

郁金香器官离体培养再生小鳞茎的研究

杨永刚 代汉萍* 胡新颖 雷家军

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要: 以4个郁金香品种‘凯氏奈丽斯’、‘风流寡妇’、‘检阅’和‘金色检阅’的叶、花茎、花托、子房、鳞片及腋芽等不同器官为外植体, 在MS+2,4-D 0.1 mg·L⁻¹, MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹, MS+BA 1.0 mg·L⁻¹, MS+BA 5.0 mg·L⁻¹, MS+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹ 5种培养基上进行离体培养。结果表明, 花托外植体直接诱导小鳞茎的频率最高, 在培养基MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹上诱导率达56.7%, 平均每块外植体产生小鳞茎数达10.7个; 其次是花茎, 直接诱导小鳞茎的频率为33.3%, 平均每块外植体产生小鳞茎数达19.9个; 鳞片及鳞片中的腋芽诱导鳞茎较难且需时间较长; 叶和子房则未能诱导出小鳞茎。

关键词: 郁金香; 组织培养; 愈伤组织; 再生鳞茎

中图分类号: S 682.2*63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1133-04

Studies on Regenerating Bulblets from Tissue Culture of Tulip

Yang Yonggang, Dai Hanping*, Hu Xinying, and Lei Jiajun

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: The leaf, floral stem, receptacle, ovary, scale, axillary bud of 4 tulip cultivars, ‘Kees Nelis’, ‘Merry Widow’, ‘Parade’, and ‘Golden Parade’, were used as explants in vitro culture on the media of MS+2,4-D 0.1 mg·L⁻¹, MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹, MS+BA 1.0 mg·L⁻¹, MS+BA 5.0 mg·L⁻¹, MS+BA 2.0 mg·L⁻¹+IAA 0.5 mg·L⁻¹ in the experiment. The results showed that the percent of bulblet induction was highest when receptacle was used as explant, with 56.7% on MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹, followed by floral stem with 33.3% on the same medium. The average number of the regenerating bulblets was 10.7 per receptacle explant and 19.9 per floral stem segment explant. The scale segment and axillary bud were difficult and with a longer time to regenerate bulblet. The leaf segment and ovary failed to regenerate bulblet in the experiment.

Key words: Tulip; *Tulipa gesneriana* L.; Tissue culture; Callus; Regenerating bulblet

1 目的、材料与方法

郁金香传统分球繁殖增殖速度很慢, 而且容易造成品种退化, 因此我国每年需从荷兰进口大量昂贵的种球。利用组织培养方法不仅能保持原品种的优良特性, 而且其繁殖系数为分球繁殖的20~25倍^[1]。目前郁金香组织培养大多用鳞片作外植体, 但分化出小鳞茎的频率较低, 离生产应用还有一段距离^[2,3]。作者对郁金香不同外植体离体诱导小鳞茎进行了研究。

本试验所用的郁金香种球引自沈阳植物园, 4个品种为‘凯氏奈丽斯’、‘风流寡妇’、‘检阅’、‘金色检阅’。

将种球进行水培, 待其第3片叶刚长出时, 取出整个植株用自来水冲洗20 min, 然后用70%的酒精消毒1 min, 再用0.1%的升汞消毒两次, 每次5 min, 最后用无菌水冲洗3次。分别取叶、花茎、花托、子房、鳞片以及鳞片中的腋芽为外植体。接种前先将外植体放到已灭菌的滤纸上除去多余

收稿日期: 2006-02-23; 修回日期: 2006-08-04

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hanping_dai@yahoo.com.cn)

的水分,再在其伤口处切去约 2 mm,防止产生药害。将花茎和花托切成长约 8 mm 的小段,叶和鳞片切成 8 mm × 8 mm 的小块接种到培养基上,腋芽和子房则直接接种到培养基上。每处理接种 16 瓶,每瓶接 5 个外植体。

试验以 MS 为基本培养基附加 2,4-D, BA 及 IAA (表 1), pH 调至 5.8。培养温度 24℃, 每天光照 12 h, 光强 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同外源激素对花茎诱导愈伤组织及小鳞茎的影响

将‘风流寡妇’品种的花茎外植体接种到 5 种不同的培养基上,均能诱导愈伤组织(表 1)。在 MS + 2,4-D 0.1 mg · L⁻¹ 与 MS + 2,4-D 0.5 mg · L⁻¹ 上愈伤组织诱导率较高,均为 30% 左右,但前者直接诱导小鳞茎的频率和平均每块外植体能诱导出的小鳞茎数均低于后者;培养基 MS + BA 2.0 mg · L⁻¹ + IAA 0.5 mg · L⁻¹ 上的愈伤组织诱导频率最低,仅为 16.4%,直接诱导小鳞茎的也较低,为 5.5%;仅用 BA 作为外源激素的培养基虽能诱导产生愈伤组织,但不能直接诱导产生小鳞茎。可见,由 MS 附加一定浓度的 2,4-D 是郁金香花茎组织培养较好的培养基。

2.2 不同品种花茎诱导愈伤组织及小鳞茎的比较

4 个郁金香品种的花茎外植体接种在 MS + 2,4-D 0.5 mg · L⁻¹ 培养基上均产生了愈伤组织,并且都有小鳞茎的直接诱导(表 1)。4 个品种产生愈伤组织的频率非常接近,均为 30% 左右,但这些愈伤组织均褐化死亡,未能进一步分化出苗。4 个品种直接诱导鳞茎的频率也很接近,均为 30% 左右,平均每块外植体大约能产生 20 个小鳞茎。

试验中还观察发现,不同品种诱导产生愈伤组织和小鳞茎的时间不同,‘风流寡妇’第 8 周就有少量外植体直接诱导出小鳞茎,同时也有少量外植体开始形成愈伤组织。‘检阅’最晚,第 10 周才开始产生愈伤组织和诱导小鳞茎。

表 1 外源激素对不同品种郁金香花茎诱导愈伤组织及小鳞茎的影响

Table 1 Effects of extraneous hormones on inducing callus and bulblets from floral stem of tulip

品种 Cultivars	浓度 Concentration (mg · L ⁻¹)			接种外植体数 Number of explants incubated	形成愈伤组织的外植体 Explants inducing callus		直接诱导鳞茎的外植体 Explants regenerating bulblet		诱导鳞茎总数 Number of bulblets induced	平均每块外植 体产生鳞茎数 Mean bulblets per explant
	BA	2,4-D	IAA		数量 Number	频率 Percent (%)	数量 Number	频率 Percent (%)		
风流寡妇 Merry Widow	1.0			68	19	27.9	0	0.0	0	0.0
	5.0			71	15	21.1	0	0.0	0	0.0
	2.0		0.5	73	12	16.4	4	5.5	22	5.5
		0.1		73	23	31.5	13	17.8	116	8.9
		0.5		69	21	30.4	23	33.3	457	19.9
凯氏奈丽斯 Kees Nelis		0.5		67	21	31.3	22	32.8	430	19.5
检阅 Parade		0.5		69	20	29.0	22	31.9	415	18.8
金色检阅 Golden Parade		0.5		71	23	32.4	21	29.6	427	20.3

2.3 不同器官诱导愈伤组织及小鳞茎的比较

将郁金香品种‘风流寡妇’的叶、花茎、花托、子房、鳞片以及鳞片中的腋芽接种在 MS + 2,4-D 0.5 mg · L⁻¹ 培养基上。从表 2 可以看出,鳞片的污染率最高(26.4%),腋芽次之,叶、花茎、花托和子房的污染率均较低(约 8%)。

花托与花茎诱导愈伤组织的频率最高,均为 30% 左右,花托直接诱导小鳞茎的频率最高,达 56.7%,平均每块能产生 10.7 个小鳞茎;花茎直接诱导小鳞茎的频率为 33.3%,平均每块能产生小

鳞茎数最高, 达 19.9 个, 试验中最多的能达到 27 个, 因此花托和花茎是比较理想的外植体。腋芽与鳞片诱导愈伤组织的频率较接近, 分别为 22.2% 和 23.4%, 它们直接诱导小鳞茎的频率和平均每块能产生的小鳞茎数均低于花托和花茎。

本试验中叶片与子房均未能诱导产生愈伤组织和小鳞茎, 其它外植体诱导产生的所有愈伤组织均褐化死亡。

表 2 郁金香品种‘风流寡妇’不同器官诱导产生愈伤组织及小鳞茎的比较

Table 2 Effects of different organs of tulip ‘Merry Widow’ on callus induction and bulblet regeneration

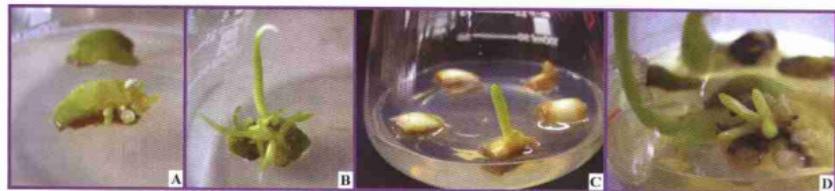
外植体 Explants	接种外植体数 Number explants incubated	污染的外植体 Number explants contaminated		形成愈伤组织的外植体 Explants inducing callus		直接诱导鳞茎的外植体 Explants regenerating bulblet		诱导鳞茎总数 Number of bulblets induced	平均每块外植体产生鳞茎数 Mean bulblets per explant
		数量 Number	频率 Percent (%)	数量 Number	频率 Percent (%)	数量 Number	频率 Percent (%)		
叶 Leaf	83	8	9.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
花茎 Floral stem	75	6	8.0	21	30.4	23	33.3	457	19.9
花托 Receptacle	32	2	6.3	9	30.0	17	56.7	182	10.7
子房 Ovary	32	3	9.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
鳞片 Scale	87	23	26.4	15	23.4	3	4.7	11	3.7
腋芽 Axillary bud	88	16	18.2	16	22.2	5	6.9	29	5.8

花茎下部被鳞片包裹, 呈白色, 组织成熟度较高, 接种不久后均褐化死亡。花茎上部未被包裹, 呈绿色, 较幼嫩, 接种 1 周后变为黄绿色, 表面光滑且有光泽, 第 8 周开始部分外植体产生黄绿色乳状突起, 第 10 周这些突起长成小鳞茎 (图版, A)。

花托接种 1 周后, 部分外植体颜色由淡黄绿色变为嫩绿色, 表面有光泽, 第 7 周后部分花托开始产生黄绿色乳状突起, 第 8 周这些突起长成可分辨的小鳞茎, 第 20 周小鳞茎的顶端出现枯萎现象 (图版, B)。

鳞片接种 1 周后开始膨大, 少部分鳞片的颜色由白色变为淡黄色。约在第 11 周开始有少量外植体从切口处直接诱导出小鳞茎 (图版, C)。

腋芽接种时为白色, 1 周后开始膨大生长, 基部逐渐长成圆球形, 10 周后外层呈灰褐色, 剥去外层, 里面的鳞茎呈白色, 继续培养这些鳞茎, 大约在第 21 周部分腋芽的基部产生淡黄绿色的愈伤组织, 2 周后在愈伤组织与正常组织交界处诱导出小鳞茎 (图版, D)。



图版说明: A. 郁金香花茎培养 10 周后诱导出的小鳞茎; B. 花托培养 20 周后小鳞茎的生长发育状态; C. 鳞片培养 11 周后诱导出的小鳞茎; D. 腋芽培养 23 周后诱导出的小鳞茎。

Explanation of plates: A. The bulblets induced from floral stem segment after culturing 10 weeks; B. The status of the bulblets regenerated from receptacle after culturing 20 weeks; C. The bulblets induced from the scale segment after culturing 11 weeks; D. The bulblets induced from the axillary bud after culturing 23 weeks.

3 讨论

部分研究者将郁金香花茎、鳞片等外植体离体培养产生的形态上象芽的结构称之为芽^[2,3]，但本试验中观察发现，它由一层封闭的鳞片构成，不是正常的叶片，且其在试管中的生长过程及生长状态与鳞片叶腋处的小鳞茎一致，虽然形态较长，但从结构上看它是一个鳞茎，因此本试验将其称为小鳞茎。

试验中郁金香花茎上部外植体诱导出小鳞茎的频率高，下部外植体则完全褐化死亡，这与 Taeb 等^[4]的结果相反。他们认为花茎下部组织比较活跃，诱导出小鳞茎的频率高，这可能与取材时间不同有关：他们所取的花茎长约 12~14 mm，而本试验中花茎长约 30~40 mm。陆文梁等^[2]在对花茎的培养中大约在第 8 周分化出愈伤组织，第 20 周这些愈伤组织再分化形成小鳞茎，平均每块外植体最多形成 15 个小鳞茎。Rice 等^[5]在对‘风流寡妇’花茎的培养中先将外植体放到 20℃ 下培养 14~18 周，然后用 4℃ 处理 8 周，最后再移回到 20℃ 下培养，通过这样的处理平均每块外植体能产生 20~25 个小芽。而本试验中的花托和花茎外植体没有经过任何特殊的处理即在第 8 周产生了小鳞茎，而且平均每块花茎外植体产生的小鳞茎也能达到 20 个。

另外，前人在郁金香组织培养中多先诱导形成愈伤组织^[1,3,6,7]，然后再分化形成小芽，而本试验中所有的小鳞茎均从外植体上直接诱导产生，不但缩短了培养时间，还避免了因经过愈伤组织阶段而可能产生的变异，但郁金香小鳞茎再生后增殖快繁尚待进一步研究。

参考文献:

- 1 唐前瑞, 陈友云, 彭尽晖. 郁金香鳞茎愈伤组织的诱导研究. 湖南农业大学学报, 1998, 24 (2): 105~107
Tang Q R, Chen Y Y, Peng J H. Study on callus inducement of bulb in tulip. Journal of Hunan Agricultural University, 1998, 24 (2): 105~107 (in Chinese)
- 2 陆文梁, 王雪洁, 郭仲琛. 郁金香组织培养及器官分化的研究. 园艺学报, 1986, 13 (1): 55~60
Lu W L, Wang X J, Guo Z C. Tissue culture and differentiation of organ in tulip. Acta Horticulturae Sinica, 1986, 13 (1): 55~60 (in Chinese)
- 3 Gude H, Dijkema M H G E. Somatic embryogenesis in tulip. Acta Horticulturae, 1997, 430: 275~280
- 4 Taeb A G, Alderson P G. Micropropagation of tulip: optimizing shoot production from floral stem explants. Acta Horticulturae, 1987, 212: 677~681
- 5 Rice R D, Alderson P G, Wright N A. Induction of bulbing of tulip shoots in vitro. Scientia Horticulturae, 1983 (20): 377~390
- 6 王丽娟, 陈 忠, 赵 越. 郁金香快速繁殖技术的研究. 北方园艺, 2003 (4): 75
Wang L J, Chen Z, Zhao Y. Study on tulip micropropagation. Northern Horticulture, 2003 (4): 75 (in Chinese)
- 7 李 艳, 方宏筠. 郁金香叶片直接诱导试管人工种球的快速繁殖研究. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 1998, 21 (2): 144~147
Li Y, Fang H J. Study on micropropagation of bulblets from tulip leaves. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science), 1998, 21 (2): 144~147 (in Chinese)