

掌叶大黄种子特性研究及无菌培养体系的构建

黑小斌, 李依民*, 李 欢, 李元敏, 沈 霞, 高 静, 彭 亮, 颜永刚, 张 岗*

陕西中医药大学药学院 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 陕西 西安 712046

摘要: **目的** 研究掌叶大黄种子形态和发芽特性并构建无菌苗和愈伤组织培养体系, 为其快繁和次生代谢调控研究提供基础。**方法** 从大小、净度、千粒质量、生活力、发芽率及发芽势等方面进行 10 批掌叶大黄种子特性分析; 利用正交试验筛选大黄无菌苗建立的消毒体系及愈伤组织诱导的激素配比; HPLC 法分析无菌苗和愈伤组织中 10 种有效成分的含量。**结果** 10 批不同产地来源掌叶大黄的果实及种子外观形态无显著差异, 含水量、生活力、发芽率及发芽势有明显差异, 和政县与渭源县大黄发芽特性最高; 75%乙醇 30 s、10% H₂O₂ 15 min 为大黄种子无菌苗建立的最佳消毒组合; 愈伤组织诱导最佳激素为 6-苄氨基腺嘌呤 (1.0 mg/L) + 6-糠氨基嘌呤 (2.0 mg/L) + 1-萘乙酸 (1.5 mg/L); 不同消毒剂处理种子对无菌苗 10 种成分的积累无显著影响 ($P > 0.05$), 愈伤组织可检测出 7 种有效成分, 含量显著低于无菌苗, 大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷含量较其他成分高。**结论** 以千粒质量、生活力、发芽率及发芽势等指标明确甘肃和政县与渭源县种子特性优良, 成功建立掌叶大黄无菌苗与愈伤组织培养体系, 为掌叶大黄下一步研究奠定基础。

关键词: 掌叶大黄; 种子; 发芽; 无菌苗; 愈伤组织; 大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)18-4430-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.024

Investigation on seeds characteristics and establishment of aseptic cultural system for *Rheum palmatum*

HEI Xiao-bin, LI Yi-min, LI Huan, LI Yuan-min, SHEN Xia, GAO Jing, PENG Liang, YAN Yong-gang, ZHANG Gang

Shaanxi Qinling Engineering Center of Application Development of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: **Objective** To study the seeds shapes and germination characteristics, construct aseptic seedlings and callus cultural system, and provide a basis for the rapid propagation and secondary metabolic regulation of *Rheum palmatum*. **Methods** Ten batches of *R. palmatum* seeds were subjected to characteristic analyses from the aspects of size, purification, weights per thousand seeds, seeds vigor, germination rates, and germination energy. The optimum disinfection system for aseptic seedlings and the optimum hormone ratio for inducing callus were screened by orthogonal test. The content of ten active components in aseptic seedlings and calli were primarily evaluated by HPLC analysis. **Results** There was no significant difference in the appearances of the ten batches of *R. palmatum* seeds from different regions. The content of moisture, seeds vigor, germination rates, and germination energy differed apparently. The germination characteristics in Hezheng and Weiyuan counties were the best. The best disinfection group for aseptic seedlings was the combination of 75% ethanol for 30 s with 10% hydrogen peroxide for 15 min. The optimum hormones for callus induction were 6-BA (1.0 mg/L) + KT (2.0 mg/L) + NAA (1.5 mg/L). Seeds treated with different disinfectants had no significant effect on the content of ten components in germinated aseptic seedlings ($P > 0.05$). Seven active components were detected in callus, which was significantly lower than that in aseptic seedlings. And the content of chrysophanol-8-*O*-glucoside was the highest in the callus. **Conclusion** The seed characteristics from Hezheng and Weiyuan counties in Gansu Province were excellent by analyses of

收稿日期: 2019-02-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973430); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发创新团队项目 (2019-QN01); 陕西中医药大学新进博士科研启动经费 (104080001); 陕西省高校青年杰出人才支持计划项目; 咸阳市中青年科技领军人才项目

作者简介: 黑小斌, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: 1239111734@qq.com

***通信作者** 张 岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与分子生药学。Tel/Fax: (029)38185165 E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com
李依民, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: 2051058@sntcm.edu.cn

weights per thousand seeds, seeds vigor, germination rates, and germination energy. The aseptic seedlings and callus cultural system of *R. palmatum* were successfully established, laying a solid foundation for further study.

Key words: *Rheum palmatum* L.; seeds; germination; aseptic seedlings; callus; chrysophanol-8-*O*-glucoside

大黄源于蓼科多年生草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 和药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎, 始载于《神农本草经》, 又称将军、黄良、肤如等, 具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒等功效, 临床常用于实热积滞、血热吐衄、目赤咽肿等症的治疗^[1]。现代研究揭示大黄富含蒽醌类、蒽酮类、鞣质类、酰基糖苷类、苯丁酮苷类等成分, 具有抗菌^[2]、抗血小板聚集^[3]及改善肾脏损伤^[4]等药理活性。大黄野生于海拔 1 200~4 000 m 山沟或林下, 现多栽培于甘肃、青海、四川或陕西等高海拔区域。

随着中药规范化种植的推进, 以种子为主要繁殖载体的中药种质受到广泛关注, 其根本在于种子质量是决定药材质量的首要关键因素。大量报道以药用植物种子含水量、净度、生活力、发芽率及发芽势等为指标, 进行种子质量研究以促进中药标准化建设。如正品大黄种子特性及分级标准的探究^[5-6], 对大黄药材质量控制有一定指导意义。尽管如此, 大黄仍然面临恶劣环境带来的资源短缺问题, 高品质地道大黄药材供不应求。因此, 如何快速繁育大黄药材以及保存优良种质成为亟待解决的问题。

随着中药生物技术的飞速发展, 组织培养技术在中药材快繁、细胞培养及转基因研究生物转化等方面发挥重要作用^[7]。建立无菌苗体系是组织培养的基础, 外植体消毒处理又是无菌苗的关键步骤, 如对党参^[8]、阿魏^[9]及杜仲^[10]等多种药用植物种子消毒方式的筛选研究, 最终获得适合的无菌苗体系。愈伤组织是再生体系的重要中间环节, 也是细胞培养和代谢调控研究的重要平台。已有大量药用植物愈伤组织体系的报道, 如人参^[11]、甘草^[12]、红景天^[13]等愈伤组织体系已被成功建立且关于人参皂苷、甘草酸或红景天苷等有效成分积累规律也有研究。目前, 仅有少数有关唐古特大黄和掌叶大黄愈伤组织或再生体系的初步分析^[14-15], 有助于大黄生物技术的深入研究。本研究首先进行掌叶大黄种子发芽特性研究, 系统筛选获得优良种质进而进行正交试验筛选, 建立了掌叶大黄无菌苗和愈伤组织培养体系, 结合 HPLC 对无菌

材料有效成分含量进行初步评价, 为掌叶大黄的快繁、细胞培养及蒽醌类有效成分代谢调控研究提供支撑。

1 材料与仪器

1.1 材料

10 批掌叶大黄种子于 2017 年 10 月采收于甘肃及宁夏 8 个县域内大黄栽培基地, 系 3 年生大黄种子, 经陕西中医药大学药学院张岗教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的种子。各样品编号及产地信息为 ZYDH1 (宁夏隆德县)、ZYDH2 (甘肃华亭县)、ZYDH3 (甘肃和政县)、ZYDH4 (甘肃宕昌县)、ZYDH5 (甘肃陇西县)、ZYDH6 (甘肃陇西县)、ZYDH7 (甘肃渭源县)、ZYDH8 (甘肃礼县)、ZYDH9 (甘肃陇西县) 和 ZYDH10 (甘肃宕昌县)。

1.2 试剂

红四氮唑 (TTC, 批号 Y05M9S60225)、6-糠氨基嘌呤 (KT, 批号 Q31M8C33091) 购自上海源叶生物有限公司; 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA, 批号 13153)、1-萘乙酸 (NAA, 批号 J994) 购自 Amersco 公司; 过氧化氢 (H_2O_2 , 批号 20180110)、次氯酸钠 ($NaClO$, 批号 20180801)、乙醇 (批号 20170808) 购自天津市天力化学试剂有限公司。MS 培养基 (批号 20170303111) 购自北京酷来搏科技有限公司。

对照品没食子酸 (批号 122811)、儿茶素 (批号 11c15)、番泻苷 B (批号 11z15) 购自天津西玛科技有限公司; 对照品大黄素 (批号 110795-200505)、大黄酸 (批号 110757-201607)、大黄素甲醚 (批号 110758-200610)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 110796-200615)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 10756-200110) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品大黄酚 (批号 B2038)、芦荟大黄素 (批号 B20772) 购自上海源叶生物科技有限公司; 以上对照品质量分数均大于 98%。色谱甲醇购自上海泰坦科技有限公司。

1.3 仪器

HFsafe-1200LC 生物安全柜 (上海力申有限公司); SPX-250-GB 智能光照培养箱 (上海跃进有限公司); Waters 2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司),

Waters 2998 PAD 检测器, Empower3 色谱工作站; GB204 型电子分析天平(北京赛多利斯有限公司); KQ-200KED 超声波清洗机(江苏昆山有限公司); GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅有限公司)。

2 方法

2.1 掌叶大黄种子特性研究

2.1.1 外观形态观测 直接观察法分辨 10 批掌叶大黄果实及种子外观形态。游标卡尺测量其长度和宽度, 每份 20 粒, 重复 3 次, 下同。

2.1.2 种子净度测定 分别称取 10 批掌叶大黄种子各 30 g, 剔除废种及杂质, 称定质量, 计算其净度(净度实验至少含有 2 500 粒种子)。

2.1.3 千粒质量测定 随机选取测定净度后 1 000 粒种子, 称定质量。

2.1.4 含水量测定 将称量瓶 105 ℃ 烘干至恒定质量, 再将适量大黄种子放入其中, 称定质量后, 打开瓶盖, 105 ℃ 烘 8 h, 取出, 干燥器内冷却至室温, 称定质量, 连续 2 次称定质量差异不超过 0.5 mg, 根据烘干前后损失的水分计算含水量。

2.1.5 生活力测定 采用 TTC 法^[6]测定。取掌叶大

黄种子各 50 粒, 蒸馏水浸泡 24 h, 沿种脊切 2 瓣, 置于培养皿内, 倒入 0.05% 的 TTC 溶液浸没切面, 30 ℃ 暗培养 4 h, 取出观察, 有生活力的种子胚被染成红色, 计算其生活力。

2.1.6 发芽实验 取净种 100 粒, 蒸馏水浸泡 48 h, 置于铺有 3 层湿润滤纸的培养皿中。置 20 ℃ 恒温培养箱中, 光照 8 h, 黑暗 16 h。每天记录发芽情况, 至无萌发种子出现为止, 计算其发芽率与发芽势。发芽期一般规定以 1/3 天数为发芽初期, 根据本实验大黄种子发芽情况, 规定发芽 3 d 后为发芽初期, 8 d 后为发芽终期。

2.2 掌叶大黄无菌苗培养

以 75% 乙醇和 3 种常用的消毒试剂(0.1% HgCl₂、2% NaClO、10% H₂O₂) 设计正交试验(表 1), 筛选消毒组合。取“2.1”项下种子特性优良的和政县掌叶大黄种子, 蒸馏水浸泡 24 h, 去翅, 对应消毒剂处理种子, 无菌水清洗 4~5 次, 接种于 30 mL MS 固体培养基上, 接种 10 瓶, 每瓶 6 粒种子, 统计发芽率、污染率、成苗率。重复 3 次。培养条件为温度 20 ℃, 光照强度 3 000 lx, 光照 8 h, 黑暗 16 h。

表 1 掌叶大黄种子消毒与愈伤组织诱导的 L₉(3³) 正交试验设计
Table 1 L₉(3³) orthogonal test for seeds sterilization and callus induction of *R. palmatum*

水平	消毒			激素/(mg·L ⁻¹)		
	75%乙醇处理时间(A)/s	试剂种类(B)	消毒时间(C)/min	6-BA(A)	KT(B)	NAA(C)
1	10	H ₂ O ₂	5	1.0	1.0	0.5
2	20	NaClO	10	1.5	1.5	1.0
3	30	HgCl ₂	15	2.0	2.0	1.5

2.3 掌叶大黄愈伤组织培养

选择 6-BA、KT、NAA 3 种激素及其不同浓度设计正交试验(表 1), 考察掌叶大黄愈伤组织诱导最佳激素组合。取“2.2”项下 1 个月龄的无菌苗, 在生物安全柜里剪切为 0.5 cm 长的叶柄段, 接种于含有激素的 MS 固体培养基上, 接种 3 个培养皿, 每皿 20 个叶柄, 统计诱导率。重复 3 次。培养条件同“2.2”项。筛出最适宜诱导愈伤组织培养激素配比后, 考察大黄子叶、叶片等外植体在最优条件下诱导愈伤的情况。

2.4 HPLC 分析

取“2.2”项下不同消毒剂在最优消毒时间处理后培养的一个月幼苗全株、“2.3”项下叶柄诱导出的愈伤组织, 平行取样 3 次。常规方法烘干, 依据课题组已建立的液相测定方法^[16], 测定 10 种成分的含量。

2.5 数据处理

根据公式计算各指标。所有实验数据统计及方

差分析用 SPSS 24.0 运算, 并进行多重比较。并以种子净度、千粒质量、含水量、生活力、发芽率和发芽势 6 类指标进行 *K* 均值聚类分析。

发芽率 = 种子发芽数/种子总数

发芽势 = 第 5 天正常发芽种子数/种子总数

污染率 = 污染种子个数/接种种子总数

诱导率 = 诱导外植体个数/接种数

成苗率 = 发芽率 × *X*

瓶内种子被污染时, *X* = 0; 无污染时, *X* = 1

3 结果与分析

3.1 掌叶大黄外观形态的比较

掌叶大黄果实外观形态统计结果(表 2)表明, 10 批大黄果实外观形态大体一致, 即长圆形, 具 3 翅瘦果, 鲜见 4 翅, 灰褐色并皱缩。果皮带有长短不一的果脐, 表面光滑无毛, 内部含有 1 粒黑褐色种子。

表 2 掌叶大黄果实及种子长度、宽度的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)
Table 2 Comparison of length and width of *R. palmatum* fruits and seeds ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

编号	果实/mm		种子/mm	
	长度	宽度	长度	宽度
ZYDH1	6.833±0.087 a	2.640±0.068 a	4.404±0.049 a	1.852±0.030 a
ZYDH2	6.579±0.071 a	2.453±0.052 b	4.115±0.015 c	1.738±0.022 b
ZYDH3	6.772±0.086 a	2.656±0.059 a	4.504±0.052 a	1.807±0.033 a
ZYDH4	6.691±0.061 a	2.689±0.033 a	4.440±0.043 a	1.822±0.025 a
ZYDH5	6.585±0.082 a	2.652±0.050 a	4.513±0.067 a	1.870±0.024 a
ZYDH6	6.364±0.133 b	2.572±0.064 a	4.374±0.072 b	1.683±0.037 b
ZYDH7	6.220±0.120 c	2.554±0.044 a	4.342±0.067 b	1.660±0.030 b
ZYDH8	6.271±0.114 c	2.571±0.058 a	4.208±0.088 c	1.718±0.032 b
ZYDH9	6.624±0.072 a	2.451±0.067 b	4.163±0.068 c	1.828±0.023 a
ZYDH10	6.495±0.082 b	2.447±0.052 b	4.090±0.035 c	1.846±0.028 a

同一因素不同处理间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 表 8 同

Different letters represent significant differences among different treatments under the same factor at $P < 0.05$, same as table 8

果实平均长度为(6.220±0.120)~(6.833±0.087) mm, 平均宽度为(2.451±0.067)~(2.689±0.033) mm, 种子平均长度为(4.090±0.035)~(4.513±0.067) mm, 平均宽度为(1.660±0.030)~(1.870±0.024) mm。

3.2 掌叶大黄种子特性的比较

10 批大黄的种子净度、千粒质量、含水量、生活力、发芽率和发芽势各有差异(表 3)。ZYDH3 净度最高(98.757±0.052)%, ZYDH7 净度最低(92.617±0.027)%; ZYDH6 千粒质量最重(11.639±0.058)g, ZYDH10 千粒质量最轻(8.756±0.045)g; ZYDH9 含水量最高(8.447±0.203)%, ZYDH8 含水量最低(4.363±0.154)%。生活力、发芽率和发芽势 3 者有

一定的关联, ZYDH3 和 ZYDH7 生活力最高分别为(54.667±2.901)%和(56.667±3.528)%, 对应的发芽率和发芽势较高, 分别为(71.000±1.527)%、(12.000±1.527)%和(71.000±0.847)%、(11.667±0.667)%; ZYDH10 生活力最低为(19.333±2.156)%, 对应发芽率和发芽势较低, 分别为(11.333±0.882)%和(2.667±0.333)%。

同时, 以种子净度、千粒质量、含水量、生活力、发芽率和发芽势等 6 类指标, 利用 SPSS 24.0 进行 K 均值聚类分析。依据 F 值大小进行排序, 发芽势(27.352) > 发芽率(18.230) > 千粒质量(16.150) > 生活力(7.058) > 净度(0.708) > 含水量(0.509), 发芽势和发芽率为大黄种子质量分类主要指标, 10

表 3 掌叶大黄种子特性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Comparison of seeds characteristics of *R. palmatum* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	净度/%	千粒质量/g	含水量/%	生活力/%	发芽率/%	发芽势/%
ZYDH1	98.037±0.135 c	9.278±0.009 e	6.390±0.122 c	28.000±1.154 e	18.333±0.882 f	3.667±0.882 c
ZYDH2	98.057±0.043 c	9.238±0.064 e	5.403±0.131 d	30.667±1.764 e	56.333±2.333 c	6.333±0.882 b
ZYDH3	98.757±0.052 a	10.221±0.017 c	5.287±0.096 e	54.667±2.901 a	71.000±1.527 a	12.000±1.527 a
ZYDH4	98.393±0.027 b	9.349±0.244 e	5.673±0.158 d	31.333±2.403 e	32.000±1.155 e	4.333±0.882 c
ZYDH5	96.590±0.080 e	9.628±0.055 d	7.270±0.128 b	49.333±4.667 b	46.000±1.528 d	7.000±0.573 b
ZYDH6	97.737±0.063 d	11.639±0.058 a	6.547±0.190 c	43.333±1.334 c	62.000±1.154 b	8.333±1.527 b
ZYDH7	92.617±0.027 g	10.882±0.061 b	5.537±0.113 d	56.667±3.528 a	71.000±0.847 a	11.667±0.667 a
ZYDH8	96.137±0.074 f	9.145±0.051 e	4.363±0.154 f	44.000±2.000 c	31.667±2.023 e	5.333±0.333 b
ZYDH9	97.610±0.035 d	8.897±0.047 f	8.447±0.203 a	36.667±1.764 d	31.000±1.154 e	3.667±0.667 c
ZYDH10	97.963±0.035 c	8.756±0.045 f	5.601±0.091 d	19.333±2.156 f	11.333±0.882 g	2.667±0.333 c

批掌叶大黄种子可分为 3 类, 第 1 类包含 ZYDH3、ZYDH6 和 ZYDH7 3 批种子; 第 2 类包含 ZYDH2、ZYDH5 和 ZYDH8 3 批种子; 第 3 类包含 ZYDH1、ZYDH4、ZYDH9 和 ZYDH10 4 批种子。在第 1 类种子中, 甘肃陇西县 (ZYDH6) 大黄种子发芽率、发芽势显著低于另外 2 个种源 ($P<0.05$)。因此, 甘肃和政县 (ZYDH3) 与渭源县 (ZYDH7) 大黄种子特性优良。选择 ZYDH3 大黄种子进行后续实验。

3.3 不同消毒剂处理对大黄种子发芽率的影响

不同消毒剂组合对 ZYDH3 种子发芽率影响结果 (表 4) 显示, 在 9 种处理下, 种子均可以萌发, 但发芽率各有差异, 且各组消毒剂处理种子发芽率整体较未消毒的 ZYDH3 有所下降。大黄种子在处理 3 条件下平均发芽率最高为 76.7%; 处理 4 平均发芽率最低为 50%。方差分析表明 (表 5), 消毒剂种类对种子发芽率有显著影响。10%

H_2O_2 发芽率最高, 平均发芽率为 68.9%。由于 75% 乙醇和消毒剂消毒时间对大黄种子发芽率影响不显著, 所以选用最高平均发芽率为最优水平, 即 $A_3B_1C_3$ 。不同类型消毒剂组合对种子污染率和成苗率也有影响。10% H_2O_2 处理掌叶大黄种子平均污染率较低, 仅为 6.3%, 平均成苗率较高为 65.7%; 0.1% $HgCl_2$ 处理种子平均污染率为 11.1%, 平均成苗率为 60.5%; 2% $NaClO$ 处理种子平均污染率为 14.1%, 平均成苗率为 51.8%。以上结果说明, 掌叶大黄种子适宜消毒组合为 75%乙醇 30 s, 10% H_2O_2 15 min, 此条件下能有效获得大量无菌实生苗。

3.4 诱导愈伤组织最佳激素的筛选

以 ZYDH3 无菌苗叶柄为外植体, 在添加不同激素的 MS 培养基培养 35 d, 筛选愈伤组织诱导最适激素组合。结果表明 (表 6), 掌叶大黄叶柄在这

表 4 不同消毒剂对掌叶大黄种子发芽率的影响 ($n=3$)

Table 4 Effects of different sterilization reagents on seeds germination rate of *R. palmatum* ($n=3$)

处理	A	B	C	发芽率/%			平均发芽率/%
				重复 1	重复 2	重复 3	
1	3	3	1	43.3	56.7	60.0	53.3
2	1	2	3	46.7	60.0	63.3	56.7
3	3	1	3	76.7	83.3	70.0	76.7
4	1	3	2	53.3	50.0	46.7	50.0
5	2	3	3	50.0	56.7	53.3	53.3
6	3	2	2	53.3	70.0	46.7	56.7
7	2	2	1	40.0	50.0	60.0	50.0
8	2	1	2	73.3	60.0	56.7	63.3
9	1	1	1	66.7	63.3	70.0	66.7
T_1	173.3	206.7	170.0				
T_2	166.7	163.3	170.0				
T_3	186.7	156.6	186.7				
最佳组合	3	1	3				

表 5 掌叶大黄种子发芽率的方差分析

Table 5 Variance analysis of seeds germination rate of *R. palmatum*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	69.682	2	34.841	27.125	
B	492.349	2	246.174	191.658	$P<0.01$
C	61.976	2	30.988	24.125	
误差	2.569	2	1.284		

9 种培养基上均能诱导出愈伤组织, 但诱导率和愈伤形态有明显差异。处理 3 诱导效果最好, 诱导率 81.1%, 愈伤组织黄绿色、致密; 处理 9 诱导效果最差, 诱导率仅 32.8%, 外植体部分褐化甚至死亡, 部分产生少量浅白色愈伤组织。表 7 方差分析显示, 6-BA 和 KT 质量浓度对大黄叶柄诱导率有显著影响 ($P<0.05$)。当 6-BA 1.0 mg/L、KT 2.0 mg/L 时, 叶柄诱导率最高, 平均诱导率为 60.4%与 60.6%;

表 6 不同激素对掌叶大黄愈伤组织诱导率的影响 ($n=3$)

Table 6 Effects of different exogenous hormones on callus induction of *R. palmatum* ($n=3$)

处理	A	B	C	诱导率/%			平均诱导率/%
				重复 1	重复 2	重复 3	
1	1	1	1	41.7	55.0	48.3	48.3
2	1	2	2	55.0	48.3	51.7	51.7
3	1	3	3	75.0	85.0	83.3	81.1
4	2	2	3	43.3	50.0	46.7	46.7
5	2	3	1	56.7	55.0	61.7	57.8
6	2	1	2	20.0	31.7	26.7	26.1
7	3	3	1	58.3	61.7	63.3	61.7
8	3	1	3	43.3	41.7	43.3	42.8
9	3	2	2	30.0	31.7	36.7	32.8
T_1	181.1	117.2	167.8				
T_2	130.6	131.2	110.6				
T_3	137.3	181.7	170.6				
最佳组合	1	3	3				

表 7 掌叶大黄愈伤组织诱导率的方差分析

Table 7 Variance analysis of callus induction of *R. palmatum*

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
A	506.539	2	253.268	40.029	$P<0.05$
B	810.110	2	405.055	64.019	$P<0.05$
C	257.870	2	128.935	20.378	
误差	12.6540	2	6.327		

由于 NAA 浓度对叶柄诱导率影响不显著 ($P>0.05$), 所以选用平均诱导率最高水平作为最优水平, 为 $A_1B_3C_3$ 。

采用 $A_1B_3C_3$ 最优组合对子叶、叶片进行愈伤组织诱导实验。结果显示, 叶柄愈伤组织诱导情况最好, 为黄绿色致密的胚性愈伤组织, 诱导率为 78.7%; 叶片诱导产生浅黄白色愈伤组织, 诱导

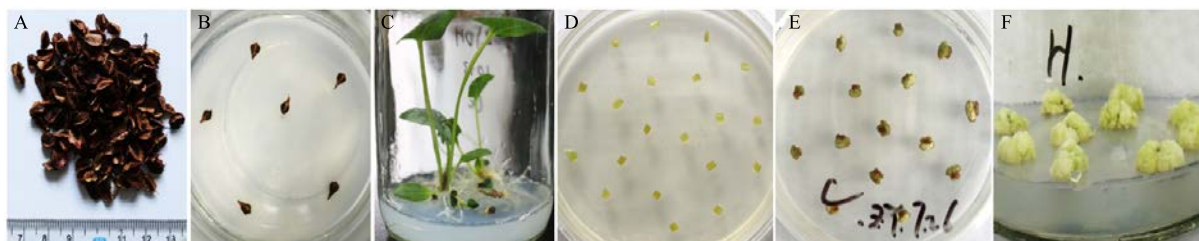
率为 56.2%; 子叶愈伤组织浅黄绿色、较致密, 诱导率为 67.5%。

因此, 掌叶大黄诱导愈伤组织适宜的外植体为叶柄, 最佳激素组合 6-BA (1.0 mg/L) + KT (2.0 mg/L) + NAA (1.5 mg/L)。ZYDH3 无菌苗和愈伤组织见图 1。

3.5 无菌苗及愈伤组织有效成分含量测定

ZYDH3 无菌苗及其愈伤组织 HPLC 分析表明 (图 2), 10 种成分在无菌苗中均能检测到, 且含量存在明显差异 (表 8), 3 种消毒剂处理无菌苗各成分含量无显著性差异 ($P>0.05$), 说明消毒剂处理种子对其无菌苗各成分积累无明显影响。

ZYDH3 叶柄愈伤组织中可检测出 7 种成分, 含量大小次序为大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 > 番泻苷 B > 儿



A-ZYDH3 掌叶大黄果实 B-10% H_2O_2 消毒种子 C-1 个月无菌苗 D-叶柄外植体 E-30 d 愈伤组织 F-50 d 愈伤组织
A-ZYDH3 *R. palmatum* fruits B-10% H_2O_2 sterilized seeds C-one month aseptic seedlings D-petiole explants E-calli at 30 d F-calli at 50 d

图 1 ZYDH3 大黄种子、无菌苗、叶柄外植体及愈伤组织

Fig. 1 Seeds, aseptic seedlings, petiole explants, and callus of ZYDH3 *R. palmatum*

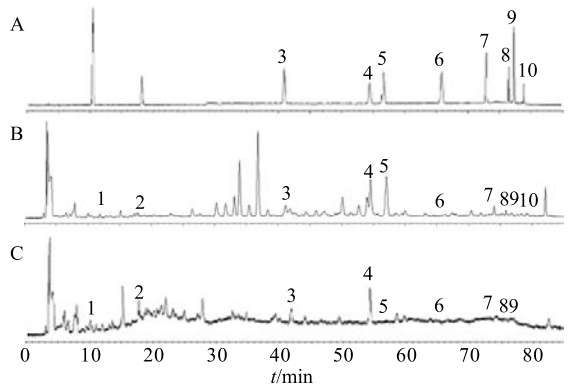


图 2 混合对照品 (A)、掌叶大黄无菌苗 (B) 和愈伤组织 (C) 的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of mixed reference substances (A), *R. palmatum* aseptic seedlings (B), and callus (C)

表 8 不同消毒剂对无菌苗各成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 8 Effect of different disinfectants on content of various components of aseptic seedlings ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

消毒剂种类	没食子酸/(mg·g ⁻¹)	儿茶素/(mg·g ⁻¹)	番泻苷 B/(mg·g ⁻¹)	大黄酚-8-O-葡萄糖苷/(mg·g ⁻¹)	大黄素-8-O-葡萄糖苷/(mg·g ⁻¹)
H ₂ O ₂	0.052 8±0.010 2 a	0.442 1±0.196 8 a	1.130 4±0.096 1 a	1.036 7±0.169 7 a	0.436 2±0.222 4 a
NaClO	0.025 2±0.007 3 a	0.498 5±0.084 9 a	0.787 2±0.203 2 a	0.701 0±0.275 0 a	0.240 1±0.134 2 a
HgCl ₂	0.050 6±0.014 6 a	0.580 1±0.062 5 a	0.993 4±0.137 2 a	1.077 6±0.128 4 a	0.199 4±0.059 3 a
消毒剂种类	芦荟大黄素/(mg·g ⁻¹)	大黄酸/(mg·g ⁻¹)	大黄素/(mg·g ⁻¹)	大黄酚/(mg·g ⁻¹)	大黄素甲醚/(mg·g ⁻¹)
H ₂ O ₂	0.018 3±0.008 9 a	0.009 7±0.000 9 a	0.022 4±0.005 0 a	0.004 9±0.001 0 a	0.041 8±0.008 0 a
NaClO	0.029 5±0.000 9 a	0.008 6±0.001 4 a	0.015 8±0.002 1 a	0.004 3±0.001 3 a	0.045 3±0.017 7 a
HgCl ₂	0.019 3±0.002 5 a	0.011 9±0.003 3 a	0.022 6±0.001 1 a	0.004 3±0.000 2 a	0.042 4±0.006 5 a

掌叶大黄种子, 从净度、千粒质量、含水量、生活力、发芽率、发芽势 6 种指标考察种子发芽特性, 结合 *K* 均值聚类分析揭示发芽势及发芽率为其种子分级主要分类依据, 这与对前人关于掌叶大黄种子分级标准的研究结果相似^[6]。本研究结果表明, 甘肃和政县与渭源县掌叶大黄种子特性优良, 推测与其生态环境密切相关。和政县与渭源县均属温带大陆性气候, 海拔 1 900~4 368 m, 平均气温 5.0~6.8 °C, 温凉湿润, 为大黄生长、规范化种植及生产提供适宜的环境, 从源头确保种子与药材质量。

中药生物技术研究中由种子构建无菌苗的首要步骤就是筛选消毒剂。研究中常用的消毒剂有 75%乙醇、HgCl₂、NaClO 和 H₂O₂ 等, 通常两两联

合使用。如党参种子经 75%乙醇浸泡预处理后再用 2% NaClO 消毒, 可有效降低种子带菌率^[8]。70%乙醇 30 s 与 12% H₂O₂ 15 min 联合处理阿魏种子消毒效果最好, 且发现 HgCl₂ 和 NaClO 对种子发芽率有抑制^[9]。另有研究显示, 无菌水预浸泡后再使用消毒剂可以明显降低烟草种子带菌率, 10% H₂O₂ 能加速种皮腐蚀、促使胚根伸出, 是理想的种子消毒剂^[18]。本实验以无菌水预先浸泡掌叶大黄果实 24 h, 去翅, 利用正交试验获得大黄种子最佳消毒组合: 75%乙醇 30 s、10% H₂O₂ 15 min。研究还发现 10% H₂O₂ 和 2% NaClO 较 0.1% HgCl₂ 消毒的种子平均早萌发 2~3 d, 可能系 HgCl₂ 对种子萌发有抑制作用, 也印证了 H₂O₂ 为理想消毒剂^[18]。本实

4 讨论

中药材种子质量是决定药材质量的首要因素。然而, 中药材种源普遍存在种子种质不纯、来源不清、检验规程或质量标准不完善等问题, 制约了中药材规范化生产, 导致药材质量参差不齐, 中药材道地性、安全性和有效性面临巨大挑战^[5-6]。中药材种子特性研究能够在源头上理清中药材种子种源, 提升种子质量可靠性、推进中药标准化建设进程。有研究报道 3 种正品大黄果实和种子的外观形态存在一定差异, 药用大黄果实和种子大小及千粒质量均最佳, 甘肃岷县掌叶大黄发芽率、发芽势较其他 5 批来源大黄高^[17]。本实验选取 10 批不同来源的

验筛选的消毒剂组合既保证最大限度控制污染,又能保持种子活力,有效获得大量无菌苗。结合 HPLC 分析发现消毒剂仅影响种子发芽率、污染率和成苗率等指标,对无菌苗化学成分变化无显著影响。

药用植物愈伤组织诱导能力差异主要受种质、生理特性及外源激素影响。研究表明,唐古特大黄无菌苗子叶、下胚轴、胚根和幼根均可作为良好的外植体,子叶诱导能力最佳,且形成的愈伤组织结构致密,愈伤诱导培养基为 6-BA (1.0 mg/L) + 2,4-D (1.0 mg/L) + NAA (1.0 mg/L)^[14]。掌叶大黄根、茎、叶均能有效诱导愈伤组织,6-BA (2.0 mg/L) + 2,4-D (2.0 mg/L) + NAA (2.0 mg/L)^[15]为最佳诱导条件。本实验利用正交试验进行激素配比筛选,适宜激素为 6-BA (1.0 mg/L) + KT (2.0 mg/L) + NAA (1.5 mg/L),子叶、叶片、叶柄等均能在激素培养基上诱导,叶柄为最佳外植体,诱导的愈伤结构致密、浅黄绿色。该激素组合与已报道的 6-BA、NAA 类似^[14-15],选取 KT 而非 2,4-D,因为 KT 有利于胚性愈伤组织和体细胞胚的形成^[19]。后续,基于 HPLC 分析检测出愈伤组织 7 种有效成分,含量普遍较无菌苗中的低,大黄素-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚未检测到。愈伤组织中次生代谢物种类及含量变化非常复杂,受宿主植物自身遗传种质、外植体生理状态、激素配比等因素影响^[20]。本研究愈伤组织可检出 10 种对照品中的 7 种,说明该愈伤组织有效成分含量尚佳,可用于后续细胞悬浮培养次生代谢研究。本研究在明确掌叶大黄种子发芽特性的基础上,初步建立了掌叶大黄种子无菌苗和愈伤组织培养体系并进行有效成分含量评价,获得了生长健壮大黄无菌苗和愈伤组织,为通过生物技术手段实现掌叶大黄快繁和探索蒽醌类合成与调控研究提供基础。

参考文献

- [1] 郑俊华,果德安.大黄的现代研究(精)[M].北京:北京大学医学出版社,2007.
- [2] Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2017, 45(2): 372-379.
- [3] 谭鹏,张海珠,李洋,等.基于活血生物效价检测大黄中 10 个蒽醌类成分抗血小板聚集作用初步研究[J]. *中草药*, 2018, 49(4): 859-865.
- [4] Zhang Z H, Vaziri N D, Wei F, et al. An integrated lipidomics and metabolomics reveal nephroprotective effect and biochemical mechanism of *Rheum officinale* in chronic renal failure [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(3): 22151.
- [5] 王昌华,刘翔,银福军,等.大黄种子质量分级标准研[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(7): 1605-1606.
- [6] 孙云波,陈垣,郭凤霞,等.掌叶大黄种子质量分级标准研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(4): 33-39.
- [7] 戴莹,杨世海,赵鸿峰,等.药用植物组织培养中褐化现象的研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(2): 344-351.
- [8] 薛雯心,魏铁锁,袁金月,等.党参无菌苗培养前种子消毒技术研究[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(12): 130-131.
- [9] 朱军,李晓瑾,王月娥,等.新疆阿魏种子无菌苗制备研究[J]. *种子*, 2011, 30(1): 11-13.
- [10] 杨蕊,汤绍虎,杨雪清,等.应用正交设计建立杜仲无菌苗快速繁育体系[J]. *西南大学学报:自然科学版*, 2007, 29(6): 136-139.
- [11] Kevers C, Jacques P, Gaspar T, et al. Comparative titration of ginsenosides by different techniques in commercial *Ginseng* products and callus cultures [J]. *J Chromatogr Sci*, 2004, 42(10): 554-558.
- [12] 刘凤彩,吕建明,吴秀祯,等.诱导培养条件显著改变甘草愈伤组织次生代谢产物的多样性[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(23): 4056-4060.
- [13] Kapoor S, Raghuvanshi R, Bhardwaj P, et al. Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. [J]. *J Photoch Photobio B Biol*, 2018, 183: 258-256.
- [14] 徐文华,陈桂琛,李毅,等.唐古特大黄组织培养技术的研究[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(9): 1734-1738.
- [15] 晋昕,崔蕾,王瑞新,等.外源激素对掌叶大黄愈伤组织诱导及种苗生根的影响[J]. *草原与草坪*, 2012, 32(3): 32-36.
- [16] 李欢,张娜,李依民,等.利用转录组测序挖掘掌叶大黄蒽醌类生物合成相关基因[J]. *药学学报*, 2018, 53(11): 195-199.
- [17] 肖苏萍,陈敏,黄璐琦,等.大黄果实形态和种子发芽特性的初步研究[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(3): 195-199.
- [18] 胡重怡,郑少清,陈兴江,等.烟草无菌苗培养前的种子消毒技术研究[J]. *中国烟草科学*, 2007, 28(2): 45-46.
- [19] Cheng W H, Zhu H G, Tian W G, et al. De novo transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 92(3): 279-292.
- [20] 付航,黄涵笠,王妍,等.防风愈伤组织诱导及植株再生体系的建立[J]. *中草药*, 2018, 49(13): 3127-3133.