

# 七叶一枝花种子萌发和组织培养

黄宗华 (广东培正学院, 广东广州 510830)

**摘要** [目的]研究七叶一枝花种子萌发的最适赤霉素( $GA_3$ )浓度和组织培养的最适培养基。[方法]采用不同浓度 $GA_3$ 处理种子,研究促进种子快速萌发且萌发率高的 $GA_3$ 浓度,再将胚根3~4 cm长的种子播于土壤中,分别在光照培养箱和自然条件下生长并观察第一片叶的长势。采用不同浓度的6-BA诱导愈伤组织,研究愈伤组织诱导的适宜6-BA浓度。[结果]150 mg/L  $GA_3$ 处理种子的萌发率最高,种子外植体最合适的愈伤组织诱导培养基为添加0.1 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA的1/2MS基本培养基。[结论]七叶一枝花种子的快速萌发方法是可行的。

**关键词** 七叶一枝花;种子;萌发率;愈伤组织

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)27-0118-04

## Seeds Germination and Tissue Culture of *Paris polyphylla* Smith

HUANG Zong-hua (Guangdong Peizheng College, Guangzhou, Guangdong 510830)

**Abstract** [Objective] To research the optimal  $GA_3$  concentration and the optimal culture medium for seed germination of *Paris polyphylla* Smith. [Method] Seeds of *P. polyphylla* were processed by different concentrations of  $GA_3$ . The optimal  $GA_3$  concentration to promote the rapid seed germination and high germination rate was researched. Seeds with 3-4 cm radicle were planted in the soil. Under the condition of illumination and natural growth, growth of the first leaf was observed, respectively. Callus were induced by different concentrations of 6-BA, so as to find the optimal concentration of 6-BA. [Result] In 150 mg/L  $GA_3$  treatment, seeds had the highest germination rate. The optimal callus induction medium for seed explants was 1/2 MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA. [Conclusion] This rapid germination method for *P. polyphylla* is feasible.

**Key words** *Paris polyphylla* Smith; Seeds; Germination rate; Callus

七叶一枝花(*Paris polyphylla*)为百合科重楼属多年生草本植物,别名重楼、草河车、七叶莲等,主要分布于江西、浙江、广东、四川、贵州等省。七叶一枝花以根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛等功效,多用于治疗无名肿毒和毒蛇咬伤,以及流行性腮腺炎、扁桃体炎、咽喉肿痛等。七叶一枝花种子具有明显的后熟特点,胚需要休眠完成后熟才能萌发,在自然条件下经过2个冬天才能出土成苗,且成苗率较低<sup>[1]</sup>。七叶一枝花种子繁殖的关键是打破其休眠,促进生理后熟,使其快速出苗。层积、低温、赤霉素( $GA_3$ )和聚乙二醇(PEG)均能提高种子的萌发率,打破种子的休眠期,缩短种子出苗时间。

获得良好的胚性愈伤组织是七叶一枝花组织培养成功的关键因素。影响七叶一枝花愈伤组织诱导和培养条件的因素主要包括外植体的选择及预处理、培养基成分、培养条件及植物激素等。虽然国外学者对延龄草属植物的组织培养获得了成功,诱导出小根茎,但在培养过程中无法诱导出愈伤组织<sup>[2]</sup>。笔者研究七叶一枝花种子萌发和组织培养,以期为其大规模生产提供技术支撑。

## 1 材料与方 法

**1.1 试验材料** 供试七叶一枝花成熟种子采集于云南大理,经中南民族大学刘学群教授鉴定后置于冰箱的密封塑料袋内使其腐烂,用水流强的自来水洗去颖壳,用手搓揉种子外种皮并用细孔筛筛去红色浆果的外种皮,余下白色种子,晾干后人工除残留物,4℃保存备用。

## 1.2 种子萌发试验

**1.2.1 浸种处理。**用不同浓度赤霉素( $GA_3$ )浸泡七叶一枝花种子24 h,以蒸馏水作为对照,置于20℃培养箱。24 h后倒掉溶液,用自来水冲洗种子,直至洗净残留液体为止,再用蒸馏水冲洗,无菌条件下处理种子。

**1.2.2 无菌处理。**在超净工作台内,用无菌水冲洗种子3~5次,然后使用75%乙醇消毒30 s(乙醇回收利用),无菌水冲洗3~5次,再用0.1%  $HgCl_2$ 浸泡10~15 min(乙醇回收,集中处理),无菌水冲洗3~5次,最后置于无菌的150 mm带滤纸的培养皿内培养。

**1.2.3 培养条件。**将种子按一定比例埋藏于基质湿沙中,然后将其置于4℃下处理60 d,再将温度调至18~20℃放置90 d,再调至低温(6~8℃)放置60 d,后置于20~22℃处理60 d,然后播种在土壤中萌发,留一个钵子的种子继续湿沙层积。种子萌发的标志以胚根刚突破种皮作为标准,萌发率=萌发的种子数/种子总数×100%<sup>[3]</sup>。

**1.2.4 试验设计。** $GA_3$ 浓度为100、150和600 mg/L,对照为相同体积的双蒸水。采用单因素设计,3次重复,每次取100粒种子。

## 1.3 种子的组织培养

**1.3.1 培养基的准备。**基本培养基为1/2MS,添加不同浓度的6-BA(0.1、0.5、0.7、1.0、1.4和2.0 mg/L)和0.5 mg/L NAA,之后分装在500 mL三角瓶内,每瓶装300 mL,于121℃高压灭菌20 min,冷却至不烫手时分装于50 mL已灭菌的三角瓶内,每瓶倒30 mL,备用。

**1.3.2 种子的消毒与接种。**在超净工作台上用无菌水清洗种子外植体3~5次,然后放入盛有75%乙醇的烧杯中浸泡30 s并轻轻摇晃,后用无菌水清洗3~5次,再用0.1%  $HgCl_2$ 浸泡种子外植体10~15 min(不断摇晃烧杯,保证所有外植

**基金项目** 湖北省自然科学基金项目(2010CDA035);中南民族大学植物遗传与发育创新团队资助项目。

**作者简介** 黄宗华(1987-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向:应用生物化学。

**收稿日期** 2016-07-20

体均匀接触溶液), 无菌水洗 3~5 次, 最后用无菌滤纸吸干种子表面的水分, 接种于愈伤组织诱导培养基<sup>[4-5]</sup>。

**1.3.3 培养条件。** 温度  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 湿度 70%, 光照条件  $1\ 000\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 光照时间 12 h/d。

## 2 结果与分析

**2.1 湿沙基质中种子的萌发情况** 湿沙基质层积 240 d 后, 将种子播于土壤中萌发, 结果 100 mg/L  $\text{GA}_3$  溶液浸泡 48 h 种子的萌发率为 95.35% (图 1 a); 150 mg/L  $\text{GA}_3$  溶液浸泡

种子 48 h 的萌发率为 98.51% (图 1 b); 600 mg/L  $\text{GA}_3$  溶液浸泡种子 48 h 的萌发率仅为 55.81% (图 1 c), 剩余种子均干死, 无法得到充足的水分。

湿沙基质层积 240 d 后, 将种子留在湿沙基质中, 继续恒温  $18^\circ\text{C}$  培养, 120 d 后, 种子的胚根已经木质化发育成主根, 且有 3 株种子的种壳已经脱落, 露出包裹的子叶, 在每个根茎部位均分化出侧芽; 360 d 后, 胚乳的营养已被逐渐耗尽, 种皮渐变成黑色, 直至干枯自然脱落, 子叶明显可见 (图 1 d)。



注: a. 100 mg/L  $\text{GA}_3$  处理, b. 150 mg/L  $\text{GA}_3$  处理, c. 600 mg/L  $\text{GA}_3$  处理, d. 100 mg/L  $\text{GA}_3$  处理后 360 d。

Note: a. 100 mg/L  $\text{GA}_3$  treatment, b. 150 mg/L  $\text{GA}_3$  treatment, c. 600 mg/L  $\text{GA}_3$  treatment, d. 100 mg/L  $\text{GA}_3$  for 360 days.

图 1 湿沙基质的种子胚根

Fig. 1 The seeds radicle in wet sand substrate

湿沙基质试验过程中发现, 仅高温或低温并不能打破种子休眠, 而是需要高低温的交替; 采用不同浓度的  $\text{GA}_3$  浸泡种子, 然后进行低温层积和  $18^\circ\text{C}$  培养箱层积, 结果低温层积种子未发芽, 原因可能是七叶一枝花种子的胚发育不完全。

**2.2 长出胚根的种子在土壤中的萌发情况** 将胚根长至 3~4 cm 的种子于春季栽种在钵子里, 其上覆盖一层 2 cm 左右的土, 第一次浇透定根水, 之后每隔 3~5 d 浇水, 放于光照培养箱内, 温度为  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 湿度为 70%, 弱光照条件下观察生长情况。另一部分于相同时间种在小钵子内, 在湖北省恩施土家族苗族自治州的自然条件下, 挖土一定的深度放入钵子与地面相平, 温度、光照时间和湿度均在不断检测中。

光照培养箱和自然条件栽种的种子均能长成心形幼苗, 说明各种处理方法均能获得大量种苗, 此方法是可行的。光照培养箱七叶一枝花的种子在其外面还残留部分鳞茎, 阻碍子叶展开, 而自然条件下七叶一枝花的种子已经长成心形幼苗, 比光照培养箱内长得快且长势良好。其原因是光照培养箱培养条件较恒定, 通风状况较差, 若水浇多, 会在其上出现

一层白膜, 而自然条件下不仅通风良好且不会存积水分, 自然条件下生长的七叶一枝花幼苗比光照培养箱生长的快和好 (图 2)。

经过上述方法打破七叶一枝花种子的休眠期, 需要 180~210 d, 种子可形成心形单叶幼苗。

**2.3 不同浓度 6-BA 对种子愈伤组织的影响** 种子外植体形成愈伤组织的适宜培养基为 1/2MS (大量元素、微量元素、有机溶剂和铁盐都为 MS 培养基的 50%) + 0.1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA。试验过程中发现, 在种子外植体愈伤组织诱导初期对培养基的要求较低, 说明培养初期胚乳可以提供种子所需要的养分。6-BA 是植物组织培养中使用较广泛的一种细胞分裂素, 且在许多植物上表现出较强的诱导不定芽形成的能力。该试验结果也说明 6-BA 用于种子不定芽的诱导是适宜的, 且最佳浓度为 0.1 mg/L。随着 6-BA 浓度的增加, 诱导不定芽的能力增强, 同时外植体开始褐化, 因此, 在一定浓度范围内, 高浓度的 6-BA 对诱导不定芽的形成是不合适的。

虽然是相同浓度的激素,但种子外植体诱导的效果不同,有的能直接形成愈伤组织,有的能形成愈伤组织和长出芽。种子外植体形成的愈伤组织(图3 a),在整个种子的周围形成一圈愈伤组织,愈伤组织较松散且易碎,诱导效果不

理想。选择长势好的愈伤组织进行分化培养,一段时间后发现有愈伤组织不同程度地褐变甚至颜色变黑,未分化出苗,既有愈伤组织又有芽的种子外植体也开始褐变和变黑(图3 b和图3 c),但种子长出的芽可以进一步生长和发育(图3 d~f)。

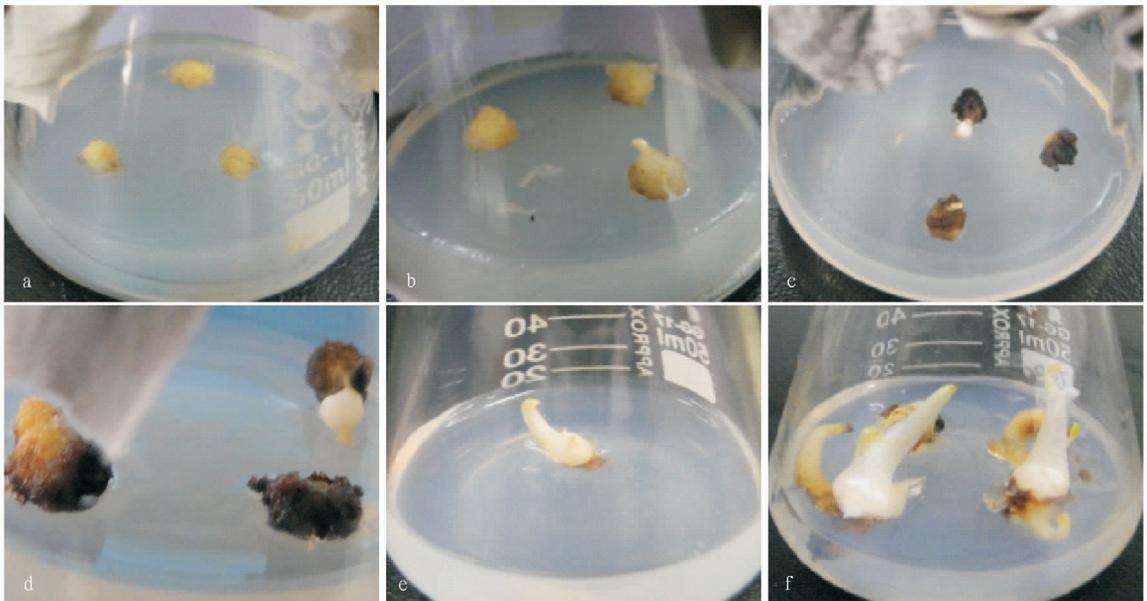


注:a和b.光照培养箱,c和d.自然条件。

Note: a and b. Illuminating incubator, c and d. Natural conditions.

图2 光照培养箱和自然条件下生长的幼苗

Fig. 2 Seedlings in labs and under natural conditions



注:a.愈伤组织,b.芽和愈伤组织,c.黑色的愈伤组织,d.分化的芽,e.芽生长和发育,f.长出根。

Note: a. Callus, b. Bud and callus, c. Black callus, d. Differentiation of bud, e. Bud growth and development, f. Growing root.

图3 七叶一枝花种子愈伤组织诱导过程

Fig. 3 Seed callus induction process of *Paris polyphylla* Smith

6-BA 能有效地被种子外植体所吸收,致使6-BA 富集,且诱导的不定芽在含有6-BA 的培养基上继代几次后,其玻璃化程度不断加重,说明种子外植体有富集细胞分裂素6-BA 的倾向。

虽然种子诱导出的愈伤组织未分化出苗,然而观察发现其种子先长出胚根,露出种子之外(图4 a~c),随着胚根的不断发育和进一步对种子进行诱导分化(图4 d~f),胚根向下生长,形成主根;与此同时,胚轴细胞也相应地生长和伸长,把胚芽连同子叶一起推出;最后胚芽突出种皮,向上生长,形成茎和叶,获得了无菌苗(图4 g~i)。由此可知,七叶一枝花是子叶出土萌发。

### 3 结论

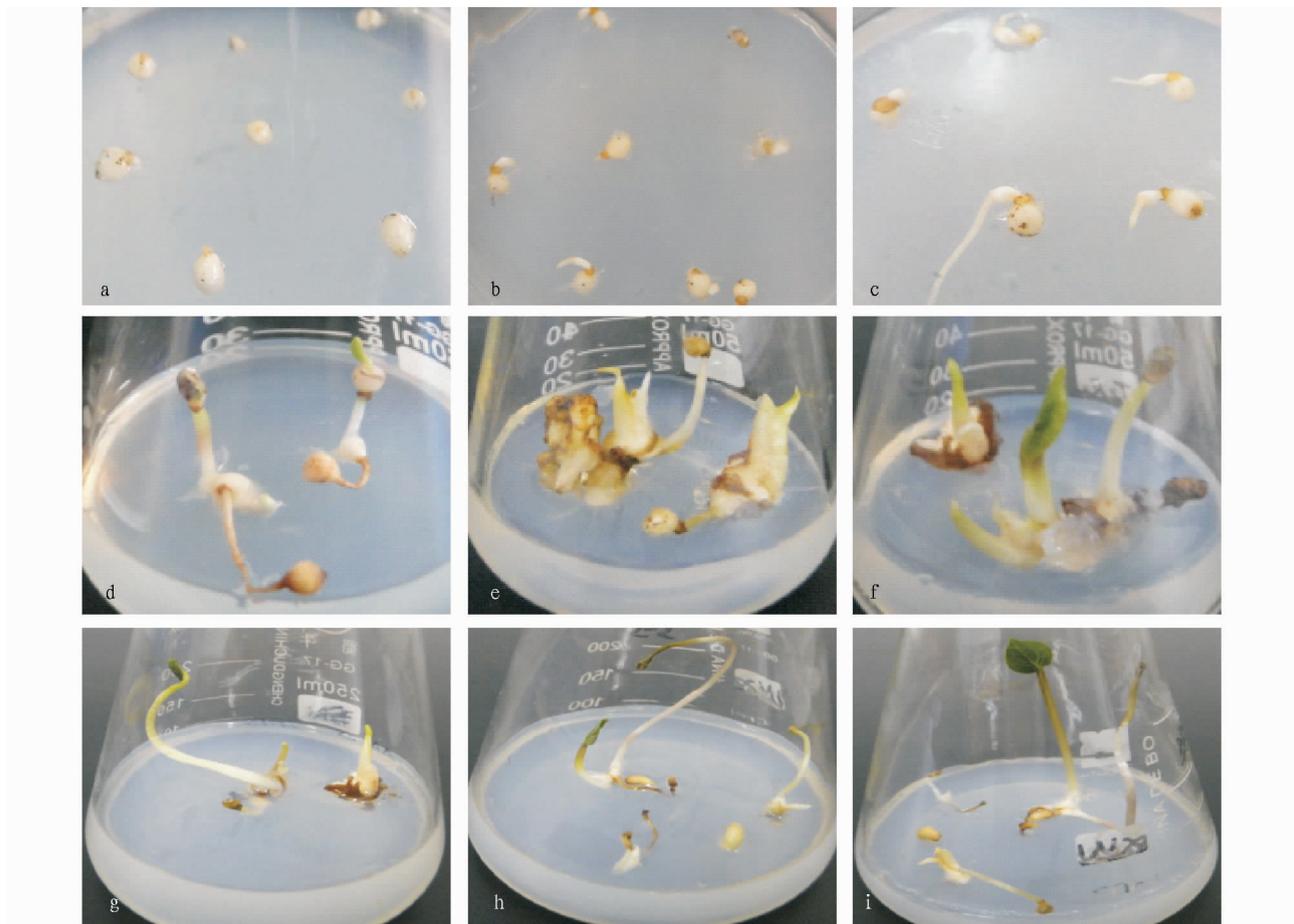
研究结果表明,七叶一枝花种子快速萌发期由2 a 缩短

为0.5 a,萌发率由10%~46%提高到90%以上。150 mg/L  $GA_3$  处理种子的萌发率最高。在七叶一枝花育苗、栽培生产中可以选择这些植物激素,提高其出苗率和幼苗成活率。

较高浓度  $GA_3$  有利于种子萌发,低浓度则使萌发率下降。先用水溶液浸泡种子,使种子充分吸胀,再用  $GA_3$  溶液浸泡,有利于种子充分吸收  $GA_3$  溶液。 $GA_3$  不仅能诱导水解酶类的合成,也能促进酶的分泌,水解贮藏物质供胚生长的小分子化合物,促进种子萌发,且促进效果最明显。

种子外植体最合适的愈伤组织诱导培养基为添加0.1 mg/L 6-BA 和0.5 mg/L NAA 的1/2MS 基本培养基,诱导的愈伤组织比较松散,湿度大,且易碎。可考虑使用未成熟的种子胚,此时胚比较幼嫩和容易获得;根茎和种子外植体都能诱导出愈伤组织,但均未分化出苗。后续试验考虑

使用正交试验筛选出合适的愈伤组织分化培养基,获得植物体,以期为解决种苗问题提供理论指导。



注:a~c. 出现胚根,d~f. 诱导分化,g~i. 无菌苗。

Note: a - c. Radide, d - f. Inducing differentiation, g - i. Aseptic seedling.

图 4 种子形成无菌苗的过程

Fig. 4 The process of seeds growing into aseptic seedling

参考文献

[1] 付婷婷,程红焱,宋松泉. 种子休眠的研究进展[J]. 植物学报,2009, 44 (5):629-641.  
 [2] PENCE V C, SOUKUP V G. Propagation of the rare *Trillium persistens* in vitro[J]. Micropropagation news,1995,1:109-110.  
 [3] 蒙爱东,闫志刚,余丽莹,等. 七叶一枝花种子无菌培养萌发观察[J].

江苏农业科学,2012,40(11):258,260.  
 [4] 王跃华,蒋婷婷,付伟,等. 重楼植物的组织培养研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(8):2014-2016.  
 [5] 王岚,付素静,李艺,等. 梵净山七叶一枝花组织培养技术初探[J]. 农技服务(实验研究),2015,32(2):66-67.

(上接第 39 页)

[17] 孙培琪,刘婧,贾建民,等. 不同药剂对打破玫瑰香葡萄芽休眠的效果研究[J]. 中国农学通报,2011,27(8):222-225.  
 [18] 董淑华. 维多利亚葡萄的日光温室丰产栽培技术试验[J]. 落叶果树, 2015,47(1):8-10.  
 [19] 曹春明. 巨峰葡萄一年两季萌芽调节的生理基础研究[D]. 南宁:广西大学,2006.

[20] 任俊鹏,郭建,刘伟忠,等. 单氧胺处理对阳光玫瑰葡萄萌芽的影响[J]. 浙江农业科学,2015,56(6):857-859.  
 [21] 倪建军,石雪晖,刘坤玉,等. 3 个欧亚种葡萄品种二茬果的产量及品质研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2009(3):9-12.  
 [22] 商佳胤,李树海,朱志强,等. 设施‘玫瑰香’葡萄二次果果实品质及芳香化合物组分分析[J]. 果树学报,2013,30(2):267-273.  
 [23] 商佳胤,田淑芬,集贤,等. 设施巨峰葡萄二次果果实品质及芳香化合物组分分析[J]. 西北植物学报,2014,34(9):1836-1842.