

文章编号:1000-5641(2008)06-0103-07

崇明水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 不同外植体分化能力与鳞茎增大初探

熊莉君, 李小方, 王洋, 孙越, 许玲

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 以崇明水仙鳞茎的上、中、下部、嫩叶和幼嫩花序为外植体, 研究其在离体培养系统中的再分化能力, 结果表明, 带鳞茎盘的鳞茎和幼嫩花序最容易分化出小鳞茎. 以组培获得的带鳞茎盘的鳞茎为材料建立快繁体系, 40 d 内小鳞茎数目增加 3 倍; 并发现浓度适合的 KH_2PO_4 及暗培养能促进小鳞茎增大. 组织学研究结果显示, 组培水仙与大田生长水仙的顶端分生组织的形态结构不同, 前者细胞分层不明显, 细胞核大且染色较深.

关键词: 崇明水仙; 外植体; 分化能力; 鳞茎增大

中图分类号: S718146; S718149 **文献标识码:** A

Differentiation of different explants and enlargement of tissue culture bulb of narcissus at Chongming (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)

XIONG Li-jun, LI Xiao-fang, WANG Yang, SUN Yue, XU Ling

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: This paper studied the de-differentiation and differentiation of various explants such as bulb, leaf and infancy inflorescence of narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*). The results showed that infrastructure and infancy inflorescence of narcissus were the best explants. When the infrastructure of adventitious buds was used as explants, the quantity of buds increased three times in forty days. Additionally, it was found that KH_2PO_4 of certain concentration and dark conditions were favorable to enlargement adventitious buds. The anatomic structure of shoot apical meristem of bulb from field was different from that of tissue culture bulb, which might be the reason why tissue culture bulbs were very hard to enlarge.

Key words: narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*); explants; differentiation; bulb enlargement

收稿日期:2008-02

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2005 第 1-2)

第一作者:熊莉君,女,硕士研究生.

通讯作者:李小方,女,副教授,研究方向为植物生理与分子生物学. E-mail: xfli@bio.ecnu.edu.cn.

0 引言

“崇明水仙”(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 是上海最具特色的品牌花卉和传统花卉之一, 和福建的漳州水仙是历史上齐名的两大中国水仙品系^[1]. 然而由于其用常规的杂交育种方法无法繁殖, 田间繁殖主要靠小仔球来增加鳞茎的数量, 难以实现大规模生产, 另外长期无性繁殖, 病毒侵染严重^[2], 造成种球退化, 产品质量下降, 栽培面积逐年减少, 使其逐渐从市场消失^[3]. 为解决这些问题, 不少研究者尝试组织培养脱毒和快繁, 但目前报道的相关文章, 包括对其它产地的中国水仙, 仅限于带鳞茎盘的鳞茎外植体的组培体系的建立^[2,4-6], 不仅取材受到局限, 同时组培得到的小鳞茎往往出现只长叶不长球、鳞茎增大困难等问题. 本文分别以水仙鳞茎的上部、中部、带鳞茎盘的鳞茎、嫩叶和幼嫩的花序为外植体, 研究其在组培体系中脱分化和再分化能力; 同时探讨了不同浓度的磷、钾成份和光、暗培养条件与鳞茎增大的关系, 为组培小鳞茎应用于生产及脱毒后快繁打下基础. 另外, 本文还对组培小鳞茎及大田生长的鳞茎的顶端分生组织进行组织显微观察, 试图从顶端分生组织分裂和分化机理方面阐述组培小鳞茎增大难的问题, 为进一步解决组培小鳞茎增大问题提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 组织培养实验材料及方法

实验所用材料是取自上海市崇明县港沿镇水仙苗圃的崇明水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*). 分别取崇明水仙鳞茎、嫩叶及幼嫩花序为外植体, 常规消毒, 将鳞茎分为上部、中部及带鳞茎盘的鳞茎三部分, 再将这三部分分别切成 1.5 cm^3 大小接种, 嫩叶切成长约 1 cm 的叶段接种, 将幼嫩花序去除佛焰苞片, 将其中小花分为上(带花瓣花药)、下(含胚珠)两部分或分成左右两部分, 分别接种到不同的培养基上.

所有组培体系建立的基本培养基均为 MS 培养基, 培养基编号及成份见表 1, 其中所用到的植物生长调节剂分别是: 6-苄氨基嘌呤(6-BA); 6-糠氨基嘌呤(KT); 3-吲哚乙酸(IAA); 萘乙酸(NAA); 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D).

以径围为 $1 \sim 2.5 \text{ cm}$ 的组培小鳞茎为材料研究鳞茎的增大. 所有培养基均附加 3% 蔗糖和 0.7% 琼脂粉, pH 值为 5.8, 培养室的培养条件为: 温度 $22 \text{ }^\circ\text{C}$, 光强 $40 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 暗培养条件是完全黑暗.

分化出小鳞茎的总数目称为总分蘖数; 分化外植体繁殖系数是指分化出小鳞茎的总数目与已分化外植体的数目的商; 接种外植体繁殖系数是指分化出小鳞茎的总数目与接种外植体总数目的商; 鳞茎诱导率是指诱导出的小鳞茎的数目与接种外植体总数目的商.

1.2 石蜡切片实验材料及方法

小心取水仙鳞茎生长锥部位, FAA 固定液常温固定 24 h , 经常规洗涤、脱水与透明、封埋、切片、粘片、脱蜡、染色、脱水、透明以及胶封, 常规镜检拍照(Olympus BX 荧光显微镜, Cool SNAP-Pro 数码相机).

2 实验结果

2.1 以不同外植体建立崇明水仙的组培体系

2.1.1 崇明水仙不同外植体脱分化培养基的初步筛选

首先选择细胞分裂素为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 和不同浓度、不同种类的生长素脱分化培

培养基(见表1 1-10#),以鳞茎上、中、下(带鳞茎盘)部位以及叶为外植体,分别于接种20 d和40 d时统计脱分化率、玻璃化率及褐化率,结果发现所有外植体在生长素分别为IAA的培养基(见表1 1-3#)和NAA的培养基(见表1 8-10#)上脱分化率很低.当生长素为2,4-D(见表1 4-8#)时,虽然以鳞茎的上、中部切段为外植体的脱分化率依然很低,但带鳞茎盘的下部切段脱分化程度很高,2,4-D浓度为 $0.1\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脱分化率均达80%以上,从愈伤组织的致密程度来看,4-6#培养基最好,但是随着2,4-D浓度增加,玻璃化程度加重,褐化率也增加,因此,选择4#培养基为鳞茎和叶的脱分化培养基,继续后续的鳞茎分化.

表1 培养基编号及成份

Tab.1 Numbers and composition of tissue culture medium

培养基编号	培养基成分及激素浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	培养基编号	培养基成分及激素浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1#	MS + 6-BA 1.0 + IAA 0.5	13#	MS + 2, 4-D 0.1 + KT 2
2#	MS + 6-BA 1.0 + IAA 1.0	14#	MS + 2, 4-D 0.1 + KT 4
3#	MS + 6-BA 1.0 + IAA 2.0	15#	MS + 2, 4-D 0.1 + KT 6
4#	MS + 6-BA 1.0 + 2, 4-D 0.1	16#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 1
5#	MS + 6-BA 1.0 + 2, 4-D 0.2	17#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 2
6#	MS + 6-BA 1.0 + 2, 4-D 0.5	18#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 3
7#	MS + 6-BA 0.4 + 2, 4-D 1.0	19#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 5
8#	MS + 6-BA 1.0 + NAA 3.0	20#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 0.1
9#	MS + 6-BA 1.0 + NAA 2.0	21#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 0.5
10#	MS + 6-BA 1.0 + NAA 1.0	22#	MS + 2, 4-D 0.5 + KT 0.8
11#	MS + 2, 4-D 0.1 + KT 0	D1	MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.5
12#	MS + 2, 4-D 0.1 + KT 1	D2	MS + 6-BA 2.0 + NAA 1.0

进一步以鳞茎的上部、中部、嫩叶及花序为外植体的试验中,固定培养基中2,4-D浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,改变细胞分裂素KT的浓度(见表1 11-19#),结果发现,2,4-D浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,KT浓度越高,褐化率及愈伤形成率越低;2,4-D浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,玻璃化率较前者大大提高,但愈伤分化率也有提高.综合考虑,12#和16#培养基较好.进一步将KT的浓度进行细分(见表1 20-22#),发现20#培养基效果也较好,所以以下以花序为外植体的组培体系的建立中选择12#、16#和20#培养基为脱分化培养基.

2.1.2 不同外植体的脱分化和再分化能力

在4#培养基上接种带茎盘的鳞茎外植体,接种20 d后,鳞茎片创口处有淡黄色疏松愈伤形成,两鳞茎片之间的芽点清晰可见,之后芽点慢慢变大并长出嫩叶,长大后的小鳞茎较细长(见图1D).将培养25 d的组织转接至鳞茎分化培养基(见表1 D1或4#)上,15 d统计分化率,结果表明(见表2),带鳞茎盘的鳞茎在两种分化培养基上都非常容易诱导出小鳞茎,耗时最短的约需要45 d就能形成完整的小植株,从单个外植体上分化出的鳞茎数目来看,生长素为NAA的D1培养基优于生长素为2,4-D的4#培养基,每块外植体诱导出的小鳞茎最多可达14个.

在脱分化培养基上,以鳞茎上部和叶片为外植体,褐化率极高,特别是外层鳞茎片褐化率达100%;而以鳞茎中部为外植体较易获得愈伤,而且越是鳞茎片内层越易脱分化,但形成的愈伤质地较疏松;以组织培养出的鳞茎上部为外植体较易形成愈伤,褐化率较低(见图2),可能是由于分化出的小鳞茎分泌物较少,这与水仙鳞茎含抑制物质的报道是一致的^[7].

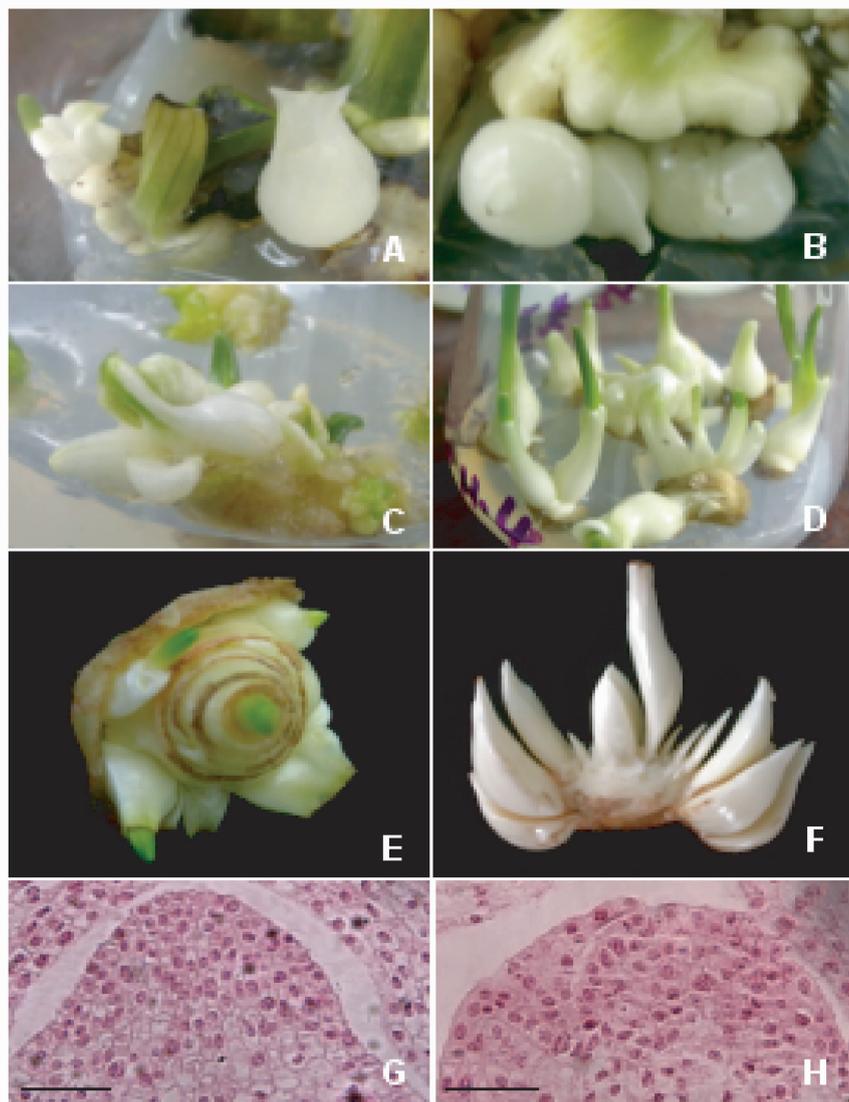


图 1 组培鳞茎及其生长锥的解剖结构

Fig. 1 Narcissus bulbs cultured in vitro and the anatomic structure of bulb

注: A 鳞茎上部诱导出的小鳞茎; B 鳞茎中部诱导出的小鳞茎; C 幼嫩花序诱导出的小鳞茎; D 带鳞茎盘的鳞茎诱导出的小鳞茎; E 培养 30 d 的小鳞茎的鳞茎盘部位; F 大田水仙鳞茎解剖图, 示芽点排列在一条直线上; G 大田水仙顶端生长锥组织切片(Bar = 80 μm); H 组培水仙顶端生长锥组织切片(Bar = 80 μm)

表 2 带鳞茎盘外植体的分化情况

Tab. 2 Differentiation of infrastructure of narcissus in tissue culture

培养基编号	外植体数目/个	分化外植体数目/个	分化率/%	总分蘖数/个	分化外植体繁殖系数	接种外植体繁殖系数
4#	44	39	88.7	89	2.28	2.02
D1	69	58	84.1	185	3.19	2.68

以幼嫩花序为外植体时,形成的愈伤为花状(见图 1C). 将脱分化培养基上接种的鳞茎中部、上部、叶、花序及组培鳞茎上部于 25 d 后全部转接到分化培养基上,培养 70 d 后统计分化率(见图 2). 以鳞茎中部、上部、叶为外植体的鳞茎分化率均很低,以叶片分化率最低(6.7%),鳞茎上部次之(10%),鳞茎中部分化率可达 14%. 而以组培鳞茎上部和幼嫩花序为外植体的鳞茎分化率相对较高,可达到约 20%. 以幼嫩花序为外植体时,比较不同切割方法对外植体分化的影响. 发现将小花分为上、下两部分时,小花上部在培养 25 d 左右褐化死亡,而小花下部分化较慢,较易褐化死亡;将小花分成左右两部分时,分化效果最好,外植体褐化率为零,小鳞茎往往从花状愈伤底部分化出(见图 1C). 以上这些外植体诱导出的鳞茎较圆,一般长叶速度很慢,与带茎盘的鳞茎为外植体诱导出的鳞茎不同(见图 1A, B, C).

2.2 以组培小鳞茎为外植体的快繁体系

进一步以组培小鳞茎为外植体进行扩繁,将鳞茎盘切成约 1.5 cm^3 大小接种到附加 6-BA 1.0 + NAA 0.5 的 MS 培养基中,10 d 后在解剖镜下可看到较外层的两层鳞片之间长出芽点,20 d 后小鳞茎芽点肉眼清晰可见,10 d 左右成球(见图 1E). 分别统计不同天数小鳞茎芽的个数发现:组培小鳞茎繁殖速度极快,40 d 鳞茎繁殖增加 3 倍多(见图 3). 进一步观察发现组培水仙鳞茎的芽点呈圈状分布,即在两个鳞片之间有多个芽再生(见图 1E),大田水仙鳞茎除鳞茎球中心的顶芽外,顶芽两侧每两个鳞片之间有一个侧芽,所有的芽都排列在一条直线上^[8](见图 1F).

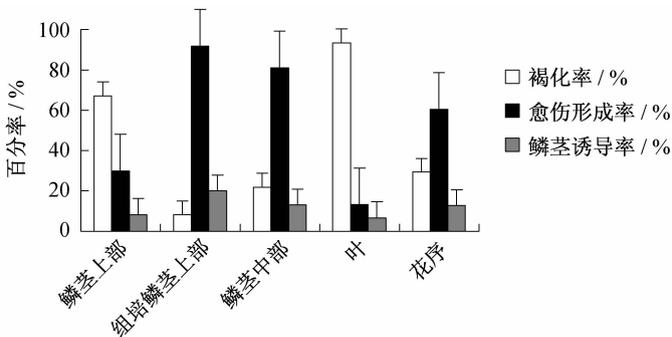


图 2 以鳞茎中部、上部、叶、花序及组培鳞茎上部为外植体的脱分化和分化情况

Fig. 2 De-differentiation and differentiation of different explants of narcissus

2.3 光照条件与 KH_2PO_4 浓度对组培小鳞茎径围增大的影响

将组培小鳞茎接种于不同培养基中,25 d 后开始统计,发现 MS 培养基中 KH_2PO_4 浓度加倍时小鳞茎径围增加较快(见表 3),这与 P、K 肥能促进球根类植物球茎增大的报道是一致的^[9,10]. 进一步比较光、暗条件对鳞茎增大的影响,发现在相同培养基中,光下的小鳞茎长叶较多且细长,叶绿色;而暗下的小鳞茎新出叶为黄色,出叶极少,长速极慢,组培小鳞茎原来的叶也由绿变黄,鳞茎增大较快. 双因素检验结果表明,暗条件下的鳞茎径围与光照条件下的鳞茎径围有显著差异,当 KH_2PO_4 浓度加倍与黑暗组合处理时,对水仙小鳞茎径围增大有极显著影响(见表 3).

2.4 组培小鳞茎顶端生长锥的细胞学特点

分别对大田水仙鳞茎和组培鳞茎的顶端进行石蜡切片观察,由图 1G 和 H 可以看出,组培水仙的顶端生长锥平齐,细胞分层不明显,细胞核大且染色较深,无典型的肋状区;而大田

生长水仙的顶端呈圆锥状,细胞分层和分区明显.推测可能是由于外源植物激素影响组培小鳞茎生长锥顶端分生组织结构和分化.

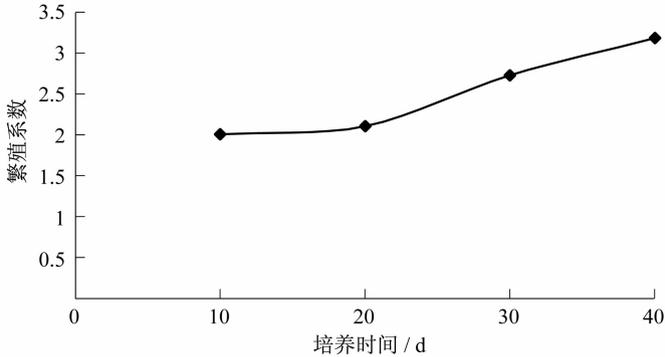


图3 以组培小鳞茎为外植体的繁殖系数随接种时间的变化情况

Fig. 3 Effect of different time on the regeneration rate of tissue culture bulbs

表3 光照与 KH_2PO_4 浓度对组培小鳞茎径围增大的影响

Tab. 3 Effect of light and concentrations of KH_2PO_4 on enlargement of the adventitious buds

KH_2PO_4 浓度	培养条件	接种数/个	接种前平均径围/cm	25 d后平均径围/cm	平均增大径围/cm
同 MS	光	16	1.68	1.85	0.17
同 MS	暗	15	1.62	2.22*	0.6
加倍	光	11	1.74	2.63*	0.89
加倍	暗	35	1.73	3.51**	1.78

注:用 SPSS11.5 软件检验相对于光照条件和正常 MS 盐浓度, KH_2PO_4 浓度加倍、黑暗条件以及加倍与黑暗组合处理对水仙小鳞茎径围增大的影响发现,MS 培养基中 KH_2PO_4 浓度加倍 + 6-BA 1.0 + NAA 0.5 在暗培养条件下鳞茎增大速度明显加快.* 显示显著影响($P=0<0.1$),** 显示极其显著影响($P=0<0.05$).

3 讨 论

以崇明水仙多个部位为外植体建立组培体系,发现不同的外植体脱分化所需要的激素有明显的差异,6-BA 和 2, 4-D 组合适合鳞茎和幼叶的脱分化,但 KT 和 2, 4-D 组合适合于幼嫩花序和鳞茎的中、上部.即使相同外植体,脱分化也因激素种类有所差异,如带茎盘的外植体在生长素分别为 IAA 和 NAA 的培养基上脱分化率很低;当生长素为 2, 4-D 时,脱分化率提高.这说明植物的不同部位由于发育状态等因素造成对不同激素的敏感性差异.从形态学位置来看,形态学位置越靠上,脱分化和再分化能力越差,也即嫩叶 < 鳞茎上部 < 中部 < 下部,因此以鳞茎的中、上部和幼叶外植体建立组培体系较难,虽然一定浓度的激素能够使其脱分化,但再分化能力很差,诱导出的鳞茎极少,并且需要周期长、褐化率高,很难应用于生产.与多个研究报告^[2,4-6]类似的是,带鳞茎盘的鳞茎再生体系比较容易建立.另外,幼嫩花序也能作为外植体诱导鳞茎再生.最佳脱分化培养基为 4# 培养基,D1 和 D2 培养基为最佳小鳞茎分化培养基,继代培养最佳外植体为带鳞茎盘的组培小鳞茎.

相比于大田水仙鳞茎盘上着生的芽排列在一条直线上,组培水仙鳞茎的芽点呈圈状分布,大大增加了侧生鳞茎的数目,这可能与植物体内激素水平有关.以组培获得的小鳞茎为外植体,再生鳞茎效率高,可以解决水仙传统组培过程中的取材难、污染率高的难题.

组培获得的小鳞茎往往存在着只长叶不长球、鳞茎增大困难的问题,组织学分析表明,与大田生长水仙的顶端生长锥相比,组培水仙的顶端生长锥细胞分层不明显,细胞核大染色较深.这种差异可能是外源激素作用的结果,但是否是组培小鳞茎增大难的原因有待进一步研究.在组织培养过程中,鳞茎生长主要靠吸收培养基的养分进行生长,再者由于培养器皿遮光,光照不足,光合作用积累的营养物质往往多用于叶片本身的消耗,所以对于球根类植物来说,减少地上部位的营养消耗对增大鳞茎异常重要,在暗培养条件下,植株几乎不长叶,消耗少,所以鳞茎径围增大快.通过 SPSS 软件对实验结果进行显著性分析表明,暗培养对组培小鳞茎的增大有显著的促进作用.另有研究报道 P、K 肥能明显促进植物地下部分增大^[9,10],这与适宜浓度的 KH_2PO_4 对组培小鳞茎径围增大起重要作用的实验结果是一致的.

[参 考 文 献]

- [1] 高世良.百种花卉养·赏·用[M].北京:北京科学技术出版社,1998:79-82.
GAO S L. The Cultivation, Ornamental and Advantage of Various Flowers[M]. Beijing: Beijing Technology and Science Publishing House,1998:79-82.
- [2] 郭建辉,沈明山,陈丽萍,等. Screen of virus - eliminated seedlings of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roen [J]. 厦门大学学报(自然科学版),2002,41(6):815-818.
GUO J H, SHEN M S, CHEN L P, et al. Screen of virus - eliminated seedlings of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roen[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science),2002,41(6):815-818.
- [3] 崇明县农业委员会.崇明岛现代农业[M].上海:崇明县档案局,2002:131-132.
The Chongming Agriculture Commission. The Modern Agriculture of Chongming Island[M]. Shanghai: The Record Office of Chongming,2002:131-132.
- [4] 胡毅敏,阙国宁.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(2):23-26.
HU Y M, QUE G N. The tissue culture technique of new species of Putuo narcissus[J]. Forest Research,1991(2):23-26.
- [5] 谢嘉华,袁建军. Tissue culture of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*[J].生物学杂志,2002,19(3):30-36.
XIE J H, YUAN J J. Tissue culture of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*[J]. Journal of Biology, 2002,19(3):30-36.
- [6] 王俐,杨德,龙春林. Tissue culture of the *Narcissus tazetta* var. *Chinensis*[J].云南农业大学学报.2004,19(5):616-619.
WANG L, YANG D, LONG C L. Tissue Culture of the *Narcissus tazetta* var. *Chinensis*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science),2004,19(5):616-619.
- [7] 毕玉蓉,汤红官,容拱兴. Isolation and determination of an inhibitor from the mucilage of *Narcissus tazetta* L. Bulbs[J].兰州大学学报(自然科学版),2000,36(1):92-97.
BI Y R, TANG H G, RONG G X. Isolation and determination of an inhibitor from the mucilage of *Narcissus tazetta* L. Bulbs[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Science),2000,36(1):92-97.
- [8] 金波,东惠茹,王世珍.水仙花[M].上海:上海科学技术出版社,1998:17-20.
JIN B, DONG H R, WANG S Z. Narcissus[M]. Shanghai: Shanghai Technology and Science Publishing House, 1998:17-20.
- [9] 张翔,朱洪勋,孙春河.大蒜氮磷钾营养吸收规律与平衡施肥研究[J].土壤肥料,1998,(2):10-13.
ZHANG X, ZHU H X, SUN C H. Study on uptake of NPK and balance fertilization of garlic[J]. Soils and Fertilizers,1998(2):10-13.
- [10] 陈树岗,宋玉坤,张瑜芳,等.洋葱氮磷钾肥配比试验[J].北方园艺,1998,118:63-63.
CHEN S G, SONG Y K, ZHANG Y F, et al. Test the effect of NPK on garlic[J]. Northern Horticulture,1998, 118:63-63.