

文章编号: 1004-3918(2007)04-0593-03

荷花胚组织培养的初步研究

孔德政¹, 李艳妮¹, 杨秋生¹, 刘广甫²

(1. 河南农业大学 林学院园艺学院, 郑州 450002; 2. 郑州市第二苗圃, 郑州 450052)

摘要: 以荷花胚为试材, 研究不同生长调节剂、基本培养基、外植体消毒时间对离体荷花胚萌发的影响。结果表明, 诱导胚萌发较理想的培养基为 MS+6-BA0.5 mg/L+2,4-D0.2 mg/L+0.1%AC+3%蔗糖; MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+0.1%AC+3%蔗糖, 光照 14h·d⁻¹。总结了荷花胚组织培养上存在的问题, 并对解决某些问题提出了一些建议。

关键词: 荷花; 胚; 组织培养; 萌发

中图分类号: S 682.32 **文献标识码:** A

荷花 (*Nelumbo nucifera*) 为睡莲科莲属多年生宿根水生草本植物, 在我国资源圃荷花品种传统的繁殖及保存方法主要采用分藕和大量缸栽或池植^[1]。但是, 荷花的分藕繁殖系数较低 (一般为 1:10), 这个问题已成为限制荷花种植业发展的主要障碍^[2-3]。近年来, 由于病毒种类日益增多, 造成植株严重减产, 品质变劣^[4]。还有些品种因生长势弱, 保存十分困难。针对以上这些情况, 国内已有不少研究者开始采取组织培养的方法来解决这些问题。比如浙江省农科院园艺所就以荷花的茎尖作为外植体来进行组织培养; 武汉市蔬菜科学研究所水生蔬菜研究室在进行试管藕的研究; 福建省农业科学院省农业遗传工程重点实验室也在探索莲藕的微繁殖技术。

我们采用荷花胚进行组织培养试验, 筛选出较为合适的培养基, 以期获得大量荷花组培苗。现将我们所做的荷花组织培养结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 供试材料

湖北洪湖 2005 年采收的成熟莲子一寸三莲。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的预处理 将莲子用洗涤剂清洗, 用清水冲洗 30 min, 晾干后放在烧杯中, 用 98% 硫酸浸泡 1 h, 其间用玻璃棒不断搅拌, 使其外壳变软后捞出, 再用清水冲洗 30 min, 除去莲子表面残留的硫酸, 接着用清水浸泡, 直至用手能轻松将外壳剥开。

1.2.2 种子消毒及外植体的获得 在超净工作台上把莲子的外壳 (果皮) 剥掉, 将种子用浓度为 75% 的酒精消毒 30~60 s, 用无菌水冲洗 2 次, 以洗掉残留在种子上的酒精, 接着再用浓度为 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 (消毒时间见图 1), 再用无菌水冲洗 3~5 次。将种子的子叶沿中缝剥开, 用镊子轻轻取出胚, 放置在装有无菌水并灭菌培养皿中, 然后用解剖刀和枪型镊子把胚上的薄膜去掉后放入另一个无菌培养皿中, 用灭菌消毒后的滤纸吸干胚表面的无菌水, 将胚作为外植体等待接种。

1.2.3 接种 将处理好的外植体接种到灭菌培养基上, 每瓶接种 4 株, 5 瓶为 1 个处理, 每个处理设 3 次重复, 最后封好封口膜, 写好标签, 放在培养架上培养。

1.2.4 培养基选择 以 MS、1/2MS、white 培养基为基本培养基, 分别在里面加入不同浓度的植物激素, 10 d 后开始统计结果。

1.2.5 培养条件 培养温度为 (25±2)℃, 每天光照时间为 14 h (8:00~22:00), 光照强度 1 500~2 500 lx。

收稿日期: 2007-03-12

基金项目: 河南省杰出青年基金 (0412001900)

作者简介: 孔德政 (1965-), 男, 江苏高淳人, 副教授, 博士研究生, 硕士生导师, 主要从事花卉栽培生理的研究。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对胚成活率的影响

本试验采用6个消毒时间,分别为4、6、8、10、12、14 min.不同的消毒时间对外植体的消毒效果不同,表面消毒剂对于植物组织可能是有毒的,因此应当正确选择消毒剂处理的时间,以尽量减少植物组织的死。外植体在0.1% HgCl₂ 消毒剂中消毒后培养10 d,然后进行调查,其结果见图1.由图1可以得知:胚的消毒效果与消毒时间的长短有很大关系,初代培养物的污染率下降,在消毒时间为4~10 min,污染率急剧下降,12~14 min 污染率的变化趋于缓和,说明当消毒时间达到10 min时,绝大多数污染病菌已被杀死。污染病菌的死亡率随消毒时间的延长呈直线上升。分析其原因可能是在灭菌时,外植体受到汞离子的毒害而死亡^[9]。荷花胚外植体成活率在消毒时间为4~10 min 范围内随时间的延长呈上升趋势,在12~14 min 呈下降趋势。因此消毒时间以10 min 为最好。

2.2 不同培养基对胚诱导的影响

本试验选用了3种不同的基本培养基 MS、1/2MS、White,激素浓度均为6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L,分别添加0.1% AC(活性炭)和3%蔗糖。MS培养基无机盐浓度高,特别是硝酸盐、钾离子和铵离子含量丰富;1/2MS培养基是MS培养基将大量元素减半,含盐量相对降低了;White培养基无机盐含量非常低,为MS培养基的1/4左右,有机成分也很低。从表1可以看出White培养基萌发率显然比MS和1/2MS低,而MS和1/2MS培养基之间萌发率没有明显差异,但1/2MS培养基诱导苗生长缓慢,说明荷花胚萌发过程中对无机盐含量需求较高。综合考虑,较好的基本培养基为MS培养基。

2.3 不同的植物激素的浓度组合对胚诱导的影响

以MS为基本的培养基,添加不同浓度的6-BA、NAA和2,4-D对荷花胚进行培养30 d,结果如表2所示:荷花胚在不含6-BA的培养基不能萌发,6-BA能促进胚的萌发,显著提高胚的萌发率;NAA和2,4-D对胚的生长也有一定的作用;NAA的浓度不宜低于0.5 mg/L,6-BA的浓度以1.0为宜;2,4-D的浓度不宜高于0.5 mg/L,以0.2 mg/L为宜,6-BA浓度以0.5 mg/L为宜。经过15~20 d的培养,胚开始长根,叶片已经形成并展开,再将由胚诱导的植株接种到MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+3%蔗糖的培养基上增值培养。

3 结论与讨论

3.1 从试验结果看在固体培养基中加入活性炭,有利于培养苗的生长。5~7 d胚开始转绿伸长。

3.2 诱导培养基以选用MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+0.1% AC+3%蔗糖;MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+0.1% AC+3%蔗糖,光照14 h·d⁻¹最为理想,既能获得较高的诱导率,又能保证荷花生长健壮。

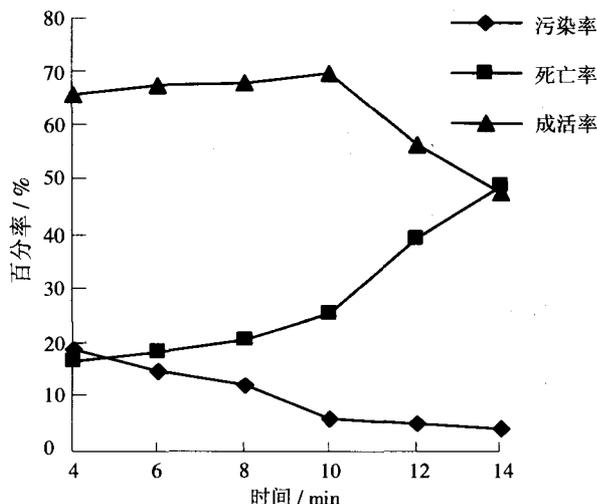


图1 不同消毒时间对胚消毒效果的影响

Fig.1 The effects of the different time on sterilization of Embryo

表1 不同培养基对荷花胚萌发的影响

Tab.1 The effect of basic media on the inducement of embryo of Lotus

基本培养基	萌发率 / %	试管苗长势
MS	41.67aA	++++
1/2MS	36.11aA	+++
White	16.67bB	++

注:小写字母表示0.05差异显著水平,大写字母表示0.01差异显著水平。

表2 6-BA、NAA和2,4-D对荷花胚萌发的影响

Tab.2 The effect of 6-BA、NAA和2,4-D on the germination of embryo of Lotus

序号	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	2,4-D / (mg·L ⁻¹)	萌发率 / %	试管苗长势
1	0	0	0	0 a	
2	0	0.1	0	0 a	
3	0	0	1.0	0 a	
4	0.5	0.2		13.89 a	+
5	0.5	0.5		16.67 b	++
6	1.0	0.5		30.56 b	++++
7	1.0	1.0		19.44 b	++
8	0.5		0.2	32.41 a	++++
9	0.5		0.5	25 ab	+++
10	1.0		0.5	19.44 b	++
11	1.0		1.0	8.33 c	+

3.3 这次试验荷花胚胎经组织培养后成活率较低,我们分析原因可能有以下3点:①用浓硫酸浸泡莲子破除种皮时,硫酸渗透到胚胎中,外植体受到伤害,但目前这个问题还无法得到更好的解决,所以如何解决莲子的破壳问题仍需我们作进一步的探讨,还有用浓硫酸浸泡的时间还需作进一步的探讨;②褐化问题,为了避免外植体的褐化,在固体培养基中加入活性炭;③本试验采用的外植体均是成熟的莲子,对不同发育时期的胚进行培养是否能提高成活率有待继续研究。

3.4 本试验以探索快速繁殖荷花优良无性系的组织培养技术为目的,要求通过组织培养能迅速提高它的繁殖系数,因此利用荷花的胚胎培养是探讨最适合荷花组织培养快速繁殖的方法之一,但是利用胚培养未能直接诱导出愈伤组织和不定芽,而是直接形成植株在进行扩繁,繁殖系数比较低。为了提高繁殖系数需进一步探讨诱导愈伤组织和不定芽。

参考文献:

- [1] 李志炎,林正秋. 中国荷文化[M]. 杭州:浙江人民出版社,1995.
- [2] 陈俊愉,程绪珂. 中国花经[M]. 上海:上海文化出版社,1990:152-156.
- [3] 彭静,柯卫东,黄新芳. 莲藕的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2001,37(1):38.
- [4] 张建福,王锋. 莲藕组织培养与微繁殖技术初探[J]. 上海农业科技,2002(6):17-18.
- [5] 冯金玲,陈辉,杨志坚,等. 锥栗组织培养外植体消毒和选择[J]. 福建林学院学报,2006,26(1):22-25.

The Preliminary Research on Tissue Culture of Lotus

KONG De-zheng¹, LI Yan-ni¹, YANG Qiu-sheng¹, LIU Guang-pu²

(College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. The Second Nursery in Zhengzhou City, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Factors which affect germination embryos of *Nelumbo nucifer* Lotus were studied. Results showed that the optimum medium for embryo culture were MS+6-BA0.5 mg/L+2,4-D0.2 mg/L+0.1%AC+3% sucrose and MS+6-BA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+0.1%AC+3% sucrose, light were 14 h·d⁻¹. And summarized the questions which the lotus embryo tissue culture existing and proposed to the suggestions of some questions. These are very significant to enhance the reproduction coefficient of the the lotus.

Key words: lotus; embryo; tissue culture; germination