

离体培养诱导多头型苏铁

林庆良^{1*}, 施榕斌², 林永灿², 林晓白², 龚金才², 邹娜³

(¹ 福建农林大学园艺学院, 福州 350002; ² 福州市建新花卉集团公司, 福州 350002; ³ 福建农林大学林学院, 福州 350002)

摘要: 进行了苏铁种子、子叶、鳞片、顶芽的试管育苗和多头苏铁诱导的研究。结果表明: 试管播种的种子比常规播种提早发芽6个月, 发芽率高; 在 ER + BA 2 mg/L + IBA 0.4 mg/L + 苏铁外种皮汁 2 mL/L 培养基中, 多头诱导率达 76.7%。离体培养的子叶和鳞片的芽诱导率分别达到 53.3% 和 33.3%; 试管苗在 4~7 月份移栽为好, 成活率可达 90% 以上。

关键词: 苏铁; 多头型; 离体培养

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1575-04

Plantlets with Multi-shoots of *Cycas revoluta* Thunb. in Vitro

LIN Qing-liang^{1*}, SHI Rong-bin², LIN Yong-can², LIN Xiao-bai², GONG Jin-cai², and ZOU Na³

(¹ College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; ² Jianxin Flower Group Company of Fuzhou, Fuzhou 350002, China; ³ College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The plantlet regeneration, with multi-shoots especially, derived from seed, cotyledon, squama and tip-bud of *Cycas revolute* Thunb. was studied *in vitro*. The results showed that the germination of seed cultured *in vitro* could be six months earlier than that of sowing in normal condition. When inoculated on ER + BA 2 mg/L + IBA 0.4 mg/L + juice of *Cycas revolute* Thunb. episperm 2 mL/L, the rate of multi-shoots was 76.7%. The differentiation rate of bud derived from cotyledon and squama was 53.3% and 33.3%, respectively. It will be better when plantlets were transplanted from April to July; and the survival rate was more than 90%.

Key words: *Cycas revoluta*; Multi-shoot; In vitro culture

苏铁 (*Cycas revoluta* Thunb.) 是我国一级保护植物, 可以用于庭院绿化, 盆景制作等, 叶片还是制作插花的好材料。市场上销售的苏铁产品, 绝大多数是单头型或多子型苏铁 (基部长出多个芽), 极少有多头型苏铁 (顶部长出多个芽)。多头苏铁因稀少及其造型独特, 价格往往也较高。

目前世界上对苏铁离体培养技术的研究还很少, 仅见国外有两篇 (Rinaldi, 1999; Chaplot et al., 2000), 其中, Rinaldi 通过苏铁的合子胚、子叶、鳞片离体培养, 获得了再生植株。国内只有一则为本项目组报道离体培养多头苏铁的信息 (邹录顺, 2000)。培育多头苏铁的常规方法有截顶法、劈干法等 (顾宝岗和朱晓华, 1998; 傅瑞树等, 2001; 刘英, 2001), 但成功率不高, 而且容易引起整株腐烂, 成本高。

笔者采用离体培养技术, 经过多年的摸索, 诱导出大量的多头型苏铁种苗, 现报道如下。

收稿日期: 2007-07-20; 修回日期: 2007-10-08

基金项目: 福建省科技厅资助项目 (98-z-91)

* E-mail: linqingliang16@sina.com

致谢: 本研究得到了华南农业大学林顺权教授的大力支持和指导, 福建农林大学潘大仁教授在英文摘要上给予指导修改, 在此表示衷心感谢。

1 材料与方法

供试材料为苏铁的种子、子叶、鳞片和顶芽。先把成熟种子清洗干净,削去外种皮,用水冲洗干净,晾干。再去掉中种皮和内种皮,用 0.1% 升汞消毒 10~20 min,无菌水冲洗 3~5 次,接种于固体培养基中。离体萌发的子叶、鳞片和顶芽作为诱导再生芽的材料。

以 ER、MS 和 MT 为基本培养基,附加不同浓度的 BA、IBA 和苏铁外种皮汁,砂糖 20 g/L,琼脂 7 g/L, pH 5.8。

种子培养用 25℃ 和 30℃,子叶、鳞片和顶芽培养用 25~28℃。种子早期用暗培养,发芽后转为光照培养,光照强度 1 000 lx,每天光照 12 h。

种子在 1 月份接种,每月观察记载一次发芽情况。子叶、鳞片和顶芽接种后 30 d 统计再生芽数量。

2 结果与分析

2.1 不同培养温度对种子发芽的影响

种子接种到 ER + BA 2 mg/L + IBA 0.4 mg/L + 苏铁外种皮汁 2 mL/L 培养基后,分别放在控制温度为 25℃ 和 30℃ 的培养室中,每处理设 3 个重复,每重复 100 粒。从表 1 可以看出,高温(30℃)对早期培养有较好的促进作用,但总的发芽率无显著差异。

表 1 不同温度下苏铁种子的发芽率

Table 1 Effects of different temperatures on seed germination

(%)

温度 Temperature(℃)	2 月 February	3 月 March	4 月 April	5 月 May	6 月 June	7 月 July	8 月 August	9 月 September
30	1.27	10.80	41.83	45.53	52.85	73.17	84.96	89.55 a
25	0	7.70	50.85	56.44	66.67	84.45	90.22	91.35 a

2.2 基本培养基的筛选

当试管培养的无菌苗鳞茎达到 1 cm 左右时进行切割处理,诱导多头苏铁。

选用 ER、MS、MT 等 3 种基本培养基,均附加 BA 2 mg/L, IBA 0.4 mg/L, 苏铁外种皮汁 2 mL/L。每处理组合设 3 次重复,各接种 30 株,60 d 后统计多头型苏铁株数。

如表 2 所示,3 种基本培养基诱导多头率都在 65% 以上。

表 2 不同基本培养基对诱导多头苏铁的影响

Table 2 Effects of different media on multi-shoots

Cycas induction			
基本培养基	接种数	多头型苏铁株数	平均多头率
Basical medium	Numbe of inoculation	Plantlet numbers of multi-shoots Cycas	Average multithread rate(%)
ER	90	69	76.7 a
MS	90	63	70.0 a
MT	90	60	66.7 a

注:二头和二头以上为多头。

Note: Multi-shoot included two-shoot and above.

2.3 BA、IBA 和苏铁外种皮汁对诱导多头苏铁的影响

利用 ER 作为基本培养基,分别添加不同浓度的 BA、IBA 和苏铁外种皮汁,每处理 3 次重复,各接种 30 株。培养 2 个月后统计多头型苏铁株数和丛芽数(5 个芽以上),其结果见表 3。

从表 3 可以看出,处理 1(ER 培养基添加 BA 2 mg/L, IBA 0.4 mg/L, 苏铁外种皮汁 2 mL/L)的多头诱导率最高,达 76.7%,其次是处理 2,其余 3 种处理组合的多头诱导率都随浓度的降低而下降。

从诱导丛芽(图版,1)来看,只有处理 1 和处理 2 可以诱导出丛芽,其中以处理 1 为佳,丛芽数占多头数的 69.6%。其余 3 种处理组合诱导的多头苏铁都在 2~3 头之间,4 头以上的很少见到。

表 3 不同附加物对诱导多头苏铁的效应

Table 3 Effects of different supplements on multi-shoots *Cycas* induction

处理号 Code	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	STZ (mL/L)	接种数 Number of inoculation	多头型苏铁株数 Plantlet numbers of multi-shoots <i>Cycas</i>	平均多头率 Average multithread rate(%)	平均丛芽数 Cluster-bud numbers	丛芽率 Cluster-bud rate(%)
1	2.0	0.4	2.0	90	69	76.7 Aa	16	69.6
2	2.5	0.5	2.5	90	57	63.4 ABab	8	42.1
3	1.5	0.3	1.5	90	51	56.7 ABabc	0	0
4	1.0	0.2	1.0	90	42	46.3 ABbc	0	0
5	0.5	0.1	0.5	90	30	33.3 Bc	0	0

注: 丛芽率 = 丛芽数/多头株数 × 100%, 表中的显著差异与极显著差异均指平均多头率。STZ 为苏铁外种皮汁。

Note: Cluster-bud rate was cluster-bud numbers divided by plantlet numbers. Significance test of difference in Table 3 was on average multithread rate. STZ: Juice of *Cycas revoluta* Thunb. episperm.

2.4 不同材料在不同培养基上诱导再生芽的差异

利用 ER 作为基本培养基, 附加不同浓度的 BA、IBA 和苏铁外种皮汁, 每处理接种 30 株, 培养一个月后, 统计萌芽情况。

从表 4 看, 较高浓度的 BA、IBA 和苏铁外种皮汁对子叶和鳞片再生芽诱导有利, 子叶萌芽率比鳞片高, 最高达 53.3%, 有的诱导出 1~2 个再生芽, 有的诱导出一排再生芽。低浓度的 BA、IBA 和苏铁外种皮汁能促进顶芽基部隐芽的生长, 萌芽率达 40%~60%, 高浓度则对顶芽生长不利, 最终导致死亡。

顶芽在 BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 苏铁外种皮汁 0.5 mL/L 的培养基上既可以长新芽, 又可以生根, 形成完整植株。这种植株经炼苗和移栽可以成活。

表 4 不同材料在不同培养基上的效应

Table 4 Effect of different stuffs on different media

处理号 Code	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	STZ (mL/L)	子叶 Cotyledon		鳞片 Squama		顶芽 Tip-bud	
				萌芽数 Germination numbers	萌芽率 Germination rate(%)	萌芽数 Germination numbers	萌芽率 Germination rate(%)	萌芽数 Germination numbers	萌芽率 Germination rate(%)
1	0.5	0.1	0.5	0	0	0	0	12 *	40
2	1.0	0.2	1.0	0	0	0	0	18	60
3	1.5	0.3	1.5	10	33.3	5	16.7	死亡 Death	0
4	2.0	0.4	2.0	16	53.3	10	33.3	死亡 Death	0
5	2.5	0.5	2.5	8	26.7	6	20.0	死亡 Death	0

注: * 表示可以直接形成完整植株。STZ 为苏铁外种皮汁。

Note: * indicates the integrity plant can be formed directly. STZ: Juice of *Cycas revoluta* Thunb. episperm.

2.5 不同培养基对生根的影响

将芽苗接入含有 NAA 0.5 mg/L 或 IBA 0.5 mg/L 的 ER 培养基中, 一个月之内能形成完整植株。由于苏铁根系发达, 在生根培养基中根往往长得很长, 反而影响芽的生长。因此应尽量使芽苗的球茎增大后再转入生根培养基, 一旦长出新根即可进行移栽。有的球茎较大, 可以直接移入土壤生根。

2.6 试管苗的移栽

当诱导的多头或单头的苏铁球茎长出新叶并已形成完整植株时即可进行移栽。移栽前加强光照。移栽时洗净根部的培养基, 用 1 000 倍 50% 的多菌灵消毒 30 min, 然后种植于预先配制好的基质中。

基质分沙、园土、珍珠岩加椰糠 (1:1) 等 3 种。3 种基质对移栽成活率没有显著的影响, 成活率都在 90% 以上, 但对移栽苗后期的生长影响较大。用沙作基质, 后期生长明显不如其余 2 种。目前移栽成活的一批 1 年生多头苏铁和 2 年生多头苏铁 (图版, 2) 长势良好。

3 讨论

研究表明, 苏铁种子在培养温度 25℃ 下, 1~2 个月开始发芽, 3 个月发芽率达到 50% 左右, 比常规播种提前半年左右发芽, 发芽率也大大提高。在培养过程中发现, 种子在 ER + BA 2 mg/L + IBA 0.4 mg/L + STZ 2 mL/L 的培养基中可以直接诱导出丛芽, 似花序状。这种丛芽经分离后可以形成新的丛生芽, 但是继代 2~3 次后即生长缓慢。由于铁树本身年生长量很低, 所以每次继代的时间较长, 需要 2~3 个月。

培养基中细胞分裂素、生长素以及苏铁外种皮中所含未知的各种激素及天然有机物, 对多头苏铁瓶苗的生长及再生芽诱导起到了关键性作用。通过切割, 破坏其顶端优势, 在合适的内外植物生长调节物质的刺激下可促进多头苏铁的形成。

苏铁试管苗生根比较容易, 只要球茎较大, 没有根也可以直接移入基质生根。试管苗移栽成活后要加强肥水管理, 尤其是盆栽多头苏铁, 肥水管理不好, 会出现原先多个头变成 2 头, 甚至单头的现象。

References

- Chaplot B B, Jasrai Y T, Lian Biao-yong, Chen Shui-long, Liao Xiao-ying. 2000. Differentiation of shoot buds in bulb-scale cultures of *Cycas revoluta* Thunb. *Phytomorphology*, 50 (1): 37-40.
- Fu Rui-shu, Liu Xun-ren, Fu Rui-qing, Lian Biao-yong, Chen Shui-long, Liao Xiao-ying. 2001. Cultivating techniques of multi-shoots *Cycas*. *Fujian Agricultural Science and Technology*, (2): 32-33. (in Chinese)
- 傅瑞树, 刘训仁, 傅瑞青, 连标勇, 陈水龙, 廖晓英. 2001. 多头苏铁的培育技术. *福建农业科技*, (2): 32-33.
- Gu Bao-gang, Zhu Xiao-hua. 1998. Methods of truncated and hack on *Cycas revoluta* pile cultivation. *Chinese Flowers and Potted Landscape*, (4): 36. (in Chinese)
- 顾宝岗, 朱晓华. 1998. 苏铁截顶劈干培育桩景法. *中国花卉盆景*, (4): 36.
- Liu Ying. 2001. Success and failure in inducing multi-shoots *Cycas*. *Chinese Flowers and Potted Landscape*, (7): 11. (in Chinese)
- 刘 英. 2001. 诱发多头苏铁的成与败. *中国花卉盆景*, (7): 11.
- Rinaldi L M R. 1999. Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35 (1): 25-28.
- Zou Lu-shun. 2000. The successful cultivation of multi-shoots *Cycas* in Fuzhou. *Fuzhou Evening News*. (in Chinese)
- 邹录顺. 2000. 福州人工培养成功多头苏铁. *福州晚报*.



图版说明: 1. 诱导出的多头型苏铁瓶苗; 2. 2 年生多头型苏铁。

Explanation of plates: 1. Multi-shoots *Cycas* plantlets induced; 2. Biennial multi-shoots *Cycas*.