

· 技术方法 ·

莲的离体快速繁殖技术

熊雅倩^{1,2}, 邓显豹^{1,3}, 张会会¹, 杨东^{1,3}, 孙恒¹, 刘娟¹, 杨美^{1,3*}

¹中国科学院武汉植物园植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074; ²中国科学院大学, 北京 100049

³中国科学院核心植物园(武汉), 协同中心, 武汉 430074

摘要 以莲(*Nelumbo nucifera*)授粉后18天的莲子胚芽为外植体, 通过初代培养、继代培养和炼苗移栽, 建立了莲离体快速繁殖体系。结果表明, 将胚芽外植体诱导出无菌苗的最适初代培养基为MS固体培养基添加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、0.5 mg·L⁻¹ NAA、30 g·L⁻¹蔗糖、0.5 g·L⁻¹活性炭和0.8 g·L⁻¹琼脂, 培养60天诱导率高于85%, 其中秋红阳走茎节数最多(3.9)。最佳继代培养基为将初代培养基中的蔗糖浓度提高到80 g·L⁻¹, 走茎采用两节一切的分苗切法, 无菌苗可50天继代1次, 最多可继代6次, 不同品种的增殖系数介于4.0–6.7之间, 以秋红阳最高(6.7)。于5–7月将生根的走茎无菌苗移栽入泥炭:塘泥=1:2 (v/v)的混合基质中进行培养, 成活率均大于83.9%。采用上述快繁技术, 理论上1个莲子胚芽经过近1年可繁殖出种苗1 465株。该研究建立了莲的离体快繁技术体系, 可为莲种苗的规模化生产提供技术支持。

关键词 莲, 无菌苗, 快速繁殖, 植株再生

熊雅倩, 邓显豹, 张会会, 杨东, 孙恒, 刘娟, 杨美 (2021). 莲的离体快速繁殖技术. 植物学报 56, 605–613.

莲为莲科(Nelumbonaceae)莲属(*Nelumbo*)植物, 是我国栽培面积最大的水生经济作物, 具有极其重要的食用、观赏和药用价值(Guo, 2009; La-ongsri et al., 2009)。经过长期人工驯化与选择, 莲已形成具有不同农业利用目的的3种类型: 子莲、藕莲和花莲(Yang et al., 2015)。子莲和藕莲主要以莲子和莲藕的鲜食或加工食用为主(王其超和张行言, 1998); 花莲主要以花的观赏为主。目前莲被国内外多座城市列为市花。同时莲的全株均可入药(Sridhar and Bhat, 2007; Shou et al., 2008; 彭燕等, 2017), 具有抗菌消炎、抗氧化和抗癌等作用(Zhang et al., 2015), 成为开发天然、安全保健药物最具潜力的首选药材之一(Jun et al., 2016)。

随着农村产业结构的调整以及对湖泊和荒洼资源的开发利用, 莲种植业有了较大发展, 种植面积逐渐提高。据统计, 2012年我国藕莲栽培面积达3.33×10⁶ hm², 子莲栽培面积约为6.7×10⁵ hm² (刘义满和柯卫东, 2012)。莲的繁殖方式主要有2种: 种子繁殖

和分藕繁殖。种子繁殖对时间季节要求较高, 而且莲为异花授粉植物, 后代常出现性状分离, 一般只用于育种。生产上通常采用分藕繁殖, 但这种方式藕莲每667 m²需要使用250 kg种藕, 产量可达2 000 kg (李峰等, 2020), 繁殖成本高, 周期长, 而且容易因病毒累积造成种质退化, 导致产量和品质下降, 严重影响良种推广和经济效益(王其超和张行言, 2005)。高效繁殖技术缺乏已成为制约莲种植业发展以及基因功能研究的瓶颈(唐嘉璈等, 2020)。

植物离体快繁技术广泛应用于种苗繁殖和工厂化生产, 已在一些物种中取得了很好的效果(黄宁珍等, 2010; 唐凤鸾等, 2019)。目前, 莲的组织快繁技术主要以地下茎茎尖和莲子胚芽为起始外植体(赵芹等, 2016)。柯卫东等(2001)以地下茎茎尖为外植体, 诱导出丛芽, 并通过调节蔗糖和赤霉素浓度, 成功诱导出莲试管藕。但该体系外植体消毒困难, 且诱导试管苗的成活率低, 可重复性差(Arunyanart and Chaitrayagun, 2005)。在以储藏莲子胚芽为外植体的

收稿日期: 2021-01-26; 接受日期: 2021-05-27

基金项目: 中国科学院前沿科学重点研究计划(No.QYZDB-SSW-SMC017)、中国科学院青年创新促进会项目(No.2017390)和国家自然科学基金(No.31772353, No.31872136)

* 通讯作者。E-mail: yangmei815815@wbpcas.cn

相关报道中,坚硬的果皮难以去除,成熟胚胎获取步骤繁琐,难度大,而且染菌率高(孔德政等, 2007; Liu et al., 2019)。目前研究使用的外植体多为新鲜莲子胚芽。Buathong等(2013)利用成熟莲子的新鲜胚芽诱导形成胚性愈伤组织,然后获得丛芽,但未能诱导出完整植株。Mahmad等(2014)以莲子幼胚(0.5–1.0 cm)为外植体成功诱导出组培苗,但培养过程中使用固液培养基,每25天需更换1次新鲜培养基,实际操作步骤繁琐。鉴于此,本研究以授粉后18天的莲子胚芽为外植体,成功诱导出莲生根走茎无菌苗,建立了一套高效且易操作的莲离体快繁体系,旨在为莲脱毒苗生产以及大规模繁殖和生产提供技术保障。

1 植物材料

选取中国科学院武汉植物园种质资源圃(116°25'E, 30°32'N)所保育的莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)品种白花建莲(Baihuajianlian)、秋红阳(Qiuhongyang)、秋日红花(Qiurihonghua)和武植子莲1号(WBG_S1)为实验材料。不同莲品种分开种植于硬质水泥隔离池内,在自然温度和光照、充分水肥条件下生长。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体消毒

采摘授粉后18天的新鲜莲子,除去果皮,用自来水冲洗15分钟。移入超净工作台,先用75%乙醇消毒30秒,用无菌水洗涤1次后剥去外种皮。然后用75%乙醇消毒30秒,无菌水漂洗1遍,用升汞消毒8分钟。最后,用无菌水漂洗5次。用镊子取出后放置于无菌滤纸上吸干水分,用无菌镊子与手术刀配合,分离子叶并去除内种皮,取出胚芽置于无菌培养皿中,备用。

2.2 培养基配方及培养条件

无菌苗培养基以MS为基本培养基,添加蔗糖、活性炭和0.8%琼脂,调pH至5.8±0.1。此外,根据实验目的添加不同浓度的生长素萘乙酸(NAA)和细胞分裂素6-苄氨基嘌呤(6-BA)。配置好的培养基采用高压蒸汽灭菌(121°C, 20分钟),待其冷却到合适温度后,在超净工作台上倒入培养瓶中,每瓶40–50 mL (培养瓶提前灭菌)。培养温度为(25±2)°C,光周期为16小时光照/8

小时黑暗,光照强度为35–45 μmol·m⁻²·s⁻¹。

2.3 初代培养

将消毒后的外植体按每瓶3个接种于培养瓶中进行初代培养,培养基成分见表1。选择的品种有秋红阳、秋日红花、武植子莲1号和白花建莲。每个品种处理60–100瓶。每隔10天观测1次,及时移走污染材料。培养2个月后,记录材料的生根数、叶片数、顶芽数和走茎节数,并统计生根率和诱导率。生根率=(生根的无菌苗数/诱导出无菌苗总数)×100%;诱导率=(诱导出无菌苗的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

表1 初代培养基组成成分

Table 1 The component of the primary culture medium

Types	NAA (mg·L ⁻¹)	6-BA (mg·L ⁻¹)	Sucrose (g·L ⁻¹)	Activated charcoal (g·L ⁻¹)
I	0.5	0.5	30	0.5
II	0.5	1	30	0.5
III	0.5	0.5	80	0.5
IV	0.5	0.5	30	1

2.4 继代培养

将初代培养2个月且生长良好的无菌苗去除衰老叶片和根,获得的走茎节段按照一定的方式切割,切割方式有:2节(x)、1节加1个生长点(y)、1节(z)和1个生长点(w)。将切割好的走茎节段每2株种植于1个培养瓶中。继代培养基均为MS固体培养基添加80 g·L⁻¹蔗糖、0.5 g·L⁻¹活性炭,添加的激素配比有以下6种(表2)。选择的品种有秋红阳、秋日红花、武植子莲1号和白花建莲。每个品种处理90–120瓶。每10天统计材料的污染率、死亡率和繁殖系数。污染率=(无菌苗污染株数/接种的外植体总数)×100%,死亡率=(无菌苗死亡株数/接种的外植体总数)×100%,繁殖系数=1个接种苗经过1次继代所获得的走茎节数。

2.5 炼苗与移栽

将秋红阳、秋日红花、武植子莲1号和白花建莲4个品种继代生长良好的走茎无菌苗从培养基中取出,用自来水冲洗干净,直接移植到装有灭菌培养土(泥炭:塘泥=1:2, v/v)的营养钵(口径17.5 cm, 深13.5 cm)中,加水至刚淹没土层,覆盖保鲜膜保湿,放置于培养室。培养室光周期为16小时光照/8小时黑暗,光照强

度为35–45 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度(25±2)°C。炼苗前5天通过控制保鲜膜透气孔径, 逐步将培养相对湿度降至50%, 并一直保持水刚好淹没培养土。7天后浇水至2–4 mm水深, 之后一直保持此水位。10天后将苗移入室外生长, 避免太阳直射。20天后更换至含有池塘淤泥的花盆(口径50 cm, 深45 cm)中生长。每10天统计移栽成活率以及叶片生长情况。

2.6 统计分析

利用Excel 2018和IBM SPSS Statistics 22软件进行统计分析。采用Duncan单因素分析法进行多重比较, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

3 结果与讨论

3.1 初代培养

3.1.1 培养基选择

将消毒后的秋红阳新鲜莲子胚芽在不同初代培养基

表2 继代培养基的激素配比

Table 2 The combinations of plant hormones in subculture medium

Types	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.5	0.5
2	0.3	0.5
3	0.1	0.5
4	0.5	1.5
5	1	0.5
6	0.3	1

上培养。培养1天后外植体极少染菌, 生长适应状况良好; 培养10天后无菌苗开始生根; 培养60天后可长出健壮的走茎无菌苗(图1A–D)。采用不同激素配比的培养基进行无菌苗培养, 发现无菌苗的生根率均大于95% (表3), I号培养基的无菌苗生根效果最好, 生根率达100%。I号和II号培养基中的无菌苗生长速度较快, 走茎节数达3.9, II号培养基比I号提高了6-BA含量, 但对无菌苗培养影响不显著, I号培养基培养形成的叶片数和顶芽数也较多。基于节约激素考虑, 以0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA较为合适。III号培养基所形成的走茎节数和顶芽数最少, 可能是高蔗糖含量影响无菌苗的生长。IV号培养基比I号活性炭浓度高, 其无菌苗走茎节数和叶片数均下降。综上, I号培养基最有利于无菌苗生根、长芽和走茎。

3.1.2 品种选择

采用I号培养基研究不同品种对无菌苗初代培养的影响。初代培养2个月, 秋红阳、秋日红花、武植子莲1号和白花建莲无菌苗的走茎节数和诱导率均有差异(图2)。无菌苗的走茎节数以秋红阳最高, 达3.9, 其次为白花建莲, 最低的是武植子莲1号, 仅为2.1 (图2A)。无菌苗诱导率以武植子莲1号最高(95.8%), 其它3个品种诱导率较为接近, 均在86%左右(图2B)。未能诱导出走茎的外植体在培养2个月均死亡。同时考虑不同品种的走茎节数和栽种面积, 我们选择秋红阳作为无菌苗继代培养和炼苗的主要品种。

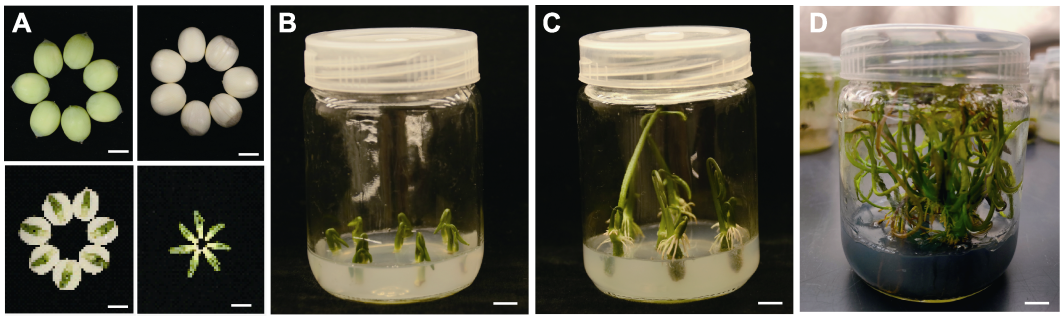


图1 秋红阳授粉后18天莲子胚芽的初代培养 (A) 授粉后18天的莲子胚芽外植体; (B) 接种后培养1天的胚芽; (C) 初代培养10天的无菌苗长根; (D) 初代培养60天的健壮走茎苗。Bars=1 cm

Figure 1 Primary culture of Qiuhongyang immature embryo explants from developing seeds of 18 days after pollination (A) Immature embryo explants from developing seeds of 18 days after pollination; (B) Immature embryo cultured one day after inoculation; (C) The rooted plantlets at 10 days after primary culture; (D) The aseptic seedling at 60 days after primary culture. Bars=1 cm

表3 培养基组分对秋红阳无菌苗初代培养的影响(接种60天)

Table 3 Effects of medium components on the growth of QiuHongyang aseptic seedlings in the primary culture (60 days after inoculation)

Types	The amount of inoculation	Rooting rate (%)	The amount of nodes	The amount of apical bud	The amount of leaves
I	331	100	3.9±0.36 a	0.9±0.03 a	4.3±0.48 a
II	134	98	4.0±0.05 a	0.7±0.04 b	3.8±0.27 a
III	122	95	3.2±0.19 b	0.7±0.01 b	4.3±0.13 a
IV	300	95	3.6±0.33 ab	0.9±0.13 a	3.9±0.22 a

不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at $P<0.05$.

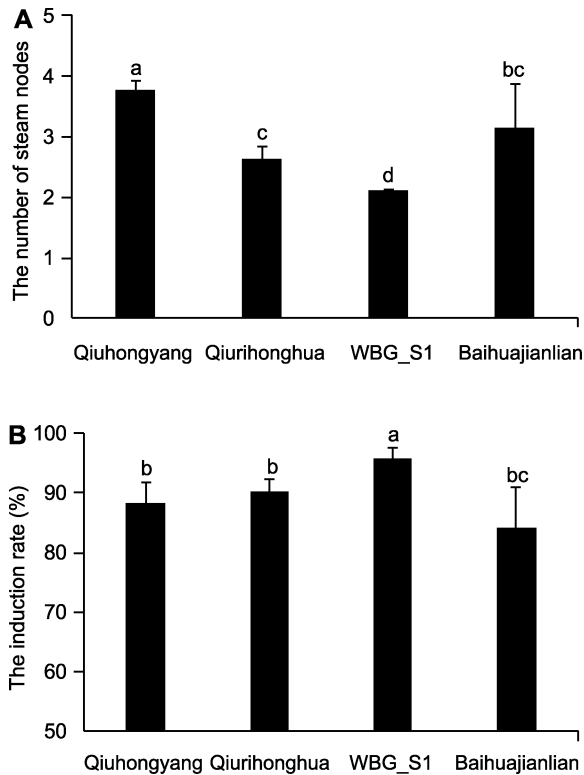


图2 不同莲品种对无菌苗初代培养的走茎节数(A)和诱导率(B)的影响

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 2 Effects of lotus varieties on the number of stem nodes (A) and the induction rate (B) of lotus aseptic seedlings in the primary culture

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

3.2 继代培养

3.2.1 走茎的分苗切法

选用初代培养中长势良好的秋红阳无菌苗进行继代培养。在继代培养前10天无菌苗生长较为缓慢,之后平均每10天可生长出一段新的节间,50天以后走茎的

生长速度变缓,因此选择每50天继代1次。前6次继代培养过程中,无菌苗繁殖系数和死亡率差异不显著。采用4种不同方式对秋红阳无菌苗的走茎进行分苗切割,结果发现无菌苗的繁殖系数和死亡率有一定差异。2节和1节加1个生长点的切割方式繁殖系数较高,培养50天2种方式的繁殖系数分别为6.9和6.7,死亡率较低(分别为4.5%和3.0%)。1节的繁殖系数最低(4.1),死亡率达15%(图3A)。由于每株初代培养的无菌苗仅含有1个生长点,易受材料限制,而节间生长点较多,因此继代培养最适合切法为2节一切。

3.2.2 激素配比

以MS为基础培养基,添加不同浓度的NAA和6-BA。结果(图3B)表明,秋红阳无菌苗在6-BA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着NAA浓度从 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,无菌苗继代繁殖系数增大,以 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA最为合适;在培养50天时,繁殖系数为6.7。6-BA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对无菌苗继代培养效果优于 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。继代培养中无菌苗死亡率均较低,不超过15%,其中在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA激素配比培养基上的无菌苗均成活。因此,继代培养中培养基激素配比采用 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA效果较好。

3.2.3 品种选择

对不同品种进行无菌苗继代培养时,繁殖系数有显著差异(图3C)。在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的激素配比下,培养50天,4个品种的繁殖系数均在4.0以上,以白花建莲和秋红阳的繁殖系数较高(分别达6.4和6.7),武植子莲1号繁殖系数最低(4.0)。所有品种无菌苗的死亡率相差较大,以武植子莲1号最高

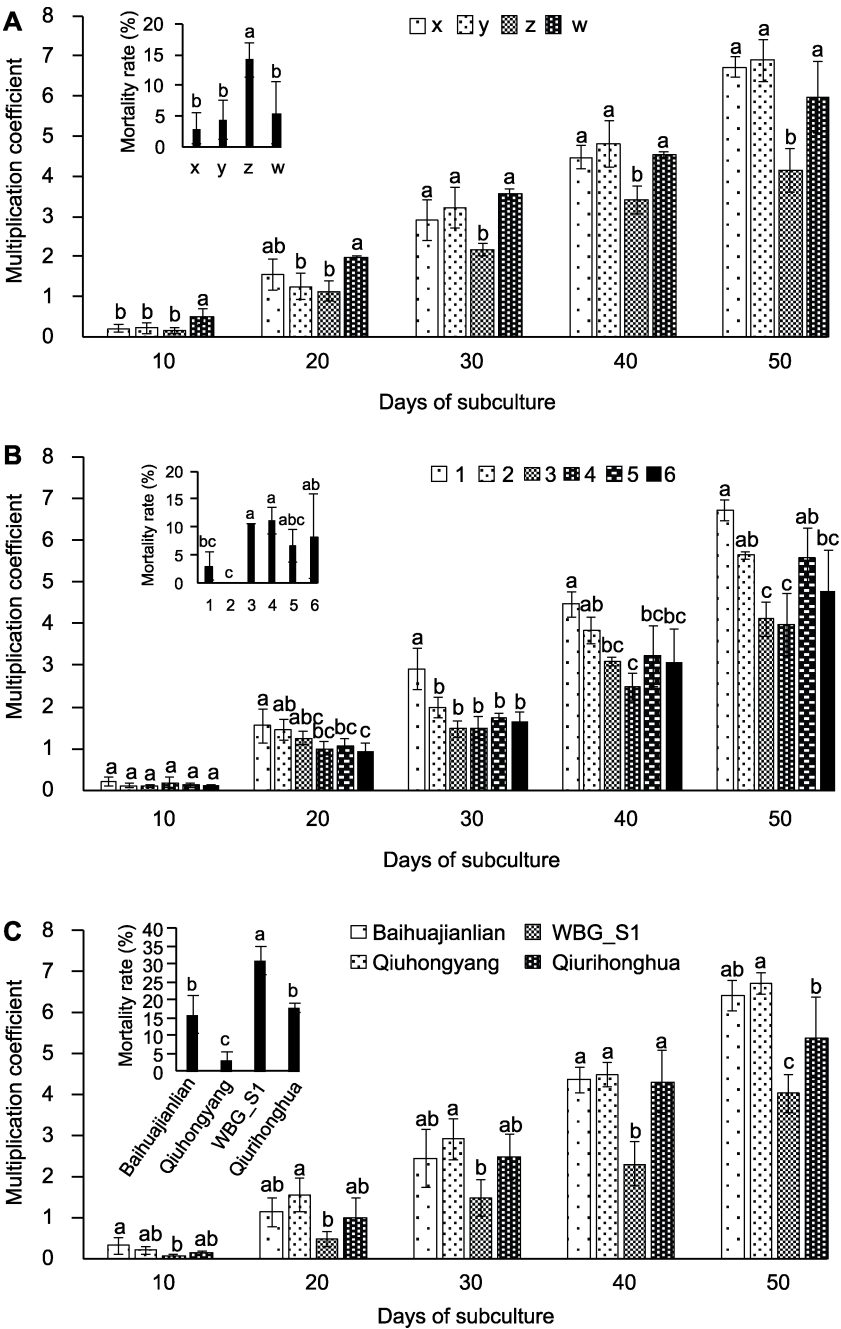


图3 无菌苗继代培养繁殖系数和死亡率
(A) 不同走茎切割方式对秋红阳无菌苗继代培养繁殖系数和死亡率的影响(x: 2节, y: 1节加1个生长点, z: 1节, w: 1个生长点); (B) 不同激素配比对秋红阳无菌苗继代培养繁殖系数和死亡率的影响, 激素配比(编号1-6)见表2; (C) 不同品种对无菌苗继代培养繁殖系数和死亡率的影响。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 3 The multiplication coefficient and mortality rate of subculture of aseptic seedlings
(A) Effect of dividing methods in Qiu hongyang aseptic seedlings on the multiplication coefficient and mortality rate of subculture (x: Cuttings with two nodes, y: Cuttings with one node and one growing tip, z: Cuttings with one nodes, w: Cuttings with one growing tip); (B) Effects of plant hormone combinations in Qiu hongyang on the multiplication coefficient and mortality rate of subculture, combinations of plant hormones (No.1-6) are in Table 2; (C) Effect of lotus varieties on the multiplication coefficient and mortality rate of subculture. Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$.

(30.9%), 秋红阳最低(仅为3.0%) (图3C)。综上所述, 在培养基中添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA较适于秋红阳的无菌苗继代培养, 而用于其它品种无菌苗继代培养的最适激素配比尚需进一步研究。

3.3 炼苗及移栽

5–7月取长势良好的莲无菌苗进行炼苗。将继代生长良好、培养50天的生根无菌苗从培养基中取出后, 用自来水冲洗干净, 可观察到无菌苗地下茎偏白, 根系不发达且叶柄较长(图4A1, A2)。移栽10天后, 叶片逐渐展开, 地下茎逐渐变灰且根系生长明显, 有新的节间长出, 表明其已经适应土壤环境(图4B1, B2)。移栽40天后, 无菌苗开始长立叶, 叶片和叶柄均明显变粗壮, 观察其地下茎发现较之前粗壮, 根系更加发达, 与外界自然生长的莲地下茎较为相似(图4C1, C2)。研究发现, 不同品种无菌苗移栽成功率差异不显著(表4)。培养10天, 无菌苗存活率达90%, 一半植株长出叶片; 培养20天存活率接近85%, 每株植株长出2片以上叶片; 培养50天, 一半植株产生立叶。综上所述,

移栽成功且存活率均较高, 不同品种对无菌苗炼苗影响不大。

3.4 快繁效率

上述结果表明, 以7月中旬采集的外植体为起始, 经过1次初代培养和6次继代培养, 到次年7月。考虑到培养过程中的污染和死亡等因素, 每代损失率约为10%。根据以上走茎节数和繁殖系数, 1颗秋红阳授粉后18天的莲子经过近1年的快速繁殖, 理论上可以获得种苗 $(3.9/2) \times (6.7 \times 0.9/2)^6 = 1\,465$ 株。

3.5 讨论

莲是我国栽培面积最大的水生经济作物, 具有极其重要的食用、观赏和药用价值。但莲的快速繁殖和炼苗体系不完善, 鉴于此, 本研究建立了一套高效的莲快速繁殖技术体系。

在莲快速繁殖过程中, 外植体的选择一直是重要的影响因素(岳建华等, 2020)。本研究使用的外植体是秋红阳授粉后18天的莲子胚芽。Liu等(2019)利用

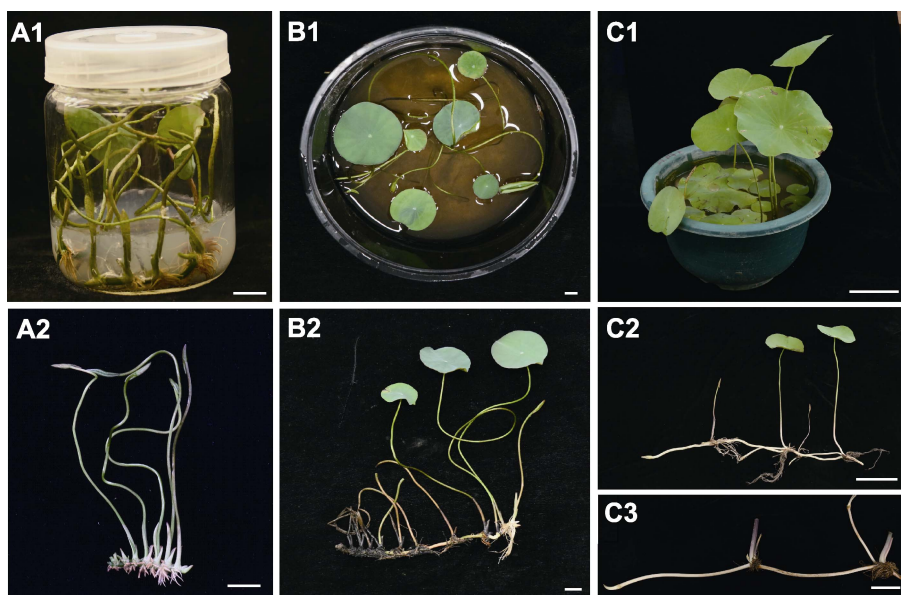


图4 秋红阳无菌苗炼苗和移栽

(A1), (A2) 无菌苗继代培养50天; (B1), (B2) 移栽10天; (C1) 移栽40天长出立叶; (C2) 移栽40天的地下茎; (C3) 正常繁殖所得地下茎。(A1), (A2), (B1), (B2) Bars=1 cm, (C1)–(C3) Bars=10 cm

Figure 4 Hardening and transplanting of Qiuhongyang aseptic seedlings

(A1), (A2) Aseptic seedlings at 50 days of subculture; (B1), (B2) Plantlets at 10 days after transplanting; (C1) Standing leaves started to emerge at 40 days after transplanting; (C2) Rhizomes at 40 days after transplanting; (C3) Rhizome taken from plants grew in ponds. (A1), (A2), (B1), (B2) Bars=1 cm, (C1)–(C3) Bars=10 cm

表4 不同品种无菌苗移栽存活率及叶片数

Table 4 Effects of lotus varieties on the survival rate and the number of leaves developed after transplanting

Lotus varieties	Survival rate (%)		The amount of expanded leaves		The amount of standing leaves
	10 d	20 d	10 d	20 d	50 d
Qiu hongyang	93.7±3.0 a	83.9±1.6 a	0.4±0.10 b	1.8±0.07 b	0.7±0.04 a
Qiuri honghua	93.3±6.7 a	93.3±6.7 a	0.7±0.07 a	2.7±0.15 a	0.5±0.04 ab
WBG_S1	95.8±7.2 a	93.3±6.3 a	0.5±0.00 b	1.7±0.05 b	0.3±0.06 b
Baihua jianlian	87.8±6.3 a	87.2±18.0 a	0.5±0.11 b	2.5±0.40 a	0.5±0.13 ab

不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at $P<0.05$.

储藏莲子为材料,通过浓硫酸软化储藏莲子的壳,然后进行消毒灭菌,可得到无菌的成熟胚芽外植体,但其消毒过程过于繁琐,胚芽外植体存活率低且染菌率高。莲地下茎茎尖同样存在消毒困难和污染率高的问题(徐君等,2013)。以授粉后18天的新鲜莲子为材料,带子叶和内种皮在0.8% HgCl_2 溶液中处理8分钟后剥取胚芽外植体,污染率可降低至5%以下,这为本研究提供了稳定的外植体。品种差异性对植物离体培养影响非常大(Deng et al., 2020)。水稻(*Oryza sativa*)中的研究表明,不同品种影响水稻快速繁殖效率(Abe and Futsuhara, 1986)。对莲的研究表明,不同品种无菌苗快速繁殖效率相差较大(何碧珠等, 2002)。在本研究选取的4个品种中,无菌苗培养效率有差异,繁殖系数在4.0–6.7之间,以秋红阳繁殖效率最高。总体而言,利用本研究建立的快速繁殖体系均可培养出长势良好的健壮无菌苗。

培养过程主要包括初代培养和继代培养两步,初代培养培养基选用MS固体培养基添加0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭。相比蔡颖欣等(2017)利用固液双层培养基进行无菌苗培养,本实验的培养基配制相对简单,更易操作,激素浓度偏低,节约培养成本。培养2个月可得到生长健壮的无菌苗,生长的走茎节数为3.9。继代培养基比初代培养基蔗糖浓度有所提高,达80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (曾明星等, 2005; 张文婷等, 2019),可为无菌苗提供充足的营养,有利于植株长壮(刘建平等, 2016)。可每50天继代1次,在前6次继代中,繁殖系数达6.7,前6次继代过程中繁殖系数无明显差异。较已有报道中多次更换培养基与激素配比,本实验初代培养无需更换培养基,激素配比较为固定,处于低激素水平,而且继代过程培养基更换时间间隔大于已有报道(Mahmad

et al., 2014),本实验培养过程中同样无需震荡培养,无菌苗可相对密集地摆放在光照培养室中,节约了空间(张建福和王锋, 2002)。因此,本研究建立的莲无菌苗快速繁殖体系,简化了试验操作、节约了人力物力成本和材料消耗,是更为高效的莲种苗繁殖体系,对莲种苗的工厂化生产有实际意义。

在5–7月可对长势良好的无菌苗进行炼苗处理,不同品种的无菌苗炼苗成活率均大于83.9%,成活率高于已有研究(Liu et al., 2019)。1年时间,1颗秋红阳莲子可扩繁出1 465株无菌苗,改善了目前种藕繁殖过程中莲种苗繁殖周期长、效率低的问题(李峰等, 2020),同时可满足一年四季的无菌苗材料供给。此外,本实验使用的不同品种均可成功诱导出无菌苗,表明该体系有较强的实用性。本研究成功建立了莲高效完整的无菌苗培养及炼苗体系,可为莲优良种苗选育、品质改良和工厂化生产奠定基础。

参考文献

蔡颖欣, 汤宇环, 邵晓宇, 黄霞 (2017). 莲子胚培养再生植株及原生质体分离的研究. 种子 36(3), 125–127, 134.
何碧珠, 曾明星, 赵时端, 王家福, 赖钟雄 (2002). 建莲茎尖离体培养研究初报. 福建农林大学学报(自然科学版) 31, 59–61.
黄宁珍, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 石云平 (2010). 桂林小花芭莖离体快速繁殖技术. 植物学报 45, 744–750.
柯卫东, 彭静, 刘玉平, 黄新芳 (2001). 试管藕诱导技术研究. 武汉植物学研究 19, 173–175.
孔德政, 李艳妮, 杨秋生, 刘广甫 (2007). 荷花胚组织培养的初步研究. 河南科学 25, 593–595.
李峰, 周雄祥, 柯卫东, 黄新芳, 朱红莲, 钟兰, 宗义湘, 吴曼, 彭静, 李双梅, 袁田垚 (2020). 湖北省莲产业发展调

- 研报告. 湖北农业科学 **59**(23), 101–106, 109.
- 刘建平, 王芳, 杜彩娴, 梁少丽, 曾莉莎, 郑芝波 (2016). 荷花幼胚组织培养技术研究. 现代农业科技 (15), 140, 142.
- 刘义满, 柯卫东 (2012). 关于提高莲产业效益的建议. 长江蔬菜 (16), 134–137.
- 彭燕, 张玲莉, 杨小青, 阳静, 李娜, 宋金春 (2017). 莲子心总生物碱对人肝癌细胞的抑制作用. 中国药师 **20**, 1009–1012.
- 唐凤鸾, 赵健, 赵志国, 夏科, 仇硕 (2019). 走马胎的组织培养与快速繁殖. 植物学报 **54**, 378–384.
- 唐嘉璈, 邱杰, 黄学辉 (2020). 基因组学技术大发展助力园艺植物研究取得新进展. 植物学报 **55**, 1–4.
- 王其超, 张行言 (1998). 二元分类法在荷花品种分类中的应用. 北京林业大学学报 **20**(2), 33–37.
- 王其超, 张行言 (2005). 中国荷花品种图志. 北京: 中国林业出版社. pp. 34–43.
- 徐君, 李静会, 李欣, 周玉珍, 韦庆华, 姜红卫 (2013). 荷花顶芽初代组织培养. 江苏农业科学 **41**(3), 38–39.
- 岳建华, 董艳, 王小画, 孙佩霞, 王思颖, 张新年, 张琰 (2020). 早花百子莲叶片器官发生和胚胎发生再生体系的建立. 植物学报 **55**, 588–595.
- 曾明星, 何碧珠, 罗银华 (2005). 建莲藕茎尖离体培养快繁技术及应用. 福建农业科技 (3), 13–14.
- 张建福, 王锋 (2002). 莲藕组织培养与微繁殖技术初探. 上海农业科技 (6), 17–18.
- 张文婷, 何燕红, 舒宁, 邢景景, 刘宝骏, 包满珠, 刘国锋 (2019). 金盏花滇百合植株再生与离体快繁技术体系的建立. 植物学报 **54**, 773–778.
- 赵芹, 李效尊, 徐国鑫, 阴筱, 尹静静, 吴修 (2016). 莲组织培养与分子生物学研究进展. 分子植物育种 **14**, 1587–1594.
- Abe T, Futsuhara Y (1986). Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **72**, 3–10.
- Arunyanart S, Chaitrayagun M (2005). Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Sci Hortic* **105**, 411–420.
- Buathong R, Saetiew K, Phansiri S, Parinthawong N, Arunyanart S (2013). Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment. *Sci Hortic* **161**, 216–222.
- Deng XB, Xiong YQ, Li J, Yang D, Liu J, Sun H, Song HY, Wang YM, Ma JY, Liu YL, Yang M (2020). The establishment of an efficient callus induction system for lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plants* **9**, 1436.
- Guo HB (2009). Cultivation of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn. ssp. *nucifera*) and its utilization in China. *Genet Resour Crop Evol* **56**, 323–330.
- Jun MY, Karki R, Paudel KR, Sharma BR, Adhikari D, Kim DW (2016). Alkaloid rich fraction from *Nelumbo nucifera* targets VSMC proliferation and migration to suppress restenosis in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* **248**, 179–189.
- La-ongsri W, Trisonthi C, Balslev H (2009). Management and use of *Nelumbo nucifera* Gaertn. in Thai wetlands. *Wetlands Ecol Manage* **17**, 279–289.
- Liu QQ, Zhang DS, Liu FL, Qin M, Tian DK (2019). Micropropagation of *Nelumbo nucifera* 'Weishan Hong' through germfree mature embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **55**, 305–312.
- Mahmad N, Taha RM, Othman R, Saleh A, Hasbullah NA, Elias H (2014). Effects of NAA and BAP, double-layered media, and light distance on *in vitro* regeneration of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (lotus), an aquatic edible plant. *The Scientific World J* **2014**, 745148.
- Shou SY, Miao LX, Zai WS, Huang XZ, Guo DP (2008). Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Biol Plantarum* **52**, 529–532.
- Sridhar KR, Bhat R (2007). Lotus-A potential nutraceutical source. *J Agric Technol* **3**, 143–155.
- Yang M, Zhu LP, Pan C, Xu LM, Liu YL, Ke WD, Yang PF (2015). Transcriptomic analysis of the regulation of rhizome formation in temperate and tropical lotus (*Nelumbo nucifera*). *Sci Rep* **5**, 13059.
- Zhang XY, Wang XY, Wu TT, Li BX, Liu TQ, Wang R, Liu Q, Liu ZJ, Gong YQ, Shao CS (2015). Isoliquinoline induces apoptosis in triple-negative human breast cancer cells through ROS generation and p38 MAPK/JNK activation. *Sci Rep* **5**, 12579.

In Vitro Rapid Propagation of *Nelumbo nucifera*

Yaqian Xiong^{1,2}, Xianbao Deng^{1,3}, Huihui Zhang¹, Dong Yang^{1,3}, Heng Sun¹, Juan Liu¹, Mei Yang^{1,3*}

¹Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Center of Economic Botany, Core Botanical Gardens, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China

Abstract Using fresh embryos isolated from developing lotus seeds of 18 days after pollination as explants, a rapid propagation system of lotus was established through primary culture, subculture plantlets hardening and transplantation. Results showed that the primary culture medium of MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ sucrose+0.5 g·L⁻¹ activated carbon+0.8 g·L⁻¹ agar was the optimum for the explant growth. The explant induction rate was up to 85% after cultured for 60 days, Qihongyang had the highest amount of stem nodes. In the subculture, the optimal concentration of sucrose in the medium was 80 g·L⁻¹. When dividing aseptic seedling for subculture, cutting with two stem nodes showed the highest multiplication coefficient. The multiplication coefficient of different varieties was ranged from 4.0 to 6.7, and Qihongyang was the highest (6.7). Aseptic seedlings were suggested to be subcultured every 50 days, with high multiplication rates for up to 6 rounds of subcultures. The rooted plantlets were transplanted to pots containing medium of peat:pond soil=1:2 (v/v) during May to July, and the survival rate of transplanted plants was higher than 83.9%. Based on these results, using this *in vitro* propagation system, it is estimated that 1 465 seedlings be developed from a single lotus seed within one year. This study has established a rapid *in vitro* propagation system for lotus, which provides the basis for the factory scale production of lotus plantlets.

Key words lotus, aseptic seedlings, rapid propagation, plant regeneration

Xiong YQ, Deng XB, Zhang HH, Yang D, Sun H, Liu J, Yang M (2021). *In vitro* rapid propagation of *Nelumbo nucifera*. *Chin Bull Bot* **56**, 605–613.

* Author for correspondence. E-mail: yangmei815815@wbcas.cn

(责任编辑: 朱亚娜)