作用[J]. 实验生物学报,1981(4): 337-341.
- [38] 刘中阳,孙小武,张玉石. 湖南黄花菜高效无公害生产技术及配套措施[J]. 湖南农业科学,2013(15):59-62.
- [39] 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.