

苏州野生水仙小鳞茎诱导的初步研究

姜丽丽¹, 蔡平¹, 顾林平², 黄雷芳², 郑丽屏¹, 王杰青¹

(1. 苏州大学 建筑与城市环境学院 园艺系, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州市金庭镇农林服务中心, 江苏 苏州 215111)

摘 要:以苏州三山岛上野生水仙鳞茎为材料,通过 4℃低温预处理 4~10 周与未经过低温预处理(室温)对照,再以双鳞片为外植体,通过 5 种激素(6-BA、NAA、KT、2,4-D、IBA)的配比组合试验,筛选出苏州野生水仙分化最适培养基,建立快繁体系。结果表明:未经过低温预处理的鳞茎切片污染较重,成活率最低为 5.0%,最高仅 25.0%。经过 4℃低温预处理 4~10 周的鳞茎切片污染率显著降低,成活率最低为 25.0%,最高达 91.7%;诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 3.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L,平均诱导产生小鳞茎 4~5 个,增殖率达 322.22%。

关键词:野生水仙;组织培养;小鳞茎诱导

中图分类号:S 682.2⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0164-03

水仙通常以自然分球繁殖法为主,即将母球上自然分生的小鳞茎掰下来作为种球,另行栽植培养,从种球到开花球需要培养 3~4 a,此法繁殖系数小^[1],远不能满足生产上的需求。目前对福建漳州、上海崇明等地水仙组织培养技术研究报道很多,但对苏州野生水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.)的研究甚少。苏州野生水仙具有花期长、花大、花艳、花香、耐寒、病虫少等优点^[2],在野外主要靠自身繁殖,至今这一野生资源还未被开发利用,因而建立苏州野生水仙快速繁殖的方法对其保护和利用具有较重要意义。该研究采用双鳞片法植物组织培养技术快繁苏州野生水仙,试验表明,未经过低温预处理(室温)的鳞茎切片污染较重,成活率最低为 5.0%,最高仅 25.0%;经过 4℃低温预处理 4~10 周的鳞茎切片污染率显著降低,成活率最低为 25.0%,最高达 91.7%。通过使用 5 种植物生长调节激素组合试验,发现 MS+6-BA 3.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L 培养基诱导苏州野生水仙形成小鳞茎的时间最短,形成的小鳞茎数量较多,平均产生 4~5 个,最多 9 个,诱导增殖率达 322.22%,比何玮毅等^[3]、陆春芳等^[4]水仙组培快繁产生白色小球状体的时间缩短 4~8 d,多形成小鳞茎 2~3 个,组织培养快速繁殖效果比较明显,为苏州野生水仙工厂化育苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苏州太湖三山岛野生水仙,于 2009 年 1 月采集,然后种植在苏州大学校园内,待叶片枯死后取出鳞茎假植于沙地里备用。

试剂:6-BA 购自上海源聚生物科技有限公司;NAA 和 KT 购自北京拜耳迪生物生化有限公司;2,4-D 和 IBA 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 球茎预处理 球茎置于 4℃冰箱中预处理 4~10 周和不经低温预处理。

1.2.2 消毒方法 取假植于沙地的 1 a 生或 2 a 生苏州野生水仙鳞茎为材料,不经过低温预处理(室温)的球茎和置于 4℃冰箱中预处理 4~10 周的球茎,均剥去鳞茎表面腐烂干枯的鳞片,在流水下用试管刷仔细洗去根部泥沙,直至冲洗干净,然后放入超净工作台中,用 3 种方法进行消毒处理。消毒方法 I:将水仙球浸入 75%酒精中 30 s,转入 0.1%升汞中灭菌 7 min;消毒方法 II:将水仙球浸入 75%酒精中 30 s,转入 0.1%升汞中灭菌 10 min,然后剥除最外层鳞茎片;消毒方法 III:水仙球浸入 75%酒精中 30 s,转入 0.1%升汞中灭菌 7 min,然后置于 4℃冰箱中 1 d,第 2 天取出,在无菌环境下剥除最外层鳞茎片,最后 3 种消毒的鳞茎球均用无菌水冲洗 5~7 次,每次 3~5 min,消毒滤纸吸干后切块。

1.2.3 诱导培养 将消毒好的鳞茎球取出,首先切去鳞茎球 2/3 部分,留下带鳞茎盘的 1/3 部分,将其平铺呈辐射状切块,每块带 2~3 层鳞片,长约 0.7~1.0 cm,宽约 0.3~0.5 cm。以切好的带鳞茎盘的双鳞片为外植体,将其接种于诱导培养基。诱导培养基为基本培养基 MS,加入不同外源激素的组合及蔗糖 30 g/L、琼脂粉 7.0 g/L,

第一作者简介:姜丽丽(1986-),女,在读硕士,研究方向为园林植物生物技术。E-mail:tiankong77@163.com。

通讯作者:蔡平(1955-),男,博士,教授,研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail:caip@suda.edu.cn。

基金项目:苏州市科技发展计划(农业)资助项目(SNG0825)。

收稿日期:2010-06-07

pH 5.8,设置6组不同激素配比。激素组合 I:6-BA 3.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L(激素单位下同);激素组合 II:KT 1.0+NAA 1.0;激素组合 III:6-BA 1.0+2,4-D 0.5;激素组合 IV:6-BA 2.0+IBA 1.0;激素组合 V:6-BA 4.5+NAA 0.4;激素组合 VI:6-BA 2.5+NAA 0.5。培养条件为恒温(25±1)℃,光照 12 h/d,光照强度 1 900 lx(下同)。

1.2.4 继代培养 在无菌条件下,将初代培养基中直径d≥8 mm的小鳞茎球上部长出的幼叶切除,留带有鳞茎盘的下半部分并纵向切成两半,接入继代培养基中继续培养。

2 结果与分析

2.1 低温预处理及消毒效果

将不经过低温预处理(室温)的球茎进行组织切块植入培养基中,第2天鳞片切口处黏液变干,切口边缘变黄褐色,切块基部产生的黏液很容易使培养基变质。球茎经过4℃冰箱中预处理4~10周,鳞片切口边缘变黄褐色的时间推迟,并且切块基部不易产生黏液。

接种14 d后统计污染率。从表1可知,在3种消毒处理方法中,无论是否经过低温预处理,均是消毒方法I的污染率最高,消毒方法II次之,消毒方法III最低;经过低温预处理后,采用3种消毒方法处理的污染率都比不经过低温预处理的低;其中,经过低温预处理后,消毒方法III的污染率最低,仅为8.3%,同时对鳞片的生长也未发

表1 低温及消毒处理对苏州野生水仙球茎组织切块成活率的影响

处理	消毒处理	组织块	污染数	污染率/%	成活率/%
经过4℃低温 预处理4~10周	消毒方法I	40	30	75.0	25.0
	消毒方法II	46	20	43.5	57.5
	消毒方法III	48	4	8.3	91.7
不经过低温 预处理(CK)	消毒方法I	40	36	95.0	5.0
	消毒方法II	42	36	85.7	9.5
	消毒方法III	48	22	45.8	25.0

现有抑制作用。

2.2 激素组合对小鳞茎诱导的影响

取置于4℃冰箱中预处理4~10周的水仙球茎,采用消毒方法III进行消毒处理,将切好的鳞片外植体接种于MS诱导培养基中,5 d左右鳞茎盘开始膨大。从鳞片向外张开的时间和程度来看,激素组合II处理和激素组合V处理较明显。接种13 d后,激素组合I处理在2片鳞片之间露白,出现2个白色小球状体,随后白色小球体增多,第17天时形成小鳞茎(图1),第21天时2个鳞片间的小鳞茎生长状态良好,同时在膨大的鳞片基部也形成多个小鳞茎,并且继续伴有白色小球体的产生(图2)。当16 d时,激素组合IV处理和激素组合V处理也露白,出现1个白色小球状体,并且处于鳞片中层;第25天时,仅形成一个小鳞茎。激素组合II处理和激素组合III处理15 d左右鳞片膨大,但无小鳞茎形成,20 d左右鳞片先端变绿,基部继续膨大。



图1 激素组合I处理外植体长出的鳞茎



图2 激素组合I处理外植体的生长情况

表2 不同激素比对苏州野生水仙小鳞茎的诱导效果

激素组合	激素配比/mg·L ⁻¹					外植体数	最早出现小鳞茎的天数/d	小鳞茎数	增殖率/%
	6-BA	NAA	2,4-D	KT	IBA				
I	3.2	0.02				18	17	58	322.22
II		1.0		1.0		16	—	0	0
III	1.0		0.5			18	—	0	0
IV	2.0				1.0	15	20	11	73.34
V	4.5	0.4				17	25	12	70.59
VI	2.5	0.5				12	24	19	158.34

注:—表示没有出现小鳞茎球。

不同激素比对苏州野生水仙小鳞茎的诱导效果如表2所示。激素组合II处理和激素组合III处理均没能诱导形成小鳞茎,但是对鳞片的增厚、增大效果非常显

著,鳞片个体较其它组均大,且激素组合II处理的鳞片比激素组合III处理的鳞片更易伸长;激素组合I、激素组合IV、激素组合V、激素组合VI的处理都能成功诱导小鳞茎

的形成,但是激素组合Ⅳ和激素组合Ⅴ最多只能形成 1 个小鳞茎;激素组合Ⅳ比激素组合Ⅴ的鳞片形成小鳞茎球的时间短 4 d 左右,接种后 20 d 左右形成小鳞茎,小鳞茎球增殖率为 73.34%;激素组合Ⅴ鳞片接种后 25 d 左右形成小鳞茎,增殖率为 70.59%;激素组合Ⅰ诱导小鳞茎的效果最好,接种后 17 d 左右形成小鳞茎球,形成小鳞茎所需的时间最短,而且形成的小鳞茎球的数量最多,在鳞片间形成 3~4 个小鳞茎,而且有的组织块其膨大的鳞茎盘上也会再长出 1~2 个小鳞茎,平均每个组织块产生小鳞茎数 4~5 个,最多可达 9 个,其增殖率达 322.22%。

2.3 鳞片发育程度对鳞茎形成的影响

在培养一段时间后,鳞片颜色发生变化,形成的鳞茎大小依次为:外层>中层>内层;小鳞茎繁殖系数:中层>内层>外层(表 3)。

表 3 鳞片不同发育程度对鳞茎形成的影响

鳞片	鳞茎直径/mm	繁殖系数/%
外层	5.7	2.31
中层	5.2	3.72
内层	3.4	2.54

2.4 继代培养的结果

继代培养基选用Ⅰ组处理的培养基(MS+6-BA 3.2+NAA 0.02)。在无菌条件下切下小鳞茎培养,取初代培养基中直径 $d \geq 8$ mm 的小鳞茎,将其上部长出的幼叶切除,留带有鳞茎盘的下半部分并纵向切成两半,接种于继代培养基中继续培养。切半的小鳞茎 4 d 左右中心部分较外层鳞片伸长 5 mm,6 d 左右中心伸长部分开始变绿,基部明显膨大。每一半鳞茎均产生 3~4 个小鳞茎,而且在其膨大的鳞茎盘上又再生出小鳞茎。

3 小结与讨论

置于 4℃ 冰箱中预处理 4~10 周的球茎比未经过低温预处理的球茎污染率降低很多,这与李招文等^[3]的研究结果基本一致。3 种消毒处理方法中,将水仙球浸入

75%酒精中 30 s,转入 0.1%升汞中灭菌 7 min,然后置于 4℃ 冰箱中 1 d,第 2 天取出,在无菌环境下剥除最外层鳞茎片的消毒效果最佳,鳞片污染率仅为 8.3%,提高了鳞片切块的利用率。表明消毒后低温处理对鳞茎外植体内源菌的活性有抑制作用。

基本培养基 MS 与 6-BA 3.2+NAA 0.02 的激素组合是苏州野生水仙小鳞茎诱导的最适合培养基,诱导形成小鳞茎的时间最短,且形成的小鳞茎数量较多,平均 4~5 个,最多达 9 个,增殖率达 322.22%。比何玮毅等^[4]黄花水仙和南日岛水仙组培快繁最佳培养基[MS+BA 0.5+2,4-D 0.1 和 MS(N6)+6-BA 0.5+NAA 2.0]、陆春芳等^[5]崇明水仙组培快繁的最佳培养基[MS(N6)+BA 2.0+2,4-D 0.1]出现白色小球状体的时间缩短 4~8 d,且多形成小鳞茎 2~3 个。在继代培养中,每半个小鳞茎又可再生 3~4 个小鳞茎,同时取 $d \geq 8$ mm 的小鳞茎切半,也有利于增加继代培养产生小鳞茎的数量,比胡毅敏等^[6]普陀水仙组培快繁技术研究中的效果好,多产生小鳞茎 2 个。

经以上试验诱导苏州野生水仙小鳞茎球的产生比较成功,但是鳞茎球的增大并不理想,主要是耗时较长,如何快速促进鳞茎球的发育还有待于研究。

参考文献

[1] 季云美,任旭琴.植物生长调节剂在水仙上的应用[J].淮阴工学院学报,2004,13(4):86-88.
[2] 顾林平,蔡平,姜丽丽,等.苏州曾是中国水仙花的故乡[J].南方农业,2010,4(2):41-42.
[3] 李招文,唐道一.水仙组织培养的研究[J].园艺学报,1982,9(4):65-68.
[4] 何玮毅,陈晓静,陈祥檀.黄花水仙和南日岛水仙的组培快繁[J].福建农林大学学报(自然科学版),2005,34(3):313-317.
[5] 陆春芳,龚德超,钱爱萍,等.崇明水仙组织培养技术初探[J].上海农业科技,2002(6):18-19.
[6] 胡毅敏,闰国宁.普陀水仙优良新品种组培繁殖技术研究[J].林业科学研究,1991,4(2):226-229.

Preliminary Study on Inducing Small Bulbs of Wild *Narcissus* in Suzhou

JIANG Li-li¹,CAI Ping¹,GU Lin-ping²,HUANG Lei-fang²,ZHENG Li-ping¹,WANG Jie-qing¹

(1. Department of Horticulture, College of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Soochow, Jiangsu 215123; 2. The Agriculture and Forestry Service Center of Jintong Town, Soochow, Jiangsu 215111)

Abstract: The wild *Narcissus* in Three-Mount Island of Soochow were respectively dealt with room temperature and low temperature in 4℃ during 4~10 weeks. The double scales were used as explants and inoculated on 5 kinds of different hormone to screen the best medium. The results showed that the lowest survival rate of bulbs in room temperature was 5.0%, and the highest was only 25.0%. Another at 4℃ during 4~10 weeks was 25.0%, and the highest was up to 91.7%. MS+6-BA 3.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L had the best effect on the inducement, the average of inducing small bulbs was 4~5 and the increment rate was up to 322.22%.

Key words: wild *Narcissus*; tissue culture; small bulbs inducement