

崇明水仙鳞茎的组织培养研究

刘 焰

(上海辰山植物园,中国科学院上海辰山植物科学研究中心,上海 201602)

摘 要:以崇明水仙鳞茎为外植体进行试管种球的诱导,对其组织培养中消毒条件、植物激素、生根移栽技术等影响因子进行研究。结果表明:诱导培养的最佳培养基为 MS+6-BA 5 mg/L+NAA 1 mg/L,诱导率为 100%;增殖培养的适宜培养基是 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L,增殖系数达 3.43;小鳞茎经壮苗培养 20 d 后移栽到珍珠岩基质中即可生根成活,移栽成活率达 90.5%。

关键词:崇明水仙;鳞茎;繁殖

中图分类号:S 682.2⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0099-04

水仙(*Narcissus*)属石蒜科水仙属多年生球根植物,著名的观赏兼药用植物,在世界花卉产业中占有重要地位^[1]。崇明水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)作为上海特有的水仙品种栽培历史悠久,与漳州水仙齐名,是我国两大水仙品系之一。然而,崇明水仙一直以分球繁殖作为主要繁殖方式,繁殖系数低、周期长,难以实现规模化生产,且长期的无性繁殖导致病毒积累鳞茎质量退化,严重影响崇明水仙种球的品质^[2-3]。组培扩繁技术利用植物细胞的全能性进行无性繁殖,可在短时间内获得大量的植株,能有效提高水仙的繁殖效率实现种球的工厂化生产,并为脱毒种球的生产奠定研究基础^[4]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

崇明水仙种球采自上海市崇明县沿港镇,选择 2~3 年生健壮、无病害的鳞茎作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 选择大小一致的崇明水仙鳞茎,在 4℃低温下预处理 6 周^[2]。除去鳞茎表面干缩的表皮和根之后用洗洁精搓洗 2~3 次,流水冲洗 30 min。将鳞茎横切后采用酒精、升汞、次氯酸钠、45℃水浴、头孢拉丁、60℃无菌水等 6 种不同消毒方式的组合对外植体进行消毒:①先用 75%酒精消毒 90 s,后用 0.1%升汞消毒

25 min;②先用 75%酒精消毒 90 s,后用 10%次氯酸钠消毒 25 min;③先用 75%酒精 90 s,0.1%升汞消毒 15 min,60℃无菌水清洗 3~5 次,再用 0.1%升汞消毒 10 min;④先用 45℃水浴 3 h,75%酒精 90 s,0.1%升汞消毒 15 min,60℃无菌水清洗 3~5 次后再用 0.1%升汞消毒 10 min;⑤1 000 mg/L 头孢拉丁水浴 3 h,用 75%酒精消毒 90 s,0.1%升汞消毒 15 min,60℃无菌水清洗 3~5 次后,再用 0.1%升汞消毒 10 min。消毒完成后,用无菌水清洗 3 次,后在无菌条件将种球下切成小块接种在培养基上。每瓶接种 10 个外植体,每处理设 6 次重复。统计 15 d 内的污染情况。

1.2.2 诱导培养 将消毒好的鳞茎切分成 0.5 cm×1.0 cm 大小,每块外植体含 2~3 片鳞片,接种在 MS 基本培养基中添加不同浓度 NAA、6-BA 的培养基上,培养基中添加 4%的蔗糖(表 1)。每瓶培养基接种 8 个外植体,每处理 5 次重复。60 d 后统计每块外植体再生鳞茎数量。

表 1 诱导培养基

Table 1		Induction culture media			mg/L
浓度		6-BA			
		1.0	3.0	5.0	10.0
NAA	0.5				A5
	1.0	A1	A2	A3	A4
	2.0				A6
	3.0				A7

1.2.3 增殖培养 将诱导培养获得的小鳞茎沿中部纵切一分为二,分别接种在添加 6-BA、NAA、2,4-D、IBA 等 4 种激素 3 个水平正交实验设计组合的 MS 培养基上增殖培养(表 2)。每瓶培养基接种 8 个外植体,每处理 5 次重复。30 d 后统计再生小鳞茎数量。

作者简介:刘焰(1983-),男,硕士,工程师,现主要从事花卉种质资源收集与遗传育种等研究工作。E-mail:liuzhaojob@126.com.

基金项目:上海市科学技术委员会科研资助项目(13231204300)。

收稿日期:2015-07-24

表 2 增殖培养基

培养基	6-BA	NAA	2,4-D	IBA
B1	1	0	0	0
B2	1	1	0.1	0.5
B3	1	2	0.5	1.0
B4	3	0	0.5	0.5
B5	3	1	0	1.0
B6	3	2	0.1	0
B7	5	0	0.1	1.0
B8	5	1	0.5	0
B9	5	2	0	0.5

1.2.4 无菌鳞茎的生根和移栽 采用直接移栽和生根培养后移栽 2 种方式进行移栽培养。直接移栽:将在 1/2MS 培养基中经过 20 d 壮苗培养尚未生根的鳞茎,从培养基中取出直接移栽到珍珠岩基质中。放置在塑料温室内培养,每天浇水 1~2 次,每周喷肥 1 次。生根培养后移栽:将直径生长到 0.5~1.0 cm 的小鳞茎切分成单个,并接种在含有不同浓度的 NAA 或 IBA 生根培养基上(表 3)。每瓶接种 10 个外植体,每处理设 5~8 个重复。30 d 后统计小鳞茎生根情况。将生根的鳞茎从培养基中取出,洗净根上的培养基,移栽至珍珠岩基质的苗床上培养。1 个月后比较直接移栽和经生根后移栽鳞茎生长状况。

表 3 生根培养基

浓度/(mg·L ⁻¹)	0	0.05	0.10	0.30	0.50	0.1	0.3	0.5	1.0
培养基	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9

1.2.5 培养条件 温度(24±1)℃;光源为日光灯,光照强度 1 600 lx,光周期 12 h/d。

1.3 项目测定

污染率(%)=污染的外植体个数/外植体总数×100;诱导率(%)=诱导鳞茎的外植体个数/外植体总数×100;增殖系数(%)=增殖小鳞茎总数/外植体总数×100;生根率(%)=生根的鳞茎个数/外植体总数×100。

1.4 数据分析

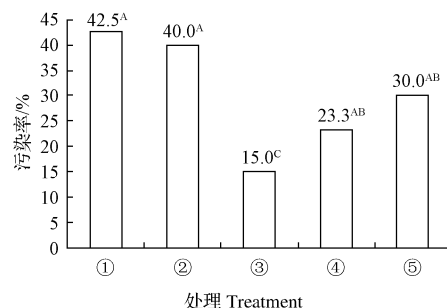
试验数据采用 SPSS 10 和 SAS 8.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方式的比较

由图 1 可知,5 种不同的消毒处理方式中,处理③的消毒效果最好,明显优于其它处理,污染率为 15.0%。试验结果表明在相同消毒时间的条件下,10%次氯酸钠的消毒好于 0.1%升汞。但是 10%次氯酸钠对外植体的伤害较大,消毒后外植体死亡率高。而升汞对外植体影响较小,外植体成活率达 100%。因此,选用升汞作为消

毒试剂,而经过升汞 2 次分步消毒的效果好于单次长时间消毒,未经预处理的组合消毒效果好于经过预处理的组合。2 次升汞消毒中间用高温无菌水清洗对降低污染率也有一定作用。因此使用多步混合消毒方式能够明显降低外植体的污染率。



注:不同英文字母表示差异显著性($P<0.05$)。

Note: Different letters show significant difference ($P<0.05$).

图 1 不同消毒方式的污染率比较

Fig. 1 Effect of the sterilizing methods on contamination rate

2.2 植物激素对外植体诱导鳞茎的影响

外植体接种在诱导培养基上,鳞片逐渐生长增厚,30 d 左右双层鳞片张开,在鳞茎盘基部长出小鳞茎,同时伴有愈伤组织产生。从表 4 可以看出,6-BA 对鳞茎的分化有明显促进作用,当 NAA 为 1.0 mg/L,6-BA 浓度在 1.0~10.0 mg/L 的范围内诱导率随激素浓度增高有先增后减的趋势。当 6-BA 浓度是 5.0 mg/L,诱导率最高为 100%,平均诱导个数也最高达 2.75 个,明显高于其它处理。但此时诱导出的鳞茎较为瘦弱,并有不定芽发生。当 6-BA 浓度降为 1.0 mg/L 时,外植体上再生出的鳞茎饱满浑圆,但是增殖能力较低,平均诱导 1.78 个鳞茎。当浓度提高到 10.0 mg/L,外植体基部产生大量淡黄色愈伤组织,同时抑制小鳞茎的分化。同样将 6-BA 浓度固定为 5.0 mg/L, NAA 浓度在 0.5~3.0 mg/L 范围内递增,增殖系数随之先增后减,在 NAA 为 1.0 mg/L 时诱导率最高。并且 NAA 浓度大于 1.0 mg/L 不利于鳞茎的分化。

表 4 不同激素配比对外植体诱导鳞茎的影响

Table 4 Effect of hormones on induction bulblets from leaf lamina with basal plate and the diameter of bulblets

培养基编号	诱导率/%	平均诱导数/个
A1	80.0	1.78 ^C
A2	85.0	2.12 ^B
A3	100.0	2.75 ^A
A4	97.5	0.13 ^{EFG}
A5	77.5	1.42 ^{CD}
A6	62.5	0.20 ^{EF}
A7	67.5	0.22 ^{EF}

注:不同英文字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Different letters show significant difference ($P<0.05$). The same below.

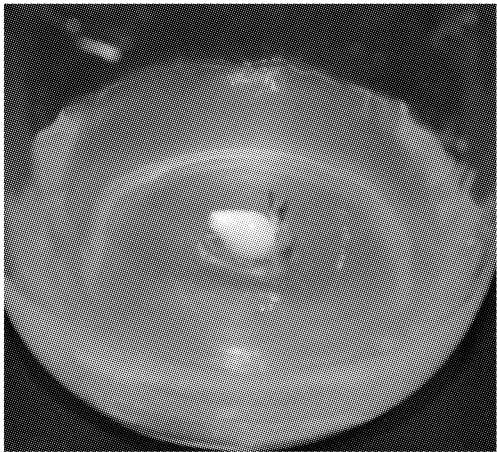


图 2 诱导培养的崇明水仙鳞茎
Fig. 2 Bulblet on induction culture medium



图 3 增殖培养的崇明水仙鳞茎
Fig. 3 Bulblets on proliferation culture medium

2.3 植物激素对增殖的影响

由表 5 可知,进入增殖培养阶段 20~30 d 后,从鳞茎盘基部再生出小鳞茎。正交实验中最佳的方案为 B2,即 6-BA 1 mg/L、NAA 1 mg/L、2,4-D 0.1 mg/L、IBA 0.5 mg/L。该处理的增殖系数明显高于其它处理,达 3.43。对试验结果进行的方差分析得表 6,4 种激素中 6-BA、2,4-D 和 IBA 对鳞茎的增殖有显著作用,而 NAA 的作用并不明显。其中低浓度的 6-BA 对鳞茎增殖有促进作用,当 6-BA 浓度是 1 mg/L 时诱导效果最好,平均增殖系数为 2.37,增殖能力优于 3 mg/L 和 5 mg/L,而后二者增殖系数并没有太大差异。同样低浓度的 2,4-D 对鳞茎的诱导有促进作用,高浓度抑制鳞茎的分化而有利于愈伤组织的形成,最适浓度为 0.1 mg/L,平均增殖系数为 2.70。2,4-D 浓度分别为 0、0.1 mg/L 的诱导效果无显著差异,但明显好于 0.5 mg/L。IBA 在一定的浓度范围内对水仙鳞茎增殖也有促进作用。PEAK 等^[5]认为 IBA 能够促进水仙小鳞茎质量的增

加,然而 9 个处理中鳞茎的茎围之间没有显著差异。这可能与不同的水仙品种有关。

表 5 不同激素配比对
崇明水仙增殖的影响

Table 5 Effect of hormones on multiplication		
培养基	茎围/mm	增殖系数
B1	6.9±0.8	2.70 ^{ABC}
B2	6.8±0.5	3.43 ^A
B3	7.2±0.8	1.58 ^D
B4	5.5±0.9	1.88 ^{DC}
B5	6.2±0.8	1.83 ^D
B6	5.0±0.7	2.68 ^{ABC}
B7	6.3±0.3	2.13 ^{BCD}
B8	6.7±0.7	1.90 ^{DC}
B9	6.0±0.7	2.78 ^{AB}

表 6 6-BA、2,4-D、IBA 结果的多重比较

Table 6 Duncan's Multiple Range Test for 6-BA, 2,4-D and IBA					
6-BA /(mg·L ⁻¹)	平均增殖 系数	2,4-D /(mg·L ⁻¹)	平均增殖 系数	IBA /(mg·L ⁻¹)	平均增殖 系数
1	2.37 ^A	0	2.42 ^A	0	2.43 ^B
3	2.34 ^B	0.1	2.70 ^A	0.5	2.74 ^A
5	2.23 ^{BA}	0.5	1.83 ^B	1.0	1.78 ^C

2.4 生根培养

由表 7 可知,对照组中,水仙鳞茎接种在 MS 基本培养基上经过 2 个月的培养能够诱导生根,但生根率仅有 4.6%,平均生根数量为 1.0 条。而 NAA、IBA 等生长素对水仙生根有明显的促进作用。NAA 诱导效果明显好于 IBA。NAA 在 0.05~0.50 mg/L 范围内随着浓度的升高生根率也随之升高,其中 NAA 0.50 mg/L 生根效果最好诱导率为 76%,平均生根 2.60 条。

表 7 不同因子对水仙生根的影响

Table 7 Effect of hormones on rooting		
培养基	生根率/%	平均生根数/个
C1	4.6	1.00
C2	12.0	1.30
C3	51.4	3.90
C4	42.8	2.30
C5	76.0	2.60
C6	5.5	1.00
C7	11.2	1.00
C8	12.6	0.02
C9	16.6	1.70

2.5 种球移栽

将经过 1/2MS 基本培养基壮苗培养 20 d 后的鳞茎直接移栽到珍珠岩基质中培养,2 周左右时间小鳞茎能够生根。2 个月后移栽成活率达到 90.5%。而将经生根培养已经生根的鳞茎移栽至相同的基质中培养,根系却逐渐褐化死亡,再经过 1~2 周的培养能重新长出新根。移栽 2 个月的成活率为 92.0%。统计分析二者之间没有显著的差异。表明崇明水仙无菌苗种球能够在壮苗培养后直接移栽生根。

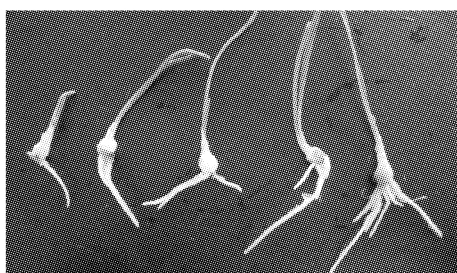


图4 水仙鳞茎的生根情况

Fig. 4 Rooting bulblets

3 讨论与结论

在诱导培养过程中发现,崇明水仙鳞茎片的数量、大小、贮藏物质的多少与小鳞茎增殖率和质量有很大关系,与叶银根等对水仙的研究结果一致^[6]。该研究表明,鳞片越厚分化出的小鳞茎质量越好,储藏营养物质多有利于鳞茎的分化。而外层鳞片诱导效果好于靠近内层的鳞片,内层鳞片因贮藏养分不足会产生徒长现象。崇明水仙2~3片外层鳞茎带鳞茎盘作为外植体的诱导效果最好。

植物激素在水仙组织培养中起着重要的调控作用,且在水仙组织培养的各个阶段所应用的激素种类和浓度各具特点^[7]。不同基因型的水仙对激素种类的需求也有所不同^[8]。利用带鳞叶的鳞茎盘直接诱导不定芽发生时,常用的分裂素类物质有6-BA、KT等。常用的生长素类物质有NAA、IAA、IBA和2,4-D等,其中以NAA为最为常用^[9-10]。低浓度NAA或2,4-D结合细胞分裂素促进鳞片间小鳞茎的直接形成,高浓度的2,4-D有利于产生诱导水仙胚状体^[11]。该研究结果表明,NAA对崇明水仙鳞茎的诱导培养确有促进作用,但是对鳞茎的增殖效果有限,6-BA对崇明水仙的诱导和增殖的作用更为显著。在启动培养中高浓度6-BA能显著的促进小鳞茎再生,但是在后续的增殖培养过程中应适当

降低细胞分裂素的浓度。

水仙组培常用的生根移栽方法为:先将种球在生根培养基中诱导生根后再把无菌苗移栽到基质中^[8,12]。该研究将无菌鳞茎经过20 d左右壮苗培养后,移栽到珍珠岩基质中。2周时间内鳞茎能够生根,且移栽的成活率在90%以上。与传统生根移栽法相比,该方法优化了生根流程,缩短了生产周期,为水仙组培苗的生根移栽提供了新方法。

参考文献

- [1] 黄双龙,赖钟雄. 水仙花生物技术研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2007,36(3):74-79.
- [2] 杨柳燕,张永春,李玉秀,等. 崇明水仙试管球脱毒技术[J]. 中国农业科学,2013,46(12):2607-2614.
- [3] 张冬梅,卞黎霞. 水仙属植物研究现状及崇明水仙发展策略[J]. 园林科技,2013(4):10-11.
- [4] 姜丽丽,蔡平,顾林平,等. 苏州野生水仙小鳞茎诱导的初步研究[J]. 北方园艺,2010(18):164-166.
- [5] PAEK K Y, LEE C W, CHIO J K, et al. The effects of explant source, breaking of apical dominance and dormancy on shoot proliferation and bulb formation in Hyacinth, Narcissus and Lily *in vitro*[J]. Journal of Horticultural-Science, 1987,28(1):88-98.
- [6] 叶银根,陈星球. 水仙双鳞茎切块繁殖的研究I. 小鳞茎的形态发生和成苗过程[J]. 园艺学报,1985,12(2):113-118.
- [7] 罗凤霞,王春彦,李玉萍,等. 水仙组织培养的研究进展[J]. 金陵科技学院学报,2009,25(3):82-85.
- [8] 何玮毅,陈晓静,陈祥檀,等. 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.
- [9] 方琪,张雪平,张伟,等. NAA、2,4-D对崇明水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)愈伤组织的诱导及再生的不同影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2013,31(3):9-15.
- [10] 陈段芬,高健,彭镇华,等. 水仙属植物研究进展[J]. 林业科学,2008,44(3):140-146.
- [11] MALIK M. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2008,94:337-345.
- [12] 王俐,杨德,龙春林,等. 中国水仙的离体培养及植株再生[J]. 云南农业大学学报,2004,19(5):616-618.

Study on Propagation *in vitro* of Chongming Narcissus Bulbs (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)

LIU Zhao

(Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602)

Abstract: This paper was mainly discussed about the propagation *in vitro* of Chongming narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*). The results showed that segments of the bulbs with basal scales and a portion of the plate, MS medium containing 5 mg/L + 6-BA + 1 mg/L NAA was suitable for induction of bulblets of Chongming narcissus, and the frequency of induction was 100%. The MS medium, supplemented with 1 mg/L 6-BA, 1 mg/L NAA, 0.1 mg/L 2,4-D and IBA 0.5 mg/L could be used for multiplication induction, and the proliferation was 3.43. After 20 days for culturing strong plants, transferred the plantlets into perlite. The plantlets started rooting about two weeks. And the survival rate of 90.5% in two months.

Keywords: Chongming narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*); bulb; propagation