

三种茄科植物种子无菌苗繁殖体系的初建

雷天翔^{1,2,3} 蔡晓剑⁴ 周党卫^{1,2,3*} 李松龄⁴ 王 环¹ 沈建伟¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810001; 2. 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室,青海 西宁 810001; 3. 中国科学院研究生院,北京 100049; 4. 青海大学土壤肥料研究所,青海 西宁 810016)

摘要 目的:以马尿泡、山莨菪、天仙子的野生种子为材料,建立这三种茄科植物种子无菌苗繁殖体系,为开展生物实验研究及其野生种质资源的保存提供了技术参考。方法:将野生种子经过不同因子(预处理赤霉素浓度、消毒试剂、消毒时间、培养温度)的组合处理后点播在 MS 培养基上,以种子发芽率、污染率和成苗率为观测指标,探讨不同因子对建立 3 种植物种子无菌苗繁殖体系的影响。结果:将野生种子用 400 ppm 赤霉素预处理 24 h 后,75% 酒精消毒 1 min,50% NaClO 消毒 20 min,22 ℃ 暗培养待种子发芽后转入光照培养箱培养,能够有效地获得马尿泡、山莨菪、天仙子的种子无菌苗。结论:初步建立马尿泡、山莨菪、天仙子种子无菌苗繁殖体系。

关键词 马尿泡;山莨菪;天仙子;种子无菌苗

中图分类号:R282.2 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2015)03-0447-04

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2015.03.005

马尿泡 *Przewalskia tangutica* Maxim.、山莨菪 *Anisodus tanguticus*(Maxim.) Pasch.、天仙子 *Hyoscyamus niger* L. 是生长在青藏高原海拔 3 200 ~ 5 000 m 的茄科天仙子亚族的不同属(马尿泡属、山莨菪属、天仙子属)植物,这三种植物在孢粉学、胚胎学、花器官发生、种子微形态方面具有一些相似的特征,关系较近^[1-3]。同时,这三种植物体内都含有东莨菪碱(Scopolamine)、山莨菪碱(Anisodamine)、阿托品(Atropine)等托烷类生物碱^[4,5]。托烷类生物碱是作用在反副交感神经系统的一类药物,具有解痉止痛、消肿的功效,可用于治疗胃痛、胆绞痛、急慢性胃肠炎、无名肿痛,也对中枢神经系统、心血管系统起作用,外用可以治疗皮肤病,有很大的开发前景^[6]。目前,对于托烷类生物碱的生产方式主要包括化学合成和从野生植物内提取,选用化学合成的方法存在生产周期长、合成有效成分的产量较低,因此不能作为一种十分经济的手段,而从野生植物中提取的方法既破坏生态环境又造成植物资源的大量浪费而濒临灭绝,更加不能满足日益增长的市场需求^[7]。目前,大量的研究多集中在通过对野生资源的驯化种植和生物技术手段来生产生物碱。由于地域、气候条件的限制,驯化种植野生资源的困难较大,而建立在无菌基础上的细胞培养技术和发根培养技术相比具有明显优势。

本研究以 3 种茄科植物马尿泡、山莨菪、天仙子野生种子为材料,通过测定不同因子(预处理赤霉

素浓度、消毒试剂、消毒时间、培养温度)对建立无菌苗繁殖体系的影响,以期探索出此三种植物的无菌苗繁殖体系最佳组合,一方面可以与组织培养技术相互配合来有效的保存种质资源;另一方面,可以为通过生物技术手段(如细胞培养技术和发根培养技术)提高生物碱产量的研究提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料 马尿泡种子(2013 年 9 月 16 日采自青海省果洛州,海拔 4 200 m)、天仙子种子(2013 年 9 月 17 日采自青海省海北州海晏县,海拔 3 000 m)、山莨菪种子(2013 年 9 月 8 日采自青海省海北藏族自治州门源回族自治县,海拔 4 000 m)。

1.2 方法 马尿泡无菌苗的获得:将不同因子设计为 4 因素 4 水平的正交试验,见表 1。取马尿泡种子,用自来水冲洗 3 次,弃用漂浮种子,然后按照正交表对马尿泡种子做预处理后与 75% 酒精配合消毒。将处理好的种子点播在装有 30 mL MS 固体培养基的 150 mL 三角瓶内,每瓶点播 5 粒种子,重复 6 次。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因子水平表

水平	因素			
	A. 赤霉素 浓度/ppm	B. $KMnO_4$ 浓度/%	C. 消毒时间 /min	D. 培养温度 /℃
1	300	0.05	5	18
2	400	0.10	10	22
3	500	0.15	15	26
4	600	0.20	20	30

收稿日期:2014-07-14

基金项目:2010 年度中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(Y229151211, Y129331211);国家自然科学基金(31070208);中国科学院重点创新计划(KSCX2-EW-J-26)

作者简介:雷天翔(1990-),男,在读硕士研究生,专业方向:生态学;E-mail:m15297090302@163.com。

*通讯作者:周党卫,E-mail:dangweizhou@sina.com。

最适消毒组合的筛选选择 3 种常用消毒试剂 (0.1% HgCl₂、20% NaClO、50% NaClO), 分别按照 0.1% HgCl₂ 消毒 1、2、3、4、5 min, 20% NaClO 消毒 20、25、30 min, 50% NaClO 消毒 10、15、20 min 进行完全随机组合, 共计 11 个处理。将 400 ppm 赤霉素预处理的马尿泡种子用 75% 酒精消毒 1 min 后按照实验设计进行消毒, 然后点播在装有 30 mL MS 固体培养基的 150 mL 三角瓶内, 每瓶点播 5 粒种子, 重复 6 次。

山莨菪、天仙子种子无菌苗的获得: 分别将经过 400 ppm 赤霉素处理 24 h 的山莨菪、天仙子种子用 75% 酒精消毒 1 min, 50% NaClO 消毒 10、15、20 min, 无菌水冲洗 6 次, 每次 3 min, 然后点播在装有 30 mL MS 固体培养基的 150 mL 三角瓶内, 每瓶点
表 2

播 5 粒种子, 重复 6 次。

1.3 培养条件 黑暗条件: 温度为 (22 ± 2) °C 恒温培养箱培养。光照条件: 温度为 (22 ± 2) °C, 光照强度为 3 000 Lx, 12 h/d 光照条件下培养。

1.4 数据分析 发芽率 = 发芽种子个数 / 接种种子总数 × 100%; 污染率 = 污染种子个数 / 接种种子总数 × 100%; 成苗率 = 发芽率 × X (注: 当瓶内种子有污染时, X = 0; 当瓶内种子无污染时, X = 1)。

正交试验方差分析选用 DPS 3.01 专业版进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同因子对马尿泡种子发芽率的影响 无菌条件下对种子发芽率的主要影响因子包括激素、消毒种类、消毒时间以及培养温度。李华赐等^[8]研究

不同因子对马尿泡种子发芽率的影响

处理	A. 赤霉素 浓度/ppm	B. KMnO ₄ 浓度/%	C. 消毒时间 /min	D. 培养温度 /°C	发芽率/%			平均 发芽率/%
					重复一	重复二	重复三	
1	300	0.05	5	18	70.0	50.0	70.0	63.33
2	300	0.10	10	22	63.6	63.6	60.9	62.70
3	300	0.15	15	26	70.0	72.7	63.6	68.77
4	300	0.20	20	30	45.5	41.7	41.7	42.97
5	400	0.05	10	26	48.2	57.3	88.3	64.60
6	400	0.10	5	30	84.6	70.0	50.0	68.20
7	400	0.15	20	18	70.0	100.0	54.5	74.83
8	400	0.20	15	22	60.0	70.0	70.0	66.67
9	500	0.05	15	30	78.3	78.3	62.9	73.17
10	500	0.10	20	26	81.8	66.7	50.0	66.17
11	500	0.15	5	22	55.5	54.5	56.4	54.47
12	500	0.20	10	18	36.4	18.2	41.7	32.10
13	600	0.05	20	22	76.2	72.9	78.6	75.90
14	600	0.10	15	18	77.8	72.7	45.5	65.33
15	600	0.15	10	30	50.0	60.0	60.0	56.67
16	600	0.20	5	26	54.5	60.0	60.0	58.17
T1	713.3	822.9	680.7	768.2				
T2	831.0	787.2	767.2	599.7				
T3	735.5	648.2	821.8	799.6				
T4	706.8	782.2	773.1	723.0				
R	11.85	19.28	14.47	6.28				
最优水平	A ₂	B ₁	C ₃	D ₂				

表 3 不同因子对马尿泡种子发芽率影响的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	978.2939	3	326.0979	2.2561	
B	2564.6056	3	854.8685	5.9146	**
C	1379.1156	3	459.7052	3.1805	*
D	342.5156	3	114.1718	0.7899	
误差	4625.1333	32	144.5354		

注: $F_{0.05}(3, 32) = 2.9$, $F_{0.01}(3, 32) = 4.46$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

报道,马尿泡在自然条件下发芽率极低,仅为 1.3%。赤霉素浸泡能够提高马尿泡和山茛菪种子在自然条件下的发芽率,可分别提高至 80%、86%。 $KMnO_4$ 是一种常见的消毒试剂,常用于花卉组织培养的消毒。培养温度是影响种子萌发的条件之一,如天仙子种子在 25℃ 条件下培养,发芽率最高,为 57.6%^[9]。通过对 4 种因素(赤霉素预处理浓度、 $KMnO_4$ 浓度、消毒时间、培养温度)组合对马尿泡种子发芽率的影响来初步确定主要因子,试验结果统计见表 2。

正交试验方差分析结果如表 3 所示, $KMnO_4$ 的浓度对种子的发芽率有显著影响。当 $KMnO_4$ 的浓度为 0.05% 时,种子的发芽率最高,平均发芽率为 69.25%。赤霉素处理有提高马尿泡种子发芽率的作用,但 300~600 ppm 差异不显著,这与李华赐等^[8]的研究结果一致。由于预处理赤霉素浓度、消毒时间、培养温度对马尿泡种子的发芽率影响不显著,所以选用平均发芽率最高的水平作为最优水平,形成的最优组合为 $A_2B_1C_3D_2$ 。本实验确定了预处理赤霉素的最佳浓度为 400 ppm,培养温度为 22℃,为后续实验提供了基础。

2.2 不同消毒试剂、消毒时间对马尿泡种子无菌苗繁殖的影响 实验发现,消毒剂不仅影响马尿泡种子的萌发,更加影响种子的污染率。当 $KMnO_4$ 的浓度为 0.05%~0.20% 时,马尿泡种子的污染率为 100%,不能形成无菌苗。因此, $KMnO_4$ 不是最适合的消毒试剂,需重新对消毒试剂和消毒时间进行选择。以 3 种常用消毒试剂(0.1% $HgCl_2$ 、20% $NaClO$ 、50% $NaClO$)进行完全随机组合试验,测定马尿泡种子发芽率以及成苗率,结果见图 1。

实验结果表明,选用 0.1% $HgCl_2$ 作为消毒试剂对种子的发芽影响较大,随消毒时间的延长种子的发芽率降低,消毒 5 min 种子的发芽率最低,平均发芽率为 0。 $NaClO$ 对种子的发芽影响较小,种子的

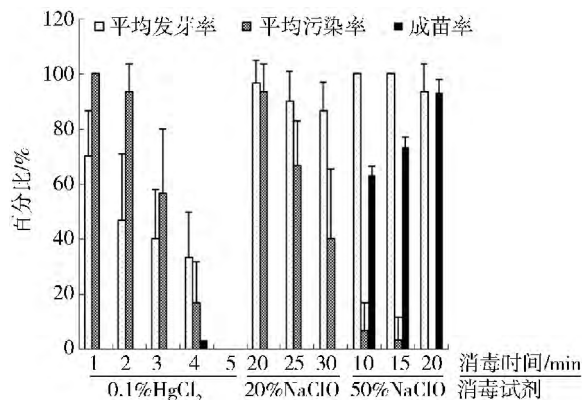


图 1 不同消毒试剂、消毒时间对马尿泡种子无菌苗繁殖的影响

发芽率基本保持在 85% 以上,但是低浓度次氯酸钠(20% $NaClO$)消毒不彻底,大量种子被污染,成苗率为 0。只有高浓度次氯酸钠(50% $NaClO$)消毒 20 min 时,种子的发芽率为 93.33%,污染率为 0,成苗率为 93.33%,能够有效获得大量种子无菌苗。经过多次重复试验,此方法获得马尿泡种子无菌苗的成苗率都保持在 90% 以上。

2.3 50% $NaClO$ 消毒不同时间对山茛菪、天仙子、马尿泡种子无菌苗繁殖的影响 消毒处理是获取无菌苗的必需条件,但消毒的同时对植物体存在一定的伤害。为了进一步摸清 $NaClO$ 消毒时间对无菌苗的影响,将 50% $NaClO$ 按消毒 10、15、20 min 处理进行试验,统计试验结果见图 2。综合考虑,当消毒时间为 20 min 时,山茛菪种子的成苗率为 90%,天仙子的种子成苗率为 83.3%,马尿泡种子的成苗率为 93.3%,都达到了较高水平。但是 3 种植物种子的萌发时间存在差异,天仙子种子的萌发时间最早,在接种后的第 3 天萌发,而且发芽比较整齐。马尿泡次之,种子萌发在接种后的 6~8 d,种子萌发持续时间长。山茛菪种子的萌发时间较晚,接种后的第 6 天开始有种子萌发露白,但大量种子萌发在接种后的第 9~10 天。实验中山茛菪和马尿泡种子的

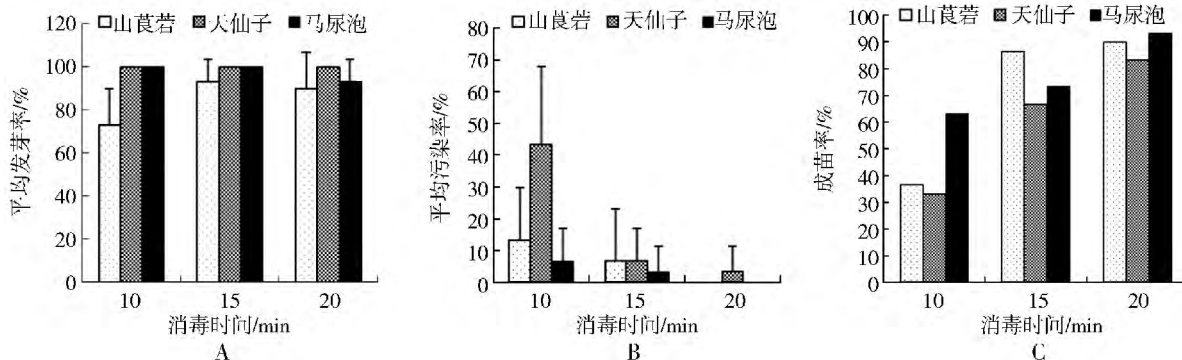


图 2 50% $NaClO$ 消毒不同时间对山茛菪、天仙子、马尿泡种子无菌苗繁殖的影响
A. 发芽率 B. 污染率 C. 成苗率

发芽时间较之李华赐等^[8]报道在自然条件下种子的萌发时间分别提前了 10 d 和 13 d 种子的发芽率也提高了 10% 左右,由此可见,消除种子表面杂菌,在组培条件下有利于种子发芽,这也可能为这 3 种植物的大田种植提供了一种催芽手段,相关研究还有待进一步进行。

3 讨论

3.1 以上实验结果表明,马尿泡、山莨菪、天仙子最适合的消毒剂是 50% NaClO,最适合的消毒时间为 20 min。最终建立的 3 种植物种子无菌苗繁殖体系为:取 3 种植物种子蒸馏水冲洗 3 次,遗弃漂浮种子 400 ppm 赤霉素预处理 24 h,75% 酒精消毒 1 min,无菌水冲洗 3 次,50% NaClO 消毒 20 min,无菌水冲洗 6 次,点播在 MS 固体培养基上,每瓶 5 粒,22 ℃ 暗培养,种子发芽后转入光照培养箱培养,能够获得 3 种植物种子无菌苗。

3.2 马尿泡、山莨菪、天仙子是重要药用植物资源。1980 年,肖培根等^[10]对这几种植物的有效成分的含量进行了测定,结果表明 3 种植物体内均含有生物碱,其中马尿泡体内生物碱的含量最高,达 1.2% ~ 2.8%。随着生物碱合成途径的不断解析,控制合成途径关键酶基因不断被克隆,利用植物反应器和转基因技术高效生产生物碱取得了一定的发展,而这些技术都是以各种植物的无菌苗为材料^[11,12]。

本实验建立了马尿泡、山莨菪、天仙子种子无菌苗的繁殖体系,获得了生长健壮、长势一致的 3 种植物的种子无菌苗,为马尿泡、山莨菪、天仙子通过生物技术手段探索高效生产生物碱的新途径的研究提供了材料基础,有效解决了这三种植物受地域、气候生长条件限制而不能随时获得不同生长阶段材料进

行研究的问题,也有可能为这三种植物的种质资源保存和利用提供新的繁殖途径。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 140.
- [2] 杨冬之. 茄科天仙子族: 结构、分化和系统关系 [D]. 北京: 中国科学院, 2002.
- [3] 张发起, 高庆波, 邢睿, 等. 青海省三种茄科植物种子微形态特征 [J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(3): 290-294.
- [4] 王环, 潘莉, 张晓峰. HPLC 法测定天仙子和马尿泡中 3 种托烷类生物碱的含量 [J]. 西北药学杂志, 2002, 17(1): 9-10.
- [5] 张晓峰, 王环. 山莨菪植物体内 4 中莨菪烷类生物碱含量的变化 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 630-634.
- [6] 肖培根, 何丽一, 王立为. 莨菪类藏药的研究 [J]. 中药通报, 1984, 9(1): 10-11.
- [7] 黄锋, 代先东, 胡亚兰, 等. 托烷类生物碱的合成研究进展 [J]. 化学试剂, 2005, 27(3): 141-144.
- [8] 李华赐, 丁经业. 赤霉素对山莨菪与马尿泡种子发芽的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1980, 30(1): 24-25.
- [9] 杨兴彪, 李海峰. 三分三种子萌发影响因素分析 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(17): 4142-4144.
- [10] 肖培根, 何丽一. 一种新的托品类生物碱资源植物——矮莨菪 [J]. 药学通报, 1980, 15(11): 41.
- [11] 唐克轩, 沈乾, 付雪晴, 等. 植物次生代谢产物生物反应器研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2014, 1(1): 7-15.
- [12] Zhang L, Ding RX, Chai YR, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(17): 6786-6791.