

# 黄花马蹄莲离体快繁技术研究

张 丽<sup>1</sup>, 王玉坤<sup>2</sup>, 马 慧<sup>1</sup>, 郭志富<sup>1</sup>, 钟 鸣<sup>1</sup>, 陈丽静<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁 沈阳, 110161; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:**以黄花马蹄莲的球茎和叶片为外植体,以 MS 培养基为基础培养基,附加不同种类和浓度的植物生长调节物质(6-BA、NAA 和 IBA)诱导丛生芽及再生体系建立。结果表明:采用 75% 的酒精浸泡 20 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 球茎浸泡 8 min、叶片 4~6 min 的灭菌方法最为有效,诱导球茎分化最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,诱导叶分化最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,芽增殖最适培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g+琼脂 7.0 g,在 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.01 mg/L 上生根质量好,在珍珠岩:蛭石:草炭土:河沙(2:2:4:1)基质上,移栽成活率高,可达 97%。

**关键词:**彩色马蹄莲;黄花马蹄莲;球茎;叶片;不定芽;离体快繁

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0170-04

彩色马蹄莲(*Zantedeschia antedeschina*)原产南非,是天南星科蔓绿绒亚科海芋属 7 个种中除白花海芋(*Z. aethiopica*)外其余 6 种及其种间杂交种(*Z. antedeschia hybrida*)的总称<sup>[1]</sup>,为多年生草本球根花卉。其花形奇特、花色艳丽、花姿高雅,被喻为 21 世纪的“花卉之星”。

现有彩色马蹄莲品种是由 6 个野生种即星叶点白花马蹄莲(*Z. albomaculata*(Hook)Bill)、星叶点黄花马蹄莲(*Z. jucunda* Letty)、黄花马蹄莲(*Z. elliottiana*(Watson)Engl.)、香水马蹄莲(*Z. odorata* P. L. Petty)、黄金马蹄莲(*Z. pentlandii*(Watson)Wittm.)、粉红马蹄莲(*Z. rehmannii* Engl)杂交选育而成的<sup>[2]</sup>。目前,许多彩色马蹄莲品种应用越来越广泛,具有极大的市场发展潜力。

彩色马蹄莲的常规繁殖主要通过播种法和分割球茎的方法进行繁殖,播种法周期长,繁殖系数小,而且变异大,很难保持彩色马蹄莲原有的优良性状;而分割球茎的方法繁殖系数低,多代无性繁殖,常引起品种退化;远不能满足生产上的需要。而组培离体繁殖可以大大加快种苗繁育进程,这方面的研究国内较多<sup>[3-9]</sup>。但迄今未见有彩色马蹄莲完整的工厂化无性快繁体系建立的报道。

作切花栽培的彩色马蹄莲主要有粉红马蹄莲(*Z. antedeschia rehmannii*)、黄花马蹄莲(*Z. elliottiana*)。现以黄色马蹄莲为试材,以规模化生产为目的,选择符合规模化生产要求的植物生长调节剂进行了组织培养研究,系统地探讨了不同取材部位、适宜的灭菌时间、不同激素组合对芽诱导和增殖的影响,选择出了最佳增殖、生根培养基和移栽基质,旨在建立简便、有效、规模化生产彩色马蹄莲种苗快速繁殖技术。彩色马蹄莲离体快速繁殖体系的成功建立,可为商业化生产这一新型高档花卉提供技术和途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以黄花马蹄莲品种为试材,材料来自沈阳农业大学生物科技学院海城产学科研基地。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料灭菌处理** 分别取健康无病虫害的球茎和嫩叶,用刀片去除根基褐色表皮层,注意不要切除芽点。嫩叶洗净,根基和叶切成 3~4 cm 长,分别放在 250 mL 烧杯中,用纱布封口,流水冲洗 2~3 h,沥水。放入超净工作台灭好菌的小烧杯里,用刀片切片成 1~1.5 cm<sup>2</sup> 的小块,用 75% 的酒精浸泡 20 s,用无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液灭菌 4~12 min,无菌水冲洗 5~6 次,放在无菌滤纸上吸干材料表面水分,接种于 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L(浓度单位下同)+蔗糖 30 g+琼脂 7.0 g,pH 5.8 的培养基上筛选合适的灭菌时间。

**1.2.2 诱导分化培养** 将球茎切成 0.5 cm<sup>3</sup>、叶片 0.5 cm<sup>2</sup> 的小块,接种于以 MS 为基本培养基,琼脂 0.7%,蔗糖 3%,pH 5.8 的诱导培养基上,不同诱导培养

第一作者简介:张丽(1977-),女,沈阳市人,在读博士,讲师,研究方向为植物生物技术。E-mail:zhangli\_1977@yahoo.cn。

通讯作者:陈丽静(1971-),女,博士,副教授,研究方向为植物基因工程与细胞工程。E-mail:chenlijing1997@126.com。

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20072124);辽宁省自然科学基金博士启动基金资助项目(20081067)。

收稿日期:2010-06-21

基处理及成分见表 3~5。每瓶接 1 块,每个处理接 30 瓶,每个处理重复 3 次。接种后放到培养室中进行培养,温度控制在 23℃ 左右,光照时间 14 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx。7 d 后观察结果,并记录 10、30、40 和 60 d 统计的结果。

1.2.3 不定芽的继代增殖 将培养 40 d 的丛芽切割并接种于不同激素浓度与配比的 MS+蔗糖 3%+琼脂 0.7%,pH 5.8 培养基中,不同继代增殖培养基处理及成分见表 6。每瓶接种 3 个小芽,每个处理 30 瓶,每个处理重复 3 次。培养条件同上,30 d 后观察并统计结果。

1.2.4 试管苗的生根 将株高约 2~3 cm,生长健壮的不定芽由芽丛单个切下,接种于不同激素浓度与配比的 MS(或 1/2MS)+蔗糖 3%+琼脂 0.7%,pH 5.8 培养基中,不同生根培养基处理及成分见表 7。每瓶接种 3 株单芽,每个处理 30 瓶,每个处理重复 3 次。培养条件同上,30 d 后观察并统计结果。

1.2.5 试管苗的移栽 当苗高 3~4 cm 左右,苗根长 1~2 cm,根为乳白至黄色时,将培养有组培苗的培养瓶置于室温条件下,逐渐把封口膜打开,练苗 4~5 d。练苗后,将试管苗从瓶中小心取出,用自来水将附在幼苗根上的培养基冲洗干净,再用 0.2% 多菌灵液浸泡 5~10 s 消毒灭菌,然后用清水洗净,晾干水分后移栽到经过 50% 福美双可湿性粉剂 1:500 喷雾消毒的基质中,不同移栽基质处理及成分见表 8。每种移栽基质均栽种 60 盆,每盆 1 株。栽好后淋透水,置于有散射光的阴凉处。7 d 后进行正常光照,并结合浇水喷施营养液,以后每 4 d 喷 1 次营养液。40 d 后观察并统计结果。

### 1.3 结果评价指标

污染率 = (污染数/接种数) × 100%, 成活率 = (接种数 - 污染数 - 灭菌灭死数) / 接种数 × 100%; 繁殖系数 = (增殖的茎尖数/接种茎尖数) × 100%; 生根率 = (生根苗数/接种苗数) × 100%。

## 2. 结果与分析

### 2.1 不同灭菌时间对外植体成活率和污染率的影响

灭菌时间的长短直接关系到外植体的成活率与诱导率。时间过短,灭菌不彻底,污染率高,时间过长对材料细胞有伤害,甚至造成死亡。虽然污染率大大降低,但成活率很低。0.1% HgCl<sub>2</sub> 处理时间对彩色马蹄莲球茎和叶片接种的污染率与成活率见表 1、2。

表 1 不同灭菌时间对球茎污染率与成活率的影响

灭菌时间/min	接种外植体数	污染率/%	成活率/%
4	30	80	20
6	30	70	30
8	30	50	40
10	30	20	10
12	30	10	6.67

表 2 不同灭菌时间对叶片污染率与成活率的影响

灭菌时间/min	接种外植体数	污染率/%	成活率/%
4	30	30	70
6	30	20	80
8	30	10	50
10	30	10	0
12	30	3.33	0

由表 1 可见,灭菌 4~6 min,球茎污染率非常高,达 70%~80%。没污染的基本都能成活。灭菌时间超过 8 min,污染率大大降低。灭菌超过 12 min 污染率只有 10%。灭菌 8 min 成活率最高,达 40%。可见 8 min 的灭菌处理是比较恰当的。相对于球茎而言,叶对灭菌处理更为敏感。由表 2 可见,在 4~12 min 范围内,灭菌时间对叶污染率影响差别不大,而对成活率影响很大,10 min 处理的叶片完全失去了生活力,4~6 min 的处理比较适宜,成活率可达 70%~80%。

### 2.2 不同外植体对诱导分化的影响

外植体选取部位不同,再生能力不同,诱导愈伤组织和分化芽的能力也不同。黄花马蹄莲不同外植体愈伤组织诱导和芽的分化情况见表 3。由表 3 所示,叶片经愈伤组织后才能分化出芽,而球茎可直接出芽。因此,球茎较叶片分化的快,可以很快进行芽苗增殖;幼叶容易诱导出愈伤组织。所以,采用黄花马蹄莲球茎做外植体可以更快的建立起无性繁殖系。

表 3 不同外植体诱导分化的影响

外植体	培养基成分 /mg · L <sup>-1</sup>	愈伤组织 /块	分化芽数	
			10 d	30 d
球茎	MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	0	3.2	8.4
幼嫩叶	MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	12	0	4.3

### 2.3 不同激素对比对球茎诱导分化的影响

细胞分裂素和生长素的用量及比例是影响外植体分化的重要因素。不同激素对比对黄花马蹄莲诱导分化的影响如表 4 所示。将球茎切成小块接种于不同的培养基上,10 d 左右球茎基部的近轴面或边缘上开始诱导出许多个淡黄色的不定芽原基,呈环状突起。这些不定芽原基继续生长,抽出淡黄绿色突起,主要集中在球茎与培养基的接触面上,上部很少,且出现时间较长,一般淡黄绿色突起达黄豆粒大甚至更大,其上分化出的不定芽粗壮。

表 4 不同培养基配方对马蹄莲球茎不定芽诱导的影响

培养基成分 /mg · L <sup>-1</sup>	接种数 /块	培养愈伤组织		分化芽数	
		10 d	30 d	40 d	60 d
1. MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	30	无	较多	1.2	3.6
2. MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	30	无	少	2.8	7.0
3. MS+6-BA 2.0+NAA 0.1	30	无	较多	3.6	9.2
4. MS+6-BA 3.0+NAA 0.1	30	极少	较多	1.0	7.8
5. MS+6-BA 4.0+NAA 0.1	30	少量	深绿、紧实	0	0

从表 4 可知,6-BA 对诱导不定芽分化有明显促进作用,在相同 NAA 水平下(0.1),6-BA 浓度由 0.5 增加到

2.0 时,随着浓度升高,芽分化增多,说明在一定范围内,6-BA 能促进芽的分化,接种后 30 d 的调查情况也能说明这一点。

分析结果得出,同时添加 6-BA 2.0 和 NAA 0.1 的 MS 培养基对黄色马蹄莲球茎不定芽分化效果最佳。

#### 2.4 不同激素配比对幼叶的诱导分化

0.5 cm<sup>2</sup> 的幼叶接于培养基中,7 d 见肿大,14 d 切口处见有少量愈伤组织产生。不同激素配比的培养基,愈伤组织形成及芽的分化差别很大(表 5)。

表 5 不同培养基配方对彩色马蹄莲幼叶诱导分化的影响

培养基成分 /mg·L <sup>-1</sup>	愈伤组织		分化芽数	
	10 d	30 d	40 d	60 d
MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	无	浅绿紧实	3.8	10.6
MS+6-BA 1.0+NAA 1.0	无	浅绿紧实	3.2	5.8
MS+6-BA 1.0+NAA 2.0	无	浅绿较紧实	1.6	2.8
MS+6-BA 1.0+NAA 3.0	无	浅绿疏松	0	0
MS+6-BA 1.0+NAA 4.0	无	浅绿疏松	0	0

由表 5 可见,随着 NAA 浓度的升高,产生的愈伤组织越来越疏松,颜色越来越浅,说明在 NAA 0.5~4.0 的浓度范围内,随 NAA 浓度的升高,有助于愈伤组织的形成,但过高 NAA 浓度则不利于芽的分化。在 MS+6-BA 1.0+NAA 3.0、MS+6-BA 1.0+NAA 4.0 培养基上根本无芽的分化,只有愈伤组织的生长。MS+6-BA 1.0+NAA 0.5~2.0 培养基上芽分化数随 NAA 浓度的增加,芽分化数降低。可能是由于 6-BA 与 NAA 的比例越来越不适合芽的分化所致。可见,MS+BA 1.0+NAA 0.5 处理最适合黄花马蹄莲愈伤组织的诱导及芽的分化。

#### 2.5 不同激素配比对马蹄莲丛芽的增殖

将诱导的不定芽接种到增殖培养基中,连续进行 3 代培养,筛选出适合于黄花马蹄莲增殖的培养基。不定芽在各增殖培养基中增殖分化 30 d 的结果见表 6。

表 6 不同培养基配方对不定芽增殖的影响

培养基成分 /mg·L <sup>-1</sup>	6-BA /NAA	接种数	增殖芽数 繁殖系数	
			增殖芽数	繁殖系数
MS+6-BA 1.0+NAA 0.2	5	30	134	4.47
MS+6-BA 1.0+NAA 0.5	2	30	82	2.73
MS+6-BA 2.0+NAA 0.2	10	30	189	6.30
MS+6-BA 2.0+NAA 0.5	4	30	106	3.53
MS+6-BA 3.0+NAA 0.2	15	30	236	7.87
MS+6-BA 3.0+NAA 0.5	6	30	158	5.27
MS+6-BA 4.0+NAA 0.2	20	30	105	3.50
MS+6-BA 4.0+NAA 0.5	8	30	172	5.73

从表 6 可知,增殖的芽数与 6-BA、NAA 的浓度配比有直接的关系,当其配比增大时,增殖的芽数也增多;当其超过所培养材料的最适配比时,增殖芽数会随着配比的增大而减少。同时,6-BA 浓度相同,NAA 的浓度高时,会抑制芽的增殖,只有当 6-BA、NAA 的浓度及其配

比恰当时,芽增殖数才能达到最大数。MS+6-BA 3.0+NAA 0.2 是诱导黄花马蹄莲增殖的最佳培养基。

#### 2.6 黄花马蹄莲生根培养基的筛选

当培养基 MS+6-BA 3.0+NAA 0.2 中的增殖试管苗达 3~4 cm 时,转入生根培养基中,进行生根。

表 7 不同培养基对试管苗生根的影响

培养基成分 /mg·L <sup>-1</sup>	总苗数 /株	生根苗数 /株	生根率 /%	平均每株 根数/条	生长状况
MS	30	15	50	5.8	++
MS+NAA 0.1	30	28	93.3	5.0	+++
1/2MS	30	26	86.7	4.8	++
1/2MS+NAA 0.1	30	21	70	2.6	+
1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1	30	30	100	6.2	++++

注:++为苗黄,长势不好;+++为分生多,不易分开,分开后根易脱落,苗弱,根数较多;++++为根壮、苗绿、长势好;+++++为叶绿、根壮、根数多、有一、二极侧根、易生根毛、长势好。

由表 7 可知,从 MS 到 1/2MS+NAA 0.1 的 4 种培养基上生长情况不如 1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1 上生长好,在 1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.01 上生根质量好,根数多,有根毛,移栽易成活。

#### 2.7 不同基质对移栽效果的影响及最佳移栽期的分析

将生根培养的小苗于实验室内下练苗 3 d,洗去培养基,栽于 105 穴育苗盘中,浇透水。移栽 1 个月,开始有幼叶发出,叶片开始长大。1 个月后逐渐增加光照,小苗开始迅速生长。不同基质的理化性质不同,透气、保水、保肥能力不同,对小苗移栽成活与否影响甚大。

表 8 不同移栽基质对试管苗移栽成活率的影响

基质	成活率/%
珍珠岩:蛭石:草炭土:河沙=2:2:4:1	97
草炭土:河沙=2:1	90
河沙	74
草炭土:炉灰渣:河沙=1:1:1	78

由表 8 可知,在基质珍珠岩:蛭石:草炭土:河沙(2:2:4:1)中小苗移栽成活率可达 97%,基质河沙仅有 74%,小苗移栽成活率低,一方面可能是基质配比不适合,理化性质不好所致;另一方面也可能是基质中养分含量较低引起。

表 9 移栽时期对移栽成活率的影响

生根培养天数/d	根数/条	根长/cm	移栽成活率/%
10	0	0	97
15	4.2	0.1~0.3	96
30	5.0	2~3	84

注:以上数据来自 1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1 培养基的生根苗在基质珍珠岩:蛭石:草炭土:河沙=2:2:4:1 中的移栽结果。

生根培养过程中,并不是根越长,移栽成活率越高。如表 9 所示,生根培养 10~15 d,未见或可见 0.1~0.3 cm 短、粗白根的小苗移栽成活率可达 96%~97%,而培养 30 d 根长 2~3 cm 的小苗移栽成活率仅有 84%。这可能是由于根较长,洗苗时损伤多,导致移栽成活率低。因此,生根培养 10~15 d,未见根和可见根 0.1~0.3 cm

时是最适移栽期。

### 3 讨论

#### 3.1 建立彩色马蹄莲的离体快繁体系,叶片不是理想的外植体材料

彩色马蹄莲诱导叶片形成愈伤组织的结果不理想,原因可能有三方面:一是切取叶片外植体的时期及部位,对愈伤组织形成不利;二是诱导叶片脱分化激素比例和生长素种类不甚合适;三是有可能叶肉组织在脱分化过程中发生了某些变异的缘故<sup>[3]</sup>。

#### 3.2 外源激素对愈伤组织诱导起重要作用

随着 NAA 浓度的升高,产生的愈伤组织越来越疏松,颜色越来越浅,说明在 NAA 0.5~4.0 的浓度范围内,随 NAA 浓度的升高,有助于愈伤组织的形成,但过高 NAA 浓度则不利于芽的分化。在 MS+6-BA 1.0+NAA 3.0、MS+6-BA 1.0+NAA 4.0 培养基上根本无芽的分化,只有愈伤组织的生长。MS+6-BA 1.0+NAA 0.5~2.0 培养基上芽分化数随 NAA 浓度的增加,芽分化数降低。可能是由于 6-BA 与 NAA 的比例越来越不适合芽的分化所致<sup>[10]</sup>。这与陈菲的结果一致<sup>[3]</sup>。

### 参考文献

- [1] 何阳修.海芋之种类及栽培习性(三)[J].种苗快讯,1994,(8):33-37.
- [2] Singh Y, Van Wyk A E. Floral biology of *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng (Araceae)[J]. South African Journal of Botany, 1997, 62(3): 146-150.
- [3] 陈菲,李黎,曲彦婷,等.彩色马蹄莲的离体快繁技术研究[J].北方园艺,2009(1):103-104.
- [4] 范加勤,张雯雯,张娜,等.几种彩色马蹄莲品种的离体培养与快速繁殖[J].南京农业大学学报,2005,28(2):28-31.
- [5] 黄学林,李筱菊.高等植物组织培养离体培养的形态建成及调控[M].北京:科学出版社,1995.
- [6] 李倩中,谭国华,周建涛.彩色马蹄莲组培技术[J].江苏农业科学,2003(6):86-87.
- [7] 彭峰,陈嫣嫣,郝日明,等.彩色马蹄莲'Parfait'不定芽诱导增殖培养条件的优化和筛选[J].植物资源与环境学报,2006,15(2):47-49.
- [8] 钱丽华,沈国正,戴丹丽,等.彩色马蹄莲的离体繁殖试验[J].浙江农业科学,2005(2):112-113.
- [9] 吴丽芳,熊丽,屈云慧,等.彩色马蹄莲组培研究[J].西南农业大学学报,1999,21(5):424-26.
- [10] 李国义,龚东芳,张丽梅,等.彩色马蹄莲组培快繁技术的研究[J].北方园艺,2004(2):64-65.

(该文作者还有:李浩戈,单位同第一作者。)

## Study on the Rapid Propagation of *Zantedeschia elliottiana*

ZHANG Li<sup>1</sup>, WANG Yu-kun<sup>2</sup>, MA Hui<sup>1</sup>, GUO Zhi-fu<sup>1</sup>, LI Hao-ge<sup>1</sup>, ZHONG Ming<sup>1</sup>, CHEN Li-jing<sup>1</sup>

(1. Bioscience and Technology Institute of Shenyang Agriculture University, Key Laboratory of Agriculture Biotechnology Liaoning Province, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Plant Protection institute, Shenyang Agriculture University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** Taking leaf and tuber of *Z. elliottiana* as explants, by MS medium as basic medium, add different kinds and different concentration of plant growth regulating substances to MS medium for inducing the cluster bud and establishment of regeneration system. The results showed that explant sterilized in the 75% of alcohol for 20 s first, and then put in 0.1% aqueous mercuric chloride for 8 minutes for tuber and 4 to 6 minutes for leaf had better effect, the optimal medium for inducing tuber differentiation was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, the optimal medium for inducing leaf differentiation was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the optimal medium for proliferation of but was MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+sucrose 30 g+agar 7.0 g, the optimal medium for take root was 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.01 mg/L. The transplant survival rate was high on the transplant medium of perlite : vermiculite : peat : sand = 2 : 2 : 4 : 1, survival rate was up to 97%.

**Key words:** *Zantedeschia hybrida*; *Z. elliottiana*; tuber; leaf; adventitious shoot; rapid propagation