

垂盆草人工种子制作技术研究

邢小姣¹, 陆 婷¹, 马 楠², 雷江丽^{2*}

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 深圳市、中国科学院 仙湖植物园, 广东 深圳 518000)

摘 要:选用垂盆草 2~4 mm 带腋芽茎段作为包埋外植体, 研究海藻酸钠浓度、激素配比、活性炭、离子交换时间及人工种子培养条件对人工种子成型、萌发及成苗的影响, 探索适合垂盆草的人工种子制作方法。结果表明, 采用滴珠法, 以 MS+4% 海藻酸钠+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA 为人工胚乳, 与 2% CaCl₂ 水溶液发生离子交换反应 15 min 后获得的人工种子呈规则的球形、富弹性, 在 MS 培养基中培养 20 d 萌发率达 95%, 30 d 生根率达 90%, 在培养皿中催芽成苗率达 60%, 为制备垂盆草人工种子的适宜方法。

关键词:垂盆草; 人工种子; 人工胚乳

中图分类号:S723.131 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)06-0169-06

Preparation Technique on Artificial Seeds of *Sedum sarmentosum*

XING Xiao-jiao¹, LU Ting¹, MA Nan², LEI Jiang-li^{2*}

(1. School of Forestry & Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China;
2. Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen & Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518004, China)

Abstract: Effects of synthetic endosperm components, activated carbon and germination conditions on the germination and rooting rate of artificial seeds of *Sedum sarmentosum* were researched by using 2—4 mm shoot cuttings with the buds used as propagules. The optimal medium used as artificial endosperm was MS + 4% sodium alginate+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA. The spherical and elastic artificial seeds were prepared after dropping the shoot cuttings into the solution of 2% CaCl₂ for 15 min. The germination rate of the artificial seeds was 95% after culture for 20 days in MS medium, the rooting rate was 90% after 30 days, and the seedling rate was 60% in a Petri dish germination. This formula was a suitable combination of artificial seeds for *S. sarmentosum*.

Key words: *Sedum sarmentosum*; artificial seed; artificial endosperm

垂盆草(*Sedum sarmentosum*)为景天科景天属多年生草本植物, 广泛分布于我国大部分地区^[1]; 常生于山坡岩石缝隙中, 生长势强, 茎肉质, 卧地部分节处生根分枝, 匍匐覆盖地面能力强^[2]。垂盆草可全草入药, 具有清热解毒、利尿等功能^[3]; 因其突出的抗旱能力及生态适应性, 且扦插繁殖容易, 被广泛应用于屋顶绿化^[4-8]; 垂盆草耐瘠薄, 生命力极强, 是边坡绿化的极好材料; 但其在华南地区未见开花, 种子不易获得, 一定程度上阻碍了其应用。

人工种子繁殖与天然种子相比, 具有繁殖速度快、生产周期短, 可工厂化大规模制备、贮藏、迅速推广、生产不受季节限制等优点^[9-10]。目前, 人工种子的研制在蔬菜和药用植物上已有进展, 如胡萝卜、铁皮石斛等^[11-16]。本研究以垂盆草带腋芽的茎段为材料, 通过优化海藻酸钠和不同激素组合的人工胚乳组分, 比较添加活性炭和不同培养条件对人工种子萌发率和生根率的影响, 为垂盆草的繁育提供一条新途径, 以期在边坡绿化客土喷播中应用。

收稿日期: 2016-02-17 修回日期: 2016-05-24
基金项目: 深圳市城市管理局基金项目(2015023)。
作者简介: 邢小姣, 女, 在读硕士, 研究方向: 园林植物遗传育种。E-mail: xing-xiaojiao@qq.com
* 通信作者: 雷江丽, 女, 博士, 教授级高工, 研究方向: 园林植物种质资源评价与利用。E-mail: lei-jl@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

带腋芽茎段采自深圳市仙湖植物园科普试验园繁育的垂盆草植株。

1.2 方法

1.2.1 垂盆草人工种子的制作 选择垂盆草带腋芽茎段,经 0.1% HgCl₂ 消毒 2 min,用无菌水冲洗 3~4 次后,切成 2~4 mm 带腋芽的茎段作为人工种子种胚,采用滴珠法制作人工种子。具体步骤是将 2~4 mm 茎段悬浮在半凝胶状态海藻酸钠溶液中充分混合,浸泡 3~4 min,然后用胶头滴管逐个吸取茎段滴入 2% CaCl₂ 水溶液内,形成人工种子用无菌水冲洗 2~3 次,置于滤纸上吸取表面水分即得到人工种子。

1.2.2 海藻酸钠浓度和离子交换时间对人工种子成形的影响 将 2%、3%、4%与 5%海藻酸钠溶液分别与 2% CaCl₂ 水溶液发生离子交换,交换时间设置 10、15 min 与 20 min 3 个处理,每处理重复 3 次。观察人工种子成球效果及韧性。

1.2.3 人工胚乳配方对人工种子萌发及生根的影响 选用 2%、3%与 4%海藻酸钠(A),0、0.5 mg·L⁻¹与 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA(B),0、0.05 mg·L⁻¹与 0.1 mg·L⁻¹ GA₃(C)与 0、0.5 mg·L⁻¹与 1.0 mg·L⁻¹ NAA(D)4 因素 3 水平 L₉3⁴ 正交试验^[17],离子交换时间为 15 min,将制作好的人工种子播于不加激素的 MS 培养基中培养,每处理 30 粒,重复 3 次。培养温度为(25±1)℃,每天光照 16 h,光照强度 2 000 lx,统计不同人工胚乳包埋制作的人工种子的萌发及生根数。

1.2.4 活性炭对人工种子萌发及生根的影响 用正交试验获得的最佳包埋基质配方制作人工胚乳,在其中添加 0.1%的活性炭与 2% CaCl₂ 溶液交换反应 15 min 制作人工种子,以不加活性炭制作的人工种子做对照。每处理 30 粒,重复 3 次,播于铺有湿滤纸的培养皿中,保持培养皿内滤纸湿润。培养条件同上,统计人工种子的萌发和生根数。

1.2.5 不同培养条件对人工种子萌发及生根的影响 以正交试验获得的最佳包埋基质配方做人工胚乳,离子交换 15 min 后制作的人工种子,分别播于不加激素的 MS 培养基(3%蔗糖、6 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.8)和铺有 2 层湿滤纸的培养皿中,保持培养皿内滤纸湿润。每处理 30 粒,重复 3 次。培养条件同上,统计人工种子的萌发率和生根数。

1.2.6 数据统计及分析 以人工种子腋芽突破人工种皮 0.2 cm 以上为标准记为出芽,不定根突破人

工种皮 0.2 cm 以上为标准记为生根,20 d 统计人工种子的萌发数,30 d 统计生根数。

萌发率=萌发的人工种子数/供试人工种子总数×100% (1)

生根率=生根的人工种子数/萌发的人工种子数×100% (2)

试验数据用 SPSS 20 软件处理并统计分析。

2 结果与分析

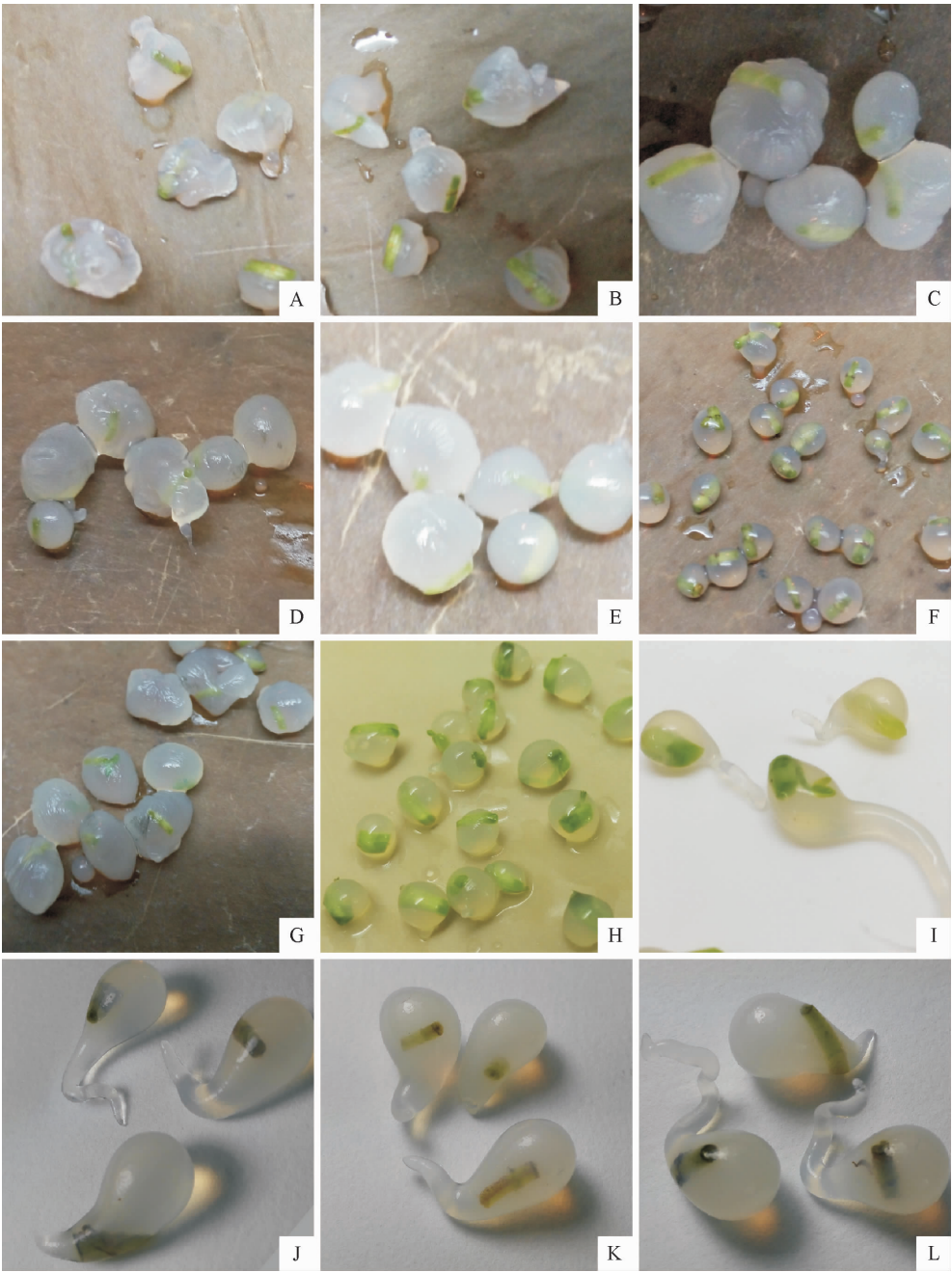
2.1 海藻酸钠浓度和离子交换时间对人工种子形成的影响

不同浓度的海藻酸钠对人工种子成球时间和形成的质量影响较大。海藻酸钠浓度较低时,人工种子成形时间较长,颗粒不均,不能成球,种子较软且易粘连(图 1A~E);浓度过高时,虽然离子交换时间缩短了,但人工种子有拖尾,硬度大,透明度低(图 1I~L);采用 5%的海藻酸钠即使在 2% CaCl₂ 溶液中反应 10 min,获得的人工种子也有拖尾现象,种子已基本无弹性,且随着反应时间的加长硬度明显增加。综合分析表明,3%的海藻酸钠溶液在 2% CaCl₂ 溶液中反应 20 min 和 4%的海藻酸钠溶液在 2% CaCl₂ 溶液中反应 15 min 形成的人工种子呈透明状,颗粒均匀、硬度适中,富有弹性(图 1F、H)。

2.2 海藻酸钠和激素对垂盆草人工种子萌发及生根的影响

极差分析表明,4 因素对于垂盆草人工种子的萌发率和生根率的影响程度依次为 A>D>C>B,即海藻酸钠浓度对人工种子的萌发及生根影响最大,其次是激素 NAA 和 GA₃,6-BA 的影响相对较小;比较各因素 3 个水平的 K 值来看,对垂盆草人工种子的萌发率和生根率的影响程度均为 A₃>A₂>A₁,B₃>B₁>B₂,C₃>C₁>C₂,D₂>D₃>D₁(表 1);综合分析表明,垂盆草人工种子的适宜人工胚乳配方组合为 4%海藻酸钠+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA。后期试验验证可知,该配方组合与 2% CaCl₂ 溶液反应 15 min 制作的人工种子的萌发率可达 95%以上,并且发芽势高,生根率达到 90%。

A 因素(海藻酸钠)、C 因素(GA₃)、D 因素(NAA)对人工种子萌发率的影响达到极显著水平(P<0.01),B 因素(6-BA)对萌发率的影响达到显著水平(0.01<P<0.05)。就生根情况而言,A 因素(海藻酸钠)、C 因素(GA₃)、D 因素(NAA)对人工种子平均生根率的影响达到极显著水平,B 因素(6-BA)影响不显著。人工胚乳中不添加激素,垂盆草人工种子也能够萌发及生根,但成苗率低,仅



注:A,B,C 分别为 2%海藻酸钠在 2% CaCl₂ 溶液中反应 10、15 min 与 20 min;D,E,F 分别为 3%海藻酸钠在 2% CaCl₂ 溶液中反应 10、15 min 与 20 min;G,H,I 分别为 4%海藻酸钠在 2% CaCl₂ 溶液中反应 10、15 min 与 20 min;J,K,L 分别为 5%海藻酸钠在 2% CaCl₂ 溶液中反应 10、15 min 与 20 min。

图 1 不同海藻酸钠浓度和离子交换时间作用下的人工种子形态特征

Fig.1 Morphological features of the artificial seeds under the condition of the different sodium alginate concentrations and ion-exchange time

20%;添加激素可促进垂盆草人工种子的萌发及生根,但激素种类不同对人工种子的萌发及生根的促进作用不尽相同,其中 NAA、GA₃ 对促进人工种子的萌发及成苗作用高于 6-BA。

2.3 活性炭对垂盆草人工种子萌发的影响

以 4%海藻酸钠+1.0 mg · L⁻¹ 6-BA+0.1 mg · L⁻¹ GA₃+0.5 mg · L⁻¹ NAA 制作人工胚乳,与

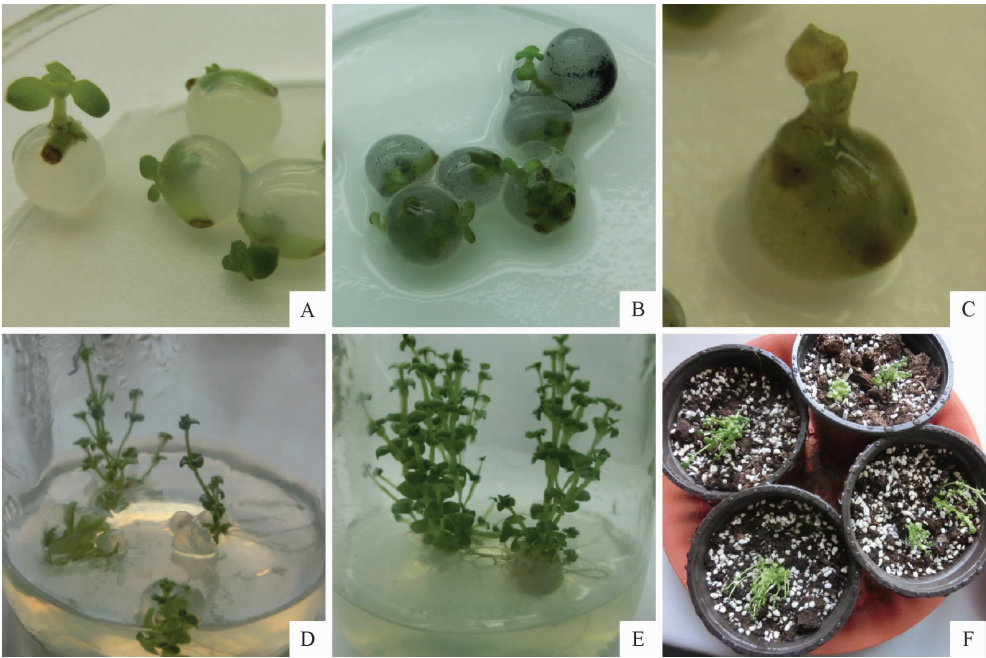
2% CaCl₂ 水溶液发生离子交换反应 15 min,添加 0.1%的活性炭,制作的人工种子颜色微发黑(图 2B),在培养皿内萌发率为 83.3%,其硬度大于不加活性炭的人工种子(图 2A),萌发率低于不加活性炭的人工种子。添加活性炭的人工种子在培养皿中培养,萌发第 10 天有 30%的人工种子出现死亡现象(图 2C)。

表 1 垂盆草人工种子萌发率和生根率分析

Table 1 Range value on the germination and rooting rate of artificial seeds of *S. sarmentosum*

组合号		A 海藻酸钠 /%	B 6-BA /(mg·L ⁻¹)	C GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	D NAA /(mg·L ⁻¹)	P _{平均萌发率} /%	P _{平均生根率} /%
1		1(2)	1(0)	1(0)	1(0)	26.65	20.5
2		1(2)	2(0.5)	2(0.05)	2(0.5)	31.65	28.5
3		1(2)	3(1.0)	3(0.1)	3(1.0)	45.00	42.0
4		2(3)	1(0)	2(0.05)	3(1.0)	60.00	55.0
5		2(3)	2(0.5)	3(0.1)	1(0)	53.35	51.5
6		2(3)	3(1.0)	1(0)	2(0.5)	70.00	68.0
7		3(4)	1(0)	3(0.1)	2(0.5)	95.00	90.0
8		3(4)	2(0.5)	1(0)	3(1.0)	81.65	75.5
9		3(4)	3(1.0)	2(0.05)	1(0)	71.65	58.5
平均萌发率	K1	32.767	60.550	59.433	50.550		
	K2	61.117	53.883	52.767	63.833		
	K3	82.767	62.217	64.450	62.217		
	R(极差)	50.000	8.334	11.683	13.333		
平均生根率	K1	30.333	55.167	54.667	43.500		
	K2	58.167	51.833	47.333	62.167		
	K3	74.667	56.167	61.167	57.500		
	R(极差)	44.334	4.334	13.834	18.667		

注:K₁、K₂、K₃ 分别表示水平 1、水平 2、水平 3 下萌发率或生根率的平均值,括号中的数值为浓度值。



注:A、不加活性炭的人工种子;B、添加 0.1%的活性炭的人工种子;C、添加活性炭的人工种子死亡现象;D、在培养基中萌发 10d 的人工种子;E、在培养基中萌发 25d 的人工种子;F、移入栽培基质中 7d 后成活的人工种子种苗。

图 2 人工种子的萌发及成苗

Fig. 2 Germination and seedling development of artificial seeds

2.4 不同培养条件对人工种子萌发及生根的影响

在不加激素的 MS 培养基中和在铺有湿滤纸的培养皿中培养的垂盆草人工种子的萌发率均在 95% 以上,但在 MS 培养基中的人工种子 10 d 左右生根,生长速度快,生根率达 90%,而培养在培养皿

中的人工种子 15 d 左右生根,生长速度相对较慢,且生根率仅 60%。MS 培养基中的人工种子生根快且多,移入栽培基质中 7 d 后成活率达 100%(图 2 D、图 2E、图 2F)。

3 结论与讨论

海藻酸钠凝胶包埋系统具有透明、无毒无害、价格较低廉而且操作工艺简单等特性被普遍用于人工种子制作;本研究发现海藻酸钠对人工种子的成球及萌发影响较大,与前人在东北矮紫杉和金线莲人工种子制作研究的结果一致^[15-16];海藻酸钠作为包埋剂制作垂盆草人工种子的适宜条件为 4%海藻酸钠溶液在 2%的 CaCl₂ 水溶液中离子交换反应 15 min,形成的人工种子呈球形,硬度适中且富有弹性,有利于人工种子的萌发成苗。范腾飞^[18]等在铁皮石斛人工种子制备研究中得出随着海藻酸钠浓度的升高,人工种子的失水率逐渐降低,有利于人工种子的贮藏。虽然本研究得出 3%海藻酸钠溶液在 2% CaCl₂ 溶液中离子交换 20 min 制备的人工种子也能达到质地要求,但考虑到垂盆草人工种子的萌发率及后期贮藏的需要,选用 4%海藻酸钠溶液作为人工包埋介质较为适宜。

人工胚乳提供人工种子萌发所需的生长激素和营养物质等,在人工胚乳中可添加基本培养基、糖类和生长激素、灭菌剂、防腐剂、活性炭与天然有机物^[19];本研究得出添加激素可促进垂盆草人工种子的萌发及生根,其中适宜浓度的 NAA 和 GA₃ 对人工种子萌发具有较强的促进作用,而 6-BA 的作用略低于 NAA 和 GA₃,与东北矮紫杉人工种子制备研究中结论相似^[15]。人工胚乳中添加一些亲水性较好储水性强的成分如活性炭、淀粉、纤维素等,可加强人工种子的保水性^[10,13,15],本研究添加活性炭虽提高了人工种子的韧性,但却抑制了其萌发。

研究人工种子目的在于代替自然种子应用于农业生产中。目前大部分人工种子的培养都是在无菌条件下才能保证较高的萌发率,李伟平^[20]等将白及人工种子在大棚内直播,2 个月后可见健康的幼苗,但管理不善会出现污染风险;曾颖苹^[21]在铁皮石斛人工种子外包一层含有杀虫剂和杀菌剂的种衣剂薄膜,在自然条件下进行萌发可提高人工种子的萌发率;张明生^[22]研究发现杜鹃兰人工种子的萌发率和成苗率在不同萌发基质中的效果依次为 MS 培养基>蛭石>复合基质(腐殖质:蛭石:沙为 2:1:1)。本研究结果表明,MS 培养基无菌培养人工种子的萌发率和生根率高于在培养皿中培养,培养皿中催芽成苗率可达 60%。但在实际应用中,生长条件相对恶劣,很难做到无菌生产和适宜条件培养成苗,因而,为达到边坡绿化客土喷播应用之目的,如何提高垂盆草人工种子的抗菌能力和延长其储藏

时间需进一步研究。

参考文献:

[1] 冯黎,张洁,荆瑞,等.北京地区景天属植物资源及园林应用评价[J].西北林学院学报,2015,30(5):278-282.
FENG L,ZHANG J,JING R,*et al.* Investigation and analysis of resources and application of *Sedum* in Beijing[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(5):278-282. (in Chinese)

[2] 张蕾.垂盆草屋顶草坪建植技术研究[D].南京:南京农业大学,2008.

[3] 张洪超,兰天,张晓辉.垂盆草化学成分与药理作用研究进展[J].中成药,2005(10):1201-1203.

[4] 董秋玲.垂盆草快速建坪技术[J].南方农业·园林花卉版,2009(1):38-39.

[5] 张蕾,江海东.光照强度对垂盆草建植期生长和生理特性的影响[J].草业科学,2013,30(3):447-451.

[6] 何吉忠.垂盆草栽培技术[J].中药材,1990(4):7-8.

[7] 林永木,王玲,马立华.垂盆草越冬及扦插繁殖技术[J].东北林业大学学报,2009(6):16-17.
LIN Y M,WANG L,MA L H. Cutting reproduction techniques for *Sedum sarmentosum* and its overwintering characteristics[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2009(6):16-17. (in Chinese)

[8] 孙朋朋.垂盆草组织培养高效再生体系的研究[J].青海草业,2014(4):22-27.

[9] MURASHIGE T. The impact of plant tissue culture on agriculture[M]//THORPE T, eds. . Frontiers of tissue culture. the international association for tissue culture. Canada:University of Calagary Alberta,1978:15-26.

[10] 丁绍欢,张明生,史梦娜.植物人工种子技术研究进展[J].种子,2011(3):60-66.

[11] 李爱贞,刘毅君,陈艳红.胡萝卜人工种子包衣材料的筛选[J].亚热带植物科学,2010(2):17-20.
LI A Z,LIU Y J,CHEN Y H. Screening of embedding medium for artificial seeds of carrot somatic embryos[J]. Subtropical Plant Science,2010(2):17-20. (in Chinese)

[12] 汤绍虎,孙敏,李坤培,等.甘薯人工种子研究[J].作物学报,1994,20(6):746-750.
TANG S H,SUN M,LI KP,*et al.* Studies on artificial seed of *Iomoea batatas* L. Lam[J]. Acta Agronomica Sinica,1994,20(6):746-750. (in Chinese)

[13] 赖佳.铁皮石斛液体悬浮培养和人工种子的研究[D].雅安:四川农业大学,2013.

[14] 程力辉.半夏人工种子技术研究[D].兰州:甘肃农业大学,2009.

[15] 孙筱筠,张宗申.东北矮紫杉人工种子的制备[J].大连工业大学学报,2010,39(5):321-324.
SUN X J,ZHANG Z S. Preparation of artifical seeds of *Taxus cuspidata* cv. Nana [J]. Journal of Dalian Polytechnic University,2010,39(5):321-324. (in Chinese)

[16] 张明生,李花,阚世超,等.金线莲人工种子制作技术及萌发研究[J].种子,2007(11):50-53.

[17] 刘志峰,汪加魏,邓世鑫,等. 油橄榄夏季芽接技术研究[J]. 西北林学院学报,2014,29(4):119-122.
LIU Z F,WANG J W,DENG S X,*et al.* Bud grafting technology of olive in summer[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(4):119-122. (in Chinese)

[18] 范滕飞,金朝霞,张宗申,等. 铁皮石斛人工种子制备关键技术研究[J]. 河南农业科学,2014,43(9):141-145.
FAN T F,JIN Z X,ZHANG Z S,*et al.* Key techniques for preparation of *Dendrobium officinale* artificial seeds[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2014,43(9):141-145. (in Chinese)

[19] GARDI T,PICCIONI E,STANDARDI A. Effect of bead nutrient composition on regrowth of stored vitro-derived encapsulated microcuttings of different woody species[J]. Journal of Microencapsulation,1999,16(1):13-25.

[20] 李伟平,田莎莎,鲁光耀,等. 利用人工种子技术快速繁殖白及[J]. 中国中药杂志,2012(22):3386-3390.

[21] 曾颖苹,朱乾坤,王万军. 铁皮石斛人工种子包衣技术研究[J]. 北方园艺,2012(17):155-158.

[22] 张明生,彭斯文,杨小蕊,等. 杜鹃兰人工种子技术研究[J]. 中国中药杂志,2009(15):1894-1897.

(上接第 161 页)

[13] DUAN J,XU C Y,JACOBS D F,*et al.* Exponential nutrient loading shortens the cultural period of *Larix olgensis* seedlings [J]. Scandinavian Journal of Forest Research,2013,28(5):409-418.

[14] WANG Z,MA LY,JIA Z K,*et al.* Interactive effects of irrigation and exponential fertilization on nutritional characteristics in *Populus*×*euramericana* cv. ‘74/76’ cuttings in an open-air nursery in Beijing,China [J]. Journal of Forestry Research,2016,273(3):569-582

[15] MANAS P,CASTRO E,DE LAS HERAS J. Quality of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings using waste materials as nursery growing media [J]. New Forests,2009,37(3):295-311.

[16] 赵文英,蒋明,许娜. 7 个云杉树种 1 年生苗对补光的响应[J]. 甘肃林业科技,2011,36(1):25-27.
ZHAO WY,JIANG M,XU N. Response of supplemental lighting on 1 year old seedling of 7 species of *Picea asperata* [J]. Journal of Gansu Forestry Science and Technology,2011,36(1):25-27. (in Chinese)

[17] 吕月玲,梁心蓝,吴发启. 油松苗木活力与相对电导率关系的研究 [J]. 西北林学院学报,2007,22(6):21-23.
LV Y L,LIANG X L,WU F Q. Relationship between seedling vigor and the relative conductivity of *Pinus tabulaeformis* seedlings [J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(6):21-23. (in Chinese)

[18] CARLES S Y,LAMHAMEDI M S,STOWE D C,*et al.* Relationships between frost hardiness, root growth potential, and photosynthesis of nursery-grown white spruce seedlings [J]. Annals of Forest Science,2011,68(8),1303-1313

[19] 樊江斌,张金龙,许新平,等. 陕西 2013 年核桃晚霜冻害发生情况调查与分析 [J]. 西北林学院学报,2014,30(5):120-124.
FAN J B,ZHANG J L,XU X P,*et al.* An investigation on frozen damage of walnut trees in Shaanxi Province [J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,30(5):120-124. (in Chinese)

[20] ALLSTADT AJ,VAVRUS SJ,HEGLUND P,*et al.* Spring plant phenology and false springs in the conterminous US during the 21st century [J]. Environmental Research Letters,2015(10):1-24.