

# 老鸦瓣离体培养再生小鳞茎的研究

孙骏威, 朱 诚, 王飞娟, 江 琼, 丁艳菲

(中国计量学院 生命科学院, 浙江 杭州 310018)

**摘 要:**以老鸦瓣鳞片为外植体,研究了不同处理对老鸦瓣小鳞茎的诱导和生根的影响。结果表明:外层的鳞片分别优于中层和内层,凹面朝上的接种方式优于凹面朝下的接种方式;多种植物生长剂组合均可诱导鳞片产生小鳞茎,但以 TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 最优,其诱导率可达 93.3%,小鳞茎数可达 12.21 个;小鳞茎在 1/4MS+NAA 0.1 mg/L + IAA 0.3 mg/L 的培养基中表现最好,生根率达 97%,移栽成活率达 98%。

**关键词:**老鸦瓣;鳞片;再生小鳞茎;植物生长调节剂

**中图分类号:**Q 948.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0107-03

老鸦瓣 [*Tulipa edulis* (Miq.) Bak.] 属百合科 (Liliaceae) 郁金香属多年生纤弱草本植物,分布于我国东北至长江流域各省。其除去膜质皮和绒毛后的干燥鳞茎入药,中药名为光慈姑,其性凉,味甘、辛,有小毒,具清热解毒、散结消肿之功效,主治咽喉肿痛、瘰疬结核、瘀滞疼痛、痈疽肿毒和蛇虫咬伤等症<sup>[1]</sup>。近年发现,光慈姑具抗肿瘤作用,阮小丽等<sup>[2]</sup>发现老鸦瓣对小鼠的 Lewis 肺癌、S180 实体瘤和肝癌均有显著抑制作用,且具有外抗人肝癌细胞株 7721 活性;其在乳腺疾病等方面也具有显著疗效。老鸦瓣需求日益增加,但目前光慈姑主要来自于野生的采挖,人工栽培繁殖系数低下,故导致供需矛盾也日益突出,且易导致野生资源枯竭<sup>[3]</sup>。据此,吴正军等<sup>[4]</sup>通过研究老鸦瓣的传花生物学特性和种子萌发特性来探讨其繁殖机理。现以老鸦瓣鳞片为外植体,研究了不同处理对老鸦瓣小鳞茎的诱导和生根的影响,旨在通过组织培养技术来实现老鸦瓣的快速繁殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年 5 月中下旬于浙江省杭州市拱墅区半山上采挖地上茎基本枯萎的老鸦瓣的鳞茎,流水冲淋,洗去表面泥土,待沥干后,用保鲜袋置于 4℃ 冰箱内保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 消毒处理 试验时,去掉干燥的根和地上部,加适量洗涤剂仔细刷洗,再用自来水冲洗 0.5~1.0 h,整个球茎浸入 70% 的酒精溶液中 30 s,再泡入滴加了 1 滴 1 mol/L NaOH 的 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液中消毒 30 min,无菌水冲洗 2~3 次以除去残余升汞,将外植体放到已

灭菌的滤纸上以除去多余的水分,将鳞片材料切成 1~2 cm<sup>2</sup> 的小块,接种于各培养基中,每瓶接种 3 块。

1.2.2 小鳞茎诱导的植物生长调节剂的初步筛选 外植体采用剥去最外面的鳞片后的第一枚鳞片,切成小块后按凹面朝上的方式接入到加有不同植物生长调节剂的 MS 培养基中,各处理分别为:1、2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L;2、6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;3、TDZ 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L;4、TDZ 0.05 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L;5、TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L。重复 3 次。所有培养基中蔗糖浓度为 3%,琼脂浓度为 0.7%,pH 5.8~6.0,121℃ 下高温高压灭菌 20 min;先进行暗培养,温度为 (25±1)℃,培养条件为 14 h 光/10 h 暗,光照强度 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,下同。观察外植体生长情况并记录,在 30 d 时随机抽出 20 瓶,统计小鳞茎的诱导率和小鳞茎平均产生数(以能产生小鳞茎的鳞片为基数),并筛选出较佳的植物生长调节剂组合以进行优化。

1.2.3 小鳞茎诱导的植物生长调节剂组合的优化 根据 1.2.2 的试验结果,选择最优的植物生长调节剂组合,设置 3 个梯度组合,配制 MS 培养,将外植体接种于其上,外植体材料和接种方向同 1.2.2。30 d 随机抽出 10 瓶进行统计。

1.2.4 不同鳞片部位对小鳞茎诱导的影响 切取消毒完的鳞茎,剥出鳞片,共选用外层、中层和内层各 1 枚鳞片,切成小块,接入添加有 TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 的 MS 培养基中,摆放位置为凹面朝上。30 d 随机抽出 10 瓶进行统计。

1.2.5 外植体不同摆放方式对小鳞茎诱导的影响 外植体采用剥去最外面的鳞片后的第一枚鳞片,切成小块后分别按凸面朝上和凹面朝上的方式接入到添加有 TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 的 MS 培养基中。

**第一作者简介:**孙骏威(1978-),男,硕士,副教授,硕士生导师,研究方向为植物生物技术。E-mail:juville@cjlu.edu.cn.

**收稿日期:**2013-11-13

30 d随机抽出 10 瓶进行统计。

### 1.2.6 不同处理对再生小鳞茎的生根和移栽的影响

材料采用 1.2.2 筛选优化得到的再生小鳞茎。仔细地将再生小鳞茎与外植体分开,如果分不开,可留少量外植体,插至生根培养基中,各设置 3 个梯度的基本培养基(MS、1/2MS 和 1/4MS)、NAA(0、0.1、0.5 mg/L)和 IAA(0.3、1.0、3.0 mg/L),每瓶 4 个再生小鳞茎。30 d 时随机抽出 10 瓶进行统计生根率。练苗时微开培养瓶盖进行练苗,1 d 后取出并洗净根部附着的培养基,移入土中,土为小粉土,初期要做好保湿措施,并置于阴凉处,待新叶长出,即可除去烧杯,同时统计移栽成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鳞茎诱导的植物生长调节剂的初步筛选

几种培养基均可诱导出小鳞茎。接入的鳞片由白色转变成绿色,鳞片也有明显增厚的现象。在切口处和凹面处不久会出现较大的颗粒状突起,随后长出绿色的不定芽,并直接长成绿色小鳞茎。但是诱导率、颗粒状突起的时间和小鳞茎的数量并不一致。由表 1 可知,诱导率为 73.3%~93.3%,以 1 号和 5 号培养基最多,但是随着培养时间的延续,每个处理均可达到 95%以上;颗粒状突起发生的最早时间为 15~23 d,以 1 号培养基最早,2 号培养基的最晚;每个外植体诱导产生的小鳞茎数量为 1.07~10.22 个,以 2 号培养基的最少,5 号的最多。从小鳞茎的生长速度来看,以 5 号培养基生长最快,而 1 号培养基最慢。综合各因素,选择 5 号培养基为进一步优化培养基的基础,设计 TDZ 和 6-BA 的不同组合。

表 1 不同植物生长调节剂组合对老鸦瓣小鳞茎诱导培养的影响

Table 1 Effects of different hormone treatments on induction of bulblets from bulb scales in *Tulipa edulis*

| 序号 | 植物生长调节剂组合                      | 小鳞茎诱导最早时间/d | 小鳞茎诱导率/% | 平均小鳞茎数/个 | 小鳞茎生长速度 |
|----|--------------------------------|-------------|----------|----------|---------|
| 1  | 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L | 15          | 93.3     | 8.61     | +       |
| 2  | 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L   | 23          | 73.3     | 1.07     | ++      |
| 3  | TDZ 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L    | 19          | 80.0     | 4.81     | +++     |
| 4  | TDZ 0.05 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L | 20          | 83.3     | 5.37     | ++      |
| 5  | TDZ 0.3 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L   | 16          | 93.3     | 10.22    | ++++    |

### 2.2 小鳞茎诱导的植物生长调节剂组合的优化

由表 2 可知,随着 TDZ 和 6-BA 浓度的升高,不定芽诱导率和诱导数均随之增加,不定芽诱导率和诱导数表现出快速上升的趋势,但在高浓度时有所下降。2 个植物生长调节剂的叠加效应也非常明显,诱导率为 68.8%~94.4%,诱导出的再生小鳞茎数量 6.19~12.21 个,但高浓度下诱导的再生小鳞茎玻璃化严重,2 种植物生长调节剂间也有叠加效应。故综合各处理的小鳞茎诱导率、诱导数和玻璃化程度,以 TDZ 0.3 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 为最佳组合,其不定芽诱导率为 93.3%,

每个鳞片诱导出的再生小鳞茎为 12.21 个无玻璃化现象。

表 2 不同 TDZ 和 6-BA 浓度组合对老鸦瓣小鳞茎诱导培养的影响

Table 2 Effects of combinations between TDZ and 6-BA on induction of bulblets from bulb scales in *Tulipa edulis*

| 序号 | TDZ 浓度 /mg · L <sup>-1</sup> | 6-BA 浓度 /mg · L <sup>-1</sup> | 小鳞茎诱导率/% | 小鳞茎诱导数/个   | 玻璃化程度 |
|----|------------------------------|-------------------------------|----------|------------|-------|
| 1  | 0.1                          | 0.5                           | 68.8±1.9 | 6.19±0.35  | —     |
| 2  | 0.1                          | 2.0                           | 75.6±1.9 | 7.79±0.20  | —     |
| 3  | 0.1                          | 5.0                           | 78.9±1.9 | 8.40±0.37  | +     |
| 4  | 0.3                          | 0.5                           | 86.7±3.3 | 10.58±0.16 | —     |
| 5  | 0.3                          | 2.0                           | 93.3±3.3 | 12.21±0.37 | —     |
| 6  | 0.3                          | 5.0                           | 93.3±0.0 | 12.12±0.38 | +     |
| 7  | 1.0                          | 0.5                           | 87.8±1.9 | 10.77±0.17 | +     |
| 8  | 1.0                          | 2.0                           | 94.4±1.9 | 12.10±0.15 | ++    |
| 9  | 1.0                          | 5.0                           | 93.3±5.8 | 12.03±0.15 | +++   |

### 2.3 不同鳞片部位对小鳞茎诱导的影响

由表 3 可知,不同部位鳞片对小鳞茎的诱导有着明显的差异,外层鳞片的诱导率和诱导数最高,内层的鳞片最低,这可能与鳞片的成熟不同有关,外层鳞片最成熟,内层鳞片最幼嫩,而细嫩组织容易受伤,在切割过程中也可能受伤。

表 3 不同部位鳞片对小鳞茎诱导的影响

Table 3 Effects of different parts of bulb scales on induction of bulblets in *Tulipa edulis*

| 鳞片位置 | 小鳞茎诱导率/% | 小鳞茎诱导数/个 |
|------|----------|----------|
| 外层鳞片 | 96.7     | 306      |
| 中层鳞片 | 73.3     | 203      |
| 内层鳞片 | 60.0     | 175      |

### 2.4 外植体不同摆放方式对小鳞茎诱导的影响

从表 4 可以看出,外植体不同摆放方式对小鳞茎诱导也有着明显的差异,小鳞茎诱导率和诱导数均以凹面朝上为佳。在试验过程中,不管凹面朝上还是凹面朝下摆放外植体,均观察到小鳞茎发生处位于切口处或凹面,而凸面几无发生。

表 4 摆放方式对小鳞茎诱导效果的影响

Table 4 Effect of inoculation methods on induction efficiency of bulblets from bulb scales in *Tulipa edulis*

| 接种方式 | 小鳞茎诱导率/% | 小鳞茎诱导数/个 |
|------|----------|----------|
| 凹面朝上 | 93.3     | 289      |
| 凹面朝下 | 60.0     | 134      |

### 2.5 不同处理对再生小鳞茎的生根和移栽的影响

由表 5 可知,所有处理均可诱导生根,但生根最早时间、生根率、生根质量和移栽成活率有所区别。其生根最早时间为 8~14 d,生根率为 45%~97%,移栽成活率为 65%~98%;随着 MS 浓度降低,生根率提高,根数量增加,变长,变细;NAA 和 IAA 对于生根有着协同作用,随着二者浓度的增加,根变长、变得粗壮,但高浓度的 NAA 或 IAA 均易导致根长度过短、粗度过大,进而导致移栽成活率降低,二者的高浓度叠加时更甚。综合

生根率、根数、根长、根粗和移栽成活率等因素,最适生根培养基为 1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.3 mg/L,最早生根时间 8 d,生根率达 97%,移栽成活率达 98%。

表 5 不同处理对再生小鳞茎的生根和移栽的影响

Table 5 Effects of different treatments on Rooting and transplanting of regenerated plantlets of *Tulipa edulis*

| 序号 | MS 浓度 | 处理 NAA 浓度 / mg · L <sup>-1</sup> | IAA 浓度 / mg · L <sup>-1</sup> | 生根率 / % | 根数      | 根长   | 根粗   | 移栽成活率 / % |
|----|-------|----------------------------------|-------------------------------|---------|---------|------|------|-----------|
| 1  | 1     | 0                                | 0.3                           | 45±3    | 2.2±0.3 | ++   | +    | 85±3      |
| 2  | 1     | 0.1                              | 1.0                           | 61±1    | 3.3±0.1 | ++   | ++   | 93±2      |
| 3  | 1     | 0.5                              | 3.0                           | 66±1    | 3.5±0.1 | +    | ++++ | 65±3      |
| 4  | 1/2   | 0                                | 1.0                           | 58±3    | 2.5±0.1 | ++++ | ++   | 91±4      |
| 5  | 1/2   | 0.1                              | 3.0                           | 88±3    | 3.4±0.2 | ++   | +++  | 74±1      |
| 6  | 1/2   | 0.5                              | 0.3                           | 88±1    | 3.8±0.2 | ++++ | +++  | 76±4      |
| 7  | 1/4   | 0                                | 3.0                           | 64±1    | 3.0±0.1 | ++   | +++  | 74±5      |
| 8  | 1/4   | 0.1                              | 0.3                           | 97±1    | 4.2±0.2 | ++++ | ++   | 98±1      |
| 9  | 1/4   | 0.5                              | 1.0                           | 88±1    | 4.0±0.1 | ++   | ++   | 97±1      |

### 3 讨论与结论

在郁金香的组织培养研究中,多先诱导形成愈伤组织,然后再分化形成小芽<sup>[5]</sup>。郇其忠<sup>[6]</sup>也曾报道先诱导愈伤组织再分化出不定芽的老鸦瓣的组织培养模式,而且其诱导愈伤组织采用的是低 6-BA 浓度高 NAA 浓度,诱导不定芽采用的是高 6-BA 浓度低 NAA 浓度。但在该研究中,6-BA 和 NAA 的组合均不能使老鸦瓣的鳞片产生愈伤组织,所有的小鳞茎均可从鳞茎直接诱导产生获得,这与杨永刚等<sup>[6]</sup>和毛洪玉等<sup>[7]</sup>在郁金香上的研究相似。这种差异可能是老鸦瓣产地不同所导致。直接从鳞片诱导出小鳞茎的模式不但能缩短组织培养过程中的培养时间,还可避免因经过愈伤组织阶段而可能造成的变异<sup>[5]</sup>。研究还发现,虽然细胞分裂素对于小鳞茎的诱导是必需的,但是过高的浓度虽有助于诱导率和诱导数的增加,但带来小鳞茎的玻璃化,而这对后面的生根和移栽带来了很多困难,所以应尽量避免使用高浓

度的 6-BA 或 TDZ。在该研究中,凹面朝上被发现更有利于小鳞茎的诱导,且小鳞茎发生的位置是切口处和凹处,外层鳞片的小鳞茎诱导发生要好于内层鳞片的,这些结果与龚明霞等<sup>[8]</sup>报道的不同,这可能是物种不同所致。试管苗生根是一个从异养状态进入自养状态的过程,常通过降低培养基的营养元素质量浓度来提高生根率。随着 MS 浓度的下降,生根率有所提高,根的数量和长度也随之增加,这更利于根的吸收。该研究还发现,使用 NAA 和 IAA 的组合对于生根有协同促进作用,但均以中等浓度为宜。研究还发现,再生小鳞茎切下的外植体,可继续用以诱导再生小鳞茎。

该试验结果表明,该试验建立了以鳞片为外植体、直接诱导生成小鳞茎的离体快繁体系,在添加 TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L 的 1/2MS 培养基中诱导获得小鳞茎,切出单个小鳞茎于 1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.3 mg/L 的培养基中生根,后于小粉土中保湿保温移栽,成活率可达 98%。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 阮小丽,施大文. 山慈菇的抗肿瘤及抑菌作用[J]. 中药材,2009,32(12):1886-1888.
- [3] 吴正军,朱再标,郭巧生,等. 老鸦瓣种子生理及其萌发特性研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(5):575-579.
- [4] 吴正军,朱再标,郭巧生,等. 老鸦瓣传粉生物学初步研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(3):293-297.
- [5] 杨永刚,代汉萍,胡新颖,等. 郁金香器官离体培养再生小鳞茎的研究[J]. 园艺学报,2006,33(5):1133-1136.
- [6] 郇其忠. 光慈菇引种栽培及离体培养技术[D]. 北京:中国协和医科大学,2008.
- [7] 毛洪玉,王瑛,刘迪,等. 郁金香离体快繁技术研究[J]. 北方园艺,2012(14):114-118.
- [8] 龚明霞,何铁光,方锋学,等. 郁金香鳞片离体培养再生小鳞茎研究[J]. 广西农业科学,2010,41(11):1158-1160.

## Study on *in vitro* Culture of Bulblets Regeneration Derived From Bulb Scales of *Tulipa edulis* (Miq.) Bak.

SUN Jun-wei, ZHU Cheng, WANG Fei-juan, JIANG Qiong, DING Yan-fei  
(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018)

**Abstract:** Taking the bulb scales as explants, the effects of different treatments on *in vitro* regeneration of bulblet derived from different parts of bulb scale of *Tulipa edulis* (Miq.) Bak. were studied. The results showed that outer bulb scales was better than middle and inner bulb scales; when the convexity of bulb scale was upward, higher bulblets induction rate and more bulblets number were recorded. Although many media could induce bulblets, the best media was 1/2MS+TDZ 0.3 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, with 93.3% of the induction rate and 12.21 of bulblets numbers; the most appropriate medium for the rooting and transplanting was 1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.3 mg/L, with 97% of rooting rate and 98% of transplanting rate.

**Key words:** *Tulipa edulis* (Miq.) Bak.; bulb scale; regenerated bulblets; plant growth regulator