

藏药桃儿七种子离体培养条件优化研究

徐文华¹,徐文军²,李艳玲¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所/青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室,青海 西宁 810008;
2. 青海省海东市乐都区人民医院,青海 海东 810700)

摘要 目的:以我国濒危药用植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 的种子为外植体,建立桃儿七种子离体培养快速繁殖体系。方法:选取野生桃儿七植株种子为材料,采用不同浸种时间、化学试剂、培养基类型处理对桃儿七种子(整粒、切种、种胚)离体培养萌发再生进行研究。结果:桃儿七种子浸泡 48 h 后,以种胚形式接种至 1/4MS 培养基中,种子萌发率最高,达 97.73%;同时,化学试剂 Na_2CO_3 (0.3%)、 NaHCO_3 (3.0%) 和 NaClO (2.0%) 处理均可显著促进桃儿七种胚的萌发,其萌发率分别为 95.34%、95.68%、96.15%;整粒种子在不同类型培养基中萌发率为 0;种子切种后在 WPM 培养基上萌发率最高,达 68.00%。结论:桃儿七种子离体培养最佳外植体为种胚,在 1/4MS 培养基中培养,可获得较高的萌发率。

关键词 桃儿七;离体培养;种子;种胚;萌发

中图分类号:R282.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2019)04-0725-05

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2019.04.004

小檗科桃儿七属多年生草本植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying, 又名鬼臼、小叶莲,藏名奥莫色,生长于海拔 2 000~4 500 m 冷凉、湿润的生态环境^[1,2],为我国珍稀濒危植物,被列入《中国珍稀濒危植物名录》,为三级保护植物^[3],分布于我国横断山脉两侧的中高山及青藏高原地带。全株均可入药,具有祛风湿、活血化瘀、化痰止咳、解毒等功效。其木脂素类化合物主要包括鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素等,具有高效抗肿瘤活性,是获得抗癌药物的重要原料植物^[4]。

关于桃儿七组织培养和细胞工程方面的研究有诸多报道,但直接采用桃儿七野生植株为外植体进行离体培养,诱导率低,且容易发生褐化,故采用桃儿七种子为外植体进行离体培养获得组培苗已成为国内外研究学者对桃儿七药材进行扩大生产研究的理想原材料^[5-7]。桃儿七种子休眠期长,生长发育缓慢,萌发参差不齐,萌发周期长^[8,9]。桃儿七种子在离体培养条件下的萌发状况是影响其快速繁殖的关键因素。目前对桃儿七种子在离体培养下萌发促进相关因素方面的研究较少,本试验以当前国内外学者对桃儿七种子休眠机制方面的研究结果为指导,采用桃儿七野生种子为材料,在离体培养条件下通过研究不同的接种方式、培养基类型和化学试剂对桃儿七种子萌发的影响,来优化桃儿七种子萌发的离体培养条件,旨在寻找桃儿七种子离体培养的适宜条件,为珍稀濒危藏药桃儿七的繁殖提供可靠的试验方法,也为桃儿七药材种苗繁育和规范化、标准

化人工种植奠定技术支撑。

1 材料

于 2013 年秋季在四川省若尔盖县采集自然生长的野生桃儿七成熟果实,置于阴凉通风处,阴干后从果实中剥离出种子,于 4 ℃ 条件下低温保存备用。

2 方法

2.1 培养基种类 所用培养基包括:MS, 3/4MS (MS 大量元素无机盐浓度为 3/4), 2/4MS (MS 大量元素无机盐浓度为 2/4), 1/4MS (MS 大量元素无机盐浓度为 1/4), YG (MS 大量元素和微量元素均减半), HG (2/4MS+0.1% 活性炭), B5 和 WPM 培养基,其中,MS、B5 和 WPM 培养基均为组织培养中常用的基础培养基,其余培养基均是在 MS 培养基的基础上改良获得的培养基。蔗糖含量均为 30g/L,琼脂含量为 6g/L, pH 为 5.8 (灭菌前)。

2.2 培养条件 第 I 阶段为:光照 14 h,光照强度为 7 200 lx,温度为 25 ℃ 左右;第 II 阶段为:黑暗 10 h,温度为 15 ℃ 左右。

2.3 灭菌及接种方法 选取颗粒饱满的种子,揉搓冲洗干净,用无菌水冲洗三遍,置于无菌瓶中用无菌水浸泡 48 h (每隔 12 h 换水一次,下同)。之后置于超净工作台中用 75% 酒精浸泡 1 min,无菌水冲洗两遍,再用 0.1% 升汞溶液浸泡 12 min,无菌水冲洗 5~6 遍。将灭菌后的种子转至无菌培养皿中,沿种脊方向对种子进行纵切即可获得带胚的半粒种子(切种)和剖离胚(种胚)。将整粒种子、切种和种胚分别接种在多种类型培养基中,在生化培养箱中进

收稿日期:2018-07-24

基金项目:青海省应用基础研究项目(2017-ZJ-749)

作者简介:徐文华(1974-),女,硕士,副研究员,研究方向:植物生物技术与药用植物资源;Tel:13619719278, E-mail:whxu@nwipb.cas.cn。

行培养。每个处理至少接种 8 个三角瓶(每瓶含 6 粒种子),所有试验均至少重复一次,每 30 d 左右转接一次。

2.4 不同浸泡时间处理桃儿七种子 将清洗干净的种子在常温条件下分别用无菌水浸泡 24、36、48、52、60、72 h,然后在无菌条件下取胚接种至 2/4MS 培养基中进行培养。

2.5 不同化学试剂处理桃儿七种子 采用单因素处理方法研究不同化学试剂(Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 NaClO 和 GA_3)对桃儿七种胚萌发的影响。将冲洗干净的种子用无菌水浸泡 24 h 后,分别采用 Na_2CO_3 (0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1.0%), NaHCO_3 (0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%), NaClO (2.0%、4.0%、6.0%) 浸泡处理 24 h,然后在无菌条件下取胚接种至 2/4MS 培养基中进行培养。

GA_3 处理则是直接采用相应浓度的 GA_3 溶液 (0.50、80、100、200、300、500、700、1 000 mg/L) 浸泡 48 h 后在无菌条件下接种至 2/4MS 培养基中进行培养。

2.6 测定指标 每隔 10 d 统计 1 次种子的萌发数、褐化数。萌发以组培苗形成根、茎、叶三种器官中的至少两种为标准,褐化以株苗或胚褐化至完全黑色且无生命迹象为标准,实际统计时去除污染的种子数目。60 d 后计算萌发率和褐化率。

2.7 数据分析 运用 SPSS 20.0 和 Excel 2013 对试验数据进行处理和统计分析。

3 结果与分析

3.1 水浸泡时间对桃儿七种胚萌发的影响 从图 1 可知,种胚萌发率随着水浸泡时间表现为先增大后减小的趋势。各处理萌发率大小呈现为:48 h>60 h>36 h 和 24 h>72 h。各组之间萌发率差异性显著。当水浸泡时间为 48 h 时种胚萌发率最高,达 91.91%。结合吸水曲线可以看出,当水浸泡时间为 48h 左右时,种子的吸水量达到最大值,表明种子充分吸水有利于种子的萌发,吸水不足或吸水过量都不适宜种子的萌发。

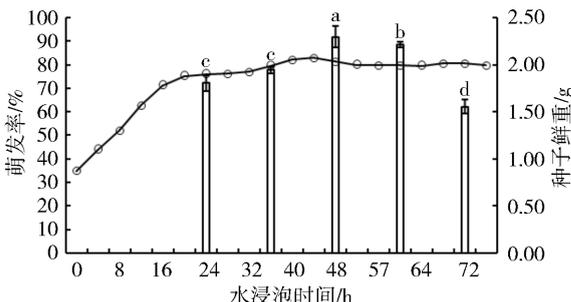


图 1 水浸泡时间对桃儿七种胚萌发的影响
注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

3.2 化学试剂处理对桃儿七种胚萌发的影响

3.2.1 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 处理对桃儿七种胚萌发的影响:不同浓度的 Na_2CO_3 化学试剂对桃儿七种胚萌发的影响见图 2,从图 2 可见,当 Na_2CO_3 浓度为 0.3% 时,种胚萌发率最高,达 95.34%。当 Na_2CO_3 浓度大于 0.3% 时,随着浓度的增加,其萌发率反而降低;当 Na_2CO_3 浓度小于 0.3% 时,随着浓度的增加,其萌发率也随之降低; Na_2CO_3 浓度为 0.3% 和 0.5% 时,桃儿七种胚芽萌发率显著高于其他浓度处理和对照。

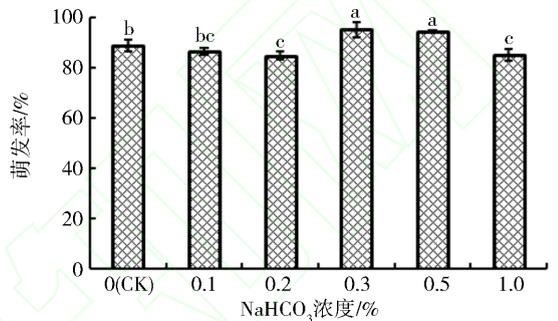


图 2 Na_2CO_3 对种胚萌发的影响
注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

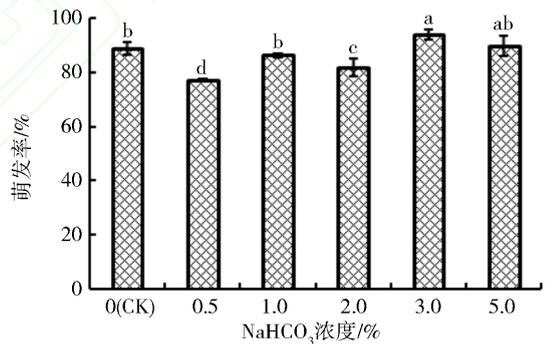


图 3 NaHCO_3 对种胚萌发的影响
注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

不同浓度的 NaHCO_3 化学试剂对桃儿七种胚萌发的影响见图 3,从图 3 可见, NaHCO_3 浓度为 3.0% 时,桃儿七种胚萌发率最高,达 95.68%,显著高于除浓度 5.0% 外的其他浓度处理和对照。

3.2.2 NaClO 处理对桃儿七种胚萌发的影响:不同浓度的 NaClO 化学试剂对桃儿七种胚萌发的影响见图 4,从图 4 可见,当 NaClO 浓度为 2.0% 时,种胚萌发率最高,达 96.15%,显著高于 6.0% 浓度和对照。

3.2.3 GA_3 处理对桃儿七种胚萌发的影响:不同浓度的 GA_3 化学试剂对桃儿七种胚萌发的影响见图 5,从图 5 可见,随着 GA_3 浓度的增加,种胚萌发率并未表现出一定的规律性,且在此试验结果中 GA_3 对种胚萌发并未表现出促进作用。

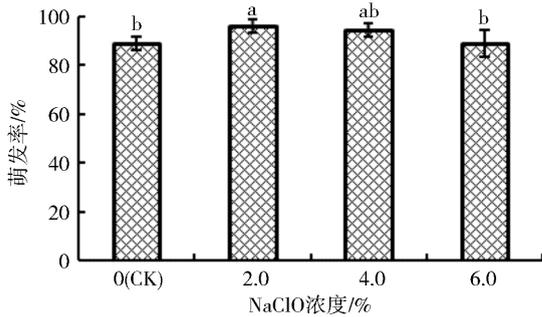


图 4 NaClO 对桃儿七种胚萌发的影响

注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

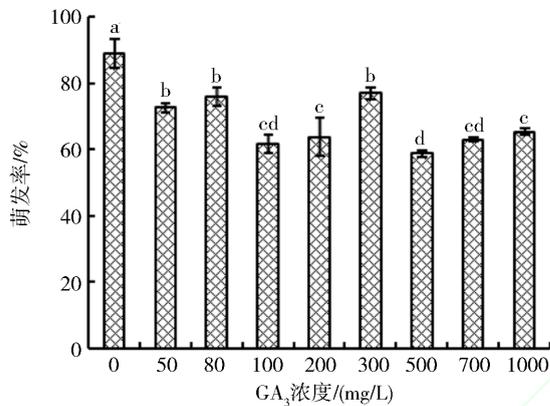


图 5 GA₃ 对桃儿七种胚萌发的影响

注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

3.3 不同接种方式和培养基类型对桃儿七种子(切种、种胚)萌发的影响 桃儿七的整粒种子接种至 6 种不同类型培养基 (MS、2/4MS、YG、HG、B5 和 WPM) 中,60 d 内萌发率为 0,种子切种和种胚在不同类型培养基上萌发和生长状况分别见表 1 和表

2。通过比较可以看出,桃儿七的整粒种子在未经任何前处理的条件下不适宜直接进行离体培养,种胚在各培养基上的萌发率均高于切种培养,褐化程度低于切种培养,生长速度明显快于切种培养,株苗生长状况也明显优于切种培养。综上表明,种胚接种是桃儿七种子离体培养的适宜接种方式。

桃儿七种子切种后离体培养的萌发与生长情况见表 1,从表 1 可见,将桃儿七种子切种后接至不同类型培养基中,萌发率为:WPM>(YG、B5)>(2/4MS、HG)>MS。WPM 萌发率最高,达 68.00%,MS 萌发率最低,仅为 9.62%。褐化率为:MS>B5>(2/4MS、HG)>YG>WPM。综上可以看出,在 WPM 培养基上其萌发率最高,褐化率最低,故 WPM 培养基最适合桃儿七种子切种的离体培养。YG 培养基在萌发率和褐化率方面均较 WPM 次之,但从组培苗生长状况和生长势上来看,YG 培养基培养的组培苗强壮于 WPM,故在实际应用中也可以考虑使用 YG 培养基进行后期组培苗转接培养。

桃儿七种胚离体培养的萌发与生长情况见表 2,从表 2 可见,桃儿七种胚在各类型培养基上的萌发率为:1/4MS>(2/4MS、YG、HG、WPM)>(3/4MS、B5)>MS。1/4MS 萌发率最高,达 97.73%,MS 萌发率最低,仅为 29.17%。褐化率为:MS>3/4MS>B5>2/4MS>1/4MS>YG>HG>WPM。综上可以看出,1/4MS 萌发率最高,且褐化率较低,故 1/4MS 适合桃儿七种胚的离体培养。

表 1 桃儿七种子切种离体培养的萌发与生长状况

培养基类型	褐化率 / %	萌发率 / %	生长描述	生长势
MS	26.92±3.77 ^a	9.62±1.61 ^d	矮小	+
2/4MS	10.20±3.04 ^c	36.73±3.47 ^c	健壮	++++
YG	5.67±1.31 ^d	50.94±1.20 ^b	健壮	++++
HG	10.00±0.20 ^c	38.00±2.86 ^c	健壮	++++
B5	16.36±3.11 ^b	49.09±1.16 ^b	健壮	+++
WPM	2.00±1.40 ^e	68.00±2.12 ^a	较纤弱	+++

注:“++++”旺盛,“+++”较好,“++”一般,“+”较差;同列不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

表 2 桃儿七种胚离体培养的萌发与生长状况

培养基类型	褐化率 / %	萌发率 / %	生长描述	生长势
MS	25.00±3.42 ^a	29.17±1.40 ^d	矮小	+
3/4MS	23.73±6.99 ^{ab}	54.17±2.24 ^c	矮小	++
2/4MS	7.55±1.57 ^b	84.90±1.75 ^b	健壮	++++
1/4MS	4.04±1.20 ^b	97.73±1.40 ^a	健壮	++++
YG	1.96±0.57 ^b	88.24±2.79 ^b	健壮	++++
HG	1.92±0.11 ^b	82.69±2.24 ^b	健壮	++++
B ₅	15.69±2.68 ^{ab}	52.94±4.41 ^c	一般	++
WPM	1.85±0.19 ^b	83.33±1.79 ^b	健壮	++++

注:“++++”旺盛,“+++”较好,“++”一般,“+”较差;同列不同小写字母表示 $P < 0.05$ 显著差异

3.4 MS 中大量元素对桃儿七种胚萌发的影响

MS 中大量元素对桃儿七种胚萌发的影响见图 6, 从图 6 可见, 桃儿七种胚萌发率随 MS 培养基中大量元素浓度的增加逐渐递减, 当大量元素浓度为 1/4 时, 种胚萌发率最高, 达 97.73%; 当大量元素浓度为 1 时, 萌发率最低, 仅为 29.17%, 可以看出: 桃儿七种胚萌发率与 MS 培养基中大量元素浓度呈显著负相关 ($R^2 = 0.9392$)。本试验中种胚在未经任何处理的条件下萌发率最高可达 97.73%, 说明桃儿七种胚本身可能并不存在生理后熟, 也可能是本试验中所采用的种子在干燥过程中种胚已完成生理后熟。

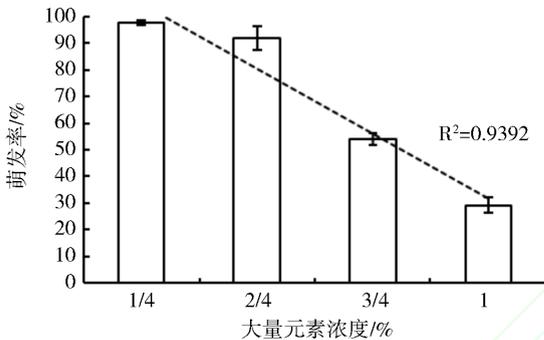


图 6 MS 中大量元素浓度对桃儿七种胚萌发的影响

4 讨论

4.1 限制桃儿七种子萌发的因素 通过比较不同接种方式对桃儿七种子离体培养萌发的结果可以看出: 相较于种子切种而言, 整粒种子在形态学上与切种相比, 多含半粒不含胚的种子, 且种皮具有完整性, 正是由于其整粒性, 致使整粒种子萌发率低于切种, 说明种皮和胚乳这两者中的一种或两种在离体培养条件下对桃儿七种子的萌发具有限制作用。同样, 通过比较种子切种和种胚的萌发状况, 也可以得出此推论。陈伟等^[9]研究桃儿七种子不同部位水浸液对白菜种子萌发的影响, 结果表明桃儿七种子中不同部位均不同程度的存在萌发抑制物, 其中胚乳中含量最高, 其次为种皮和种胚。Sreenivasulu 等^[10]研究表明胚乳的厚壁细胞抑制桃儿七种子胚根突破种皮, 即胚乳抑制桃儿七种子萌发。结合本实验结果可以推测得出, 胚乳中厚壁细胞机械束缚及种子中萌发抑制物的存在是限制桃儿七种子的萌发的因素之一。

郭琪等^[7]通过将带胚的半粒桃儿七种子和种胚分别接种至改良 MS 培养基 (MS 培养基中大量元素减半) 中进行培养, 结果表明半粒种胚生长缓慢甚至褐化死亡, 而带有半个胚乳的胚生长迅速且生长势强, 该研究认为桃儿七种子离体培养过程中, 在

胚萌发初期, 保留半个胚乳既能消除种子的萌发阻力, 又能为种胚的萌发生长提供充足的内源物质^[10]。但是在本研究中, 通过比较表 1 和表 2, 可以看出: 同一类型培养基条件下种胚培养萌发率及生长状况显著优于切种培养结果, 与以上研究结果不甚相同, 甚至完全相反, 分析原因可能与种子的储藏方式有关。

4.2 无机盐浓度对桃儿七种胚离体培养的影响 植物组织培养过程中, 不同种类的植物对无机盐浓度的要求不同, 即使是同一类型的植株在不同的生长阶段所需的无机盐类型和浓度也不同。MS 培养基是目前组织培养中使用最广泛的培养基, 其无机盐浓度较高, 特别是硝酸盐、钾离子和铵根离子含量丰富, 能够满足快速增长的组织对营养元素的需求。结合表 2 和图 6 可以看出高浓度的大量元素对桃儿七种胚的萌发具有一定的抑制作用, 而较低浓度的大量元素能够促进种胚的萌发和生长。同时, 随着大量元素浓度的降低, 种胚的褐化率逐渐减少, 可以看出高质量的大量元素浓度会引起植物外植体酚的氧化, 进而加速培养物的褐化速度。在很多试管苗的生根研究表明, 含较低浓度无机盐离子的 White 培养基和 1/2MS、1/3MS 或更低浓度的 1/8MS 培养基促进根的形成与生长^[11]。有报道表明较低浓度的无机盐离子浓度不仅能够促进植物生根, 同时也有利于丛生芽的发生, 且植株生长较为健壮^[12-14]。这可能是由于植株种类不同等原因造成的。本实验研究结果也证明低浓度的无机盐离子促进。

4.3 化学试剂对桃儿七种胚萌发的影响 桃儿七种胚的萌发和生长 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 能够促进休眠种子的萌发, 这可能是由于 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 属于弱碱盐, 其水溶液具有一定的腐蚀性, 能够去除种皮表面的油蜡, 软化种皮, 减缓种皮的机械约束作用, 增加种子的透气、透水性, 同时也有可能浸提出种子内部的萌发抑制物, 进而促进种子的萌发。本试验在采用 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 浸泡种子过程中, 出现种子褪色种皮松软等现象, 说明这两类物质可能具有明显改变种皮的透性等功能, 减缓种皮等对种子的机械束缚作用, 从而促进桃儿七种子的萌发。

NaClO 作为氧化剂, 在组织培养过程中除用于灭菌外, 由于其可以腐蚀种皮改善种皮透性, 同时也能够氧化一部分易于氧化的萌发抑制物, 因而可以用于促进休眠种子的萌发^[15]。张春红等^[16]研究表明 NaClO 可以通过对种皮的软化或腐蚀作用有效促进黑莓种子的萌发, 同时相较于浓 H_2SO_4 的强腐蚀性容易灼伤种子而言, NaClO 更容易用于控制其

对种子的腐蚀程度。本试验中 NaClO 处理种子结果表明 NaClO 能够明显促进桃儿七种胚的萌发,可能也是由于其具有腐蚀性和一定氧化萌发抑制物的作用。

GA₃ 作为植物生长调节剂,可以代替光照和低温打破种子休眠,机理为 GA₃ 可诱导 α-淀粉酶、蛋白酶和其它水解酶的合成,催化种子内贮藏物质的降解,以供胚的生长发育所需^[17]。本试验中 GA₃ 对桃儿七种胚的离体培养未表现出促进作用,原因可能是桃儿七种胚已达到成熟状态,即不具备生理休眠,故作用不明显。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第29卷. 北京:科学出版社,2001:249.
- [2] 杨永昌. 藏药志[M]. 青海:青海人民出版社,1991:319.
- [3] 虞泓. 珍稀植物桃儿七[J]. 植物杂志,1999,(3):6-7.
- [4] 袁菊丽. 太白七药桃儿七研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(5):95-97.
- [5] Rajesh M, Sivanandhan G, Subramanyam K, et al. Establishment of somatic embryogenesis and podophyllotoxin production in liquid shake cultures of *Podophyllum hexandrum* Royle[J]. *Ind Crop Prod*, 2014, 60(1):66-74.
- [6] Nadeem M, Palni LMS, Purohit A N, et al. Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb[J]. *Biol Conserv*, 2000, 92(1):121-129.
- [7] 郭琪,张军,赵小锋,等. 濒危药用植物桃儿七的离体培养研究[J]. 植物研究,2012,32(4):484-487.
- [8] 马绍宾,姜汉侨,黄衡宇. 药物植物桃儿七不同种群种子产量初步研究[J]. 应用生态学报,2001,12(3):363-368.
- [9] 陈伟,杨楼,马绍宾. 濒危药用植物桃儿七种子的萌发特性初探[J]. 种子,2008,27(4):49-51.
- [10] Sreenivasulu Y, Chanda SK, Ahuja PS. Endosperm delays seed germination in *Podophyllum hexandrum* Royle-an important medicinal herb[J]. *Seed Sci Technol*, 2009, 37(1):10-16.
- [11] 杨金富,余茂德,徐立,等. 桑树试管苗生根因素研究[J]. 蚕学通讯,2002,22(3):1-5.
- [12] 李粹钰,尹明华,徐卫红,等. MS培养基无机盐水平、肌醇浓度和pH值对绿豆试管内萌发的影响[J]. 上饶师范学院学报,2008,28(6):62-65.
- [13] 魏芳,朱芹. 激素配比及无机盐浓度对阿月浑子组培的影响[J]. 中国园艺文摘,2011,(1):10-12,33.
- [14] 钟海丰,钟淮钦,黄敏玲,等. 蝴蝶兰丛生芽增殖培养条件优化研究[J]. 福建农业学报,2013,28(7):675-679.
- [15] 胡晋. 种子生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:126-133.
- [16] 张春红,胡淑英,吴文龙,等. 不同处理方式对黑莓‘Kiowa’种子发芽的影响[J]. 林业科技开发,2012,26(3):29-33.
- [17] 王忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:418.