

# 郁金香鳞片组织培养研究

胡新颖, 王锦霞, 代汉萍, 雷家军\*

(沈阳农业大学 园艺学院, 沈阳 110161)

**摘要:**为探索郁金香的快繁方法,并为转基因分子水平研究奠定基础,对4个郁金香品种‘Parade’, ‘Merry Widow’, ‘Golden Parade’, ‘Pink Diamond’的鳞片组织培养进行系统的研究。结果表明:0.1% $\text{HgCl}_2$  10min+5% $\text{NaClO}$  20min 是最佳的消毒方法。‘Parade’适宜诱导愈伤组织的培养基为 $\text{MS+NAA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,诱导率可达100%。‘Parade’和‘Merry Widow’适宜诱导芽的培养基分别为 $\text{MS+NAA}2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{MS+NAA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,芽的直接再生率均为15.4%。中层鳞片易诱导成愈伤组织,诱导率为8.0%,内层鳞片较易直接诱导生芽,再生率可达26.7%。培养基中添加50~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素C有利于直接再生芽,而不利于愈伤组织的诱导。鳞片接种后暗处理5d和15d可以使芽的直接再生率分别达到12.5%和10.3%。

**关键词:**郁金香;鳞片;组织培养

中图分类号: S682.2.63

文献标识码: A

文章编号: 1000-1700(2007)03-0304-04

## Tissue Culture of Bulb Scale in Tulip

HU Xin-ying, WANG Jin-xia, DAI Han-ping, LEI Jia-jun\*

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

**Abstract:** The experiment was to look for a method of micropropagation and establish a base for research of molecule level. The effect of six factors on tissue culture of bulb scales of four tulip cultivars was studied. The results showed that bulb sterilization with 0.1% $\text{HgCl}_2$  for ten minutes and 5%  $\text{NaClO}$  for twenty minutes was the best. The best culture medium for callus inducement of cv. ‘Parade’ was  $\text{MS+NAA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The rate of callus inducement was up to 100%. The best culture media for shoot regeneration of cv. ‘Parade’ and cv. ‘Merry Widow’ were  $\text{MS+NAA}2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $\text{MS+NAA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{BA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The rates of shoot regeneration were all 15.4%. The middle-layer scales of bulb were easier to induce callus, with the rate 8.0%, but inner-layer scales of bulb were easier to induce shoots directly, with the rate 26.7%. Adding 50~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ascorbic acid in culture medium was proved to be advantageous to the shoot regeneration, but to be disadvantageous to the callus inducement. The rates of shoot regeneration were up to 12.5% and 10.3% when bulb scales were given darkness treatments for five days and fifteen days after inoculating.

**Key words:** tulip; bulb scale; tissue culture

郁金香(*Tulipa gesneriana* L.)别名洋荷花、草麝香,是百合科郁金香属球根花卉,原产地中海沿岸、中亚细亚及土耳其等地。郁金香以其艳丽的花色、端庄的外表、亭亭玉立的花姿博得世界人民的喜爱,被视为园林露地观赏花卉的首选<sup>[1]</sup>。但郁金香靠鳞茎自然增殖速度很慢,且受病毒、病害等因素影响,品质退化和死亡现象严重。运用组织培养法繁殖郁金香,除能保持原品种的优良性状外,其繁殖系数比分球繁殖法高20~25倍,且生长速度快,开花期比实生苗提早3~4年<sup>[2]</sup>。郁金香组织培养的研究工作国外开展较早,但大多数研究者是以花茎为外植体诱导形成小苗,很少有采用鳞片为外植体的报道<sup>[3-5]</sup>。我国对郁金香组织培养的研究起步较晚,研究者不多,杨乃博、谢亚红、薛寒青等对郁金香外植体消毒、愈伤组织诱导、不定芽分化及生根等进行过简要报道<sup>[6-9]</sup>。本试验对郁金香鳞片组织培养过程中诱导愈伤组织和再生芽的影响因素进行研究,旨在探索郁金香组培快繁方法,并为转基因等分子水平的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为荷兰进口的优质郁金香种球,品种名分别为‘Parade’, ‘Merry Widow’, ‘Golden Parade’和

收稿日期: 2006-09-10

作者简介: 胡新颖(1980-),女,沈阳农业大学硕士研究生,从事观赏植物遗传育种研究。\*通讯作者 Corresponding author: 雷家军(1966-),男,沈阳农业大学教授,博士,从事观赏植物遗传育种研究。

‘Pink Diamond’。

## 1.2 方法

以 MS 培养基(pH 值 5.8,蔗糖 30g·L<sup>-1</sup>,琼脂 7g·L<sup>-1</sup>)为基本培养基。培养室温度为(25±1)℃,每天用日光灯照明 12h,照度为 2000lx。

1.2.1 不同消毒方法对鳞片接种污染率的影响 去掉种球外面的膜质鳞片,整球置于流水下冲洗 20min,然后进行消毒处理。设 3 种消毒处理,依次为处理 I :5%NaClO 20min;处理 II :0.1%HgCl<sub>2</sub> 10min;处理 III :0.1%HgCl<sub>2</sub> 10min+5%NaClO 20min。最后用无菌水冲洗 4~6 遍,切成(0.8~1.0)cm×(0.8~1.0)cm 的小方块,接入培养基,7d 后调查鳞片切块的污染情况。

1.2.2 不同基因型和激素配比对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响 将‘Parade’和‘Merry Widow’的鳞片切块接种在含 NAA0.5~2.0mg·L<sup>-1</sup>和 BA0.5~1.0mg·L<sup>-1</sup> 7 种浓度配比的培养基中,比较 2 种激素及其浓度对诱导再生的影响。

1.2.3 不同层鳞片对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响 将‘Parade’的鳞茎分外、中、内 3 层逐层剥开,切块接种到培养基 MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA2.0mg·L<sup>-1</sup> 中,比较不同层鳞片对诱导再生的影响。

1.2.4 维生素 C 对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响 将‘Golden Parade’的鳞片切块接种到附加 0,10,50,100,200,500mg·L<sup>-1</sup> 维生素 C 的培养基 MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup> 中培养,比较维生素 C 对诱导再生的影响。

1.2.5 黑暗对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响 将‘Pink Diamond’的鳞片切块接入含 NAA 和 BA 各 1.0mg·L<sup>-1</sup> 的 MS 培养基中,分别进行 5,10,15,30d 连续黑暗培养,以光培养为对照,30d 后调查鳞片不定芽再生和愈伤组织诱导情况,比较暗培养对诱导再生的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒方法对鳞片接种污染率的影响

由表 1 可见,0.1%HgCl<sub>2</sub> 10min 的消毒效果明显好于 5%NaClO 20min,污染率可由 43.7% 下降到 9.8%,而用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 10min +5% NaClO 20min 消毒的污染率比单独使用 0.1%HgCl<sub>2</sub> 10min 更低,仅为 7.1%,且消毒时不至于杀死鳞片组织细胞。因此,郁金香鳞片的最佳消毒方法是 0.1%HgCl<sub>2</sub> 10min+5%NaClO 20min。

表 1 不同消毒方法对郁金香鳞片接种污染率的影响

Table 1 Effect of sterilization methods on contamination of bulb scales in tulip

消毒方法 Methods sterilization	接种外植体/Piece Explants inoculated	污染外植体/Piece Explants contaminated	污染率/% Rate of pollution
I	270	118	43.7
II	397	39	9.8
III	210	15	7.1

### 2.2 不同基因型和激素比对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响

由表 2 可见,‘Parade’和‘Merry Widow’的鳞片切块在 7 种培养基中的再生效果存在一定差异。‘Parade’在 MS+NAA0.5~2.0mg·L<sup>-1</sup>+BA0.5~1.0mg·L<sup>-1</sup> 的 6 种培养基上均可产生愈伤组织(图 1),且在 MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup> 上愈伤组织诱导率最高(100%),在 MS+NAA2.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup> 上愈伤组织诱导率也较高(54.1%)。但这 2 种培养基上始终未见有芽的分化,其他 5 种培养基上均有芽直接再生(图 2),再生率最高为 15.4%。

在相同培养基上,‘Merry Widow’愈伤组织诱导率和芽直接再生率都低于‘Parade’,只有在 MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA0.5mg·L<sup>-1</sup> 上有 5.6%的鳞片诱导出愈伤组织,在 MS+NAA0.5mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup> 上芽直接再生率达 15.4%,而在 MS+NAA2.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup> 上芽直接再生率仅为 2.8%。因此,‘Parade’比‘Merry Widow’更易再生,‘Parade’适宜诱导愈伤组织的培养基为 MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup>,适宜再生芽的培养基为 MS+NAA2.0mg·L<sup>-1</sup>+BA0.5mg·L<sup>-1</sup>,‘Merry Widow’适宜再生芽的培养基为 MS+NAA0.5mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup>,适宜诱导愈伤组织的培养基还有待进一步研究。

### 2.3 不同层鳞片对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响

由表 3 可见,不同层鳞片的愈伤组织诱导和芽再生存在差异。外层鳞片接入培养基后大部分褐变死亡,仅 4.4%的鳞片诱导产生愈伤组织。中层鳞片易发生愈伤组织诱导和芽再生,诱导率和再生率分别为 8.0%和

4.0%, 而内层鳞片易于直接诱导再生芽, 再生率可达 26.7%。综上, 采用郁金香的中、内层鳞片进行组织培养的效果较好。

表 2 不同 NAA 和 BA 浓度对不同品种郁金香鳞片愈伤组织诱导和芽再生的影响

Table 2 Effect of concentration of NAA and BA on callus inducement and shoot regeneration of bulb scales in different tulip cultivars

品种 Cultivar	NAA 浓度 /mg·L <sup>-1</sup> Concentration of NAA	BA 浓度 /mg·L <sup>-1</sup> Concentration of BA	接种外植体 /Piece Explants inoculated	产生愈伤组织 的外植体/Piece Explant induced callus	产生芽的外植体 /Piece Explant regenerated shoot	愈伤组织 诱导率/% Rate of callus inducement	芽再生率 /% Rate of shoot regeneration
Parade	0.5	0.5	40	8	4	20.0	10.0
	1.0	0.5	50	5	5	4.0	4.0
	2.0	0.5	39	9	6	23.1	15.4
	0.5	1.0	48	12	6	25.0	12.5
	1.0	1.0	40	40	0	100.0	0.0
	2.0	1.0	37	20	0	54.1	0.0
	1.0	2.0	37	0	2	0.0	5.4
Merry	0.5	0.5	40	0	0	0.0	0.0
Widow	1.0	0.5	36	2	0	5.6	0.0
	2.0	0.5	53	0	0	0.0	0.0
	0.5	1.0	39	0	6	0.0	15.4
	1.0	1.0	40	0	0	0.0	0.0
	2.0	1.0	36	0	1	0.0	2.8
	1.0	2.0	49	0	0	0.0	0.0



图 1 郁金香鳞片诱导产生愈伤组织

Figure 1 The callus induced from bulb scales of tulip



图 2 郁金香鳞片诱导直接再生芽

Figure 2 The shoot induced from bulb scales of tulip directly

表 3 郁金香品种 'Parade' 的不同层鳞片对再生的影响

Table 3 Effect of different bulb scales on regeneration in vitro of tulip cv. 'Parade'

鳞片层 Layer of bulb scales	接种外植体/piece Explant inoculated	产生愈伤组织的外植体/piece Explant induced callus	产生芽的外植体/piece Explant regenerated shoot	愈伤组织诱导率/% Rate of callus inducement	芽再生率/% Rate of shoot regeneration
外层 Outer-layer	45	2	0	4.4	0.0
中层 Middle-layer	50	4	2	8.0	4.0
内层 Inner-layer	45	0	12	0.0	26.7

#### 2.4 培养基中附加维生素 C 对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响

在培养基中附加一定量的维生素 C 对愈伤组织诱导和芽直接再生有一定影响。由表 4 可见, 当维生素 C 浓度为 50, 100, 200mg·L<sup>-1</sup> 时, 鳞片不经愈伤组织而直接再生芽, 但再生率不高, 均低于 10%。当维生素 C 浓度为 0, 10, 500mg·L<sup>-1</sup> 时, 虽然产生了愈伤组织, 但始终不见有芽直接再生, 愈伤组织也未能再分化出芽。可见, 不同浓度维生素 C 在郁金香鳞片诱导分化中起到一定作用。另外, 有报道提到维生素 C 有防止植物组织培养过程中组织褐化, 且可使不定芽生长良好的作用<sup>[10, 11]</sup>, 本试验中未见郁金香鳞片褐化减轻, 这可能是由于该品种鳞片本身的特性或其他原因引起的。因此, 维生素 C 是否在郁金香鳞片组织培养中起到防止褐化的作用以及其对鳞片诱导成苗的影响还有待于进一步研究。

表4 品种'Golden Parade'的培养基中附加维生素C对鳞片再生的影响

Table 4 Effect of ascorbic acid adding in media on regeneration in vitro of tulip cv. 'Golden Parade'

Vc 浓度/mg·L <sup>-1</sup> Concentration of ascorbic acid	接种外植体/Piece Explant inoculated	产生愈伤组织 的外植体/Piece Explants induced callus	产生芽的外植体/Piece Explant regenerated shoot	愈伤组织诱导率/% Rate of callus inducement	芽再生率/% Rate of shoot regeneration
CK	30	2	0	6.7	0
10	37	8	0	21.6	0
50	42	0	2	0	4.8
100	31	0	2	0	6.5
200	39	0	3	0	7.7
500	37	1	0	2.7	0

### 2.5 黑暗对愈伤组织诱导和直接再生芽的影响

由表5可见,不论暗处理与否,都未见有愈伤组织形成,但暗处理5d和15d时芽的直接再生率较高,分别为12.5%和10.3%,对照和暗处理10d的芽直接再生率相近,分别为3.3%和2.8%,暗处理30d时再生率为0。可见,黑暗对郁金香鳞片不定芽再生有一定影响。对于在所有处理中均未产生愈伤组织现象,可能是由于品种'Pink Diamond'的鳞片不易启动脱分化的缘故,也可能是试验操作中可能存在一定误差所致。因此,黑暗培养对郁金香鳞片再生的影响还需进一步研究。

表5 黑暗处理对品种'Pink Diamond'不定芽再生的影响

Table 5 Effect of darkness on regeneration of shoot in vitro of tulip cv. 'Pink Diamond'

黑暗处理/d Date of darkness	接种外植体/Piece Explants inoculated	产生芽的外植体/piece Explants regenerated shoot	芽再生率/% Rate of shoot regeneration
CK	30	1	3.3
5	48	6	12.5
10	72	2	2.8
15	58	6	10.3
30	42	0	0

## 3 讨论

在组织培养试验中,外源激素是植物离体再生能否成功的关键因素之一。本试验中采用NAA和BA作为外源激素,结果表明,'Parade'的鳞片在培养基MS+NAA1.0mg·L<sup>-1</sup>+BA1.0mg·L<sup>-1</sup>中的愈伤组织诱导率高达100%,这与陆文梁等<sup>[8]</sup>和崔辉梅等<sup>[9]</sup>的研究结论一致,但由于愈伤组织再分化出芽较难,本试验认为通过愈伤组织再分化芽的途径来实现郁金香离体再生是不适合的。所以,采用培养基MS+NAA2.0mg·L<sup>-1</sup>+BA0.5mg·L<sup>-1</sup>直接再生芽是'Parade'的最佳繁殖途径。另外,在相同培养条件下,'Merry Widow'鳞片的愈伤组织诱导和不定芽直接再生都较'Parade'难,这可能与品种基因型有关,因此,不同基因型等因素对郁金香离体培养的影响也是今后的研究重点。

### 参考文献:

- [1] 赵小明,茅淑敏.郁金香生产技术[M].北京:中国农业出版社,2002:1-3.
- [2] 曹前进,何明勋.我国郁金香组织培养的研究进展[J].上海农业科技,2003,(1):9-10.
- [3] WRIGHT NA, ALDERSON PG. The growth of tulip tissues in vitro[J].Acta Horticulturae,1980,109:263-270.
- [4] ALDERSON PG, RICE RD, WRIGHT NA. Towards the propagation of tulip in vitro[J].Acta Horticulturae,1983,131:39-47.
- [5] TEAB AG, ALDERSON PG. Effect of low temperature and sucrose on bulb development and on the carbohydrate status of bulbing shoots of tulip in vitro[J].Journal of Horticultural Science,1990,65(2):193-197.
- [6] 杨乃博.郁金香鳞茎、心叶的不定芽分化[J].植物生理学通讯,1985,(4):37-38.
- [7] 谢亚红,吴雪萍,宋慧芬.郁金香的组织培养[J].植物生理学通讯,1985,(4):36.
- [8] 陆文梁,王雪洁,郭仲琛.郁金香组织培养及器官分化的研究[J].园艺学报,1986,13(1):55-60.
- [9] 崔辉梅,刘彤,马兵钢,等.野生郁金香愈伤组织的诱导研究[J].湖北林业科技,2001,(4):10-12.
- [10] 周俊辉,周家容,曾浩森,等.园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J].园艺学报,2000,27(增刊):481-486.
- [11] 杨丽萍,张虎林,赵秀梅.沙棘离体快速繁育技术研究[J].国际沙棘研究与开发,2004,2(1):12-16.

[责任编辑 马迎杰]