

文章编号:2095-7386(2016)01-0039-04

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.01.009

两种郁金香品种愈伤组织诱导及显微观察

吴阿宝,郭亚兰,刘利,李佳

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院,湖北 武汉 430023)

摘要:以海顿和布拉两种郁金香(*Tulipa gesneriana*)品种的种球为外植体,采用MS培养基附加不同浓度的激素,进行愈伤组织的诱导,并对其愈伤组织进行显微观察。在该过程中,对6-BA、NAA、2,4-D、KT等激素条件对郁金香愈伤组织诱导的影响进行了正交实验分析。结果显示,采用预先冷处理的种球作为外植体,在MS培养基附加1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L KT和0.5 mg/L 2,4-D中,黑暗培养7 d,后转入光照12 h/d,可诱导出白色、细碎、状态良好的愈伤组织。在显微观察中,发现在该组合下,海顿郁金香的愈伤组织生长较好,内含物颗粒量大,品质较高。

关键词:郁金香;愈伤组织;植物激素;正交设计

中图分类号: S 682.263

文献标识码: A

Callus induction and microscopic observation of two Tulip Varieties

WU A-bao, GUO Ya-lan, LIU Li, LI Jia

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In this article, with bulbs of Brad and Haydn tulip (*Tulipa gesneriana*) as explants, MS medium plus different concentrations of plant growth regulators was used in callus inducement. The callus was microexamined. In this process, orthogonal experimental methods were used to analysis the impact of 6-BA, NAA, 2,4-D and KT to callus inducement of Tulips. The results showed that, after cool pretreatment, the explants of bulbs were cultured on MS medium supplemented with 1.0mg/L 6-BA, 0.1mg/L KT and 0.5mg/L 2,4-D. Firstly, the culture was in dark for 7 days, and then transferred to 12 h/d light. Then the white, loose and good status callus was induced. The microexamination results showed that the callus of Haydn tulip grew better, and the cell inclusion particles were bigger and had higher quality in abovementioned conditions.

Key words: *Tulipa gesneriana*; callus; plant growth regulator; orthogonal design method

1 引言

郁金香(*Tulipa gesneriana*)属于百合科,是世界著名的花卉之一,最初产在土耳其和中亚细亚一

带^[1]。郁金香与玫瑰一样是用来表达爱意的花朵,数目上的差异也会带来含意的不同。而早在17世纪,郁金香曾是专门种给皇室贵族观赏的花种,收藏在欧洲皇室专属花园中^[2]。在荷兰,郁金香是四宝

收稿日期:2015-12-01.

作者简介:吴阿宝(1994-),男,本科生,E-mail:1538176726@qq.com.

通信作者:李佳(1975-),女,博士,讲师,E-mail:wljiajia@126.com.

之一,与风车、奶酪和木鞋齐名。曾经有段时间,荷兰人以拥有郁金香为豪,而在现代,荷兰是郁金香的主要出口国,为其带来了巨大的利润。

在我国很早就有郁金香的少量栽培,主要在西北地区。近些年国内很多大、中城市频繁举办花展,都收获了一定的经济效益和社会效益,其中以郁金香花展最为突出,因此,中国目前已经成为郁金香的主要进口国^[3-4]。正是由于郁金香的美丽以及它带来的可观的经济效益,国内也逐步地开展郁金香的大面积栽培,但仍然无法满足市场的巨大需求。造成这一现象的原因主要有两个:一是郁金香属于球花卉,自然繁殖所需时间长,并且成功率低;二是由于病害等导致郁金香品种退化。为了改变国内郁金香大量依赖进口的现状,采用组织培养是一种可行有效的解决方式。

笔者选取了郁金香的海顿和布拉两个品种,进行了愈伤组织诱导,希望通过该方式为郁金香的快速繁殖和良种繁育提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料

所选用的材料为海顿和布拉郁金香(*Tulipa gesneriana*)种球。材料来源为市场购买。

2.2 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、光照恒温培养箱等。

2.3 外植体的制备与接种

将郁金香种球置于冰箱中冷藏适宜时间,取出,剥去外衣,用清水洗净。超净工作台中,75%酒精浸泡 30 s,取出,无菌水清洗 3 次,2%次氯酸钠溶液中浸泡 30 min,取出,无菌水冲洗 3 次,备用。将郁金香鳞茎切成 5—8 mm 的块,接种到培养基中。

2.4 培养基配方与培养条件

采用 MS 基本培养基添加不同浓度激素,另加 3%蔗糖、0.7%琼脂粉,pH 值 5.8。

培养过程首先在黑暗中处理 7 d,之后光照 12 min/d,培养温度为 25 ℃。

2.5 愈伤组织显微观察

取诱导出的愈伤组织适量,放置于载玻片上,轻轻压碎,番红染液染色 2 min,95%酒精冲洗,盖盖玻片,显微镜下观察拍照。

2.6 正交实验

确定影响郁金香愈伤组织诱导的因素为 4 个,

分别进行两组正交实验,设定 3 个水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验(见表 1、表 2)。

表 1 6-BA 和 NAA 组合的正交实验因素与水平

水平	因素	
	6-BA(A)/(mg/L)	NAA(B)/(mg/L)
1	0.5	0
2	1.0	0.1
3	2.0	0.2

表 2 6-BA、KT 和 2,4-D 组合的正交实验因素与水平

水平	因素		
	6-BA(A)/(mg/L)	KT(B)/(mg/L)	2,4-D(C)/(mg/L)
1	0.5	0	0
2	1.0	0.1	0.5
3	2.0	0.2	1.0

3 结果与分析

3.1 不同激素组合对郁金香愈伤组织诱导的影响

3.1.1 6-BA 和 NAA 组合

6-BA 与 NAA 组合诱导郁金香愈伤组织的结果如表 3 所示。

表 3 6-BA 和 NAA 组合诱导郁金香愈伤组织正交设计实验结果

实验编号	A	B	诱导率/%
1	1	1	0
2	1	2	20.0
3	1	3	26.7
4	2	1	0
5	2	2	26.7
6	2	3	33.3
7	3	1	13.3
8	3	2	26.7
9	3	3	33.3
K_1	15.567	4.433	
K_2	20.000	24.467	
K_3	24.433	31.100	
R	8.866	26.667	

注:诱导率=诱导愈伤组织的外植体数目/接种的外植体数目 $\times 100\%$ 。

从表 3 中数据可以看出,NAA 对愈伤组织诱导影响更大,极差为 26.667,其作用效果 K 值显示,随

着 NAA 浓度的增加,诱导出愈伤组织的外植体量有所增加,此外,每块外植体上,愈伤组织的产量也有增加。

6-BA 的添加也是必不可少,与 NAA 配合后,可明显提高愈伤组织的产量。然而随着 6-BA 的浓度增加,愈伤组织易产生硬块,而且褐化较为严重。

3.1.2 6-BA、KT 和 2,4-D 组合

表 4 为 6-BA、KT 和 2,4-D 组合时,郁金香愈伤组织诱导情况的正交实验结果。

表 4 6-BA、KT 和 2,4-D 组合诱导郁金香愈伤组织正交设计实验结果

实验号	A	B	C	诱导率/%
1	1	1	1	0
2	1	2	2	26.7
3	1	3	3	33.3
4	2	1	2	13.3
5	2	2	3	40.0
6	2	3	1	0
7	3	1	3	46.7
8	3	2	1	0
9	3	3	2	46.7
K_1	20.000	20.000	0.000	
K_2	17.767	22.233	28.900	
K_3	31.133	26.667	40.000	
R	13.366	6.667	40.000	

注:诱导率 = 诱导出愈伤组织的外植体数目/接种的外植体数目 $\times 100\%$ 。

正交实验结果显示,在 6-BA、KT 和 2,4-D 组合中,对郁金香愈伤组织诱导影响最显著的是 2,4-D,其影响极差为 40.0,比较三个水平的作用效果值,为 $K_3 > K_2 > K_1$,其中 K_3 和 K_2 数值相差不大,当 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 时,可诱导出白色细碎的愈伤组织,而随着 2,4-D 浓度的增加,诱导出的愈伤组织出现颗粒状结节,容易褐化死亡。

其次,6-BA 对愈伤组织诱导的影响极差为 13.366,比较 K 值,为 $K_3 > K_1 > K_2$,且发现添加低浓度的 6-BA 可诱导出较多的白色愈伤,状态良好。此外,KT 也对愈伤组织的状态有利,少量的添加可增加愈伤组织的产量,且愈伤组织细碎、色白,不易褐化。

3.2 不同郁金香品种在愈伤组织诱导实验中的差异

选择 1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L KT 和 0.5 mg/L 2,4-D 组合时,比较海顿和布拉两个品种的郁金香

愈伤组织诱导情况,结果显示二者的愈伤诱导率没有显著差异,均能达到 20% 左右,且愈伤组织状态良好。

3.3 郁金香愈伤组织显微观察

将 1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L KT 和 0.5 mg/L 2,4-D 组合下诱导出的愈伤组织进行染色后,在显微镜下观察,发现两种郁金香的愈伤组织均有大量的储藏细胞,其中含有颗粒状储藏物(如图 1,图 2)。而海顿郁金香中的储藏颗粒相对更多、更大,说明其品质更加优良。

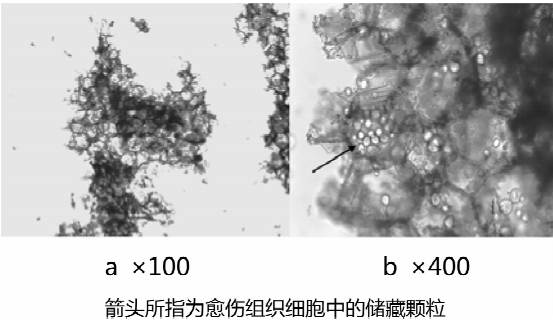


图 1 布拉郁金香愈伤组织显微形态观察结果

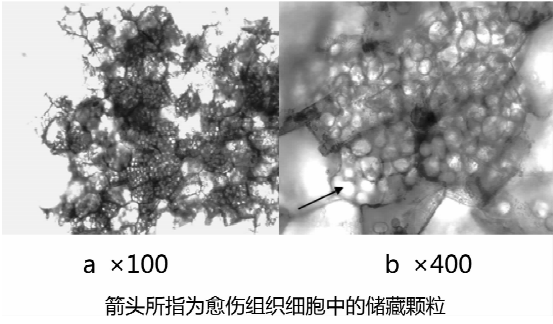


图 2 海顿郁金香愈伤组织显微形态观察结果

因此,综合以上结果,笔者认为在对郁金香进行愈伤组织诱导时,可采用预先冷处理的种球,在 MS 培养基附加 1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L KT 和 0.5 mg/L 2,4-D 中,黑暗培养 7 d,后转入光照 12 h/d,可诱导白色、细碎、状态良好的愈伤组织。

4 结果与讨论

在对郁金香进行愈伤组织诱导的过程中,发现生长素的添加是必不可少的,其中,2,4-D 比 NAA 诱导的愈伤组织的量更多,但是诱导出的状态往往欠佳,浓度高时,容易褐化。有报道显示^[5-6],生长素采用 NAA,其诱导率最高可达 50% 左右,然而当我们同样采用 NAA 时,诱导的结果最高只达到 33.3%,虽然同样采用前人报道的黑暗处理的方法,

但未添加活性炭,可能是由于该原因,未达到更高的诱导率。然而当我们将生长素更换为2,4-D,愈伤诱导率明显增加,虽然状态欠佳,但通过另外添加KT,可有效改善愈伤组织的状态。

此外,布拉和海顿两个郁金香品种在愈伤组织诱导率上没有显著差异,然而在显微观察后,发现海顿郁金香愈伤组织中储藏颗粒更多,品质更佳。

参考文献:

- [1] 张艳秋,屈连伟,刘萍萍,等. 郁金香组织培养技术研究进展[J]. 现代园林, 2015, 12(4):332-336.
- [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] 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.
- [4] 胡新颖,王锦霞,代汉萍,等. 郁金香鳞片组织培养研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(3): 304-307.
- [5] 唐前瑞,陈友云,彭尽晖. 郁金香鳞茎愈伤组织的诱导研究[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(2): 105-107.
- [6] 张志英,贺永娟,唐道城. 不同外植体对郁金香组织培养愈伤诱导的影响[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 56-60.
- (上接第16页)
- [3] 罗世霞,商明菊,吕妍,等. 地沟油与食用油理化指标的对比分析[J]. 广州化工, 2014(17): 97-98.
- [4] GB 2716-2005,食用植物油卫生标准[S].
- [5] GB/T5538-2005,动植物油脂过氧化值测定[S].
- [6] 褚小立,陆婉珍. 近五年我国近红外光谱分析技术研究与应用进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 2595-2605.
- [7] 苏东林,李高阳,何建新,等. 近红外光谱分析技术在我国大宗水果品质无损检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012(6): 460-463.
- [8] 赵中振,梁之桃. 近红外光谱技术在中药鉴定中的应用与优势[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(4): 1062-1065.
- [9] 张军,姜黎,陈哲,等. 基于近红外光谱技术成品汽油分类方法的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(10): 2654-2657.
- [10] 宋志强,沈雄,郑晓,等. 应用近红外光谱对低碳数脂肪酸含量预测[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(8): 2079-2082.
- [11] Sinijia V R, Mishra H N. F T-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 42(5): 998-1002.
- [12] 吴新生,谢益民. 支持向量机回归法在近红外光谱测定植物纤维原料中甲氧基含量中的应用[J]. 化学分析计量, 2009, 18(2): 17-19.
- [13] 尼珍,胡昌勤,冯芳. 近红外光谱分析中光谱预处理方法的作用及其发展[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 824-829.
- [14] 林升梁,刘志. 基于RBF核函数的支持向量机参数选择[J]. 杭州:浙江工业大学学报, 2007, 35(2): 163-167.