

文章编号: 1674-7054(2014)04-0363-05

漳州水仙的组织培养技术

金雄霞^{1,2}, 詹富钧², 罗越华^{1,2}, 夏志辉^{1,2}

(1. 海南大学 热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海南 海口 570228;

2. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘 要: 以漳州水仙为材料, 研究了漳州水仙的组织培养技术, 优选出不定芽再生与生根的最佳培养基, 结果表明: 鳞茎盘与愈伤组织分化不定芽的最优培养基都为 MS + 6-BA 10 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹; 生根的最佳培养基为 1/2 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 15 g · L⁻¹ 的液体培养基。

关键词: 漳州水仙; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S 682.2⁺1

文献标志码: A

中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 为石蒜科水仙花属植物, 属多年生草本鳞茎花卉, 是一种具有很高的观赏价值与文化价值的名花。根据产地分为漳州水仙和崇明水仙, 通常所说的中国水仙常指漳州水仙, 现已遍及全国和世界各地^[1]。漳州水仙为三倍体植物, 只能通过营养繁殖方式进行增殖, 极大增加了水仙品种改良的难度。成熟、完善的组织培养(简称组培)体系不仅是脱毒、品质更新的重要技术手段, 也是植物遗传转化的基础。目前对漳州水仙组培再生体系已有若干报道, 但再生效果不尽相同^[1-3]。为了进一步明确漳州水仙植株再生及生根的培养条件, 笔者开展了漳州水仙组培体系的研究, 旨在为水仙的组织培养提供技术依据, 并为进一步开展漳州水仙的基因转化、品种改良等工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及外植体处理 供试的漳州水仙球茎由南京大渊生物技术公司提供。先将鳞茎置于 4 ℃ 的冰箱预处理 1 个月, 取出后, 剥去外层污染的鳞片 and 坏死的鳞茎盘, 然后, 用自来水冲洗干净。在超净台上, 鳞茎先用 $\varphi=75\%$ 的乙醇浸泡并搅动 1 min, 再用质量浓度为 13 g · L⁻¹ 的次氯酸钠溶液振荡消毒 30 min, 无菌水冲洗 4~6 次后, 用无菌滤纸吸干表面多余水分, 将消毒好的鳞茎盘的鳞茎基底切成 1.0 cm × 1.5 cm 大小的块体, 置于培养基中进行培养。

1.2 鳞茎盘不定芽的直接诱导 将切成块的鳞茎盘基底接入到再生培养基 (MS + NAA (1.0, 3.0, 5.0, 10.0) mg · L⁻¹ + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹) 中, 每处理接种 20 个外植体, 30 d 后观察不定芽的诱导与生长状态。

1.3 鳞茎叶和鳞茎盘愈伤组织诱导 将无菌鳞片切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 接种到愈伤组织诱导培养基 (MS + 6-BA 0.1 mg · L⁻¹ + 2,4-D 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹)^[4] 上, 每处理接种 120 个外植体, 40 d 后统计愈伤组织的诱导率。

1.4 愈伤组织不定芽的诱导 将生长良好的愈伤组织接种到植株再生培养基 (MS + 6-BA (1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0) mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹) 上, 每个处理接种

收稿日期: 2014-04-25

基金项目: 海南省教育厅高校科研资助项目 (Hjkj2012-12); 海南大学科研启动经费 (KYQD1001)

作者简介: 金雄霞 (1988-), 女, 海南大学农学院 2011 级硕士研究生. Email: 371081051@qq.com

通信作者: 夏志辉 (1978-), 男, 海南大学农学院副研究员, 博士, 硕导. 研究方向: 分子育种. Email: zhxia-111@163.com

90 个愈伤块 30 d 后统计不定芽再生率。

1.5 生根培养 将鳞茎上的丛芽(高度 > 3 cm),切成带有鳞茎盘的单株,接入生根培养基 [1/2 MS + NAA (0.05 0.1 0.2) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA (0.01 0.2) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 植物凝胶(0.3 0) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] 中。

1.6 培养条件 光照强度 2 000 lx,培养温度为 (25 ± 1) °C,每日光照/黑暗时间为 16 h/8 h,其中愈伤组织诱导与继代培养阶段置黑暗处培养。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 与 NAA 配比对鳞茎盘直接诱导不定芽的影响 将消毒好的鳞茎盘接种到添加不同 6-BA 与 NAA 配比的植株再生培养基上,进行不定芽诱导培养,7 d 后外植体开始膨大,20 d 后长出不定芽,40 d 后不定芽可长至 5 cm (见图 1)。从表 1 可以看出,在 NAA 质量浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下,随着 6-BA 浓度的增加,水仙鳞茎盘诱导的小芽数也随之增加,在添加 6-BA 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 NAA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,出芽率最高,达到 100%,效果最好。

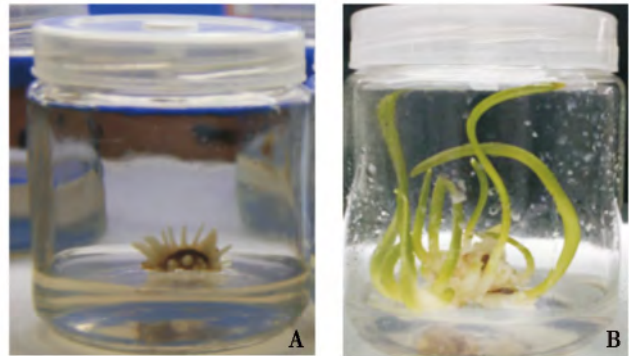


图 1 鳞茎盘不定芽直接诱导

A: 诱导 20 d 后的鳞茎盘; B: 诱导 40 d 后的鳞茎块。

Fig. 1 Adventitious buds induced from bulb scale segments

A: Bulb scale segment 20 days after inoculation; B: Bulb scale segment 40 days after inoculation.

表 1 不同 6-BA 与 NAA 配比对鳞茎盘不定芽诱导的影响

Tab. 1 Effects of different ratios of 6-BA to NAA on bud induction from bulb scales

激素配比/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Hormone combination	接种块数 Number of explants	出芽的块数 Number of explants with bud	出芽率/% Ratio of bud induction
6-BA 0 + NAA 1.0	20	3	15
6-BA 0.5 + NAA 1.0	20	13	65
6-BA 1.0 + NAA 1.0	20	16	80
6-BA 5.0 + NAA 1.0	20	19	95
6-BA 10.0 + NAA 1.0	20	20	100

注: 基本培养基为 MS + 蔗糖 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 植物凝胶 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Note: The basic medium is MS + 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ phytagel

2.2 鳞茎叶和鳞茎盘愈伤组织诱导 分别将鳞茎叶切块、鳞茎盘切块 2 种外植体接种在愈伤组织诱导培养基上,40 d 后统计愈伤组织的诱导率。从表 2 可知,鳞茎盘切块的出愈率达 74.2% (见表 2),愈伤组织状态为浅黄色、致密型;鳞茎叶出愈率较低,只有 37.4%,愈伤组织状态为浅白色、致密型。

表 2 不同外植体诱导愈伤组织的效果比较

Tab. 2 Comparison of callus induction among different explants

外植体类型 Explants	接种数 Number of explants inoculated	生成愈伤的块数 Number of explants with calli	愈伤形成百分率/% Callus induction rate	愈伤组织状态 Callus growth
鳞茎盘切块 Bulb scale segment	120	89	74.2	浅黄色、致密型 Light yellow, dense
鳞茎叶切片 Bulb leaf segment	120	45	37.5	浅白色、致密型 Light white, dense

2.3 愈伤组织不定芽的诱导 在实验过程中, 笔者发现 鳞茎叶诱导产生的愈伤组织不能分化出不定芽, 只有鳞茎盘切块诱导的愈伤组织才能分化出不定芽(见图 2) , 但分化效果跟激素配比有关。从表 3 可知 鳞茎盘愈伤组织不定芽的分化率为 16.7% ~ 83.3% , NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 6-BA 10 mg · L⁻¹ 组合的分化率最高, 为 83.3%。因此, 愈伤组织分化不定芽最好的培养基为: MS + 6-BA 10 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹。

2.4 生根培养 将高超过 3 cm 的芽切下, 转接到不同的生根培养基上, 20 d 后调查生根情况。从表 4 可知, 芽在 6 种添加了 3 g · L⁻¹ 植物凝胶的固体培养基上均能生根, 其中, 添加 NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ 的培养基的生根率为 90%, 平均每株 4 条根; 添加 NAA 0.05 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ 培养基的生根率达到 100%, 平均每株 3.5 条根; 在不添加植物凝胶的液体培养基(添加 NAA 0.05 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹) 上, 生根率达到 100%, 平均每株 11.1 条根, 该培养基不论是根的数量, 还是粗壮程度都比添加了植物凝胶的培养基好(见图 3) 。因此, 最佳的生根培养基是: 1/2 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 15 g · L⁻¹ 的液体培养基。

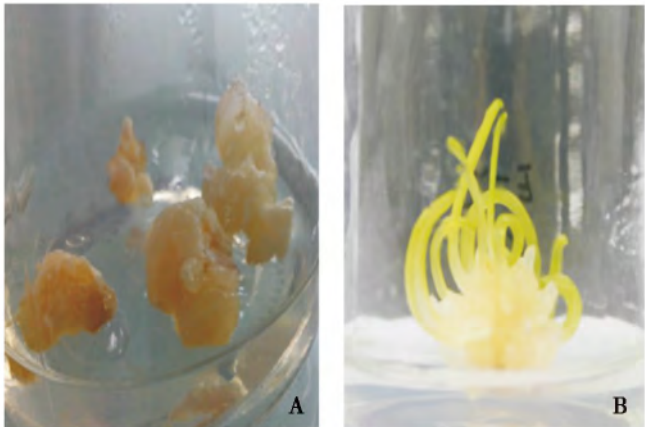


图 2 鳞茎盘愈伤组织的诱导与愈伤组织的不定芽再生
A: 鳞茎盘诱导的愈伤; B: 愈伤分化不定芽。
Fig.2 Callus induction from explants of bulb scale segment and adventitious bud regeneration from callus
A: Callus induction from bulb scale segment; B: Adventitious buds/shoots developed from callus.

表 3 不同 6-BA 与 NAA 对比对愈伤组织分化不定芽的影响			
Tab. 3 Effect of different ratios of 6-BA to NAA on inducing of adventitious buds from callus			
激素配比/(mg · L ⁻¹) Hormone combination	接种愈伤数 Number of calli	出芽愈伤块数 Number of calli with buds	分化率/% Bud inducing frequency
6-BA 0.5 + NAA 1.0	90	15	16.7
6-BA 1.0 + NAA 1.0	90	27	30.0
6-BA 5.0 + NAA 1.0	90	45	50.0
6-BA 10.0 + NAA 1.0	90	75	83.3
6-BA 15.0 + NAA 1.0	90	60	66.7

注: 基本培养基为 MS + 蔗糖 30 g · L⁻¹ + 植物凝胶 3 g · L⁻¹
Note: The basic medium is MS + 30 g · L⁻¹ sucrose + 3 g · L⁻¹ phytagel

表 4 不同生长素对比对芽生根的影响				
Tab. 4 Effects of different auxin combinations on rooting of shoots				
生长素配比/(mg · L ⁻¹) Auxin combination	接种株数 Number of bulbils	生根株数 Number of rooted bulbils	生根率/% Rooting rate	平均根数/条 Average of roots
NAA 0.1	20	12	60	2.5
NAA 0.2	20	8	40	3.0
IBA 0.1	20	14	70	2.4
IBA 0.2	20	8	40	3.0
NAA 0.1 + IBA 0.1	20	18	90	4.0
NAA 0.05 + IBA 0.1	20	20	100	3.5
NAA 0.05 + IBA 0.1 液体培养基 Liquid medium	20	20	100	11.1

注: 基本培养基为 1/2 MS + 15g · L⁻¹ 蔗糖, 除液体培养基外, 其他培养基都加 3 g · L⁻¹ 的植物凝胶
Note: The basic medium is 1/2 MS + sucrose 15 g · L⁻¹, and all the mediums are added with 3 g · L⁻¹ phytagel except the liquid medium

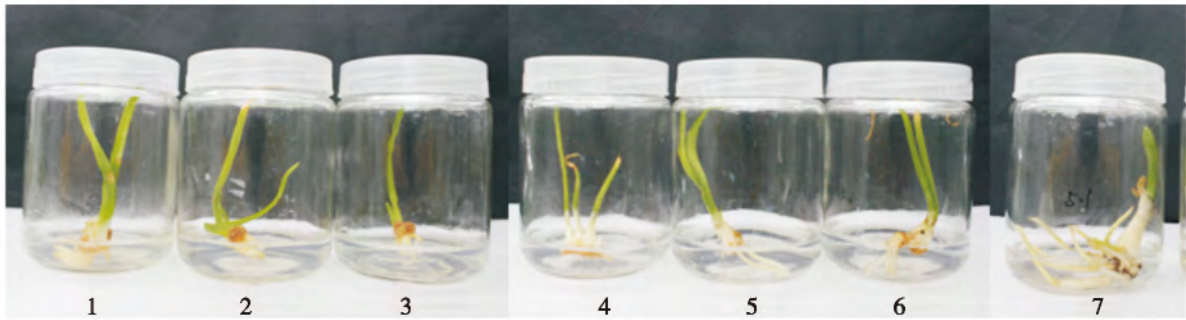


图3 不同生长素对比对生根的影响

1: 添加 NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 2: 添加 NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 3: 添加 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 4: 添加 IBA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 5: 添加 NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 6: 添加 NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基, 7: 添加 NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液体培养基

Fig.3 Effects of different auxin combinations on rooting

1: Medium added with NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2: Medium added with NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 3: Medium added with IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: Medium added with IBA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: Medium added with NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: Medium added with NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 7: Liquid medium added with NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

3 讨论

植物生长调节剂在水仙组织培养中起着重要的调控作用,在水仙组织培养各个阶段应用的植物生长调节剂种类和浓度各不相同,适用的植物生长调节剂的范围和种类也较广,关于此方面的研究相对较多,但研究结果不尽相同。吕晓会等^[5]研究荷兰水仙再生体系,得出芽诱导效果最好培养基为添加 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基,出芽率为 87.5%;李颖等^[6]发现,MS + 6-BA $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基,诱导苏州野生水仙小鳞茎的分化效果较好;曾荣华等^[7]以中国水仙的鳞茎盘为外植体进行基因转化研究,结果表明,MS + 6-BA $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基非常适合水仙鳞茎组织的生长,培养约 20 d,95% 以上的水仙鳞茎盘分化出小鳞芽。在本研究中,笔者发现漳州水仙在 MS + 6-BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,出芽率达到 100%,当 NAA 的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,出芽率随着 6-BA 质量浓度的增大而增加。

愈伤组织分化出芽是基因工程的关键,谢嘉华等^[8]对水仙愈伤组织的分化进行过研究,但没有给出一个具体的优化培养基配方。王小敏等^[9]得到的欧洲水仙愈伤分化的优化培养基为 MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分化率为 72.73%。本研究对漳州水仙诱导愈伤组织及分化出芽的植物生长调节剂的种类与浓度进行了进一步的优化,认为 MS + 6-BA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基最适合水仙愈伤组织分化,分化率可达 83.33%。

Bergonon 等^[10]对水仙外植体进行振荡液体培养,在 250 mL 的培养瓶中进行丛生芽的继代培养,取得了较好的效果。笔者采用液体培养基进行漳州水仙不定芽的生根培养,结果表明,该培养基不仅生根快、数量多、粗壮,而且由于培养基不添加植物凝胶,还能降低组织培养的成本。

参考文献:

- [1] 王俐, 杨德, 龙春林. 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.
- [2] 庄晓英. 中国水仙遗传转化及离体诱变体系的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [3] 林加根, 何炎森, 林霜霜, 等. 漳州水仙组培快繁技术研究[J]. 现代农业科技, 2012(20): 163-168.
- [4] 陈段芬. 中国水仙花型、花色发育基因(*NTMADS1*, *NtMADS3*, *NTPDS1* 和 *NTPZDS1*) 的克隆与转化[D]. 北京: 中国林业科学院, 2008.
- [5] 吕晓会, 马晓红, 史益敏. 荷兰水仙组织培养再生体系关键技术研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(4): 339-343.

- [6]李颖,蔡平,姜丽丽,等.苏州野生水仙繁殖技术研究[J].江苏农业科学,2010(6):276-278.
- [7]曾荣华,陈亮,沈明山,等.农杆菌介导的中国水仙遗传转化体系的建立[J].厦门大学学报(自然科学版),2001,40(5):1145-1149.
- [8]谢嘉华,袁建军.中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)的组织培养[J].生物学杂志,2002,(3):30,36.
- [9]王小敏,李维林,朱洪武,等.欧洲水仙鳞片组织培养与快速繁殖[J].林业科技开发,2011,25(4):82-85.
- [10] BERGONON S, CODINA C, BASTIDA J et al. Shake liquid culture as an alternative way to the multiplication of *Narcissus* plants[J]. Acta Horticulturae, 1992, 325(4):447-452.

Tissue Culture of Zhangzhou Narcissus

JIN Xiongxia^{1,2}, ZHAN Fujun², LUO Yuehua^{1,2}, XIA Zhihui^{1,2}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Zhangzhou Narcissus (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*), one of the 10 famous traditional flowers in China, was tissue cultured with bulb-scale and leaf segments as explants on the callus inducing and rooting mediums supplemented with different auxin combinations. Calli were induced from both segments on the mediums but no adventitious buds were developed from callus culture of bulb leaf segment. The optimal medium for adventitious bud formation from calli induced from bulb scale segments was MS + 6-BA 10 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + sucrose 30 g · L⁻¹ + phytagel 3 g · L⁻¹, and the optimal rooting medium was 1/2 MS + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + sucrose 30 g · L⁻¹ + phytagel 0 g · L⁻¹.

Key words: Zhangzhou Narcissus; tissue culture; plant regeneration

(上接第362页)

Identification of Two Species of *Sargassum* Collected in Haitou town, Danzhou, Hainan

LIU Xinxin^{1,2}, ZHU Jun², HUANG Huiqin², LIU Min², ZOU Xiaoxiao², BAO Shixiang²

(1. College of agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: *Sargassum* is one of the important economic algae in Hainan Province, China, and is high in biomass, rich in resource and wide in application. In recent years, there are a few studies about the species diversity of *Sargassum* in Hainan although coastal residents obtained huge economic benefits from *Sargassum*. The cognition of the diversity of this genus is insufficient. Two samples of *Sargassum* species with the largest biomass were collected in Haitou town, Danzhou, Hainan Province for morphological and molecular analysis. The morphological characteristics of the main parts such as frond, holdfast, stipe, branches, blades, vesicle and receptacles of these two samples of the *Sargassum* species were observed, and the gene sequence similarity of the two samples collected were compared by using the ITS. The results showed that these two samples were identified as *Sargassum odontocarpum* and *Sargassum polycystum*, respectively.

Key words: *Sargassum*; classification and identification; morphological identification; molecular identification; Hainan province