

DOI:10.11937/bfyy.201614025

# 不同处理对三种药用植物外植体生长发育的影响

李景蕪, 叶春宇, 马维波, 王春云

(湖北第二师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 武汉 430205)

**摘 要:**以红豆杉、无花果、大叶黄杨的植物茎段为外植体,研究了不同浓度琼脂与不同灭菌时间处理对3种药用植物外植体褐化、污染及发芽情况的影响。结果表明:随着琼脂浓度的升高,褐化率、褐化等级、污染率和发芽率均呈下降趋势;综合各项指标分析,以琼脂浓度  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  效果较好。随灭菌时间增加,褐化率、褐化等级上升,但污染率、发芽率均急剧下降,综合各项指标分析,以灭菌时间 5~10 min 的处理效果较好。

**关键词:**琼脂浓度;灭菌时间;外植体;褐化;污染率;发芽率

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0102-04

红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)属红豆杉属植物,又名紫杉,是濒临灭绝的古老孑遗树种。用红豆杉植物中提取的紫杉醇(paclitaxel)制备的抗癌药物 Taxol,是治疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌的一线临床用药,且对恶性黑色素瘤、头颈部肿瘤、白血病、结肠癌等也有明显疗效<sup>[1-3]</sup>。红豆杉是世界公认的天然珍稀抗癌植物,应用人工繁殖方法是解决红豆杉资源短缺、加快红豆杉药用林建设最有效的途径之一<sup>[4]</sup>。红豆杉组培具有可以人为控制、生长周期短、繁殖率高、方便管理、便于自动化操作等优点<sup>[5-6]</sup>。大叶黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb.)属卫矛科,为南方常见栽培植物,既可观赏又可入药,民间常以茎皮及枝叶采收晒干备用。据《中华本草》记载,性味苦、辛、微温;具有祛风温、强筋骨、活血止血之功效。利用组织培养技术,可分批分期进行扩大繁殖,缓解苗木供求紧张状况,以保证苗木的周年供应,可在短期内获得大量的脱毒优质苗<sup>[7]</sup>。通过组织培养建立大叶黄杨无性繁殖体系是获得高产高质最有效的途

径。无花果(*Ficus carica* L.)属桑科榕树属落叶灌木或小乔木,现代药理研究发现,其果实具有健胃清肠、消肿解毒、抗肿瘤、降压、轻泻、催乳、助消化等药用价值。植物组织培养是快速繁殖、加大栽培规模的重要方法,但是外植体出现褐化及污染是导致组培失败的最主要原因,故防止外植体褐化及污染显得尤其重要<sup>[8-9]</sup>。

现以红豆杉、无花果、大叶黄杨的茎段为外植体,在不同琼脂浓度、不同灭菌时间处理下进行外植体褐化、污染及发芽情况的研究,以期对药用植物优质种苗生产提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为湖北第二师范学院校园及苗圃内种植的红豆杉、无花果、大叶黄杨的植物茎段。将选取的外植体剪去叶片、保留叶柄,用自来水冲洗干净后,在超净工作台上将其剪成 10 cm 长带腋芽的茎段,放入经高温灭菌的瓶中,加入 75% 的酒精浸摇 30 s,倒出酒精,然后用 0.1% 的升汞溶液消毒 8~10 min,用无菌水冲洗 5 次,待接种。诱导芽分化,以 MS 为基本培养基,加入激素 6-BA  $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,再向其中加入蔗糖 20 g,制成固体培养基,用圆形培养瓶分装,每瓶 30 mL,灭菌后备用。

**第一作者简介:**李景蕪(1967-),男,博士,副教授,研究方向为药用植物学与园艺学。E-mail:15527608267@163.com.

**基金项目:**湖北第二师范学院建设资助项目。

**收稿日期:**2016-03-26

**Abstract:** Taking *Antirrhinum majus* and *Malus* 'Snow drift' as materials, using agrobacterium-mediated method, the recombinant vector containing *Am4'* CGT and *AmAS1* was expressed in *Malus* flowers, the instantaneous expression effect was identified by HPLC and PCR analysis. The results showed that the recombinant vector CGT-AS-pCambia 1302 was built successfully, after infected by EHA105, the *Malus* flowers appeared to be light yellow, and it indicated that the target genes were transcribed and expressed in *Malus* flowers. A new absorption peak was found by HPLC analysis, the result indicated that there were aurones accumulated.

**Keywords:** crabapple; aurones; bivalent expression vector; transient expression

## 1.2 试验方法

琼脂设置 3 个浓度处理:5、10、15 g·L<sup>-1</sup>;灭菌时间设置 4 个处理(使用 0.1%的升汞溶液):3、5、10、15 min。各影响因素采用单因子多水平对比设计,每处理重复 3 次。其它营养成分和培养条件相同。

## 1.3 项目测定

褐化率(%)=(有褐化现象外植体数/接种外植体数)×100;褐化表现级别,参照李景蕪等<sup>[10]</sup>的褐化等级标准进行划分,0 级:无或轻度褐变,材料周围培养基色泽基本呈乳白色;1 级:淡褐色;2 级:较严重褐变,褐色;3 级:严重褐变,黑褐色。污染率(%)=(有污染现象外植体数/接种外植体数)×100;发芽率(%)=(有发芽现象外植体数/接种外植体数)×100。

## 1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 软件进行处理,SPSS 13.0 软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同琼脂浓度对外植体的影响

2.1.1 不同琼脂浓度对外植体褐化的影响 由图 1 可知,在不同琼脂浓度处理下,红豆杉、无花果、大叶黄杨外植体都有褐变现象的发生,随着琼脂浓度的上升,三者褐化率均呈缓慢下降趋势,经方差分析显示,三者变化均不显著( $P>0.05$ )。褐化率较低的是红豆杉,而无花果一直较高。通过外植体褐化等级的百分比分析发现(表 1),在 3 种不同琼脂浓度下,红豆杉褐化等级变化不大,均为 1 级。而无花果褐化等级最高,出现了 3 级。随琼脂浓度升高,三者褐化等级均减轻。导致这样的原因可能是较高的培养基硬度限制了无花果外植体启动培养时褐化物质的外渗,使得有毒物质难以扩散。

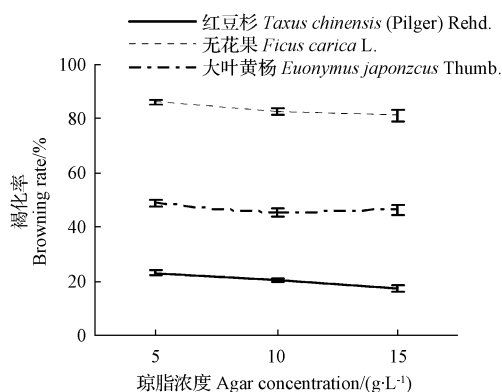


图 1 不同琼脂浓度对外植体褐化的影响

Fig. 1 Effect of different agar concentration on the browning of explants

2.1.2 不同琼脂浓度对外植体污染率的影响 由图 2 可知,不同琼脂浓度条件下,3 种外植体都有污染现象发生,随着琼脂浓度升高,外植体污染率变化情况各不相

表 1 不同琼脂浓度下外植体褐化等级

Table 1 Browning degree of explants in different agar concentration %

外植体 Explant	褐化程度 Browning degree	琼脂浓度 Agar concentration/(g·L <sup>-1</sup> )		
		5	10	15
红豆杉 <i>Taxus chinensis</i> (Pilger) Rehd.	0 级	77.0	79.4	82.8
	1 级	23.0	20.6	17.2
	2 级	0.0	0.0	0.0
	3 级	0.0	0.0	0.0
无花果 <i>Ficus carica</i> L.	0 级	13.9	17.3	18.8
	1 级	50.4	49.4	49.7
	2 级	23.9	22.5	23.1
	3 级	11.8	10.7	8.5
大叶黄杨 <i>Euonymus japonicus</i> Thunb.	0 级	51.3	54.9	53.9
	1 级	32.5	27.5	30.3
	2 级	16.2	17.7	15.8
	3 级	0.0	0.0	0.0

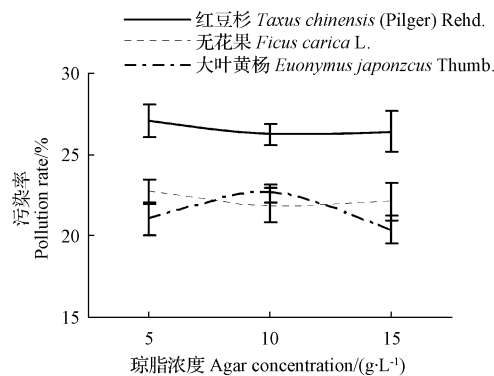


图 2 不同琼脂浓度对外植体污染率的影响

Fig. 2 Effect of different agar concentration on the pollution rate of explants

同,大叶黄杨先升后降,红豆杉和无花果先降后升,但总体呈下降趋势,方差分析结果不显著( $P>0.05$ )。

2.1.3 不同琼脂浓度对外植体发芽率的影响 由图 3 可知,红豆杉、无花果外植体的发芽率随着琼脂浓度升高而降低,而大叶黄杨相反,稍有升高。经方差分析显示,三者变化均不显著( $P>0.05$ ),均保持 70%~80%的发芽率。说明琼脂浓度过高不利于芽增殖,这与刘小玉等<sup>[11]</sup>、张敏等<sup>[12]</sup>的试验结果一致。

### 2.2 不同灭菌时间对外植体的影响

2.2.1 不同灭菌时间对外植体褐化的影响 由图 4 可知,3 种外植体在不同灭菌时间后进行培养,随着灭菌时间增加,褐化率显著上升,经方差分析显示,变化均达极显著水平( $P<0.01$ )。在灭菌 15 min 的材料中,无花果褐化率达 100%,大叶黄杨达 87%,红豆杉也达 65%,说明灭菌时间过长也是增加外植体褐化的重要原因。从褐化等级百分比来看(表 2),无花果褐化等级较高,大多为 2、3 级;其次是大叶黄杨;红豆杉褐化程度较轻,在 4 个灭菌时间下,褐化等级均为 1 级。3 种外植体均表

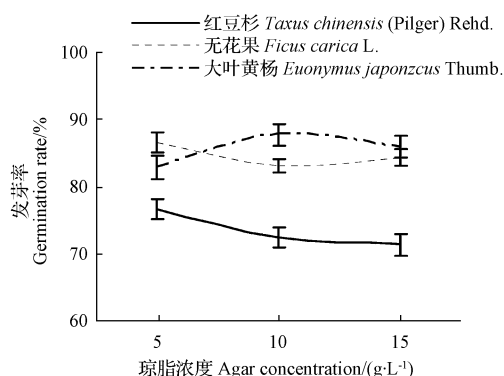


图3 不同琼脂浓度对外植体发芽率的影响

Fig. 3 Effect of different agar concentration on the germination rate of explants

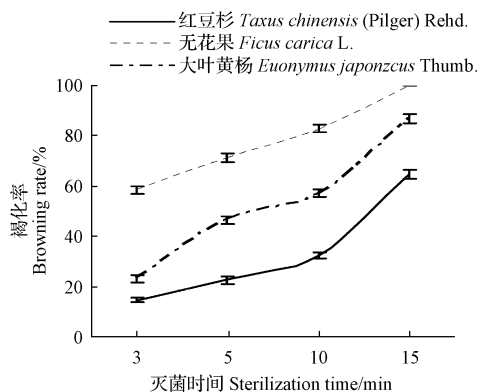


图4 不同灭菌时间对外植体褐化的影响

Fig. 4 Effect of different sterilization time on the browning of explants

表2 不同灭菌时间处理下外植体褐化等级

Table 2 Browning degree of explant with different sterilization time treatment

外植体 Explant	褐化程度 Browning Degree	灭菌时间 Sterilization time/min				%
		3	5	10	15	
红豆杉 <i>Taxus chinensis</i> (Pilger) Rehd.	0级	85.4	77.5	67.6	35.4	
	1级	14.7	22.5	32.4	18.3	
	2级	0.0	0.0	0.0	22.5	
	3级	0.0	0.0	0.0	23.9	
无花果 <i>Ficus carica</i> L.	0级	41.4	28.6	17.2	0.0	
	1级	16.8	18.8	14.0	13.2	
	2级	24.0	20.3	26.6	24.9	
	3级	17.8	32.3	42.2	61.9	
大叶黄杨 <i>Euonymus japonicus</i> Thunb.	0级	76.9	53.4	42.8	13.1	
	1级	23.1	24.3	23.4	18.4	
	2级	0.0	22.3	18.8	31.0	
	3级	0.0	0.0	14.9	37.5	

现出随灭菌时间增加,褐化等级增加的趋势。

2.2.2 不同灭菌时间对外植体污染率的影响 由图5可知,随着灭菌时间增加,全部外植体的污染率均急剧下降,经方差分析显示,三者变化达显著( $P < 0.05$ )或极显著水平( $P < 0.01$ )。在灭菌10 min时,全部污染率已

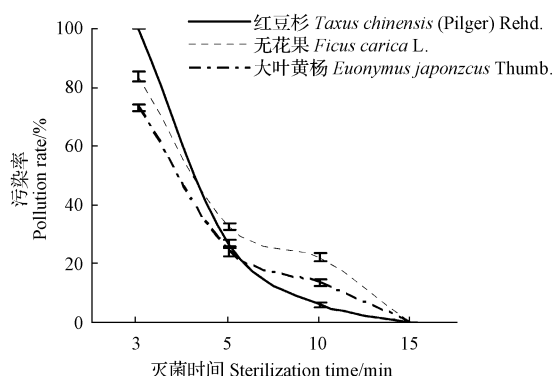


图5 不同灭菌时间对外植体污染率的影响

Fig. 5 Effect of different sterilization time on the pollution rate of explants

控制在25%以下;灭菌15 min时,全部污染率都为0。说明灭菌时间延长是控制外植体污染的关键之一。

2.2.3 不同灭菌时间对外植体发芽率的影响 由图6可知,3种外植体的发芽率均随着灭菌时间的增加,先缓慢而后急剧下降,经方差分析显示,灭菌5 min以后,其变化均达极显著水平( $P < 0.01$ )。在15 min时,所有外植体的发芽率在15%以下,其中红豆杉为0。说明升汞溶液灭菌处理超过10 min以后,对植物的伤害较大,对植物的细胞组织及其生长发育都有强烈的抑制作用。

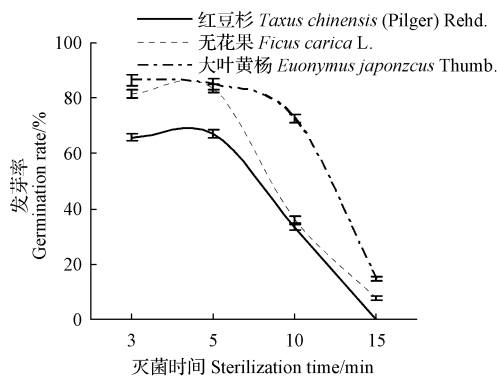


图6 不同灭菌时间对外植体发芽率的影响

Fig. 6 Effect of different sterilization time on the germination rate of explants

### 3 结论与讨论

试验结果表明,随着琼脂浓度的升高,红豆杉、无花果、大叶黄杨褐化率和褐化等级都呈下降趋势,这与王箫等<sup>[13]</sup>、叶添谋<sup>[14]</sup>的结论相近,即随着琼脂用量增加,褐化率降低;但与徐振彪等<sup>[15]</sup>、李浚明<sup>[16]</sup>、梅兴国等<sup>[17]</sup>的研究结果不一致。导致研究结果截然相反的原因,可能正好说明了影响褐化的因素是多种多样的,抗褐变剂的选择也应该因外植体种类、激素多少、培养基成分、培养条件的不同而不同<sup>[10]</sup>。与此同时,随琼脂浓度升高,外植体的污染率和发芽率都有下降趋势,但差异不显

著。MARHGERTA 等<sup>[18]</sup>的试验结果也表明,芽随着培养基中琼脂浓度的提高而生长量下降。综合分析褐化率、污染率、发芽率指标的结果表明,琼脂浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的效果较好。琼脂是培养基中的凝固剂,对培养材料主要起支持作用。但是不同的琼脂浓度使培养基的硬度不同,有可能影响了外植体对培养基中营养物质及激素的吸收,从而影响了外植体的增殖和生长发育。总的来说,琼脂浓度过高或过低都不利于外植体的生长发育及吸收营养物质<sup>[19]</sup>。

该试验中,3种外植体随灭菌时间增加,褐化率快速上升,变化均极显著;同时褐化等级也在增加,验证了灭菌时间过长是增加外植体褐化的重要原因。随灭菌时间增加,污染率、发芽率均急剧下降,说明灭菌时间延长是控制外植体污染的关键之一,但同时对植物生长发育也有明显抑制作用。综合分析上述3项指标结果表明,以灭菌时间5~10 min的处理效果较好。所以,为了抑制外植体褐化及污染,但又不影响正常的诱导分化,针对不同种类植物或品种应选择并控制好适宜的灭菌时间。为保证药用植物外植体良好地生长发育,将来还需进一步开展相关试验研究,以找出最佳的培养条件及其组合。

#### 参考文献

- [1] 夏洪平. 癌症的克星:植物抗癌药紫杉醇[J]. 食品与药品, 2005, 7(7):52-53.
- [2] 傅喆喆,袁杰,黄雄伟,等. 植物抗癌药紫杉醇的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(3):58-61.
- [3] 杨礼香,周诗毅. 南方红豆杉组织培养和紫杉醇含量测定[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2001, 35(4):453-455.
- [4] 李景蕪,陈功轩. 关于珍稀植物红豆杉水培繁殖的思考[J]. 现代园艺, 2012, 6(11):19-20.
- [5] 陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等. 不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异[J]. 中草药, 2000, 31(3):216-218.
- [6] 盛长忠,王淑芳,王宁宁,等. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究[J]. 中草药, 2000, 31(2):130-132.
- [7] 吴广宇,杨玲玲. 大叶黄杨带腋芽茎段组织培养研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(5):815, 817.
- [8] 周俊辉,周家荣,曾浩森,等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊):481-486.
- [9] 朱建华,关丽霞. 无花果的组织培养研究[J]. 北方果树, 2002(3):9-10.
- [10] 李景蕪,刘艳丽. 无花果组培中培养条件对外植体褐化的影响[J]. 北方园艺, 2015(14):99-101.
- [11] 刘小玉,洪森荣. 无机盐、琼脂和 NAA 对黄独试管苗生长发育的影响[J]. 上饶师范学院学报, 2010, 3(30):66-69.
- [12] 张敏,张曙光,孙红绪,等. 对影响草莓组培苗玻璃化若干因素的探讨[J]. 湖北农业科学, 2002(2):82-83.
- [13] 王箫,黎云祥,邹利娟,等. 白藜愈伤组织的诱导及褐化的防治[J]. 西华师范大学学报(自然科学版), 2008, 29(3):263-268.
- [14] 叶添谋. 植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J]. 韶关学院学报(自然科学), 2010, 31(3):84-90.
- [15] 徐振彪,傅作申,原亚萍,等. 植物组织培养过程中的褐化现象[J]. 国外农学-杂粮作物, 1997(1):55-56.
- [16] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1992:349-350.
- [17] 梅兴国,董妍玲,潘学武. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4):8-11.
- [18] MARHGERTA B, PAOLO C, PIERRE D. Influence of agar on *in vitro* cultures. II. Biological performance of ranunculus on media solidified with three different agar brand[J]. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 1999, 35(1):94-101.
- [19] 翟彦,张宗勤,宋西德. 不同浓度琼脂对东方百合西伯利亚组培小鳞茎繁殖的影响[J]. 北方园艺, 2010(6):159-161.

## Effect of Different Treatments on the Growth and Development of Three Kinds of Explants of Medicinal Plants

LI Jinghong, YE Chunyu, MA Weibo, WANG Chunyun

(School of Chemistry and Life Science, Hubei University of Education, Wuhan, Hubei 430205)

**Abstract:** Taking *Taxus chinensis*, *Ficus carica* L. and *Euonymus japonicus* Thumb. as materials, the effects of different agar concentration and different sterilization time on browning, pollution and germination were studied. The results showed that with the increase of agar concentration, the browning rate, browning degree, pollution rate and germination rate were all decreased. Comprehensive analysis of indicators, the effect of the concentration of agar  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  was better. With the increase of sterilization time, the browning rate and browning degree increased, but the pollution rate and germination rate decreased sharply. The treatment effect of the sterilization time 5—10 minutes was better.

**Keywords:** agar concentration; sterilization time; explant; browning; pollution rate; germination rate