

## 当年生喜树种子的无菌发芽及幼苗生长

徐颖莹, 黄明亮, 单梅, 胡家金\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 以当年生新鲜喜树种子为材料, 采用植物组织培养技术, 研究其萌发及幼苗生长的适宜条件。结果表明, 采用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  和 10%  $\text{NaClO}$  分别对外植体进行消毒后, 以 0.1%  $\text{HgCl}_2$  进行果实消毒的种子萌发率最高, 为 41.11%; 在此基础上用 10%  $\text{NaClO}$  将预培养种子浸泡 3 min 后, 其萌发率和成苗率显著提高, 分别达 85.56% 和 55.56%, 而且幼苗生长状态好, 平均生成侧根 6~7 条, 主根长约 10 cm; 对未经处理的种子苗做切根处理, 并转移到新鲜的 MS 培养基, 幼苗生长效果与经 10%  $\text{NaClO}$  处理过的种子苗的生长效果相同, 但将其转移到含 1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基后, 种子苗的子叶变黄, 无新根生成或只有 1 个短根生成。

**关 键 词:** 喜树; 种子; 萌发率; 成苗率; 切根

中图分类号: Q945.34

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)03-0277-04

## Aseptic germination and seedling growth of *Camptotheca acuminata* seeds on that very year

XU Ying-ying, HUANG Ming-liang, SHAN Mei, HU Jia-jin\*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The suitable condition of seeds germination and their growth were researched by taken fresh seeds of *Camptotheca acuminata* on that very year as materials through plant tissue culture. To compare the rate of seed germination, explants were disinfected with 0.1%  $\text{HgCl}_2$  and 10%  $\text{NaClO}$  respectively. The result showed that rate of seed germination was the highest with 0.1%  $\text{HgCl}_2$  disinfection, which achieved 41.11%. Further, rate of seed germination and seedling were significantly increased with 10%  $\text{NaClO}$  soak for 3 minutes on the basis of treatment of 0.1%  $\text{HgCl}_2$  disinfection, which reached 85.56% and 55.56% respectively. Fresh seedlings grew well with an average of 6~7 lateral roots and a 10 cm long taproot. The growth of seedlings treated by root-cut and transferred in fresh MS medium were same as treatment with 10%  $\text{NaClO}$ . Seedlings, however, became yellow and had no new root or only one short root after transferred them to MS medium with 1 mg/L 6-BA.

**Key words:** *Camptotheca acuminata*; seeds; germination rate; seedling rate; root-cut

喜树(*Camptotheca acuminata* Decne)是山茱萸目(Cornales)珙桐科(Nyssaceae)喜树属(*Camptotheca*)多年生落叶乔木<sup>[1]</sup>, 可作为园林观赏及环境保护的绿化树种<sup>[2-4]</sup>。喜树是继红豆杉之后被发现的重要的木本抗癌药用植物<sup>[5-6]</sup>。喜树组织中含有的喜树碱(camptothecin, CPT)具有抗癌活性<sup>[7-8]</sup>, 可以通过阻断癌细胞中 DNA 拓扑异构酶 I (topoisomerase,

TopoI)的合成来阻止癌细胞的形成<sup>[9]</sup>。目前对喜树的研究多数是针对喜树碱的分离、提取与鉴定<sup>[10]</sup>, 喜树愈伤的诱导<sup>[4,8]</sup>和茎段的扦插快繁<sup>[6,11]</sup>等。关于喜树种子无菌发芽及幼苗生长的研究少见报道。喜树的无菌扦插繁殖受季节影响, 愈伤组织诱导再生植株的周期较长, 无菌苗的大量获得困难, 故采用种子无菌发芽来解决该问题具有现实意义。鉴于喜

收稿日期: 2013-12-29

基金项目: 湖南省教育厅项目(08C430)

作者简介: 徐颖莹(1988—), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术研究, gxqds@126.com; \*通信作者, jjhu3@sohu.com

树种子本身的休眠作用,其萌发率不高<sup>[12]</sup>。笔者从种子无菌发芽角度来研究当年生喜树种子的适宜萌发条件及喜树种子萌发率和成苗率的提高途径,旨在建立良好的喜树无菌苗培养体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

当年生新鲜喜树果实采于湖南农业大学校园内。试验时剥取果实内种子接种。

采用 MS 基本培养基,各培养基均含 3% 的蔗糖和 0.8% 的琼脂, pH 5.8, 高压灭菌。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 种子和幼苗的培养条件

培养基分装于 100 mL 的三角瓶中,每瓶 40 mL 左右。接种时每个处理 5 瓶。每瓶接种 6 粒种子。重复 3 次。材料培养温度(25±2) °C, 光照度 1 500~2 000 lx, 光照时间 16 h, 相对湿度大于 50%。

#### 1.2.2 适宜外植体消毒方式的选取

将喜树果实和种子分别用流水冲洗干净,再用蒸馏水润洗 2 遍;于超净工作台内,用 70% 的乙醇表面消毒约 60 s,再用无菌水冲洗 1 遍,然后将果实和种子分别进行消毒(T<sub>1</sub>: 0.1% HgCl<sub>2</sub> 果实消毒; T<sub>2</sub>: 10% NaClO 果实消毒; T<sub>3</sub>: 0.1% HgCl<sub>2</sub> 种子消毒; T<sub>4</sub>: 10% NaClO 种子消毒)。消毒时不时地摇动, 10 min 后倒去消毒液,并用无菌水反复冲洗 3 次以上。消毒后的种子直接接种于 MS 培养基上;果实则剥去果肉后接种于 MS 培养基中。观察并统计种子的萌发率。

#### 1.2.3 预培养喜树种子的不同化学溶液处理

将喜树种子按 1.2.2 中筛选出的适宜外植体消毒方式进行处理后预培养 15 d,再分别用 10% NaClO、1% NaClO 和 70% 乙醇处理 3 min,接种在新鲜的 MS 培养基上,各处理均接种 30 粒种子。以未经化学溶液处理的种子为对照。统计种子的萌发率和成苗率,并观察幼苗生长状态。

#### 1.2.4 种子苗的切根处理及转移

将未经化学溶液处理的种子苗切去部分根部(留下与茎部相接的一小部分),并转移到分别附加了 0、1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上,观察切根处

理后幼苗在不同培养基上的生长情况。

### 1.2.5 数据处理

试验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 16.0 软件进行分析和处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 喜树种子的萌发情况

#### 2.1.1 不同外植体消毒方式下喜树种子的萌发率

表 1 结果表明, T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 处理喜树种子的萌发率较高,而 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 处理喜树种子的萌发率很低,且前者与后者之间的差异均达显著水平。考虑到用 10% NaClO 消毒的污染率较高,因此,采用 T<sub>1</sub> 处理(0.1% HgCl<sub>2</sub> 果实消毒)进行后续试验。

表 1 各消毒处理喜树种子的萌发情况

Table 1 Effects of different treatments on seed germination of *Camptotheca acuminata*

处理	接种数/粒	萌发数/粒	萌发率/%
T <sub>1</sub>	30	12.33±2.08	(41.11±6.94)a
T <sub>2</sub>	30	10.33±1.53	(34.45±5.09)a
T <sub>3</sub>	30	0.67±0.58	(2.22±1.92)b
T <sub>4</sub>	30	0.33±0.58	(1.11±1.92)b

#### 2.1.2 化学溶液处理对喜树种子萌发的影响

表 2 结果表明: 3 种化学溶液处理都使喜树种子的萌发率得到了提高,其中以 1% NaClO 处理的效果最好,10% NaClO 处理的效果次之,且均与对照差异显著,而 70% 乙醇处理与对照间的差异无统计学意义。由于 1% NaClO 处理的成苗率不高,所以,在后续试验中采用 10% NaClO 处理。

表 2 不同化学溶液处理喜树种子的萌发率和成苗率

Table 2 Effects of different chemical solution treatments on the rate of seed germination and seedling of *Camptotheca acuminata*

处理	萌发率/%	成苗率/%
10% NaClO	(85.56±6.93)a	(55.56±5.09)a
1% NaClO	(91.12±5.09)a	(25.56±8.39)b
70% 乙醇	(51.11±11.71)b	(12.22±3.85)c
对照	(41.11±6.94)b	(34.45±6.94)b

### 2.2 不同处理喜树幼苗的生长情况

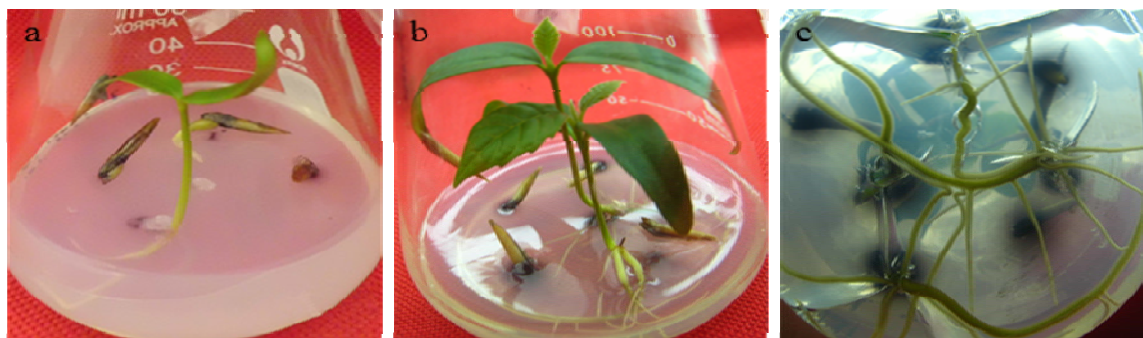
#### 2.2.1 化学溶液处理后喜树种子的成苗率和幼苗生长情况

由表 2 可见,经过 3 种化学溶液处理后,种子

的成苗率以 10% NaClO 处理的最高(显著高于对照), 70% 乙醇处理的最低(显著低于对照)。

试验结果表明, 对照(未经任何处理)的幼苗无真叶长出, 只有 1 条粗而短的主根, 无侧根形成(图 1-a); 经 10% NaClO 处理的幼苗生长较快, 在相同

的时间内可以较快地长出真叶, 叶色深绿(图 1-b), 幼苗主根长达 10 cm, 在主根上生有 6~7 条长短不一的侧根, 具有发达的根系(图 1-c)。可见, 采用 10% NaClO 处理过的喜树种子生成的幼苗, 其生长状态优于对照幼苗。



a 对照的幼苗; b 10% NaClO 处理的幼苗; c 10% NaClO 处理幼苗的根系。

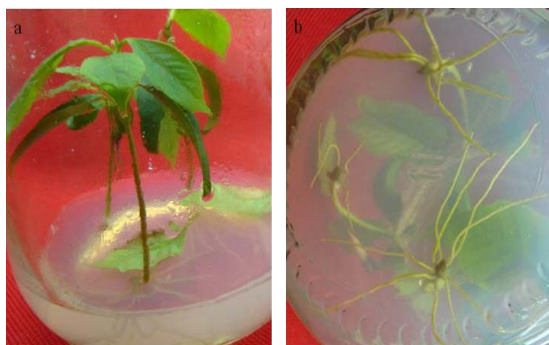
图 1 对照和 10% NaClO 处理的喜树幼苗及其根系

Fig. 1 Seedlings and roots under treatment of contrast and 10% NaClO

## 2.2.2 幼苗切根转移对其生长的影响

试验结果表明, 种子萌发后在原培养基上生长缓慢, 甚至生长停滞, 这可能是由于培养基中的营养成分在种子萌发过程中被消耗殆尽, 或者是种子萌发后在幼苗的周围形成了某种抑制生长的物质。

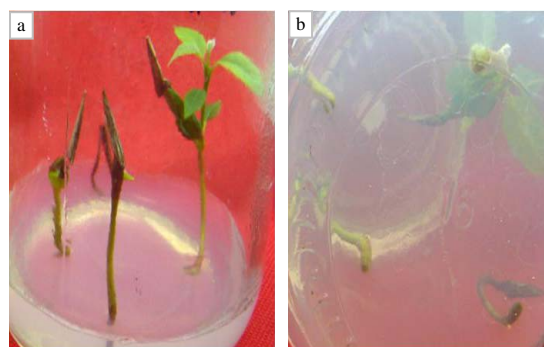
未经 10% NaClO 处理的种子苗, 切除其部分主根, 并转移到新鲜 MS 培养基后, 幼苗生长快, 叶色青绿, 植株健壮, 而且根部形成较多的侧根, 平均为 7~8 条, 根长约 9 cm(图 2), 而转移到含有 1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中的幼苗长势较弱, 叶色发黄, 也无侧根生成(图 3)。



a 幼苗; b 幼苗根部。

图 2 切根后转移到 MS 培养基上生长 1 个月的幼苗及其根部

Fig.2 Seedlings and roots growing in a month in MS medium after root-cut



a 幼苗; b 幼苗根部。

图 3 切根并转移到含 1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上生长 1 个月的幼苗及其根部

Fig.3 Seedlings and roots growing in a month after root-cut and transferred to MS medium with 1 mg/L 6-BA

## 3 结论与讨论

a. 成熟的喜树种子具有较长的休眠期, 采用适当的物理方法或化学方法可有效地打破种子休眠。剪破种皮可以打破喜树种子的休眠<sup>[13]</sup>。本研究结果表明, 喜树果实消毒后去除果皮时, 种子受到的机械划伤、种皮被割破等使种皮透气、透水, 从而促进了种子的萌发。

b. 适当的化学方法浸泡种子可以软化种皮, 去除一些种皮内的抑制物, 促进种子萌发<sup>[15-16]</sup>。兰花碧玉春和独占春杂交种子无菌萌发试验, 采用 10% NaClO 溶液浸泡种子 10 min, 提高了种子的萌发率<sup>[16]</sup>。王菲等<sup>[17]</sup>采用 25% NaClO 溶液浸泡树莓种子也得

到了较高的种子发芽率。吕春华等<sup>[18]</sup>采用 0.4% NaClO 溶液浸泡青枫种子,其萌发率最高达到了 67%。本研究在 0.1% HgCl<sub>2</sub> 果实消毒的基础上采用 10% NaClO 溶液处理种子 3 min,有效提高了喜树种子的萌发率,而且后期的成苗率也显著提高,长成的幼苗健壮,叶色浓绿,根系发达。

c.切断主根可以抑制主根的生长,促进侧根的发生<sup>[19-20]</sup>。其原因可能是切除部分主根后,苗木地上部分的水分供应减少,苗木的生长受到限制,从而根部被迫生长出更多的侧根和毛细根,以吸收水分供给苗木<sup>[21]</sup>。本研究中发现,对未经处理的种子苗做切根处理,并转移到新鲜的 MS 培养基上后,幼苗生长可以达到与经 10% NaClO 处理过的种子苗相同的效果,其幼苗的根系发达,幼苗健壮,但培养基中含 1 mg/L 6-BA 时抑制了幼苗侧根的生成。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1983:144-147.
- [2] 王丽玲.喜树的研究进展[J].安徽农学通报,2008,14(1):156-157.
- [3] 张启香,方炎明.喜树组织培养初步研究[J].江苏林业科技,2005,32(3):1-3.
- [4] 马林.喜树愈伤组织的诱导与培养[J].中国中药杂志,2007,32(13):1273-1276.
- [5] 冯建灿,张玉洁,谭运德,等.喜树与喜树碱开发利用进展[J].林业科学,2000,36(5):100-108.
- [6] 陈颖,曹福亮,李淑娴,等.喜树不定芽的诱导及植株再生[J].植物生理学通讯,2004,40(5):579.
- [7] Wall M E, Wani M C, Cooke C E, et al. Plant antitumor agents, the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukaemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*[J]. J Am Chem Soc, 1966, 88: 3888-3890.
- [8] 刘菲,彭克勤,彭志红,等.喜树细胞悬浮培养体系的建立[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(5):528-530.
- [9] Hsiang Y H, Herizberg R, Hecht S, et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I[J]. J Biol Chem, 1985, 260(27): 14873-14878.
- [10] 冯建灿,张玉洁,杨天柱.低温胁迫对喜树幼苗 SOD 活性、MDA 和脯氨酸含量的影响[J].林业科学研究,2002,15(2):197-202.
- [11] 陈颖,曹福亮,李淑娴,等.喜树不定芽的诱导及再生系统的建立[J].经济林研究,2004,22(1):8-11.
- [12] 刘济明.喜树的种子休眠及更新[J].西南师范大学学报:自然科学版,1998,23(6):721-725.
- [13] 周佑勋.喜树种子休眠和萌发特性的研究[J].林业实用技术,1989(8):22-25.
- [14] 王玉青,余玲,张建全,等.沙蓬种子的生活力测定和休眠破除方法[J].草业科学,2012,29(6):955-959.
- [15] 黄磊,贺筱蓉,郑立民,等.春兰种子非共生萌发的研究[J].种子,2003(6):40-41.
- [16] 王亚沉,石镇源,王丹,等.碧玉春和独占春正反交及种子无菌萌发研究[J].北方园艺,2013(4):64-67.
- [17] 王菲,代汉萍,雷家军.浓硫酸与次氯酸钠对树莓种子发芽的影响[J].种子,2007,26(7):76-78.
- [18] 吕春华,苏家乐,张往祥,等.不同处理方式对青枫种子萌发的影响[J].江西农业科学,2013,41(4):179-180.
- [19] 赵宁.不同育苗方式及切根对苗木根系形态的影响[D].郑州:河南农业大学,2006:1-4.
- [20] 杨喜田,王广磊,赵宁,等.不同切根处理对林木幼苗根系侧根生长的影响[J].河南农业大学学报,2010,44(2):155-159.
- [21] 毛齐正.切根对侧柏幼苗根构型的影响[D].郑州:河南农业大学,2008:2-3.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库