

## 老鸦瓣芽茎组织培养初步研究

朱丽芳<sup>1</sup>, 史俊<sup>2</sup>, 朱再标<sup>1</sup>, 席刚俊<sup>2</sup>, 郭巧生<sup>1\*</sup>, 马宏亮<sup>1,3</sup>, 赵桂华<sup>2\*</sup>

1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095

2. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212000

3. 广州白云山中一药业有限公司, 广东 广州 510530

**摘要:** 目的 建立老鸦瓣芽茎愈伤组织诱导及丛生芽增殖体系。方法 以老鸦瓣冷藏芯芽产生的芽茎为外植体, MS为基本培养基, 考察不同质量浓度 6-BA、NAA 对愈伤诱导、分化及丛生芽增殖的影响。结果 芽茎诱导愈伤的最佳培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L, 愈伤诱导率 78.54%, 诱导出的愈伤组织在原培养基上继代培养增殖后即可进行芽分化; 愈伤分化不定芽最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 芽诱导率为 66.21%; 丛生芽增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 增殖系数 2.48。结论 筛选出芽茎诱导愈伤、分化不定芽及丛生芽增殖的培养基, 初步建立了老鸦瓣芽茎组织培养体系。

**关键词:** 老鸦瓣; 芽茎; 不定芽; 组织培养; 增殖; 愈伤组织; 丛生芽

**中图分类号:** R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)04-0563-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.021

## Bud stem tissue culture of *Tulipa edulis*

ZHU Li-fang<sup>1</sup>, SHI Jun<sup>2</sup>, ZHU Zai-biao<sup>1</sup>, XI Gang-jun<sup>2</sup>, GUO Qiao-sheng<sup>1</sup>, MA Hong-liang<sup>1,3</sup>, ZHAO Gui-hua<sup>2</sup>

1. Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212000, China

3. Guangzhou Baiyunshan Zhongyi Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510530, China

**Abstract: Objective** To establish the tissue culture system of callus induction and cluster shoot proliferation with bud stems of *Tulipa edulis*. **Methods** Bud stems were isolated from cooled *T. edulis* bulbs as explants. The calli were induced on MS media with different concentration of 6-BA and NAA, and the cultural conditions of shoot differentiation and multiplication were optimized. **Results** The optimal medium for callus induction was MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L with a callus induction rate of 78.54%. After subcultured in original medium, the callus was turned into differentiation medium. The optimal medium for callus differentiation was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L with a shoot differentiation rate of 66.21%. The optimal medium for the shoot multiplication was MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L, and the proliferation coefficient was 2.48. **Conclusion** The media for callus induction, adventitious bud differentiation, and cluster shoot proliferation are optimized. The optimal medium for the culture of *T. edulis* bud stems is preliminarily established.

**Key words:** *Tulipa edulis* (Miq.) Baker; bud stems; adventitious buds; tissue culture; proliferation; callus; cluster shoot

老鸦瓣 *Tulipa edulis* (Miq.) Baker 为百合科郁金香属药用植物, 生长在山坡草地及路旁, 分布于我国辽宁、山东、江苏、浙江、安徽、江西、湖北、湖南和陕西等地, 朝鲜、日本也有分布<sup>[1]</sup>。其地下鳞茎去掉膜质皮及绒毛后的干燥鳞茎入药为光慈姑, 具有解毒散结、行血化瘀的功效, 主治咽喉肿痛、

瘰疬、痈疽、疮肿、产后瘀滞<sup>[2]</sup>。近年来发现光慈姑在乳腺疾病等方面治疗效果显著<sup>[3]</sup>, 中药产业对光慈姑的需求激增, 而目前光慈姑主要来源于野生, 导致其供需矛盾日益突出<sup>[3-4]</sup>。目前老鸦瓣的研究主要集中在本草考证、生理生物学特性以及栽培繁育等方面, 而且文献较少。在组织培养方面, 邴其忠<sup>[5]</sup>以

收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202867)

作者简介: 朱丽芳 (1988—), 女, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为药用植物引种驯化。E-mail: 2011104177@njau.edu.cn

\*通信作者 郭巧生 Tel: (025)84395980 E-mail: gqs@njau.edu.cn

赵桂华 Tel: (0511)87290298 E-mail: zhao50050@sina.com

老鸦瓣全鳞茎和芯芽为外植体,进行了初步研究,未能应用于实际生产<sup>[6]</sup>。目前,种苗繁育等问题仍是限制老鸦瓣规范化人工栽培的主要因素。由试管苗培养诱导试管鳞茎作为组培技术中一条有效途径,虽然增加了离体培养的工作量,但却增强了繁殖材料的适应环境和抗逆能力,可以解决快繁中驯化难、移栽成活率低的问题。开展老鸦瓣组织培养工作,扩大繁殖系数,保证种苗数量和质量,从而解决种苗的生产及供应问题,可为光慈姑药材大量规模化生产奠定基础。本实验对老鸦瓣鳞茎产生的芽茎进行离体培养,研究愈伤组织和不定芽的诱导及芽茎的继代增殖,以期为建立老鸦瓣的离体快繁体系提供依据。

## 1 材料

供试材料为处于休眠期的老鸦瓣鳞茎,约 2.0 g/个,采自安徽省阜南县,经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定为老鸦瓣 *Tulipa edulis* (Miq.) Baker。

## 2 方法

### 2.1 基本培养基和培养条件

基本培养基为 MS 培养基分别添加琼脂 6.3 g/L、蔗糖 30 g/L, pH 5.8, 经 121 °C 高温灭菌 20 min, 培养温度 (25±2) °C, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

### 2.2 无菌外植体的获得

将采集的老鸦瓣鳞茎清洗消毒后,晾干,以 1:3 体积比,与湿沙(河沙先经 135 °C 干热灭菌 4 h,湿沙含水量约 6%~8%)混匀,于 0~2 °C 下沙藏处理 80~120 d,定期查看水分情况和拣出霉烂者。消毒方法参考邴其忠<sup>[5]</sup>的方法,略有改动。取层积后的老鸦瓣鳞茎,除去绒毛层,用饱和洗衣粉溶液清洗 3 次,剖取内部芯芽,保留完整基部,再经饱和洗衣粉溶液清洗 3 次,流水冲洗 2 h。移至超净工作台,于 75%乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> (含数滴聚山梨酯-80) 消毒 15~20 min,无菌水冲洗 4~5 次,吸干水分,接入不添加激素的 MS 培养基,查看冷藏芯芽产生芽茎情况。

### 2.3 愈伤组织的诱导

取冷藏芯芽在无激素 MS 培养基中产生的鳞芽及芽茎为初代外植体,诱导愈伤组织,芽茎分为芽茎顶端和芽茎切段(0.5~0.8 cm),接入添加 6-BA 和 NAA 不同配比(表 1)的 MS 培养基。重复 3 次。外植体接种后观察出愈时间,定期观察统计愈伤组织的颜色、质地及生长情况。

表 1 老鸦瓣愈伤诱导的激素水平

Table 1 Levels of hormones for callus induction in *T. edulis*

处理	激素质量浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> )		外植体
	6-BA	NAA	
1	0	0.5	鳞芽
2	0.5	2.0	芽茎顶端
3	0.1	0	芽茎切段
4	1.0	0.01	鳞芽
5	4.0	1.0	芽茎切段
6	2.0	0.1	芽茎顶端

### 2.4 愈伤组织增殖

将冷藏芯芽形成的芽茎诱导得到的愈伤组织切割成大小均匀的切块(约 1.0 cm×1.0 cm)后,分别接入编号为 A1 至 A6,添加 6-BA (0、0.2、0.5 mg/L) 和 NAA (0、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) 不同配比的 MS 培养基中进行继代增殖。每处理重复 2 次。通过愈伤组织的色泽、状态、分化、生根、芽茎产生情况等比较不同继代培养基的增殖效果。

### 2.5 不定芽诱导

挑选增殖 1~2 个月后,黄白至黄绿色、质地紧密、生长旺盛的愈伤组织,切割成大小均匀的切块(约 1.0 cm×1.0 cm),接入编号为 B1 至 B6,MS 附加 6-BA (0、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 NAA (0、0.2 mg/L) 的不同愈伤组织分化培养基中进行不定芽分化培养。每处理重复 2 次。2 个月后统计芽诱导率、平均芽数及短壮不定芽、细弱不定芽、芽茎的生长情况。

短壮不定芽指芽体较短、壮实、多圆锥形、芽体多实心、黄白至黄绿色,伸长生长不明显、主要为加粗生长,芽体基部不形成芽茎的一类不定芽;细弱不定芽(试管苗)指芽或苗较细弱、瘦长、多葱叶型、中空、黄绿色至绿色,主要表现为伸长生长,芽或苗基部多能形成芽茎的一类不定芽。

### 2.6 丛生芽增殖

将愈伤组织途径的丛生芽切分成单芽,尽量不破坏芽基部的分生组织,接入到编号为 D1 至 D5,添加 6-BA (0、0.2、0.5、1.0 mg/L) 和 NAA (0、0.2 mg/L) 不同配比的 MS 培养基中进行芽增殖。每处理重复 2 次。45 d 继代更换一次新鲜培养基,3 个月后统计芽增殖情况,计算增殖系数(增殖系数=增殖后芽数/接种芽数)。

## 2.7 数据统计

实验所得数据用 Excel 和方差分析软件处理。

出愈率 = 形成愈伤组织的外植体数 / 接种的外植体数

芽诱导率 = 形成的不定芽总数 / 接种的外植体数

芽数 = 形成的芽总数 / 接种的外植体数

短壮 (细弱) 不定芽数 = 短壮 (细弱) 不定芽数 / 接种的愈伤组织块数

芽茎诱导率 = 产生芽茎的愈伤组织块数 / 接种的愈伤组织块数

芽茎数 = 产生的芽茎总个数 / 接种的愈伤组织块数

## 3 结果与分析

### 3.1 愈伤组织的诱导

不同浓度激素组合对愈伤组织形成和生长影响跟外植体相关, 鳞芽接种 10~14 d 后, 基部开始形成新的不定芽, 或开始形成愈伤, 总体上鳞芽产生的愈伤组织较少。芽茎顶端和切段在接入愈伤组织诱导培养基后, 切口处周围慢慢膨大肿胀, 表面出现黄白或黄绿色的颗粒状突起物, 15 d 即有愈伤组织形成; 部分芽茎切段表皮爆裂, 或形成不定芽或顶出内部形成愈伤。培养 25 d 后形成黄白或黄绿色不规则的愈伤组织。1 个月后, 统计各愈伤组织诱导率, 继代于相同培养基, 经过 2 个月, 统计不定芽的数量。

外植体在不同激素配比下初代诱导效果差异较大, 且不同的外植体对激素的反应也不同。鳞芽和芽茎切段外植体形成愈伤组织的形式有: 鳞

芽基部周围形成少量愈伤组织; 芽茎顶端或切口处或整个芽茎段膨大成不规则状, 继而形成愈伤组织; 或芽茎切段裂开, 在切口和内部形成愈伤; 不定芽的形成方式有: 鳞芽基部裂开后直接长出新的不定芽; 芽茎顶端爆开, 长出不定芽; 芽茎切口处形成不定芽。

由表 2 可以看出, 在不添加生长素 NAA 或 NAA 浓度比较低 (0.1 mg/L) 时, 几乎不形成愈伤组织 (处理 3、6); 冷藏芯芽产生的芽茎切段在生长素比例相对较高的处理 2 (6-BA 0.5 mg/L、NAA 2.0 mg/L) 中具较高的愈伤组织诱导率, 为 78.54%; 芽茎顶端在 6-BA : NAA 为 4 : 1 时, 没有形成愈伤, 可能是因为二者的浓度均比较高的原因; 鳞芽在细胞分裂素与生长素比值较高的处理 4 (6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L) 中具有较高的芽诱导率和丛生芽数, 分别为 89.53% 和 2.30 个, 但冷藏鳞茎在 MS 中产生鳞茎的数量较少, 取材有限制。不定芽形成后, 会在继代的过程中逐渐长成较细长的试管苗, 部分试管苗基部同时亦会再形成芽茎。处理 1 的试管苗基部芽茎可伸长生长, 而处理 4 试管苗基部芽茎则伸长生长受阻, 可能是细胞分裂素和生长素浓度比例不同造成的。且在生长素比例较大的处理中, 常见到有不定根产生。所以用冷藏芯芽产生的芽茎为外植体诱导愈伤效果较好, 适宜的培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L。

表 2 不同生长物质对愈伤诱导的影响

Table 2 Influence of different growth regulators on callus induction

处理	接种数 / 个	愈伤组织诱导率 / %	不定芽形成率 / %	不定芽数 / 个
1	16	70.83 aA	45.83 bB	0.81 bB
2	12	78.54 aA	33.33 bCB	0.75 bB
3	13	2.38 cC	7.14 cD	0.07 cB
4	13	18.38 bB	89.53 aA	2.30 aA
5	14	0 cC	16.67 cCD	0.16 cB
6	12	0 cC	16.67 cCD	0.17 cB

小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著, 大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著, 下同

Lowercase letters mean significant difference at 0.05 level among treatments, uppercase letters mean highly significant difference at 0.01 level; same as follow

### 3.2 愈伤组织增殖

愈伤组织接种一段时间后, 即发现新的愈伤组织开始生长, 由表 3 可以看出, 愈伤组织在处理 A2、A3、A4、A5、A6 中都有增殖现象, 说明愈伤组织的继代增殖需要激素作用; 以低分裂素浓度 6-BA 0.5 mg/L 和高生长素 NAA 2.0 mg/L (A6 处理) 增

殖效果最好, 愈伤组织表现为体积增大、颜色趋向黄白至黄绿、呈菜花状略显酥脆, 表面多颗粒状突起物, 利于分化不定芽, 其次是 A5 处理 (6-BA 0.5 mg/L、NAA 1.0 mg/L)。所以愈伤增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L。但增殖过程会伴有少量较为缓慢的芽分化, 也有少量芽茎

表 3 不同浓度生长物质组合对愈伤组织增殖的影响

Table 3 Influence of growth regulator combinations at different concentration on callus proliferation

处理	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	愈伤状态	芽茎产生情况	增殖效果
A1	0	0	黄白至黄绿色, 湿润, 色泽发暗, 生长停滞, 个别略显水渍状或后期褐化死亡	极少见	+
A2	0	0.2	黄白至黄绿色, 湿润, 少量小颗粒状突起, 略显松散或菜花状, 生长缓慢	少见, 较长	++
A3	0.2	0.2	黄绿至绿色, 湿润, 大颗粒状突起, 松散或致密, 生长缓慢	少见, 较长, 伴随细弱丛生芽产生	++
A4	0.5	0.5	黄绿至绿色, 湿润或略显干燥, 表面颗粒性、松散或不规则状突起物, 瘤状, 生长快	少见, 较短, 主要伴随细弱不定芽产生	+++
A5	0.5	1.0	黄白至黄绿色, 湿润, 颗粒性或菜花状, 略显松散, 生长较快	少量, 较长, 主要伴随细弱不定芽产生	++++
A6	0.5	2.0	黄白至黄绿色, 湿润, 体积增大, 菜花状或细碎颗粒性, 生长旺盛	少量, 较长, 主要伴随细弱不定芽产生	+++++

“+”的多少表示愈伤组织增殖效果的强弱

“+” refers to the strength of the callus proliferation effect

产生。可能是愈伤组织自身生理状态在激素作用下的结果, 亦可能是激素累加作用形成, 不易控制; 而且随着培养时间的延长, 部分愈伤组织会因过于松散而不利于不定芽分化, 要适当降低生长素浓度, 以促进愈伤组织更致密和易于分化不定芽, 所以从不定芽分化的角度考虑, 愈伤组织应减少继代增殖次数, 以保证芽分化的质量和数量。

### 3.3 不定芽诱导

不同质量浓度激素组合对不定芽的诱导有不同的效果, 激素浓度影响芽的长势, 各培养基均诱导出芽。由表 4 中可以看出, NAA 0.2 mg/L 时, 随着 6-BA 浓度的增加, 芽诱导率和平均芽数都呈增加趋势, 其以 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 芽诱导率最高为 66.21%和 1.73 个; 当

6-BA ≥ 1.0 mg/L 时, 短壮芽比例有了明显的增加, 占芽数的 2/5 ~ 3/5。芽茎数量则随分裂素浓度比例的增加而呈先增加后降低趋势, 这是因为芽茎主要是在细弱丛生芽基部产生, 当分裂素比例增加时, 芽茎数目伴随着细弱丛生芽的增加而增加, 而当分裂素比例过大时可能反而抑制了芽茎的分化。

### 3.4 不同激素组合对丛生芽增殖的影响

将愈伤组织分化得到的不定芽切分后, 接种到 5 种芽增殖培养基, 3 个月后, 统计高于 0.5 cm 的芽, 结果见表 5。在各增殖培养基中, 都有芽增殖的现象, 其中以处理 D4 (6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.2 mg/L) 的丛生芽增殖效果最好, 增殖系数为 2.48; 其次为 D5 处理 (6-BA 0.2 mg/L、NAA 0.2 mg/L)。

表 4 不同生长物质对不定芽诱导的影响

Table 4 Influence of different growth regulators on induction of adventitious buds

处理	激素 / (mg·L <sup>-1</sup> )		接种数 / 个	芽诱导率 / %	芽数 / 个	短粗芽数 / 个	细弱芽数 / 个	芽茎率 / %	芽茎数 / 个
	6-BA	NAA							
B1	0	0	20	15.66 cB	0.26 cC	0.10	0.16	10.10	0.10
B2	0	0.2	24	33.33 bcAB	0.58 bcBC	0.25	0.33	29.17	0.38
B3	0.2	0.2	27	30.00 bcAB	0.78 bcABC	0.45	0.33	19.17	0.35
B4	0.5	0.2	24	45.83 abcAB	1.13 abABC	0.29	0.83	33.33	1.29
B5	1.0	0.2	32	50.00 abAB	1.53 aAB	0.91	0.63	21.88	0.69
B6	2.0	0.2	27	66.21 aA	1.73 aA	0.75	0.99	32.97	0.51

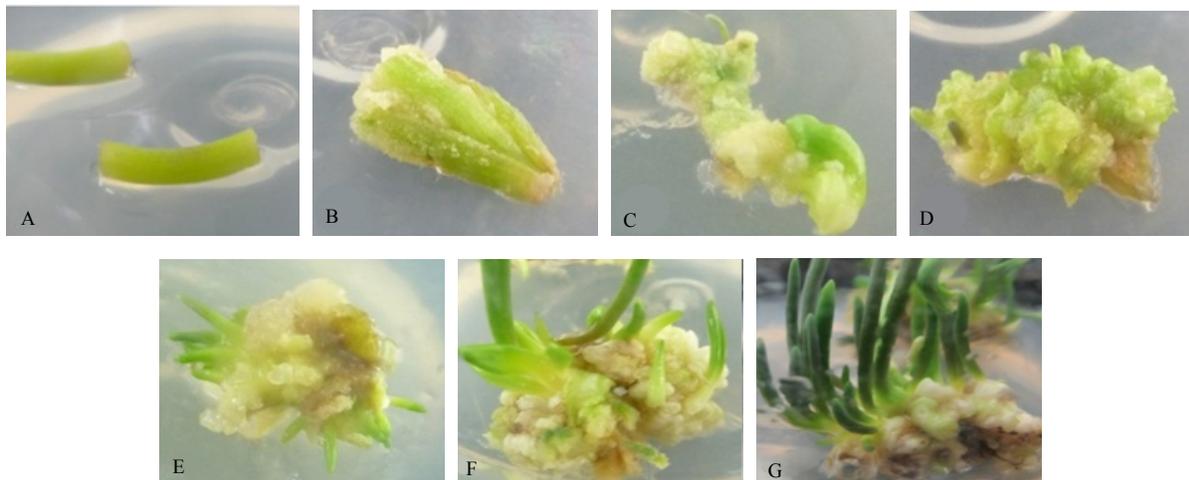
总体看来,当 NAA 为 0.2 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加芽的数量和质量有所提高,且丛生芽增殖系数随细胞分裂素 6-BA 比例的增加呈先上升后下降的趋势,说明该愈伤组织途径的丛生芽增殖以低细胞分裂素和低生长素浓度配比为宜。而且在继代过

程中,不将增殖的芽分割,而是以芽簇形式增殖时发现,芽数量增多,芽丛越大,芽生长越快,表现出类似“群居效应”,芽丛浓密,色泽浓绿,可见继代的过程也伴随有壮苗现象。同时有部分细弱芽高达 7~10 cm,形成无根苗,见图 1。

表 5 不同生长物质对丛生芽增殖的影响

Table 5 Influence of different growth regulators on cluster shoot proliferation

处理	激素 / (mg·L <sup>-1</sup> )		接种芽数 / 个	增殖后总芽数 / 个	增殖系数	芽生长状况	芽茎率 / %	生根率 / %
	6-BA	NAA						
D1	0	0	31	43	1.39 bcA	芽少, 稀疏, 细弱, 长势不好	48.33 aA	10.00
D2	0	0.2	22	26	1.18 cA	芽少, 稀疏, 细弱, 长势缓慢	40.83 abAB	33.33
D3	0.2	0.2	29	50	1.72 abcA	芽多, 翠绿, 细长, 葱叶状	30.95 cdBC	20.48
D4	0.5	0.2	25	62	2.48 aA	芽多, 浓绿, 健壮, 葱叶状	35.09 bcABC	0
D5	1.0	0.2	21	48	2.28 abA	芽多, 浓绿, 健壮, 生长快	23.64 dC	0



A-芽茎外植体 B-接种 20 d 后开始形成愈伤 C-接种 30 d 后形成的愈伤 D-2 个月后的愈伤表面有小芽点突起 E-愈伤分化不定芽初期 F-愈伤分化出大量不定芽 G-丛生芽继代增殖兼壮苗  
A-bud stems explant B-formation of callus stem after inoculating for 20 d C-formation of callus after inoculating for 30 d D-small bud primordium appearing in surface of callus after 2 months E-early stage of callus differentiated adventitious bud F-large amount of adventitious buds differentiated from callus G-cluster shoots subcultured proliferation and strong seedling

图 1 老鸦瓣芽茎诱导愈伤途径芽增殖过程

Fig. 1 Pathways of callus proliferation induced in *T. edulis* bud stems

#### 4 讨论

植物组织培养中,外植体诱导成苗的途径随外源激素变化而变化<sup>[7]</sup>。外植体的初代诱导结果与外植体本身取材有关,也和培养中使用的激素密切相关,可以说激素对细胞分裂和器官形态建成起着至关重要的作用。老鸦瓣为百合科郁金香属植物,同属的植物组织培养方面,研究比较成熟的是郁金香。Famelaer 等<sup>[7]</sup>以郁金香成熟胚为外植体,培养 4 周到 7 周后诱导出愈伤组织,诱导率达到 68.9%。

Podwyszyńska 等<sup>[8-9]</sup>以郁金香鳞茎在 5 °C 下低温处理 16 周后形成的花茎为外植体,诱导出不定芽,并在低浓度的 TDZ 和 NAA 作用下,进行芽继代增殖,得到的芽进行低温处理以促使其诱导鳞茎,鳞茎最终在 20 °C 富含蔗糖的培养基中形成,建立了郁金香微繁体系。Custers 等<sup>[10]</sup>采用郁金香幼胚,5 °C 低温培养 12 周后,萌发形成小幼苗,最终在改良 MS 培养基含 60 g/L 蔗糖条件下,幼苗形成鳞茎率达到 90% 以上。而国内研究主要是以不同品种郁金香的

鳞片、叶、腋芽、花茎等为外植体<sup>[11-14]</sup>，诱导出愈伤组织，再分化出不定芽，诱导小鳞茎或者直接由外植体诱导小鳞茎，完成植株再生，建立组培体系。因此，国内外郁金香组培的多数研究是以外植体直接诱导出再生小鳞茎或外植体直接诱导不定芽，由芽分化出再生植株。

老鸦瓣的组织培养，目前只有邴其忠<sup>[5]</sup>做了初步研究，发现以芯芽为外植体诱导愈伤及愈伤分化不定芽的效果好于全鳞茎，且用时较短；仅使用6-BA，则不能使芯芽和全鳞茎产生愈伤；较低质量浓度的6-BA和较高质量浓度的NAA，有利于愈伤组织的发生；高浓度的6-BA和较低浓度的NAA，则有利于不定芽的分化。而本实验用休眠的老鸦瓣鳞茎低温冷藏处理打破休眠后，以芯芽产生的芽茎为外植体进行初代诱导愈伤时，发现培养基中不含生长素NAA，而只有细胞分裂素6-BA时，也不能形成愈伤，这与邴其忠的研究结果相符。但本研究发现利用芽茎做外植体，诱导出愈伤，再分化不定芽，不定芽增殖后可获得大量丛生芽；而且从愈伤到丛生芽的每一步都会伴随有芽茎产生，如此可形成一个芽茎到芽的循环增殖过程。

本实验以老鸦瓣芽茎为外植体，诱导出愈伤组织，再由愈伤组织分化出芽，增殖后获得大量丛生芽，初步奠定了老鸦瓣芽茎组织培养的基础。百合、郁金香、大蒜、贝母等<sup>[15-19]</sup>已经在试管鳞茎诱导上取得了突破。试管苗驯化作为组培微繁殖和大田生产衔接的关键环节，往往因为根系受损和抗逆性弱导致成活率低。而试管鳞茎省去了炼苗环节，可以显著提高大田成活率。因此，在本研究的基础上，计划由愈伤组织途径的芽继续培养，参考Podwyszyńska等<sup>[8]</sup>的研究，利用丛生芽进行试管鳞茎诱导，完善组培体系；同时以冷藏芯芽在无激素的MS中形成的鳞芽为外植体，筛选合适的培养基，直接进行芽诱导芽培养，以丰富培养途径，最终完成试管鳞茎诱导。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第14卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] 河南省中药材标准 [S]. 1991.

- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 邴其忠. 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.
- [6] 陆文梁, 王雪洁, 郭仲琢. 郁金香组织培养器官分化的研究 [J]. 园艺学报, 1986, 13(1): 55-60.
- [7] Famelaer I, Ennik E, Eikelboom W, et al. The initiation of callus and regeneration from callus culture of *Tulipa gesneriana* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1996, 47: 51-58.
- [8] Podwyszyńska M, Agnieszka M. Effects of thidiazuron and paclobutrazol on regeneration potential of Tulip flower stalk explants *in vitro* and subsequent shoot multiplication [J]. *Acta Soc Bot Pol*, 2003, 72(3): 181-190.
- [9] Podwyszyńska M, Sochacki D. *Micropropagation of Tulip: Production of Virus-free Stock Plants* [M]. Skierniewice: Humana Press, 2010.
- [10] Custers J B, Eikelboom W, Bergervoet J H, et al. In ovulo embryo culture of tulip (*Tulipa* L.): effects of culture conditions on seedling and bulblet formation [J]. *Sci Hortic*, 1992, 51: 111-122.
- [11] 尹新新, 杨瑞卿, 金建邦, 等. 郁金香组织培养技术 [J]. 江苏农业科学, 2010(5): 85-86.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 薛寒青. 郁金香愈伤组织诱导技术研究 [J]. 青海农业科技, 2007(4): 4-6.
- [15] 梁建丽. 东方百合试管鳞茎生长特性及移栽技术的研究 [D]. 西安: 西北农林科技大学, 2006.
- [16] 郑军, 叶萌, 赵孙才, 等. 人工栽培川贝母鳞茎采收分级研究 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 273-276.
- [17] 万丽. 大蒜试管鳞茎发生发育和休眠的调控及生理基础研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [18] 吴晓莉, 张婷, 边金铎, 等. 大蒜鳞茎蒜氨酸酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 143-147.
- [19] 赵彦杰. 郁金香试管种球诱导的研究 [J]. 种子, 2005, 24(11): 65-66.