

珍稀藏药桃儿七组织培养研究

叶耀辉 张文雪 张寿文 黄慧莲

(江西中医学院 江西 南昌 330004)

摘要:建立以带胚种段为外植体的藏药桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)组织快繁培养体系,研究了外植体不同处理方法、不同激素配比对无菌苗诱导的影响;活性炭(AC)、维生素C(Vc)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对无菌苗褐变的抑制效果。结果表明:带胚种段经诱导、增殖、生根系列培养基培养后能获得长势良好诱导率较高的无菌苗,诱导率为90.0%。胚诱导培养基为MS+20 g/Lsucrose+1 g/L AC;诱导培养基为MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT+1.0 mg/L GA₃+20 g/Lsucrose+1 g/L PVP;增殖培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃+20 g/Lsucrose+1 g/LPVP;生根培养基为MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L GA₃+20 g/Lsucrose+1 g/LPVP。

关键词:藏药桃儿七;带胚种段;正交设计;褐变;组织培养

中图分类号:Q943.1 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)06-1144-05

A Study on the Tissue Culture of the Rare Tibetan Medicine *Sinopodophyllum hexandrum*

YE Yao-hui ZHANG Wen-xue ZHANG Shou-wen HUANG Hui-lian

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: The tissue culture system of explants from separated embryo seeds of matured Tibetan medicine *Sinopodophyllum* was established. The effects of seedling induced rate by different treatments and different concentrations of hormones, activated charcoal (AC), vitamin C (Vc) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) were studied. The results indicated that seedling induced rate could reach 90.0% with better growth and development on the series of media including induction, proliferation and rooting. The embryo induction medium was a base of MS+1 g/L AC; the induction medium was MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT+1.0 mg/L GA₃+1 g/L PVP; proliferation media was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L GA₃+1 g/L PVP and the rooting medium was MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L GA₃+1 g/L PVP. In addition 2 g/L sucrose and 0.4% agar were the common components of the four.

Key words: Tibetan medicine *Sinopodophyllum hexandrum*; embryo seeds; orthogonal design; browning; tissue culture

桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)为小檗科(Berberidaceae)鬼臼亚科(Podophylloideae)桃儿七属(*Sinopodophyllum* Ying)多年生草本植物,又名桃耳七、小叶莲,为我国西藏珍稀药材。桃儿七具有活血化瘀、调经的功能,可用于治疗血瘀经闭、难产、死胎、胎盘不下等症。桃儿七所含鬼臼毒素类物质作为抑菌杀虫药的应用也是当今学术界研究的热点之一。近年用鬼臼毒素(podophyllotoxin)等作为前体合成的抗癌药物广泛用于临床治疗子宫癌、乳腺癌、食道癌等,现已被世界卫生组织推荐为治疗皮肤癌和

收稿日期:2011-08-20 修回日期:2011-11-03

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(09278)

作者简介:叶耀辉(1973—),男,副教授,主要从事药用植物栽培研究 E-mail: 18970065779@189.cn。

性病尖锐湿疣的首选药物。另外,桃儿七的花十分艳丽、叶子叶片上的色斑变化和分布格局花样繁多,具有非常好的观赏价值。它的成熟果实胎座中含有糖分,味道甜美可食用,新鲜果实的果汁除可治疗烧伤烫伤外,还具有一定的美容作用。由此可见,桃儿七具有较高的药用价值和开发潜力。

近年桃儿七的市场需求旺盛,人们对野生桃儿七过度采挖,加之野生桃儿七自身繁殖力有限且遗传多样性较低^[1],使得野生资源量迅速减少,导致其开发利用受限。目前鲜见关于西藏桃儿七带胚种段组织培养研究的报道。为此,本文建立了以桃儿七带胚种段为外植体的组织培养体系,并对无菌苗诱导的条件进行了摸索和优化,同时通过解决组织培养过程中出现的褐变问题进一步提高了无菌苗的诱导和存活率。

1 材料与方法

1.1 植物材料

桃儿七 [*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying] 种子采自西藏。

取籽粒圆滑饱满的健康种子,冲洗干净后用 5 g/L 碳酸钠 (Na_2CO_3) 溶液浸泡 24 h,以打破休眠^[2]。接种前先用体积分数为 75% 酒精漂洗 10 s,无菌水冲洗 2 次;再用体积分数为 0.158% 升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 4~5 次。将切好的带胚种段放在盛有少量无菌水的培养皿中,待接种时再将带胚种段置于无菌滤纸上,吸干水分。

外植体的不同处理方法:取已消毒的饱满健康种子 150 粒,随机分成 5 组,每组 30 粒。在超净台上用灭菌刀片将种子剥离种胚,纵切和横切处理后,将外植体用不同接种方式接种至 M_1 培养基观察(培养基成分见表 1),结果见表 2。

1.2 方法

1.2.1 培养基成分 基本培养基为 MS 加 20 g/L 蔗糖和 4 g/L 琼脂, pH 为 5.8~6.0。各培养基成分见表 1。

表 1 培养基成分

Tab. 1 Composition of media

培养基 Media	培养基的组成 Composition of plant growth substances
M_1	MS + 1 g/L AC
M_2	MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + GA ₃ 1.0 mg/L + 1 g/L PVP
M_3	MS + 6-BA 2.0 mg/L + GA ₃ 0.3 mg/L + 1 g/L PVP
M_4	MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + GA ₃ 0.5 mg/L + 1 g/L PVP
M_5	MS
M_6	MS + 1 g/L AC
M_7	MS + 1 g/L PVP
M_8	MS + 20 mg/L Vc

度组合设计了两组诱导培养基: M_1 和 M_2 ; 增殖培养基: M_3 ; 生根培养基: M_4 。

实验开始前首先采用 $L_9(3^4)$ 正交表对 M_2 诱导培养基中添加的激素种类、浓度配比进行正交实验,分析正交实验结果,筛选出最佳处理组合,见表 3、表 4。

无菌条件下将种子横切、切面朝左或右接种至

M_5 、 M_6 、 M_7 、 M_8 培养基中培养,观察培养过程中的褐变情况,见表 5。

1.2.2 培养条件 实验中每个比较均设 3 个重复,培养温度 (25 ± 2) °C,光照强度为 35~40 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间光照 24 h/d。

1.2.3 数据处理 采用 SPSS11.5 软件和 Excel 2003 对实验数据进行分析。以最小显著差数法(LSD)评价差异的显著性。

2 结果与讨论

2.1 不同外植体处理方式对无菌苗诱导的影响

将按表 2 所示方法处理后的外植体接种至 M_1 培养基观察 15 d,实验结果见表 2。

桃儿七种子具有休眠特性,需经过一定处理方能萌发^[3]。引起桃儿七种子休眠的主要原因是种皮和胚乳的限制以及生理后熟^[4]。由于种胚被桃儿七致密的种皮包裹,并且其成熟种子含有萌发抑制物,在一定程度上阻碍了激素的吸收,由表 2 可以看出,种子经剥离种胚和横切、切面朝左或右接种的无

菌苗诱导率均可达 90.0% ,说明剥离种胚和切段处理能有效提高诱导率。这种现象在八角莲的研究中也得到了证实^[5]。本研究中纵切法发芽率为零,可能是破坏了胚的完整性,导致种子不能萌发。横切后、切面朝左或右接种组的开始发芽时间和萌发率明显优于切面朝下接种组,究其原因,可能是因为切面朝下的种胚不能很好地利用氧气和水分。

表2 外植体不同处理方法对无菌苗诱导的影响

Tab.2 Effect of different processing methods on seedling induction of explants

外植体处理方法 Explants treatment method	开始萌发时间/d Start germination time	诱导率/% Induction rate	生长势 growth conditions	褐变情况 Browning conditions
剥离种胚 Split of embryo	2	91.1	+++	+
纵切 + 切面朝下 Longitudinal cutting , section down	-	-	-	++++
纵切 + 切面朝左或右 Longitudinal cutting , section left or right	-	-	-	++++
横切 + 切面朝下 Crosscutting , section down	8	53.3	++	+++
横切 + 切面朝左或右 Crosscutting , section left or right	2	90.0	+++	++

“++++”强 “+++”较强 “++”中度 “+”弱 “-”无现象。 “++++”,strong “+++”,stronger “++”,moderate “+”,weak; and “-” no phenomenon.

2.2 不同植物激素对比对无菌苗的诱导效果

将种子横切、切面朝左或右接种至 MS + IAA 0.5 mg/L 和附加其他不同激素的培养基中培养,实验结果见表 3、表 4。通过分析正交实验结果极差分析发现,在一定浓度范围内激素对诱导率影响的重要性: GA₃ > 6-BA > IAA,以 MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L 培养基诱导率最高。对结果进行方差分析可知,GA₃ 和 6-BA 对诱导率有显著性影响,最佳培养基为 MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L

表3 无菌苗诱导的正交试验结果

Tab.3 Orthogonal experiment outcomes of induced seedling

列 Array	KT 的浓度 /(mg · L ⁻¹) KT concentration	6-BA 的浓度 /(mg · L ⁻¹) 6-BA concentration	GA ₃ 的浓度 /(mg · L ⁻¹) GA ₃ concentration	平均诱导率/% Mean induction rate	生长势 Growth conditions
1	0	0	0.3	37	++
2	0	0.3	0.5	43	+
3	0	0.5	1	58	++
4	0.3	0	0.5	71	++++
5	0.3	0.3	1	47	+++
6	0.3	0.5	0.3	31	++
7	0.5	0	1	81	+++
8	0.5	0.3	0.3	51	++
9	0.5	0.5	0.5	36	++
\bar{X}_1	46	63	40		
\bar{X}_2	50	47	50		
\bar{X}_3	56	42	62		
极差 Range	10	21	22		

表 4 无菌苗诱导的方差分析表

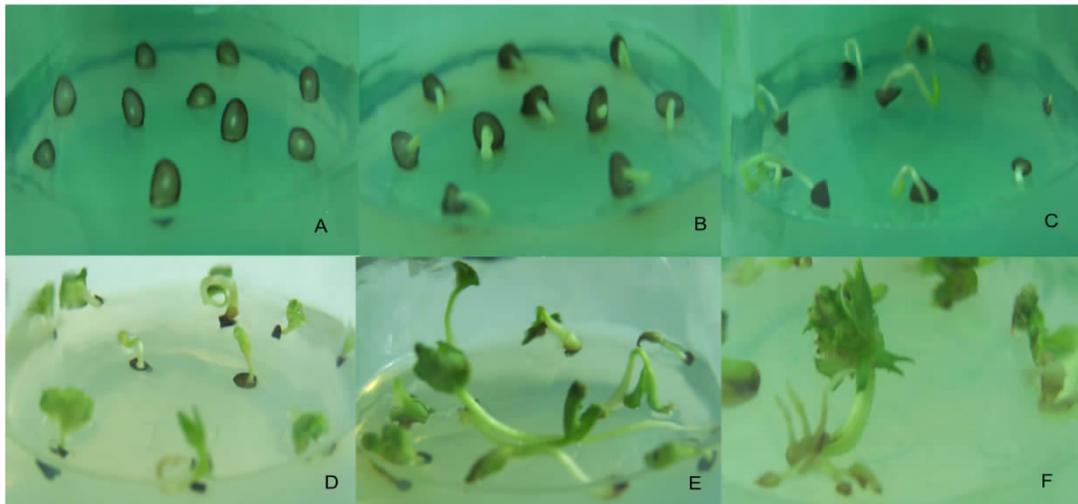
Tab. 4 Analysis of variance table of seedling induction

来源 Source	离差平方和 Sum of square	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	Sig.
KT	480.889	2	240.444	2.018	0.162
6-BA	2 229.556	2	1 114.778	9.357	*
GA ₃	2 204.222	2	1 102.111	9.251	*
重复试验 Repeated test	13.556	2	6.778	0.057	0.945
误差 Error	2 144.444	18	119.136		
总和 Total	75 778.000	27			

* 表示在 0.05 水平差异显著。

* represented significant difference at $P=0.05$ level.

+ GA₃ 1.0 mg/L 进一步实验发现,在上述最佳培养基中添加 0.5 mg/L 6-BA 后的无菌苗虽较粗壮,但植株易畸形化,故以 MS + IAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L 为最适宜诱导无菌苗培养基。图 1 为桃儿七带胚种段在此培养基中不同时期的生长状况。



A ~ F 依次为桃儿七带胚种段培养 2 d、5 d、10 d、20 d、30 d、45 d 时的生长发育状况。(A) 胚萌动;(B) 胚轴伸长,子叶微张;(C) 子叶继续生长;(D) 长出真叶;(E) 植株继续生长;(F) 生根,得完整植株。

A ~ F showed growth and development on days 2, 5, 10, 20, 30 and 45. (A) Embryo seeds germination; (B) The hypocotyls elongate and cotyledons slightly opened; (C) The cotyledon continued growth; (D) The true leaf is growing; (E) Plants continue to grow; (F) Taking root, and complete seedlings was obtained.

图 1 不同时期桃儿七生长状况

Fig. 1 In different periods of *S. hexandrum* growth

2.3 不同添加物对抑制褐变作用的影响

在植物组织培养过程中,由于外植体组织被切割和接种快繁时,损伤切面细胞中酚类物质在酚氧化酶的作用下与氧气聚合而发生氧化反应,形成有毒的醌类物质,外植体切面迅速变成棕褐色或暗褐色,并逐步扩散至培养基中,抑制其它酶的活性,导致组织代谢紊乱,生长受抑制,最终致使外植体死亡。本实验对种子进行切段处理,极易出现褐变现象。与此同时,桃儿七的次生代谢产物中含有的具有一定细胞毒性的鬼臼毒素会引起褐变毒死植株^[6]。解决好组织培养过程中出现的褐变问题有助于提高无菌苗的诱导和存活率,但目前关于解决桃儿七组织培养过程中褐变问题的研究较少。Chattopadhyay 等^[7]曾在生产鬼臼毒素的细胞悬浮培养液中加入 10 g/L 的 PVP 来解决外植体褐化和培养基酸化等问题,并提出 PVP 的加入有利于鬼臼毒素的合成。栗孟飞^[8]曾通过筛选碳源、调节琼脂用量来降低褐变率。本文通过添加一定量的吸附与抗氧化剂来深入探讨抑制褐变的方法,结果见表 5。

表5 不同添加物对带胚种段生长的影响
Tab.5 Effects of different additives on the growth of embryo seeds

培养基 Media	开始萌发时间/d Start germination	褐变率/% Browning rate				诱导率/% Induction rate	生长势 Growth conditions
		10 d	20 d	30 d	40 d		
M ₅	2	40.0	53.3	66.7	83.3	86.7	+++
M ₆	2	3.3	13.3	26.7	36.7	90.0	++++
M ₇	7	0.0	6.7	20.0	26.7	43.3	++
M ₈	5	23.3	40.0	53.3	66.7	56.7	++

AC、PVP 和 Vc 都有抑制褐变的作用,但三者作用机制和范围不同^[9]。由实验结果发现, M₆、M₇ 培养基抑制褐变效果明显,但后期因为 M₆ 中 AC 的无选择吸附性导致无菌苗生长受限,故最佳抑制褐变方案为早期 1 g/L AC 与中后期 1 g/L PVP 的组合。另外,以 20~25 d 为一个培养周期进行转瓶处理也能在一定程度上防止褐变的发生。

3 讨论

桃儿七种皮质密并具细纹,极易造成消毒不彻底而霉变,通过多次试验,发现用体积分数为 75% 酒精浸种 10 s 结合体积分数为 0.158% 升汞溶液浸种 10 min 可以达到较理想的消毒效果。种子圆而小,不易夹取,用镊子夹住种子的头尾两端,可较好地控制住种子。因为种胚在种子尖端且长度仅为整个种子长的 1/3,故在靠近尖端的 1/3 处横切,取尖端带胚的部分接种。

本文通过切断处理法与剥离种胚离体培养法^[2-3,6,10]的对比实验发现(表 2),同一条件下切段处理的无菌苗诱导率为 90.0%,剥离种胚离体培养无菌苗诱导率为 91.1%,二者相差不大,但前者在一定程度上降低了难度、简化了工序、提高了种子利用率,并降低了获得外植体过程中的染菌率,故本文优选工艺简单的切段处理方法。

种子经切割后 5~7 d 内带胚种段大量分泌酚类物质,先经胚诱导培养基培养,使组织中的酚类物质先部分渗入此培养基中,待 10 d 左右转至诱导培养基中培养,此培养方式既能提高无菌苗诱导率、改善长势,又可减少褐变的发生。

在进行桃儿七组织培养时,采用“带胚种段→胚诱导培养基→诱导培养基→增殖培养基→生根培养基”系列培养方式,并使用 1 g/L AC 与 0.1 g/L PVP 的组合抑制褐变方案,可得到诱导率高、长势良好的无菌苗。

参考文献:

[1] 尚海琳. 桃儿七形态与生理特征的地理变异及种子萌发生理[D]. 西安: 西北大学, 2009: 5-11.
 [2] 李玉萍, 漆燕玲, 魏莉霞, 等. 桃儿七种子发芽促进剂的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 9105-9124.
 [3] 漆燕玲, 栗孟飞, 孙萍, 等. 桃儿七成熟胚的离体培养研究[J]. 生物学杂志, 2008, 25(4): 39-41.
 [4] 李城德, 李唯, 栗孟飞, 等. 濒危植物桃儿七种子休眠特性的研究[J]. 植物研究, 2008, 28(5): 618-621.
 [5] 杨爽, 王勇, 陈芝兰, 等. 西藏八角莲种胚愈伤诱导的初探[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(3): 63-65.
 [6] 兰小中, 李春燕, 鲍隆友. 西藏八角莲的组织培养条件筛选[J]. 西藏科技, 2006(3): 56-58.
 [7] Chattopadhyay S, Srivastava A K, Bhojwani S S, et al. Development of suspension culture of *Podophyllum hexandrum* for production of podophyllotoxin[J]. Biotechnol Lett, 2001, 23: 2063-2066.
 [8] 栗孟飞. 桃儿七种子休眠特性及其种胚组织培养研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008: 39-47.
 [9] 叶梅, 王伯初, 段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 426-428.
 [10] 栗孟飞, 李唯. 桃儿七组织培养体系的建立及鬼臼毒素的检测[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1366-1370.