

CO₂ 激光对大叶龙胆种子萌发及幼苗生长的影响

薛慧君, 岳 明, 王亚洲*

(西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘 要:目的 研究 CO₂ 激光对大叶龙胆种子萌发及幼苗生长的影响。方法 使用不同剂量的 CO₂ 激光辐照大叶龙胆湿种子, 观察不同光照条件下种子的萌发情况, 并研究激光处理后的幼苗生长情况。结果 光照条件下, 激光可提高大叶龙胆种子的发芽势及发芽率, 但对黑暗条件培养的种子无明显促萌发作用。低剂量激光还可提高大叶龙胆幼苗的叶绿素和可溶性蛋白含量, 促进幼苗生长。结论 低剂量的 CO₂ 激光可促进光照条件下的大叶龙胆种子萌发及幼苗生长。

关键词: 大叶龙胆; CO₂ 激光; 种子萌发; 幼苗生长

中图分类号: R 282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253 2670(2004)03 0324 04

Effects of CO₂ laser irradiation on seed germination and seedling growth in *Gentiana macrophylla*

XU E Hui-jun, YUE M ing, WANG Ya-zhou

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Key words: *Gentiana macrophylla* Pall.; CO₂ laser; germination of seeds; growth of seedlings

大叶龙胆 *Gentiana macrophylla* Pall. 为龙胆科龙胆属的多年生草本植物, 分布在西北、华北、东北及四川等地, 其根入药称秦艽, 为一种常用的传统中药。近几年以秦艽为原料的新药开发取得了较大进展, 需要量越来越大, 由于过去秦艽的药用全靠野生, 而野生受自然条件的制约, 分布面狭窄, 加之耕作范围扩大和盲目采集, 使资源日趋减少, 产量和质量下降, 面临濒危, 药用资源严重紧缺, 被国务院列为野生药材资源保护管理物种之一。因此开展大叶龙胆规范化种植尤为重要。大叶龙胆多以种子繁殖, 但其种子萌发率较低。目前关于大叶龙胆种子发芽特性的研究较少, 故研究促其种子萌发和幼苗生长的方法对探索大叶龙胆人工栽培有一定意义。

国外自 20 世纪 60 年代, 我国自 20 世纪 70 年代初, 已经开发了激光诱变育种技术的研究^[1]。美国和加拿大等国较早采用红宝石激光处理蚕豆、萝卜、紫花苜蓿和南瓜种子, 结果激光处理都提高了种子的发芽率和发芽势^[2], 在玉米、小麦、马铃薯、甜橙等的研究中都表明低剂量的激光辐照种子, 能打破休眠, 提高发芽率、发芽势, 促进苗期生长, 早熟高产、代谢旺盛、抗逆性增强^[3,4]。李雨润等^[5]曾通过对 6 种不同蔬菜种子进行低剂量 CO₂ 激光照射后, 进行实验室或田间栽培。观测其各种生理指标得出结论:

适量 CO₂ 激光照射蔬菜种子可增强种子的活力, 提高幼苗素质, 增加产量, 促进早熟, 加强生理功能, 改善解剖结构。因此, 本研究拟用不同剂量 CO₂ 激光辐照大叶龙胆种子, 探索促进其萌发和营养生长的途径。

1 材料与方法

实验用大叶龙胆种子由陕西省陇县西北大学秦艽种植基地提供, 为 2002 年收获的干燥成熟种子。

1.1 种子品质的检验

1.1.1 形态观察: 用体视显微镜观察大叶龙胆种子形态并用测微尺测量其大小。

1.1.2 种子净度的测定: 用十字区分法^[6]取 3 组种子测定种子净度, 用下面公式计算, 取平均值。

$$\text{种子净度} = \frac{\text{供试种子质量} - \text{废种子质量} - \text{杂质质量}}{\text{供试种子质量}} \times 100\%$$

1.1.3 千粒质量测定: 从洁净种子中随机取 1 000 粒称质量, 重复 3 次, 取平均值。

1.1.4 种子含水量测定: 先将称量瓶放在 105 °C 烘箱内烘干, 冷却后称质量, 再将 5 g 供试种子放入称量瓶, 在 105 °C 烘箱中烘 6~8 h 至恒重后, 盖瓶盖并取出, 放入干燥器内冷却至室温称重。

$$\text{种子含水量} = \frac{\text{种子烘前质量} - \text{种子烘后质量}}{\text{种子烘前质量}} \times 100\%$$

1.2 CO₂ 激光促萌发试验

* 收稿日期: 2003-07-21

基金项目: 陕西省教育厅重点产业化项目(01ZC08)

作者简介: 薛慧君(1978—), 女, 山西人, 助教, 硕士, 研究方向为中药学、生态学。E-mail: huijunx@soho.com

* 通讯作者

1.2.1 种子处理方法: 2002年10月27日将种子用饱和漂白粉溶液消毒0.5 h, 流水冲洗, 然后室温浸泡24 h; 28日将湿种子摆在铺有两层滤纸的培养皿内用CO₂激光器(M SHCO—A—C800MM, 西北大学光电研究所生产)做6组处理, 本研究所用CO₂激光波长1 060 nm, 扩束光斑直径为30 mm, 照射距离为25 cm, 功率密度为3.2 mW/mm², 照射时间分别为0(CK), 30, 60, 90, 120 s。每皿种子100粒, 每处理3个重复。然后放入22℃温箱里, 光照培养。作相同的另外一批在22℃温箱里, 黑暗中培养。

1.2.2 萌发率的统计^[7]: 第8天统计发芽势, 第14天统计发芽率。当幼根长度等于或大于种子长度时, 即认为种子发芽。

发芽势 = (规定天数内发芽数/实验总粒数) × 100%

发芽率 = (发芽总粒数/实验总粒数) × 100%

1.3 促生长实验

1.3.1 幼苗的培养: 同上法作5个处理的种子, 然后放入22℃温箱中光照培养。第6天种子开始萌发, 施以MS培养液, 第10天将各处理的幼苗种在花盆中, 并做标记, 放入花房培养。培养土为1:1的黄土和腐殖质混合物, 花盆上盖塑料布以保湿透光, 并每天用小型喷雾器浇水。第15天揭去塑料布, 幼苗已经适应土壤环境, 长势良好。继续保持条件使其生长。20~30 d后幼苗长出两片真叶, 在此期间适时间苗, 留下生长一致的幼苗, 并去杂草。1月8日(即生长两个月后)将各处理的苗采下, 进行生理指标的测定。

1.3.2 叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白含量的测定: 用魏海姆(1974)^[8]方法测叶绿素含量, 蒽酮法^[9]测可溶性总糖含量, 考马斯蓝染色法^[10]测定可溶性蛋白含量, 含量以mg/g计算。

1.3.3 统计分析: 对叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白含量分别进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 种子品质: 大叶龙胆种子椭圆形, 长1.5~1.7 mm, 直径0.5~0.6 mm, 表面黄棕色至褐色, 光滑; 种脐位于基部尖端, 不明显, 解剖镜下见种子表面密布略凸起的纵皱纹。种子净度为94.8%, 千粒重0.145 g, 种子含水量为9.8%。

2.2 CO₂激光处理对无光条件下大叶龙胆种子萌发的影响: 在无光培养条件下, 虽然不同剂量的CO₂激光处理的大叶龙胆种子萌发数都略大于对照, 但是CO₂激光对种子萌发并无显著的影响, 最大发芽率还不足35%。说明CO₂激光对打破大叶龙胆种子

的光萌发特性无显著作用(图1)。

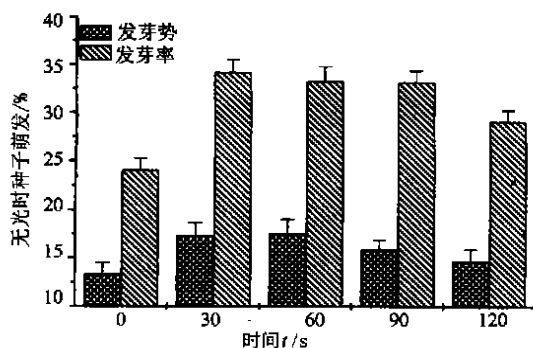


图1 CO₂激光处理对无光条件下大叶龙胆种子萌发的影响

Fig. 1 Effects of CO₂ laser irradiation on seed germination of *G. macrophylla* in dark

2.3 CO₂激光处理对有光条件下大叶龙胆种子萌发的影响: 在光照条件下, 各处理的大叶龙胆种子萌发数都大于对照, 其中60 s CO₂激光处理的促进作用最大, 其发芽势、发芽率分别为对照的130%, 133%, 而且长势整齐, 其次为30和90 s的处理(图2)。

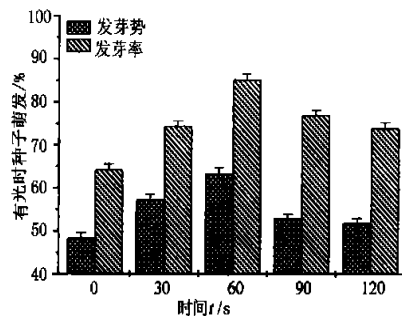


图2 CO₂激光处理对有光条件下大叶龙胆种子萌发的影响

Fig. 2 Effects of CO₂ laser irradiation on seed germination of *G. macrophylla* in light

2.4 CO₂激光处理对大叶龙胆幼苗叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响: 结果表明(表1), 30和60 s处理组的大叶龙胆幼苗叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均高于对照, 其中30 s处理组的显著高于对照的($P < 0.05$); 而90和120 s处理组的叶绿素a、叶绿素b及总叶绿素含量均低于对照, 且差异显著($P < 0.05$)。30和60 s处理组的大叶龙胆幼苗可溶性糖含量与对照的接近, 而90, 120 s处理组的可溶性糖含量均显著低于对照($P < 0.05$)。30~120 s各处理组大叶龙胆幼苗的可溶性蛋白含量均显著高于对照($P < 0.05$)。总的来看, 30和60 s处理组的大叶龙胆幼苗的各种生理指标都比对照高,

表1 CO₂激光对大叶龙胆幼苗叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of CO₂ laser irradiation on contents of chlorophyll, soluble sugar, and soluble protein in seedling of *G. macrophylla* ($\bar{x} \pm s$)

时间/s	含量/(mg·g ⁻¹)				
	叶绿素a	叶绿素b	总叶绿素	可溶性糖	可溶性蛋白
对照	0.48±0.05	0.15±0.02	0.63±0.05	1.10±0.17	4.6±0.36
30	0.72±0.02*	0.29±0.02*	1.06±0.02*	1.07±0.21	7.0±0.89*
60	0.52±0.02	0.16±0.03	0.69±0.03	1.12±0.16	8.4±0.53*
90	0.44±0.01	0.18±0.03	0.63±0.05	0.54±0.07	7.0±0.27*
120	0.35±0.01*	0.12±0.01*	0.47±0.02*	0.39±0.03*	6.9±0.33*

* 处理组与对照组(CK)之间有显著差异

* indicated a significant difference between TR and CK

并且这两组的幼苗长势也明显好于对照和其他两处理组,所以30和60s的CO₂激光辐照对大叶龙胆幼苗生长有较好的促进作用。

3 讨论

激光对生物体的作用表现为光效应、电磁效应、热效应和压力效应^[11],但低功率的激光器产生的热和压力很少,因此,激光对生物体的影响就主要为光效应和电磁效应,其本质是生物分子吸收不同波长的激光,或在激光的电磁场效应下,分子内发生能级跃迁,达到一定的震动能和产生自由基引起生物分子内分解、裂解或断裂,导致分子激活或损伤。激光对生物体有直接和间接作用,即直接使生物体的性状发生改变或导致生物体死亡,或间接使生物分子吸收能量,分子内发生能级跃迁,达到一定的震动能以后,使机体当代产生光照活化效应所至。从而使DNA酶活性提高,有丝分裂加快,核仁活化,宏观上可使种子发芽率高,出苗快,苗期生长旺盛,多分蘖,提早开花和成熟。产量增加,对生产极为有利。

而本试验也表明,低剂量(30,60s)CO₂激光处理对大叶龙胆种子的萌发及幼苗生长有促进作用。

图1中,在无光条件下,CO₂激光处理的大叶龙胆种子萌发率虽略增加却最高仅达到35%,这可能与大叶龙胆种子的光萌性有关。李惠娟认为^[12]种子收获时其胚仅发育至心性胚,需经过后熟阶段才能萌发,为实现进一步发育,种子需吸水并保持有利的温度条件。在本实验中,虽有充足的水份,适宜的温湿度,却因无光照而使种子萌发率低,关于光在大叶龙胆种子萌发过程中的作用机制还需进一步研究。

从图2中可明显看出激光处理使大叶龙胆种子的萌发率提高,随着处理时间的增大,萌发率是逐渐提高,60s处理的萌发率为最高,后又下降,但仍高于对照。这样一个变化说明低剂量CO₂激光辐照主要表现为刺激效应,随着剂量的增加,其生物效应从刺激向抑制转化。

在表1中可看到,与对照相比,30~60s的CO₂激光处理可提高大叶龙胆的叶绿素含量,同时各组CO₂激光处理均可显著提高可溶性蛋白含量,表明CO₂激光处理可刺激酶类合成。酶的光激活是光生物学发展最快的一个领域,其重要性在于酶是一种催化剂,原则上讲一个光子可激活一个酶分子,激活的酶分子转而又能产生成千上万的物质分子。许多实验也证明在一定的剂量范围内,激光辐射会使生物体内的硝酸还原酶、酯酶、淀粉酶等活性普遍提高,代谢旺盛,抗逆性增强。总之,与对照组相比,在幼苗期,30和60s处理的幼苗生长都更为茁壮,这与它们生理指标表现出来的一致。而90和120s处理的幼苗生长就要差,说明低剂量的CO₂激光处理可用以促进大叶龙胆种子的萌发及幼苗生长,在后续工作中将对大叶龙胆种子进行30和60s处理,并设立对照,研究低剂量激光对其营养生长处秦艽药材质量的影响,为推广到生产实践提供更详实可靠的依据。

References

- [1] Tang X Z, Feng G L, Shao Y C. Survey of laser and laser biology development [J]. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), 1999, 8(2): 157-160.
- [2] Paleg L G, Aspinall D. Field control plant growth and development through the laser activation of phytochrome [J]. *Nature*, 1970, 970-973.
- [3] Klebanov G, Kapitanov A B, Tesslkin Y A. The antioxidant properties of lycopen [J]. *Biol Membrany Moscow*, 1998, 15(2): 22-25.
- [4] Cai S W, Zhao X S, Lu F T. The influence of He-Ne laser irradiation on the active oxygen metabolism of corn seedling [J]. *Chin J Laser* (中国激光), 1994, 9: 767-769.
- [5] Li Y R, Hao L Z. A study on raising the vitality of vegetable seeds by CO₂ laser irradiation [J]. *Acta Laser Biol Sin* (激光生物学报), 2000, 9(2): 110-113.
- [6] Shaanxi Forest Research Institute. *The Handbook of Seeds Collection and Seedlings Nursery of Forest* (林木采种育苗手册) [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1984.
- [7] Liu L S, Ji K P. Germination characters of seed of *Gentiana macrophylla* Pall. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 33(3): 269-271.

- [8] Witham F H, Blaydes D F, Devlin R M. *Experiments in Plant Physiology* (植物生理学实验) [M]. Beijing: Science Press, 1974.
- [9] Shanghai Plant Physiology Academy. *Experiment Handbook in Plant Physiology* (植物生理学实验手册) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1985.
- [10] Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Method and Technology of*

Biochemical Experiments (生化实验方法和技术) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1997.

- [11] Xiang Y. *Laser Biology* (激光生物学) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1995.
- [12] Li H J, Wang Y Z. Embryology of *Gentiana macrophylla* Pall. [J]. *Acta Bot Boreali-Occidentalia Sin* (西北植物学报), 1994, 14(4): 243-248.

紫花洋地黄的组织培养和植株再生

施和平, 权 宏*

(华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631)

紫花洋地黄 *Digitalis purpurea* L. 是玄参科毛地黄属的可供药用和观赏的两年或多年生的草本植物, 原产欧洲。其叶片为制备强心药物西地兰和地高辛的原料或将叶片直接作原料药药用。临床试验表明, 其药用成分洋地黄强心苷等具有加强心肌收缩力, 减慢心率, 抑制传导的作用, 并用于充血性心肌功能不全症治疗等^[1]。有报道表明, 洋地黄的细胞培养物具有羟基化的生物转化能力, 能将洋地黄毒苷转化为羟基洋地黄毒苷^[2,3]。但至今少见有关紫花洋地黄组织培养和植株再生的正式报道。本实验报道利用紫花洋地黄叶片外植体诱导形成愈伤组织并得到再生植株的实验结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料: 取紫花洋地黄 *Digitalis purpurea* L. 种子用清水吸胀后, 置于细纱布袋中, 先用 75% 酒精消毒 30 s, 再置入 0.1% 升汞溶液中浸泡 24~26 min, 用无菌水冲洗 5~6 遍后, 将种子置于盛 MS 培养基湿润滤纸的灭菌三角瓶中萌发。

1.2 愈伤组织的诱导: 将萌发生长 20 d 的无菌苗叶片切成 0.5~1.0 cm² 的小块, 接种至含 2, 4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上诱导愈伤组织和继代培养。愈伤组织每周继代一次。

1.3 芽和根的分化: 将叶片产生的新鲜浅黄绿色愈伤组织转接至含 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上诱导芽的分化。将所得到的芽从愈伤组织上切下, 转接至含 NAA 0.5 mg/L 或不含任何外源生长调节剂的 MS 培养基上诱导根的形成。

1.4 培养条件: 以上所用的培养基均加 0.7% 琼脂, 3% 蔗糖 (A.R.), pH 5.8。除愈伤组织诱导在 (25±2) °C, 光照 12~14 h/d, 1 200 lx 下培养外; 幼芽分化及生根诱导均在 (25±2) °C, 光照 12~14 h/d, 光强 2 000 lx 下进行培养。

2 结果

2.1 愈伤组织的诱导及芽的分化: 幼嫩的紫花洋地黄叶片外植体在愈伤组织诱导培养基上培养 1 周后, 叶片外植体切块不同程度卷曲, 并整体膨大; 2~3 周后从叶片外植体产生大量疏松浅黄绿色或淡黄色愈伤组织; 且随着培养时间延长, 愈伤组织体积逐渐增大。但若在该愈伤组织培养基上生长太久 (30~40 d), 老的愈伤组织就开始变黄, 或轻微变褐 (图 1)。

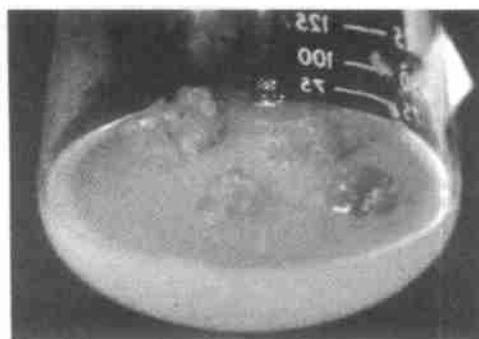


图 1 紫花洋地黄叶片外植体产生的愈伤组织

Fig. 1 Callus formation from *D. purpurea* blade explants

将叶片外植体上产生的新鲜愈伤组织转接至 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的芽分化培养基中, 约 5~6 d 后愈伤组织变得更疏松, 呈浅

* 收稿日期: 2003-07-22

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (003062)

作者简介: 施和平 (1964—), 男, 湖南浏阳人, 博士, 副研究员, 从事植物生长发育调控方面的科研教学工作。

E-mail: shihp@scnu.edu.cn Tel: (020) 85214793