

## 碗莲组培快繁技术初探

孔德政<sup>1</sup>,毛瑞丽<sup>1</sup>,孔德平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河南农业大学,河南郑州 450002;<sup>2</sup>河南省郑州市第三苗圃,河南郑州 450043)

**摘要:**以碗莲‘案头春’茎尖为实验材料,对诱导培养基成份、培养基状态、最佳取材时期以及增殖培养基筛选等方面进行了研究。结果表明:最佳取材季节为10~12月份;碗莲茎尖分化最适宜培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub>;适宜的增殖培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA;固液培养状态:上层为5mm厚的MS+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub>液态培养基,下层为1cm厚的MS+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub>固态培养基,更有利于芽诱导;培养过程中污染的芽苗用75%酒精1min、0.1%HgCl<sub>2</sub>10min灭菌效果最好。

**关键词:**碗莲;茎尖;离体繁殖

**中图分类号:**S682.32 **文献标识码:**A

### Preliminary Studies on Shoot Tip in vitro Propagation of Bowl Louts Cultivar

Kong Dezheng<sup>1</sup>, Mao Ruili<sup>1</sup>, Kong Deping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; <sup>2</sup>Henan The third Nersury of Zhengzhou, Zhengzhou 450043)

**Abstract:** the shoot tips of bowl lotus were used as explants for in vitro propagation. The factors affecting the inducible culture and proliferate mediums and the methods of controlling contamination in culture were studied. The result indicated the suitable timing of taking shoot tips for culture were October to December, the most suitable inducible medium was 1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub>, the best proliferate medium was MS+4.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA. the best medium state is liquid-solid state, that is the upper layer's component is MS+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub> with 5 mm thickness and the under layer's component is MS+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub> with 1cm thickness. the method of controlling contamination in culture was 75% alcohol 1min and 0.1% HgCl<sub>2</sub> 10min.

**Key words:** bowl lotus, shoot tips, in vitro propagation

荷花 (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 属睡莲科莲属植物,是中国十大传统名花之一,是重要的水生花卉。碗莲,是荷花大家庭中的一类微型品系<sup>[1]</sup>。因其植株矮小,花小叶小,可植于花盆或碗中观赏而得名<sup>[2]</sup>,碗莲由大型荷花演变而来,在中国已有很长的栽培历史,其繁殖方法一般以播种繁殖和分藕繁殖为主,偶尔也有用地下茎分生繁殖。但其繁殖系数较低,速度慢。尤其对于一些珍贵品种及特色品种来说,发展受到很大的限制。利用组织培养技术,不仅可以大大提高其繁殖系数,加快新品种的推广,同时可为一些珍贵品种的保存开辟一条新途径。据报道,国内外已有何子灿<sup>[3]</sup>、李良俊<sup>[4]</sup>、彭静<sup>[5]</sup>及日本

的山本雄雄<sup>[6]</sup>等进行了莲藕的组织培养研究,但有关碗莲组织培养研究较少,笔者对碗莲‘案头春’地下茎茎尖进行了离体培养,为碗莲的快繁提供一些参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

试验于2007年3月—2008年1月年在河南农业大学进行,供试材料碗莲‘案头春’的地下茎茎尖,由河南省郑州市花卉市场碗莲基地提供。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌 切取健壮碗莲地下茎茎段,用水冲去污泥,将顶芽切下,用2%洗衣粉溶液浸泡30min,然

**基金资助:**河南省杰出青年基金“河南省高效创新人才培养工程项目”(0412001900)。

**第一作者简介:**孔德政,男,1965年出生,江苏高淳人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事花卉栽培生理的研究。通信地址:450002 河南省郑州市文化路95号 河南农业大学林学院园艺学院。E-mail:maoruili2005@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2008-01-17,修回日期:2008-02-14。

后用自来水冲洗 30min,再用纱布吸干,放置于超净工作台上。用 75% 酒精浸泡 1min,0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌 10min,无菌水冲洗 5~6 遍后,用解剖刀剥去包裹顶芽最外层芽鞘和内层叶鞘至茎尖部分(约 0.5cm),切除与灭菌剂接触部分,接种于培养基中。

1.2.2 培养条件 光照强度 2000lx,光照时间为 12h/d,培养温度为  $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 1.2.3 诱导培养基筛选

(1)组成成份筛选。培养基以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L,琼脂 7.0 g/L 及不同浓度配比的激素,激素的浓度范围分别是:6-BA 0~2.0 mg/L,NAA 0~0.5 mg/L, $\text{GA}_3$  0~1.0 mg/L,培养基 pH 值为 5.8。共四个处理,每处理 10 瓶,每瓶接种 1 个茎尖,重复 3 次。30d 后观察、统计芽分化情况。

(2)培养基的状态。培养基分两种:I 固态:MS +1.0mg/L 6-BA +0.25mg/L NAA+1.0mg/L  $\text{GA}_3$ 。II 固液结合:上层为 5ml 厚的 MS + 1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L  $\text{GA}_3$  液态培养基,下层为 1cm 厚的 MS+1.0mg/L 6-BA+0.25mg/L NAA+1.0mg/L  $\text{GA}_3$  固态培养基。共 2 个处理,每处理 10 瓶,每瓶接种 1 个茎尖,重复 3 次。30d 后观察芽分化情况。

1.2.4 取材季节对诱导影响 分别在萌芽期(2007 年 3 月—4 月)、生长期(2007 年 5 月—9 月)、休眠前期(2007 年 10 月—12 月)进行取材。每处理 10 瓶,每瓶接种 1 个茎尖,重复 3 次。30d 后观察芽分化情况。

1.2.5 增殖培养基筛选 将已分化的丛生芽切成单芽后接种在 NAA 为 0.25 mg/L,6-BA 分别为 1 mg/L、2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L 固液培养基上。共 4 个处理,每处理 10 瓶,每瓶接种一个单芽,重复 3 次。30d 后观察芽增殖情况。

1.2.6 防治芽苗污染的方法 I 将已污染的单芽用 75% 酒精灭菌 1min,0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌 10min,然后无菌水冲洗 5~6 遍,接种于培养基上;II 已污染的单芽无菌水冲洗 5~6 遍,然后接种在上层分别添加硫酸庆大霉素 800 mg/L 和 400 mg/L 培养基上,III 空白处理。共 4 个处理,每处理 10 瓶,每瓶接种 1 个芽苗,重复 3 次。30d 后观察芽苗污染情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源激素对碗莲茎尖诱导的影响

碗莲茎尖的分化率因外源激素浓度配比的不同而有所差别。由表 1 可知,将碗莲的茎尖接种在 MS+1.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L  $\text{GA}_3$  培养基上启动率和分化率最高,分别为 87.5%和 87.5%,平均芽长为 1.0cm,长势健壮;MS+0.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+0.5 mg/L  $\text{GA}_3$  培养基的启动率和分化率最低,分别为 37.5%和 25.0%,平均芽长为 1.6cm,长势细弱;而 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L  $\text{GA}_3$  培养基的分化率虽然高达 100%,但其启动率较低为 40%,鉴于以上分析,碗莲茎尖分化最适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L  $\text{GA}_3$ 。

表 1 不同外源激素对比对‘案头春’地下茎茎尖分化的影响

| 编号 | 处理组合                                   | 启动率/% | 分化率/% | 平均芽长/cm | 平均叶柄长/cm |
|----|----------------------------------------|-------|-------|---------|----------|
| 1  | MS+0.56-BA+0.25NAA+0.5 $\text{GA}_3$   | 37.5d | 25.0d | 1.6     | 4.5      |
| 2  | MS+2.0 6-BA+0.5 NAA+0.5 $\text{GA}_3$  | 40.0c | 100a  | 2.2     | 5.0      |
| 3  | MS+0.5 6-BA+0.5 NAA+1.0 $\text{GA}_3$  | 66.7b | 50.0b | 0.8     | 2.5      |
| 4  | MS+1.0 6-BA+ 0.25NAA+1.0 $\text{GA}_3$ | 87.5a | 87.5c | 1.0     | 3.5      |

注:小写字母表示 5%差异显著水平。以下同。

表 2 不同培养基状态对‘案头春’茎尖诱导的影响

| 培养基状态 | 接种瓶数 | 分化瓶数 | 分化率/% | 启动时间/d | 芽生长情况 |
|-------|------|------|-------|--------|-------|
| 固体培养基 | 30   | 21   | 70.0b | 6      | 缓慢    |
| 固液培养基 | 30   | 26   | 86.6a | 3      | 较快    |

### 2.2 培养基状态对碗莲茎尖诱导的影响

将碗莲茎尖分别接种在固态培养基和固液结合培养基上,培养 1 个月,见表 2,接种于固液结合培养基上的芽分化率为 86.6%明显高于固态培养基上芽分化率 70.0%,从启动时间来看,在固液培养基上芽的启动时间比固态培养基上快 3d。且固液培养基上茎尖的生长明显好于固态培养,可能是固液培养模拟了碗莲的自然生境<sup>[9]</sup>,更符合碗莲生长的自然条件。因此,固

液培养基更有利于碗莲茎尖的诱导。

### 2.3 取材季节对碗莲茎尖诱导的影响

将不同时期的碗莲茎尖接种在 MS+1.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L  $\text{GA}_3$  的固液培养基上,从表 3 可以看出,萌芽期分化率最高为 87.5%,而生长期的分化率最低为 65.5%,原因可能是萌芽期,由于自身积累的养分较多,所以易于萌发和诱导,而在生长期,开花、结籽消耗养分较多<sup>[9]</sup>,所以诱导率较差。此

表 3 不同取材时期对‘案头春’茎尖诱导的影响

| 取材时间 | 接种瓶数 | 污染率 / % | 分化率 / % | 启动时间 / d |
|------|------|---------|---------|----------|
| 萌芽期  | 30   | 35. 5b  | 87. 5a  | 6        |
| 生长期  | 30   | 73. 4a  | 65. 5b  | 7        |
| 休眠前期 | 30   | 26. 5c  | 82. 6c  | 6        |

表 4 不同浓度的 6-BA 对‘案头春’增殖的影响

| 6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> ) | NAA/(mg·L <sup>-1</sup> ) | 接种瓶数 | 增殖系数  | 平均每芽长叶数 / 个 | 芽苗生长情况 |
|----------------------------|---------------------------|------|-------|-------------|--------|
| 1. 0                       | 0. 25                     | 30   | 1. 0c | 1. 3        | 叶柄细长   |
| 2. 0                       | 0. 25                     | 30   | 3. 3a | 5. 3        | 叶柄较长   |
| 3. 0                       | 0. 25                     | 30   | 2. 6b | 4. 0        | 叶柄短    |
| 4. 0                       | 0. 25                     | 30   | 2. 3b | 3. 5        | 叶柄粗短   |

外虽然萌芽期的分化率为 87.5%略高于休眠前期 82.6%,但其污染率也明显高于休眠前期。原因可能是休眠前期,组织较为新鲜,内生菌含量少<sup>[9]</sup>;而萌芽期,新芽微微长出,材料上仍会带有一部分老组织,而老组织带有内生菌较多,固萌芽期内生菌也较多。因此休眠前期进行碗莲茎尖诱导更适宜。另从 3 个时期启动时间来看差异并不明显。

#### 2.4 6-BA 对碗莲增殖的影响

将已分化的丛生芽切成单芽后接种于增殖培养基上,培养 1 个月后,由表 4 可以看出,4 种培养基上生长的单芽均可增殖。10d 后,6-BA 浓度为 3.0 mg/L 和 4.0 mg/L 的两处理开始先有新芽出现,1 个月后,

MS+2.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L 培养基上长出的单芽,增殖系数最高为 3.3,且芽苗叶柄较长,叶色浓绿,叶片伸展较多。

#### 2.5 不同处理方法对芽苗污染的防治

将污染的芽苗分别接种在 3 种不同处理方法的 MS+1.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub> 固液结合培养基上,培养 45d 后,从表 5 可看出:经 75%酒精和 0.1%HgCl<sub>2</sub> 灭菌过的芽苗不再有污染现象出现。而在分别添加硫酸庆大霉素 800 mg/L 和 400 mg/L 的培养基中生长的芽苗则仍然有污染出现。原因可能是培养过程中出现的污染大部分是真菌引起的,而硫酸庆大霉素主要是对细菌起作用,而对真菌却不起作用的缘故。

表 5 不同处理方法对‘案头春’芽苗污染的防治

| 编号 | 处理方法                                    | 污染瓶数 | 污染瓶数 | 污染率 / % | 表现状况 |
|----|-----------------------------------------|------|------|---------|------|
| 1  | 空白处理                                    | 30   | 30   | 100     | ++++ |
| 2  | 75%酒精 1min+0. 1%HgCl <sub>2</sub> 10min | 30   | 0    | 0       | +    |
| 3  | 硫酸庆大霉素 800 mg/L                         | 30   | 30   | 100     | ++   |
| 4  | 硫酸庆大霉素 400 mg/L                         | 30   | 30   | 100     | +++  |

注: + 培养基上层下层均无污染情况; ++ 培养基上层出现少量白色絮状分散细菌下层茎尖基部出现少量白色放射状菌丝; +++ 培养基上层出现大量白色絮状分散细菌下层茎尖基部出现少量白色放射状菌丝。++++ 培养基上层出现大量白色絮状分散细菌下层茎尖基部出现大量白色放射状菌丝。

### 3 结论与讨论

试验结果表明 MS+1.0 mg/L 6-BA+ 0.25 mg/L NAA+1.0 mg/L GA<sub>3</sub> 最适合芽诱导。培养基中加入 GA<sub>3</sub> 有利于碗莲茎尖的诱导,其浓度大小对茎尖的启动率有一定的影响作用,随着 GA<sub>3</sub> 的浓度的提高启动率也逐渐提高;但由实验可知,启动率的提高不等于分化率的提高,但两者之间有一定的相关性。此外,外植体的质量、生长状态等因素也会影响分化率,与柯卫东等<sup>[10]</sup>实验结果一致。

固液培养更有利于碗莲茎尖诱导。试验中发现固液培养基中茎尖切口处分泌的一些褐化类物质,能及时分散的漂浮在上层液体的表面上,因此对外植体进

一步吸收养分影响不大。而固态培养过程中切口处出现的褐化类物质,却很容易积累在茎尖的切口处,从而影响茎尖对养分的吸收,进一步影响茎尖的生长。

取材时期对茎尖的诱导培养影响很大,研究表明萌芽期诱导率很高,但这一时期污染率也较高,相比较而言,休眠前期取材更好。

增殖过程中,适量的 6-BA 对增殖有促进作用,但浓度过高将影响芽苗的生长。试验中当 6-BA 为 2.0 mg/L 时,芽苗叶柄较长,长势较好。但 6-BA 达到 3.0 mg/L 时叶柄明显变短,芽苗变矮,长势缓慢。尤其当 6-BA 达到 4.0 mg/L 时叶柄变得又粗又短,芽苗几乎不长。

培养过程中很容易出现污染,用已污染的丛生苗做实验,将不同浓度的硫酸庆大霉素注入到培养基上层,结果污染仍然继续出现,而用酒精和  $\text{HgCl}_2$  进行灭菌,则效果很明显,60d 后污染不再出现,并且培养苗生长良好。

#### 参考文献

- [1] 段春燕,候小改.碗莲高效栽培管理技术[J].种子,2005,24(11):83-83.
- [2] 颜亮.碗莲栽培浅谈[J].森林与人类,2000,(8):46-46.
- [3] 何子灿,刘士佳.莲离体茎尖的培养[J].水生生物学报,1987,11(2):191-192.
- [4] 李良俊,何小弟,赵有为等.莲藕茎尖培养技术的初步研究[J].江苏农学院学报,1995,(16)3:31-34.
- [5] 彭静,柯卫东,黄新芳.莲藕的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通报,2000,(37)1:38-38.
- [6] 山本雄慈·松本理.ハスの组织培养(第1报).生长点からの苗条诱导[J].山口农试研报,1988,40:44-48.
- [7] 山本雄慈·松本理.ハスの组织培养(第2报).増殖・驯化・培养苗の生产力[J].山口农试研报,1990,42:1-6.
- [8] 何必珠,曾明星,赵时端等.建莲茎尖离体培养研究初报[J].福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(1):59-61.
- [9] 罗丽萍,蔡奇英,杨柏云等.太空莲根状茎离体繁殖初代培养条件[J].南昌大学学报:理科版,2004,28(3):266-269.
- [10] 柯卫东,彭静,刘玉平等.试管藕诱导技术研究[J].武汉植物学研究,2001,19(2):173-175.