

火龙珠种子无菌萌发研究

李晓亮¹, 杨世先¹, 杨进成¹, 王刚², 张钟¹, 陈佳清³, 周翠英⁴, 左丽娟¹, 邓成忠¹, 张玉荣¹, 段永华^{1*}

(1. 玉溪市农业科学院, 云南玉溪 653100; 2. 玉溪瑞珀花卉贸易有限公司, 云南江川 652600; 3. 峨山县化念镇农业农村综合服务中心, 云南峨山 653200; 4. 玉溪市江川区江城镇农业农村综合服务中心, 云南江川 652600)

摘要 [目的]建立火龙珠种子的无菌苗技术体系,为火龙珠的种苗快繁、种质保存、遗传转化及杂交实生苗获得等提供可行的技术途径。[方法]选择和采集4种不同大小的火龙珠果实进行灭菌、无菌播种和种子培养试验,调查记录种子的萌发情况。[结果]火龙珠果实的适宜灭菌方法是0.20% HgCl₂ 灭菌8~16 min;火龙珠不同种子的无菌萌发差异明显,相比其他3类果实的种子,最大横径为(11.19±0.21) mm、单果重(0.66±0.02) g的果实内种子发芽起始时间较早(30 d后),发芽持续时间较长(60 d),萌发频率较高(100%),发芽率较大(7.81±0.50)%,种子萌发形成的幼苗株高、叶片数、节间距、节段数、增殖系数等较大,幼苗生长势较强,是火龙珠无菌苗获得的适宜果实。[结论]通过选择合适的火龙珠果实进行种子无菌播种,可以建立火龙珠高效的无菌苗技术体系,且是一个重要的途径。

关键词 火龙珠;果实;种子;组织培养;无菌萌发

中图分类号 S 686 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0140-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.038



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Seed Aseptic Germination of *Hypericum*

LI Xiao-liang, YANG Shi-xian, YANG Jin-cheng et al (Yuxi Academy of Agricultural Sciences, Yuxi, Yunnan 653100)

Abstract [Objective] To establish the aseptic seedling technical system of *Hypericum* by its seeds, in turn to provide one feasible technical approach for rapid propagation of seedling, germplasm conservation, genetic transformation, and hybrid seedling, etc. [Method] 4 different types fruits of *Hypericum* were selected and gathered to carry out experiments of sterilization, aseptic seed sowing and seed culture. [Result] The results showed that a suitable approach for fruits of *Hypericum* was to treat 8-16 min by 0.20% HgCl₂, and there was a great difference in different seeds aseptic germination of *Hypericum*. Compared with seeds in the other 3 kinds of fruits, fruits containing maximum diameter of (11.19±0.21) mm and single fruit weight of (0.66±0.02) g were suitable fruits for obtaining aseptic seedling of *Hypericum*, because its seed had earlier (30 d after aseptic seed sowing) and last for 60 d of seed germination, higher germination frequency of 100%, higher germination rate of (7.81±0.50)%, higher indexes of seedlings height, leaf number, knot spacing, sections and proliferation coefficients, and stronger seedling growth vigour. [Conclusion] It is the seed aseptic germination of these suitable *Hypericum* fruits that establish an efficient aseptic seedling technical system of *Hypericum*, which is an important approach.

Key words *Hypericum*; Fruit; Seed; Tissue culture; Aseptic germination

种子是种子植物特有的器官,繁殖是其主要功能,这对于延续物种起着至关重要的作用。利用植物组织培养技术(简称“组培”)进行种子的培养,可以快速繁殖种苗,打破种子休眠以促进其萌发,解决作物杂交胚胎败育及繁育作物杂交的后代等具有重要意义^[1]。国内以种子开展植物组织培养研究的报道较多,如石斛^[2]、白芨^[3]、云南甜龙竹^[4]、牛角瓜^[5]、黄精^[6]、灰岩金钱莲^[7]等作物的组培快繁种苗技术研究;月季的休眠种子无菌萌发研究^[8];月季的胚挽救技术研究^[9];金花茶杂交种子的组培研究^[10]等。火龙珠(*Hypericum*),属金丝桃科欧金丝桃属,低矮灌木,单叶,对生或轮生,有腺点,多全缘,花瓣为5瓣,以黄色为主,雄蕊多数,通常合生,火龙珠常用作切果或观花,叶厚纸质,果形高圆、无青肩、成熟后大红亮丽,富光泽,经久贮存果色不变,娇艳可爱,深受人们的喜爱,是一种重要的观赏性花卉植物^[11]。近年来,火龙珠的生产发展迅速,因其种植投资成本低(不需大棚设施等)、产量高、价格好、见效快等优点,形成火龙

珠较好的种植经济效益,在云南省滇中地区的江川区、通海县等地广泛引进种植,且种植规模不断扩大^[12]。经查阅文献,目前有关火龙珠组织培养鲜见研究报道。无菌苗获得是植物组织培养中一个起始性和关键性的环节,对植物组织培养全过程起着至关重要的作用,亟待开展相关研究。为此,开展火龙珠不同种子无菌萌发的试验研究,拟解决3个关键问题:①火龙珠种子能否在常规培养条件下无菌萌发;②不同时期火龙珠种子无菌萌发情况;③能否通过火龙珠种子无菌萌发建立高效的无菌苗技术体系。通过研究,旨在建立火龙珠种子的高效无菌苗技术体系,为火龙珠的种苗快繁、种质保存、遗传转化及杂交实生苗获得等提供可行的技术途径。

1 材料与方法

1.1 材料 以粉果火龙珠果实内含有的种子为研究对象,火龙珠果实采集于云南省玉溪市江川区火龙珠种植田块。

1.2 方法

1.2.1 果实采集。按照果实的最大横径(mm)、单果重(g)2个指标将火龙珠果实划分成A、B、C、D4种类型(图1)。随机采集生长正常、无病虫害发生的4类果实,各类分别采集6个,密封后带回室内处理。

1.2.2 果实灭菌。摘除果实的叶子和叶柄,先用流水冲洗果实0.5 min,再用洗洁精水浸泡2.5 min后流水冲洗干净,

基金项目 玉溪市农业科学院科研项目“作物组培扩繁及配套栽培技术研究与应用”(YXNKYZP2020)。

作者简介 李晓亮(1982—),男,云南江川人,高级农艺师,硕士,从事植物(作物)组织培养技术研究与应用、果蔬作物的育种及栽培等。*通信作者,高级农艺师,从事果蔬作物育种及栽培研究。

收稿日期 2021-07-19

最后于超净工作台上用 75% 乙醇浸泡消毒 30 s 后进行果实 灭菌。



图 1 火龙珠 4 种类型的果实

Fig. 1 Fruit types of *Hypericum*

对 4 种类型的果实均设计 5 个灭菌试验处理: 处理① (0. 20% HgCl_2 灭菌 8 min), 处理② (0. 20% HgCl_2 灭菌 10 min), 处理③ (0. 20% HgCl_2 灭菌 12 min), 处理④ (0. 20% HgCl_2 灭菌 14 min), 处理⑤ (0. 20% HgCl_2 灭菌 16 min)。

1. 2. 3 无菌播种。在超净工作台上, 将灭菌后的果实纵切成两半, 随机挑取果实内部的种子接入 MS 培养基中。

1. 2. 4 种子培养。种子完成无菌播种后, 将种子置于温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度 2 000~3 000 lx, 光照时间 12 h/d 的培养室中培养 120 d。期间, 观察记录种子的颜色变化、萌发、苗生长等数据。

1. 3 数据统计与分析 数据统计按以下公式计算: 细菌污染率 = 细菌污染的瓶数 / 总瓶数 $\times 100\%$; 发芽率 = 发芽的种子数 / 种子总数 $\times 100\%$; 萌发频率 = 有种子萌发的瓶数 / 总瓶数 $\times 100\%$; 增殖系数 = 新生的茎段 (芽) 数 / 母株的茎段 (芽) 数 $\times 100\%$ 。采用 Excel 2003 和 SPSS 16. 0 统计软件进行数据统

计和分析。

2 结果与分析

2. 1 果实灭菌 不同灭菌处理对火龙珠 4 种类型果实的灭菌效果差异不明显, 各灭菌处理的细菌污染率均为 0, 成活率均为 100%, 灭菌效果较好, 说明 0. 20% HgCl_2 灭菌 8~16 min, 适宜用于火龙珠的果实灭菌。

2. 2 种子的无菌萌发情况 火龙珠不同类型种子无菌萌发的差异明显 (表 1、图 2)。A、B 类果实种子萌发频率和发芽率为 0; D 类果实的种子萌发频率最大, 为 100%, C 类果实的种子萌发频率仅为 28. 57%; D 类果实的种子发芽率、萌发形成的幼苗株高、叶片数、节间距、节段数、增殖系数均显著大于 C 类果实 ($P < 0. 05$); D、C 类果实种子萌发形成的幼苗苗生长势较强, D 类在母株幼苗上有明显的增殖分化现象发生, 而 C 类没有增殖分化现象发生 (图 2)。

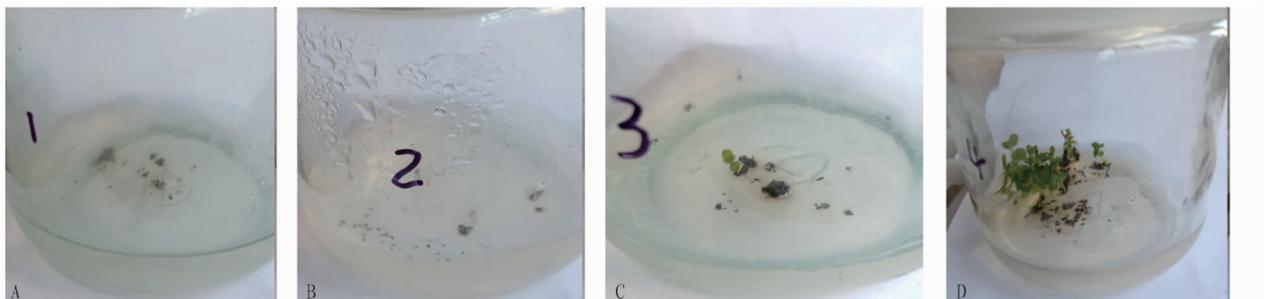
表 1 火龙珠不同类型果实对种子萌发的影响

Table 1 Effects of different types fruit on its seed germination in *Hypericum*

果实类型 Fruit type	萌发频率 Germination frequency//%	发芽率 Germination rate//%	株高 Plant height cm	叶片数 Leaf number	节间距 Knot spacing cm	节段数 Sections 段/株	增殖系数 Proliferation coefficients	生长势 Growth vigour
A	0	0 c	—	—	—	—	—	—
B	0	0 c	—	—	—	—	—	—
C	28. 57	1. 49 \pm 0. 07 b	0. 63 \pm 0. 06 b	3. 33 \pm 0. 33 b	0. 13 \pm 0. 01 b	3. 67 \pm 0. 33 b	0 b	叶绿、健壮
D	100	7. 81 \pm 0. 50 a	2. 14 \pm 0. 19 a	8. 33 \pm 0. 88 a	0. 38 \pm 0. 01 a	5. 67 \pm 0. 33 a	3. 67 \pm 0. 88 a	叶绿、健壮

注: 同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0. 05$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P < 0. 05$)



注: A、B、C、D 为 4 种果实类型

Note: A, B, C and D in figure were 4 types fruits

图 2 火龙珠不同类型果实的种子萌发情况

Fig. 2 Germination of seeds in different types fruit from *Hypericum*

2.3 种子萌发的时间动态规律 火龙珠不同种子进行无菌播种后,种子萌发的时间动态规律差异明显(图3)。A、B类果实的种子在120 d内无萌发现象发生;C类果实的种子在第60天后开始萌发,持续时间为30 d,发芽率为1.49%;D类果实的种子在第30天后开始萌发,持续时间60 d,第2个30 d期间的发芽率为3.24%,第3个30 d期间的发芽率为4.57%。D类果实比C类果实的种子发芽起始时间较早,持续时间较长,发芽率较高。由此可知,火龙珠种子的萌发时间为无菌播种后的60~90 d。

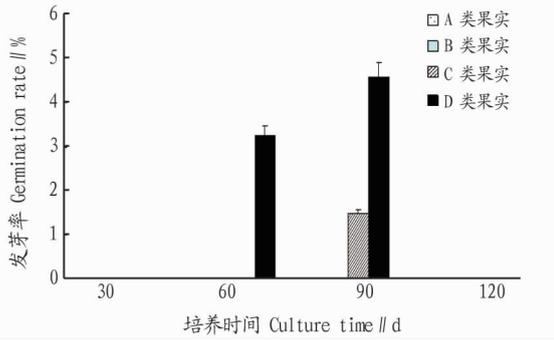


图3 火龙珠不同类型种子萌发的时间动态规律

Fig. 3 Temporal dynamics of germination in different types of *Hypericum* seeds

3 结论与讨论

外植体灭菌是植物组织培养中重要步骤,其是指用化学药物破坏微生物的细胞结构或使酶类失活,阻止正常代谢而杀死微生物,化学药剂选择和使用方法对外植体的灭菌效果有直接影响^[12]。该研究结合多年的组培经验,用0.20% HgCl₂ 灭菌火龙珠果实,不同处理间的灭菌效果差异不明显,但有较好的灭菌效果,细菌污染率为0,成活率为100%,这可能是由于火龙珠果实类型属于蒴果,果实内部的种子处于“无菌”态,只要将果实外部的微生物杀死,且有果实外部的“保护”作用,外部杀伤一定程度上对种子活性影响不大,就会得到理想的灭菌效果。由此说明,蒴果的灭菌时间弹性幅度较大,灭菌较易于操作,这为今后该类外植体的灭菌提供了重要参考,同时也说明对火龙珠果实进行灭菌比较容易,是获得火龙珠无菌外植体的理想途径。

该研究中,不同大小的火龙珠果实代表果实的不同发育时期,A、B、C、D 4类果实分别为幼果、近中年果、中年果、近成熟果。根据植物组培技术的原理^[1,13],理论上A、B、C、D 4类果实的种子都能萌发。但该研究显示,不同火龙珠种子无菌萌发的差异明显,A、B类果实的种子通过无菌播种得不到无菌苗,C、D类果实的种子通过无菌播种能很好地获得健壮的幼苗。这种差异可能是与培养基的成分有关。一般来说,大多数作物种子萌发的适宜培养基是MS,其常用于种子的无菌播种。该研究使用MS培养基对不同的火龙珠种子进行

培养,由于A、B类种子未成熟,可能是MS培养基不能促进其萌发,还需加入其他成分(如植物生长调节剂等),这需进行进一步研究。C、D类果实的种子在MS培养基上能萌发出健壮的幼苗,说明火龙珠通过种子无菌萌发建立无菌苗技术体系较容易,且可行。

该研究中,火龙珠D类果实的种子无菌播种到MS培养基上进行培养后出现了明显的增殖现象,这区别于以往的认识:一般来说,在植物组织培养中,须在MS培养基中加入植物生长调节剂(如6-BA、NAA等)后才会有增殖现象发生^[1,13],这可能是由于火龙珠生长分化能力较强;另一方面,在火龙珠A、B、C、D类果实中,D类果实的种子发芽起始时间较早,持续时间较长,相比其他作物的种子无菌发芽率(84.4%~93.0%)^[14-15],其种子发芽率较低,仅为7.81%,但其有100%的萌发频率,一个D类果实中含有很多非常细小的种子,可以播出同D类瓶一样的20~30个无菌瓶(约75粒种子/瓶),每个无菌瓶内的种子萌发形成的幼苗健壮、节段较多,且幼苗有增殖系数为3.67的增殖发生,因此,按这样计算,获得无菌苗是比较高效的。由此可见,该研究通过试验筛选出了适宜的火龙珠果实进行无菌播种,从而成功建立了火龙珠种子的高效无菌苗技术体系。通过该体系,不断增殖无菌苗的茎段或顶芽后完成生根培养就会产生大量的种苗,其成为火龙珠种苗组织培养快繁的重要途径,从而促进火龙珠的生产发展。

参考文献

- [1] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:北京农业大学出版社,1991.
- [2] 蔡宣梅. 福建铁皮石斛的组培快繁体系的研究[J]. 福建热作科技, 2020,45(4):1-4.
- [3] 马玲,仇文婷,王彦军,等. 珍稀中药材白芨组培快繁体系的建立[J]. 中国农学通报,2020,36(19):80-84.
- [4] 郑祥乾,陈凌娜,孙茂盛,等. 基于种子无菌苗的云南甜龙竹组培快繁研究[J]. 世界竹藤通讯,2019,17(4):26-29,33.
- [5] 严乔顺,何俊,李村富,等. 牛角瓜种子萌发和组培快繁技术研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2019,34(2):318-324.
- [6] 张瑜,包康佳,倪穗,等. 黄精种子萌发及组培技术研究[J]. 中国野生植物资源,2019,38(1):21-26.
- [7] 胡琦敏,黄云峰,张启伟. 灰岩金线莲种子萌发与组培快繁技术研究[J]. 南方农业学报,2016,47(11):1891-1896.
- [8] 闫海霞,蒋月喜,黄昌艳,等. 4种处理方法对月季种子萌发的影响[J]. 南方农业学报,2016,47(12):2108-2112.
- [9] 王丽花,瞿素萍,唐开学,等. 用胚挽救方法获得月季杂交后代植株[J]. 西南林学院学报,2008,28(6):53-56.
- [10] 吴丽君,高楠,陈达,等. 金花茶杂交种子无菌苗的组培快繁研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2018,42(5):32-38.
- [11] 百度百科. 火龙珠[EB/OL]. [2021-07-16]. <https://baike.baidu.com/item/%E7%81%AB%E9%BE%99%E7%8F%A0/10441698?fr=aladdin>.
- [12] 杨世先,张军云,李晓亮,等. 云南滇中地区火龙珠扦插育苗技术[J]. 农业科技通讯,2021(2):255-257.
- [13] 胡尚连,王丹. 植物生物技术[M]. 成都:西南交通大学出版社,2004.
- [14] 楼均威,张香琴,宋慧. 葫芦种子无菌苗组培体系建立[J]. 广西农学报,2017,32(1):47-49,59.
- [15] 徐永清,李海燕,王光海,等. 月见草种子的无菌萌发条件[J]. 安徽农业科学,2010,38(33):18832-18834.