

帝王花种子无菌播种和快速繁殖研究

陈权¹, 陈慧兰¹, 李文剑²

(1. 上海孙桥现代温室种子种苗有限公司, 上海 201210; 2. 上海孙桥溢佳农业技术股份有限公司, 上海 201210)

摘要 [目的] 建立帝王花无菌播种和快速繁殖技术体系。[方法] 以 MS 或 1/2MS 为基础培养基, 添加不同激素组合, 筛选适宜的诱导、增殖及生根培养基。[结果] 1/2MS+6-BA 0.01 mg/L 为帝王花种子最佳诱导培养基, 培养 14 d 种子萌动, 35 d 形成幼苗; MS+6-BA 1.00 mg/L+IBA 0.01 mg/L 为最适宜的增殖培养基, 增殖倍数达 2.83 倍; 1/2MS+IAA 1.00 mg/L 为最佳生根培养基, 生根率达 96%, 苗高达 4.2 cm; 将种苗栽植于泥炭:珍珠岩=3:1 的基质上, 其移栽成活率为 85%。[结论] 该研究为快速繁殖帝王花优质种苗奠定了基础。

关键词 帝王花; 无菌播种; 激素配比; 组织培养

中图分类号 S604 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)02-0067-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.02.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Aseptic Sowing and Rapid Propagation Technology for *Protea cynaroides* L. Seed

CHEN Quan¹, CHEN Hui-lan¹, LI WEN-jian² (1. Shanghai Sunqiao Modern Greenhouse Seed and Seedling Co., Ltd., Shanghai 201210; 2. Shanghai Sunqiao Yijia Agriculture Technology Co., Ltd., Shanghai 201210)

Abstract [Objective] To establish a system of aseptic sowing and rapid propagation technology for *Protea cynaroides* L.. [Method] Different hormone combinations were added to MS or 1/2MS medium to screen the suitable induction, proliferation and rooting medium. [Result] The proper medium for the seeds induction of *Protea cynaroides* L. was 1/2MS medium containing 6-BA 0.01 mg/L, seed germination was observed on 14 days, seedling formation was observed on 35 days; the most suitable proliferation medium was MS medium containing 6-BA 1.00 mg/L+IBA 0.01 mg/L with proliferation times 2.83; the best seedling rooting medium was 1/2MS medium containing IAA 1.00 mg/L, rooting rate was up to 96%, plant length was up to 4.2 cm; seedlings were planted in substrate that composed with peat and perlite in a ratio of 3:1, the survival percent of transplantation could reach 85%. [Conclusion] The study laid a foundation for rapid breeding of high quality seedling of *Protea cynaroides* L..

Key words *Protea cynaroides* L.; Aseptic sowing; Hormones ratio; Tissue culture

帝王花(*Protea cynaroides* L.), 又名菩提花, 俗称木百合或龙眼花, 是山龙眼科普洛蒂亚属多年生木本植物, 两性花, 头状花序锥形, 基部有彩色的叶状苞片, 花期常为秋季至翌年春末。帝王花是山龙眼花卉中最著名、最有经济价值的种类, 也是世界上流行的新型高档木本切花^[1-3]。帝王花原产南非, 是南非共和国的国花, 在园林装饰方面越来越受到大家的欢迎。帝王花既是优良的鲜切花, 也适合制作干花, 作为鲜切花可以摆放很长时间, 因此受到世界上越来越多人的欢迎和喜爱, 市场潜力巨大。帝王花通常采用播种繁殖, 种子大多从国外进口, 价格昂贵, 加上种子具有休眠特性, 用常规方法播种出苗率极低^[4], 萌发周期也很长^[5], 导致用种子繁殖生产成本较高。笔者也曾尝试采用成年帝王花植株茎秆进行组培, 但帝王花属于灌木类, 腋芽发芽困难, 成活率低。而且在外植体诱导过程中很容易褐化, 这与前人的研究结果一致^[6-7], 因而不适合在生产上推广。故如何提高帝王花的繁殖率, 加快从播种到成株的速度成为目前亟待解决的问题。

国外已有利用合子胚和子叶组织直接诱导帝王花体细胞胚胎研究的报道^[8]。但尚未见利用无菌播种和组培快繁技术进行帝王花组培种苗工厂化生产方面的系统报道。笔者采用帝王花种子无菌播种获得的实生苗, 取其子叶以上部分作为诱导不定芽的材料, 并经过不断增殖, 最终获得大量组培苗木。这种帝王花快速繁殖的方法, 克服了常规繁殖方

法所面临的问题, 大大提高了帝王花种苗繁殖率, 为进口苗木品种种苗的国产化提供了可靠的技术保障。笔者研究了帝王花种子无菌播种和快速繁殖, 以期快速繁殖帝王花优质种苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 帝王花种子从上海开普公司购得。

1.2 方法

1.2.1 种子消毒。将帝王花种子表面的黑色绒毛去除, 在超净工作台上进行种子消毒。在清水中加入少量洗衣粉, 用洗衣粉水将种子表面的污垢清洗干净, 并在流水下冲洗干净。无菌条件下, 用 75% 乙醇处理 30 s, 用 0.05% HgCl₂ 浸泡消毒 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 无菌滤纸吸干。待接种。

1.2.2 培养条件。使用 240 mL 广口瓶为培养容器(下同), 每瓶灌装 40 mL 培养基, 培养基中均添加白砂糖 30 g/L、琼脂粉 5 g/L, pH 5.8, 培养温度(25±1)℃, 光照强度 2 500 lx。

1.2.3 无菌播种初代诱导培养。以 MS 或 1/2MS 为基本培养基, 将消毒后的种子剥去种皮后接种于添加不同激素的 MS 萌发诱导培养基上, 培养基配方: ① MS; ② MS+6-BA 0.01 mg/L; ③ MS+IBA 0.01 mg/L; ④ 1/2MS; ⑤ 1/2MS+6-BA 0.01 mg/L; ⑥ 1/2MS+IBA 0.01 mg/L, 观察不同培养基对帝王花种子萌发的影响。

1.2.4 增殖培养。以 MS 为基础培养基, 切取无菌实生苗上胚轴及以上部分, 接种于添加不同激素的增殖培养基上, 培养基配方: ① MS+TDZ 0.10 mg/L+IBA 0.01 mg/L; ② MS+TDZ 0.20 mg/L+IBA 0.01 mg/L; ③ MS+TDZ 0.50 mg/L+IBA 0.01 mg/L; ④ MS+6-BA 0.50 mg/L+IBA 0.01 mg/L; ⑤ MS+6-

作者简介 陈权(1977—), 男, 上海人, 农艺师, 从事植物组织培养研究。

收稿日期 2019-07-15

BA 1.00 mg/L+IBA 0.01 mg/L;⑥MS+6-BA 2.00 mg/L+IBA 0.01 mg/L。增殖培养继代周期为 35 d。连续继代 3 次后,统计种苗第 4 次继代的增殖倍数。种苗增殖倍数=培养 35 d 时植株数/接种时种苗数。

1.2.5 壮苗生根培养及炼苗。将增殖培养基中高度 2 cm 的单株切下,以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度 IBA、IAA (0、0.20、0.50、1.00、1.50 mg/L),壮苗生根培养 42 d,统计苗高、生根率。将完成生根过程的瓶苗预先放到温室内,散射光下炼苗 7 d,然后从培养瓶中取出植株,洗净培养基,用 700 倍多菌灵浸泡 2 min 后,移栽于泥炭土:珍珠岩=3:1 的混合基质中,搭小拱棚用薄膜覆盖,空气湿度保持 80%以上,环境温度 16~26 ℃。

1.3 数据分析 采用 Excel 2007 对试验数据进行统计和分析。

2 结果与分析

2.1 无菌播种初代诱导培养 帝王花种子表皮外有黑色绒毛包裹,影响种子消毒效果。直接剥取种子胚接种于播种培养基上,35 d 形成幼苗。培养 5 d 左右,胚逐渐吸水膨胀,

14 d 时,种子开始萌动转绿。处理①~⑥种子均能正常萌动,其中处理②和⑤萌动稍快,而处理⑤后期长势快且好,植株生长健壮。以处理⑤1/2MS+6-BA0.01 mg/L 为帝王花种子诱导最佳培养基,种子萌发率达 100%。

2.2 增殖培养 将初代诱导培养的帝王花种苗接种于各增殖培养基上,经过 3 次连续继代,统计观察第 4 次继代后的增殖及生长情况。由表 1 可知,在含 TDZ 的 3 个处理中,随着 TDZ 浓度的提高,帝王花种苗增殖倍数逐渐提高,处理③最高达 2.96 倍,但形成的芽小而弱,且少量叶片肥厚而脆弱,有玻璃化的趋势。在含 6-BA 的 3 个处理中,处理⑤增殖倍数最高,达 2.83 倍,芽长势好且粗壮。随着激素浓度的进一步提高,出现玻璃苗现象,处理⑥增殖倍数为 2.66 倍,增殖比例反而降低。从 6-BA 与 TDZ 对帝王花组培苗不定芽的诱导效果看,在含 6-BA 的增殖培养基中诱导的不定芽粗壮且生长速度快,芽伸长生长明显。在含较高浓度 TDZ 的增殖培养基中诱导的不定芽数量虽然最多,但诱导的芽弱且芽伸长生长缓慢。综合比较后认为,在实际生产中 MS+6-BA 1.00 mg/L+IBA 0.01 mg/L 为最适宜的增殖培养基。

表 1 6-BA 和 TDZ 对帝王花芽增殖的影响

Table 1 Effect of 6-BA and TDZ on the proliferation of *Protea cynaroides* L.

处理 Treatment	6-BA mg/L	TDZ mg/L	IBA mg/L	接种数 Number of inoculation//株	35 d 种苗数 Seedlings number on 35 days//株	增殖倍数 Proliferation times	生长状态 Growth situation
①	0	0.10	0.01	100	225	2.25 E	芽少而弱
②	0	0.20	0.01	100	275	2.75 C	芽多而弱
③	0	0.50	0.01	100	296	2.96 A	芽多而弱
④	0.50	0	0.01	100	198	1.98 F	芽少而壮
⑤	1.00	0	0.01	100	283	2.83 B	芽多而壮
⑥	2.00	0	0.01	100	266	2.66 D	有玻璃苗

注:同列不同大写字母表示不同处理间差异极显著($P<0.01$)

Note: Different capital letters in the same column mean extremely significant differences ($P<0.01$)

2.3 壮苗生根培养及驯化移栽 由表 2 可知,生长素(IAA、IBA)浓度低于 0.50 mg/L 时,帝王花组培苗生根率较低。生长素浓度在 0~1.00 mg/L 时,随着浓度的提高,生根率逐渐提高,植株高度也呈现相同变化,差异极显著。相同浓度下,

表 2 IAA 和 IBA 对帝王花壮苗生根培养的影响

Table 2 Effect of IAA and IBA on the strong seedling and rooting of *Protea cynaroides* L.

处理 Treatment	IAA mg/L	IBA mg/L	生根率 Rooting rate//%	株高 Plant height cm
①	0	0	0 I	2.1 G
②	0.20	0	12 H	2.1 G
③	0.50	0	45 E	2.8 E
④	1.00	0	96 A	4.2 A
⑤	1.50	0	88 B	3.8 B
⑥	0	0.20	15 G	2.1 G
⑦	0	0.50	36 F	2.6 F
⑧	0	1.00	83 C	3.6 C
⑨	0	1.50	75 D	3.4 D

注:同列不同大写字母表示不同处理间差异极显著($P<0.01$)

Note: Different capital letters in the same column mean extremely significant differences ($P<0.01$)

IAA 的生根效果优于 IBA。当 IAA 浓度为 1.00 mg/L 时,生根率最高达 96%,植株高度达 4.2 cm。无论是 IAA 还是 IBA,当浓度高于 1.00 mg/L 时,生根率和植株高度反而有所降低。综上所述,1/2MS+IAA1.00 mg/L 为最佳壮苗生根培养基,当植株接种于此壮苗生根培养基后,14 d 后陆续长出新根,35 d 后生根率达 96%,植株高度达 4.2 cm。

瓶内生根的植株经过 7 d 炼苗后,移栽于泥炭土:珍珠岩=3:1 的混合基质中,移栽成活率达 85%。

3 讨论

帝王花常规的种子发芽方法发芽所需时间长,发芽率低。因此种子无菌播种和快繁技术研究对解决帝王花种苗的繁殖具有重要意义。在可控的环境条件下,种子萌发率大大提高,因而无菌播种的优势明显。周辉明等^[9]对垂花蕙兰种子无菌播种和快速繁殖进行研究,结果认为适宜外源激素的添加能促进种子萌发,林辉锋等^[10]研究石橄榄种子无菌播种和快速繁殖,发现外源激素的添加更能促进石橄榄种子萌动。该研究得出相似结论,在种子萌发培养基中添加微量细胞分裂素能促进帝王花种子萌发,利于培育健壮植株,适宜的种子无菌播种培养基为 1/2MS+6-BA0.01 mg/L。

在帝王花的增殖培养中发现,在基本培养基中添加不同的细胞分裂素,增殖效果有明显差异。在添加 6-BA 的增殖培养基中诱导的不定芽数量少,芽粗壮且生长速度快,芽伸生长明显,而在添加 TDZ 的增殖培养基中诱导的不定芽数量多,芽弱且芽的伸生长受到抑制。任鹏斌等^[11]在研究 TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导效应时发现,TDZ 对魔芋不定芽的伸生长表现出较强的抑制作用,而 6-BA 对不定芽的伸生长则表现出较好的促进作用,该研究得出了与前人相同的研究结果。可见,不同的细胞分裂素种类和浓度,对于帝王花不定芽的分化、增殖效果不同。在生产过程中,结合种苗增殖的实际情况,6-BA 和 TDZ 可交替使用。

在植株壮苗生根阶段,较高浓度的生长素有利于帝王花组培苗生根,这可能与帝王花种苗内源生长激素较低有关。相同浓度下,IAA 对帝王花种苗的瓶内生根效果优于 IBA。该研究条件下 1/2MS+IAA 1.00 mg/L 为最佳壮苗生根培养基,当植株接种于此壮苗生根培养基后,14 d 后陆续长出新根,35 d 后生根率达 96%,植株高度达 4.2 cm。该研究还发现,NAA 对帝王花的生根无明显的促进作用。

移栽成活率是影响组培种苗工厂化生产成本的关键因素之一。在获得较为健壮种苗的基础上,通过加强移栽后温湿度的管控,提高种苗移栽成活率。该研究中瓶内生根的植株经过 7 d 炼苗后,移栽于泥炭土:珍珠岩=3:1 的混合基质中,移栽成活率达 85%,种苗长势良好。

4 结论

该研究以帝王花种子为试验材料,研究了不同激素及其浓度对帝王花种子萌发、芽增殖、壮苗生根的影响,筛选出了

适宜的诱导、增殖及壮苗生根培养基配方,建立了一套帝王花种子无菌播种和快速繁殖技术体系,具有种子萌发率高、芽增殖系数高、生根效果好、移栽成活率高等特点。该研究为帝王花种苗工厂化生产提供了可靠的技术保障,同时对于进口苗木品种种苗的国产化研究具有重要意义。

参考文献

- [1] ELIOVSON S. Proteas for pleasure how to grow and identify them [M]. Cape Town: Howad Timmins, 1965: 1-40.
- [2] MANNING L E, CONSIDINE J A, GROWNS D J. *Chamelaucium uncinatum* (Waxflowes), Family Myrtaceae [M] // JOHNSON K A, BURCHETT M. Native Australian plants. Sydney: University of New South Wales Press, 1996: 124-151.
- [3] 代色平, 朱纯, 黄花枝. 南非山龙眼科 (Proteaceae) 植物介绍 [J]. 广西园林, 2007, 29(6): 66.
- [4] DEALL G B, BROWN N A C. Seed germination in *Protea magnifica* Link [J]. South African journal of science, 1981, 77: 175-176.
- [5] WU H C, DU TOIT E S. Effects of temperature, light conditions and gibberellic acid on the in vitro germination of *Protea cynaroides* L. embryos [J]. Afr J Biotech, 2010, 9(47): 8032-8037.
- [6] WU H C, DU TOIT E S. Reducing oxidative browning during in vitro establishment of *Protea cynaroides* [J]. Scientia horticulturae, 2004, 100(1/2/3/4): 355-358.
- [7] 何丽娜, 潘会堂, 马琳, 等. 帝王花 (*Protea cynaroides*) 启动培养研究 [C] // 张启翔. 中国观赏园艺研究进展 2012. 北京: 中国林业出版社, 2012: 293-297.
- [8] WU H C, TOIT E S, REINHARDT C F. A protocol for direct somatic embryogenesis of *Protea cynaroides* L. using zygotic embryos and cotyledon tissue [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2007, 89(2/3): 217-224.
- [9] 周辉明, 林辉锋, 尚伟, 等. 垂花蕙兰种子无菌播种和快速繁殖 [J]. 福建农业学报, 2013, 28(10): 981-986.
- [10] 林辉锋, 陈昌铭, 尚伟, 等. 石橄榄种子无菌播种和快速繁殖研究 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(8): 161-162, 166.
- [11] 任鹏斌, 王阿娇, 刘佳晨, 等. TDZ 与 6-BA 对魔芋不定芽诱导的效应研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2014(8): 23-27.
- [12] 科技文摘 [J]. 中国园艺文摘, 2015, 31(6): 227-236.
- [13] 姚发展, 马万敏, 圣冬冬, 等. 不同浓度营养液对温室黄瓜生长发育的影响 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(19): 6181-6183.
- [14] 曹玉鑫, 曹红霞, 王萍, 等. 营养液浓度对番茄生长、品质以及耐贮性的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(7): 63-70.
- [15] 陈杰, 赵世静. 我国无土栽培营养液浓度管理方式现状及发展趋势 [J]. 现代农业科技, 2015(24): 192-193.
- [16] 柳美玉, 曹红霞, 杜贞其, 等. 营养液浓度对番茄营养生长期生长发育的影响 [J]. 北方园艺, 2015(8): 10-14.
- [17] 柳美玉, 曹红霞, 杜贞其, 等. 营养液浓度对番茄营养生长期干物质累积及养分吸收的影响 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2017, 45(4): 119-126, 133.
- [18] 李邵. 草莓无土栽培的几种模式 [J]. 农业工程技术, 2016, 36(7): 15-19.
- [19] 李灵芝, 郭荣, 李海平, 等. 不同氮浓度对温室番茄生长发育和叶片光谱特性的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(4): 965-969.
- [20] 李淑红, 王磊, 史文婷, 等. 不同营养液浓度对“巨峰”葡萄生长发育和果实品质的影响 [J]. 西北农业学报, 2018, 27(3): 394-401.
- [21] 季延海, 武占会, 于平彬, 等. 不同营养液浓度对水培韭菜生长适应性的影响 [J]. 中国蔬菜, 2017(11): 53-56.
- [22] 吴东升, 张燕, 曹云娥. 不同配方营养液对设施番茄品质及产量的影响 [J]. 宁夏农林科技, 2017, 58(11): 22-26.
- [23] 许雪, 季延海, 张广华, 等. 不同营养液配方对黄瓜营养液育苗效果的影响 [J]. 北方园艺, 2015(11): 44-48.
- [24] 马万征, 汪凯, 赵宽, 等. 不同营养液浓度对温室黄瓜生长发育中磷分配规律的研究 [J]. 北方园艺, 2015(1): 42-44.
- [25] 马万征, 赵凤, 马万敏, 等. 不同浓度铬对黄瓜氮磷钾吸收分配的影响 [J]. 应用化工, 2015, 44(1): 41-43, 47.
- [26] 常晓晓. 不同供氮水平对设施黄瓜养分吸收利用和产量的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

(上接第 66 页)

素含量能显著提高温室黄瓜的干鲜重、叶面积。

该试验结果表明,只有最适的营养液浓度和适宜的营养元素含量才能使无土栽培作物生长发育最好,从而提高产量,该试验主要是研究不同水肥供给对温室黄瓜生长发育的影响,对于黄瓜在生长发育各个阶段对各种元素的选择性、需求量有待于进一步研究。

4 结论

通过对不同浓度营养液下温室黄瓜生长发育状况的研究,可知在一定范围内随着营养液浓度的增加,温室黄瓜的生长发育状况越好,在 T_4 处理下温室黄瓜的生长发育状况最好,营养液浓度 T_4 为最适浓度。探究在不同氮、磷、钾元素含量下黄瓜植株的生长状态可确定各个营养元素含量的上限,在各个元素含量上限内营养元素含量增加则黄瓜植株生长发育越繁茂,若超过其各元素含量上限则对生长产生抑制作用,营养液中氮元素含量上限为 8.591 mg/L,磷元素含量上限为 3.32 mg/L,钾元素含量上限为 263.63 mg/L。

参考文献

- [1] 张雁, 高航, 金美玉, 等. 无土栽培营养液浓度对马铃薯植株生长和微型薯形成的影响 [J]. 延边大学学报, 2016, 38(2): 117-121.