

曼陀罗种子萌发及植株再生

张 鸿, 张显强, 罗正伟, 湛金吾, 孙 敏*

西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

摘 要: **目的** 探索曼陀罗种子萌发及组织培养条件的优化。**方法** 利用不同质量浓度 GA_3 及不同处理时间的曼陀罗种子, 测定其发芽率和发芽势; 采用正交设计法探讨不同植物激素配比及培养基对曼陀罗再生体系建立的影响。**结果** 种子用 60 mg/L GA_3 浸泡 10 h 后发芽率最高, 达到 73.33%; 叶片用 75% 乙醇消毒 15 s 后用 0.1% $HgCl_2$ 处理 3 min 时成活率最高, 为 70.59%; 以叶片为外植体诱导出愈伤组织的最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 诱导率达 92.5%; 丛生芽诱导的适宜培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 诱导率达到 94.50%; 生根为不加激素的 MS 培养基, 15 d 后根系粗壮, 移栽成活率达 90% 以上。**结论** 使用 GA_3 促使曼陀罗种子快速萌发, 用“两步法”建立了曼陀罗高效无菌再生体系。

关键词: 曼陀罗; 种子萌发; 组织培养; 植株再生; 最佳培养基

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)12-2499-04

Seed germination and plant regeneration of *Datura stramonium*

ZHANG Hong, ZHANG Xian-qiang, LUO Zheng-wei, CHEN Jin-wu, SUN Min

Key Laboratory of Eco-environments of Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences,

Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: **Objective** To optimize the conditions for the seed germination and plant regeneration of *Datura stramonium*. **Methods** The seeds were treated by GA_3 at different concentration for various durations, the germination percentage and germination trend of seeds were determined, and the effects of different hormones and media on the plant regeneration were investigated by orthogonal design. **Results** The seeds treated by GA_3 (60 mg/L) for 10 h had the highest germination percentage (73.33%); The leaves had the highest survival rate (70.59%) when sterilized in 75% ethyl alcohol for 15 s then 0.1% $HgCl_2$ for 3 min; The optimal medium for callus induction of leaves was MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, with the inductivity of 92.5%; The optimal medium for callus induction of clustered buds was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, with the inductivity of 94.50%; The rooting was radicated in hormone free MS medium and grew well after 15 d, and the survival rate of planting is over 95%. **Conclusion** The seeds of *D. stramonium* germinate faster after being treated by GA_3 , and high efficient steriled plant regeneration system for *D. stramonium* is established by the “two-step method”.

Key words: *Datura stramonium* L.; seed germination; tissue culture; plant regeneration; optimal culture medium

曼陀罗 *Datura stramonium* L. 是茄科一年生草本植物, 又叫醉心花、狗核桃、洋金花、枫茄花、万桃花等, 有祛风除湿、止喘定痛的作用, 具有很高的药用价值^[1]。其药效成分主要为莨菪碱 (hyoscyamine)、东莨菪碱 (scopolamine) 及阿托品 (atropine) 等托品烷类生物碱类, 内含的生物活性成分具有抗胆碱特性且活性较高^[2], 在医学、戒毒、植保和环保领域都有广泛的运用, 对多种疾病有很好的治疗作用^[3]。目前有关曼陀罗种子萌发和组织

培养的研究, 仅见用理化方法处理曼陀罗种子, 打破其休眠而提高种子发芽率^[4]、愈伤组织分化及悬浮细胞再生、用愈伤组织制备原生质体等方面^[5]。而利用 GA_3 促进曼陀罗种子萌发的时间和浓度效应以及植株再生体系的建立未见系统报道。曼陀罗种子自然萌发率低, 对季节和气候要求高, 建立曼陀罗种子萌发及植株再生体系, 打破曼陀罗生长和繁殖的环境限制, 为曼陀罗资源开发和市场需求提供重要的技术保证。

收稿日期: 2012-07-13

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划资助 (201210635067); 贵州省科技基金 (黔科合 J 字[2011]2162 号); 贵州警官职业学院科技基金 (10ZDZK03)

作者简介: 张 鸿 (1996—), 男 (布依族), 本科, 主要从事生物科学教育研究。Tel: 15086740846 E-mail: zhanghongswu@126.com

*通讯作者 孙 敏 Tel: (023)68254061 E-mail: jwscm@swu.edu.cn

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1750.003.html>

1 材料

曼陀罗种子采于贵州省贵阳市药用植物园,经西南大学孙敏教授鉴定为曼陀罗 *Datura stramonium* L.,将种子放于4℃冰箱内保存3个月,用GA₃处理使种子萌发,待幼苗长至5 cm左右,以幼叶作为外植体。

2 方法

2.1 种子萌发

将种子放于40℃温水中浸泡1 h,然后用自来水常温浸泡24 h,洗净后分别用0(CK)、20、40、60 mg/L的GA₃分别处理1、5、10、15 h,将种子播种于装有湿沙培养皿中,每个处理30粒种子。每天观察种子的萌发数,计算种子的发芽率和发芽势^[6]。

2.2 愈伤组织诱导及再生体系构建

2.2.1 培养基与培养条件 基本培养基为MS, pH 5.8,蔗糖30 g/L,琼脂6.5 g/L。培养温度为(25±1)℃,光照强度1500 lx,光照时间16 h/d。

2.2.2 外植体消毒 曼陀罗幼苗经自来水冲洗2 h,用75%乙醇和0.1% HgCl₂作为消毒剂,使用不同消毒方法消毒后,无菌水冲洗4~5次后把幼苗剪成1 cm左右的外植体,用无菌滤纸吸干后接种于MS固体培养基预培养,光照培养7 d后记录外植体污染数和存活数。

2.2.3 愈伤组织的诱导 取无菌的叶片切成5 mm×5 mm大小的外植体,采用表1设计的方案进行试验,每组3个重复,每个接种5个外植体,培养基为MS。4周后统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率=出愈外植体数/接种外植体数)。

2.2.4 丛生芽的诱导 选取长势较好的愈伤组织,采用L₉(3⁴)正交试验表将实验设计为9组,每组3个重复,每瓶接种3个外植体。分别将其接种在附

加不同质量浓度6-BA、NAA培养基上,30 d后统计生芽率和平均发芽个数,并分析试验结果,正交试验设计见表2。

表2 L₉(3⁴)正交设计

Table 2 L₉(3⁴) orthogonal design

水平	因素		
	A (6-BA)/(mg·L ⁻¹)	B (NAA)/(mg·L ⁻¹)	C (MS)
1	1.0	0.1	1
2	2.0	0.2	1/2
3	3.0	0.3	1/4

2.2.5 生根及移栽 待丛生芽长到5~6 cm时,剪下生长健壮的芽体接到MS固体培养基中,每瓶接种3株苗,每个水平重复3次,光照培养20 d后,观察其生根情况。

选择生长健壮的植株,打开瓶盖,室内培养3 d,洗尽根上残余的培养基,将小苗移栽于腐殖土和蛭石(5:2)混合的土壤中温室培养,两周浇1次不加激素和蔗糖的MS液体培养基。

3 结果与分析

3.1 GA₃处理对曼陀罗种子萌发的影响

GA₃可以解除种子的休眠,但不同质量浓度的GA₃和处理时间对种子萌发的影响不同。随着处理质量浓度和时间的增加,发芽率、发芽势都先升高后降低。质量浓度为60 mg/L和处理时间为10 h时,种子的发芽率、发芽势最高,发芽率达73.33%,发芽势达4.58%。所以,用60 mg/L GA₃处理10 h时种子萌发效果最好(图1)。

3.2 不同消毒方法对曼陀罗外植体的影响

适当的消毒时间对获得无菌的外植体很重要,70%~75%的乙醇具有较强的浸透力和杀菌力。结果见表3,外植体经75%乙醇处理15 s后再用0.1% HgCl₂浸泡3 min后获得的无菌曼陀罗外植体具有较高的存活率,存活率达到70.59%,污染率较小,效果最佳。

3.3 愈伤组织的诱导

将无菌叶片接种到培养基中约7 d后,叶片周围出现了少量较致密的浅黄色愈伤组织,随着时间的延长,愈伤组织体积迅速增加(图2-A)。愈伤组织的诱导率和培养基中所含激素的浓度有关,结果见表4。当6-BA质量浓度一定时,愈伤诱导率随NAA质量浓度升高而增大,在0.1 mg/L时愈伤分化最高;当NAA质量浓度一定时,随6-BA质量浓度的升高,愈伤组织诱导率先升高再降低,在0.5 mg/L时分化

表1 不同生长调节剂组合诱导愈伤组织

Table 1 Media with different combinations of growth regulators for callus induction

序号	外植体数	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)
1	15	0.1	0.01
2	15	0.1	0.05
3	15	0.1	0.10
4	15	0.5	0.01
5	15	0.5	0.05
6	15	0.5	0.10
7	15	1.0	0.01
8	15	1.0	0.05
9	15	1.0	0.10

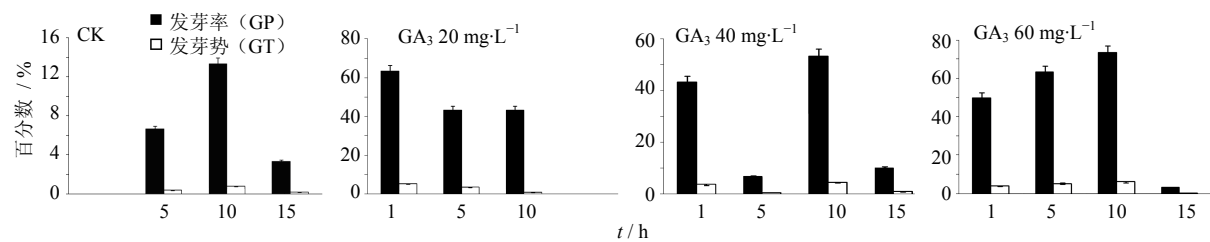


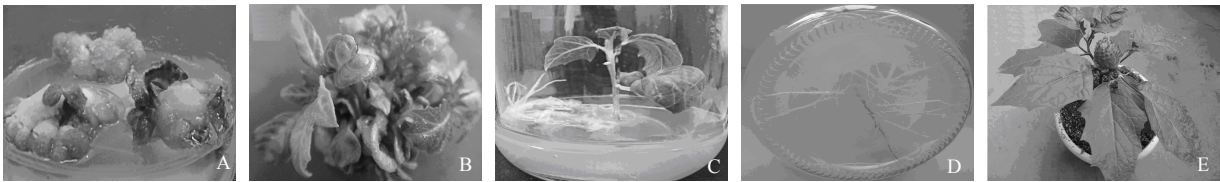
图 1 GA₃ 处理时间对种子发芽率和发芽势的影响

Fig. 1 Effects of treating time with GA₃ on germination percentage and germination trends of seeds

表 3 不同消毒方法对曼陀罗外植体成活率的影响

Table 3 Effects of different sterilizing techniques on survival rate of *D. stramonium* explants

处理	处理方法	接种数	污染数	污染率 / %	存活数	存活率 / %
1	75%乙醇 5 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 3 min	19	6	31.58	3	15.97
2	75%乙醇 10 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 3 min	20	2	10.00	4	20.00
3	75%乙醇 15 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 3 min	17	4	23.53	12	70.59
4	75%乙醇 5 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 5 min	19	0	0.00	5	26.32
5	75%乙醇 10 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 5 min	16	0	0.00	1	6.25
6	75%乙醇 15 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 5 min	16	0	0.00	1	6.25
7	75%乙醇 5 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 7 min	18	1	5.56	0	0.00
8	75%乙醇 10 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 7 min	19	0	0.00	0	0.00
9	75%乙醇 15 s, 0.1% HgCl ₂ 浸泡 7 min	16	0	0.00	4	25.00



A-愈伤组织 B-丛生芽 C-再生植株 D-再生植株生根 E-移栽后的植株
A-callus B-clustered buds C-regenerated plant D-rooting of regenerated plant E-plant after transplantation

图 2 曼陀罗植株再生过程

Fig. 2 Plant regeneration of *D. stramonium*

表 4 不同生长调节剂组合对诱导愈伤组织的影响

Table 4 Effects of different growth regulator combinations on callus induction

外植体个数	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	愈伤诱导率 / %
15	0.1	0.01	75.4
15	0.1	0.05	81.8
15	0.1	0.10	85.6
15	0.5	0.01	86.5
15	0.5	0.05	87.4
15	0.5	0.10	92.5
15	1.0	0.01	83.3
15	1.0	0.05	86.2
15	1.0	0.10	88.9

最高。所以诱导愈伤组织最佳的培养条件为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 诱导率达 92.5%。结果表明, 在诱导愈伤组织过程中, 不但需要控制植物生长调节物质的质量浓度, 而且应当控制生长素和细胞分裂素的配比。在脱分化过程中, 生长素起主要作用, 但与一定质量浓度的细胞分裂素配比, 效果会更好。

3.4 丛生芽诱导

选择生长良好的愈伤组织, 接种到培养基上培养 7 d 后, 伤口处膨大并长出许多绿色突起, 随后小突起进一步膨大成丛生芽的芽点, 随着时间的延长, 约 30 d 后形成簇生绿色丛生芽(图 2-B)。第 4 组丛生芽的诱导率最高, 为 94.5%, 平均发

芽数 17.78 个, NAA 和 6-BA 对丛生芽诱导结果的影响不显著($P>0.05$), 丛生芽诱导结果见表 5。极差分析表明影响曼陀罗丛生芽诱导因素依次为 6-BA>NAA>MS, 6-BA 对丛生芽的形成影响较大, 诱导丛生芽的最优组合为 $A_2B_1C_1$, 即 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。

3.5 生根及移栽

芽长至 3~5 cm 时, 将丛生芽切成单芽, 转入

MS 固体培养基中培养。芽苗在转入 MS 固体培养基中培养 8 d 之后小芽基部开始有白色突起形成, 约 15 d 培养基中长出较多的根, 植株生长健壮, 发育良好(图 2-C、D)。曼陀罗是热带阳生植物, 对光的依赖性较强。组织培养所得曼陀罗幼苗比较脆弱, 移栽过程中环境相对湿度过高时, 根易染菌而死亡。组培苗经过驯化后, 移栽到室外的成活率较高, 可达 80%以上, 植株生长正常(图 2-E)。

表 5 不同处理对曼陀罗丛生芽诱导的影响

Table 5 Effects of different treatments on induction of clustered buds

试验号	因素				丛生芽诱导率 / %	平均发芽个数
	A (6-BA)	B (NAA)	C (MS)	D (误差)		
1	1.0	0.1	1	1	65.33	6.27
2	1.0	0.2	1/2	2	56.47	5.33
3	1.0	0.3	1/4	3	50.00	4.38
4	2.0	0.1	1/2	3	94.50	17.78
5	2.0	0.2	1/4	1	92.21	12.50
6	2.0	0.3	1	2	84.35	10.35
7	3.0	0.1	1/4	2	89.64	11.67
8	3.0	0.2	1	3	78.50	9.83
9	3.0	0.3	1/2	1	68.89	8.76
K_1	171.80	249.47	228.18	226.43		
K_2	271.06	227.18	219.86	230.46		
K_3	237.03	203.24	231.85	223.00		
R	99.26	46.23	11.99	7.46		

4 讨论

在种子萌发过程中, 要使种子快速萌发须破除种子的正常休眠, 破除休眠有很多方法, 如采用 GA_3 、NaOH 处理等^[7], 种子的破眠难易程度与种后熟存放时间长短有很大联系^[8]。本实验表明曼陀罗种子经 GA_3 破眠处理后种子萌发率显著提高。另外在对种子进行破眠处理前用 35 °C 温水浸泡 2 h 预处理后再用 GA_3 破除休眠, 比单独使用 GA_3 处理种子更好。组织培养过程中, 获得无菌外植体是建立植株再生体系的基础, 因此消毒剂和消毒方法的选择尤为重要^[9]。75%的乙醇具有很强的浸透力和杀菌力, 适当的消毒时间对获得无菌外植体也很重要。要特别注意的是, 用 $HgCl_2$ 对植物材料消毒后要用无菌水反复冲洗, 洗净外植体上残留的重金属汞, 避免汞对培养物产生进一步的毒害作用。

在诱导愈伤组织和丛生芽时, 激素的配比极为关键。本实验结果显示, 在诱导曼陀罗愈伤组织时, 生长素和细胞分裂素的比值相对大, 有利于愈伤组织的分化; 而在诱导丛生芽时, 生长素和细胞分裂素的比值相对小, 有利于芽的形成。而且在愈伤组织的诱导过程中, 生长素起着主要的作用, 生长素

(NAA) 和细胞分裂素在此过程中表现出协同作用; 在生根过程中, 曼陀罗外植体在 MS 中能够很快地长出根, 并且植株很健壮, 这可能是受植物内源激素的影响, 这还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 龚加顺, 杨兆祥. 白花曼陀罗悬浮培养细胞生长和生物碱活性成分合成 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 936-939.
- [2] 邓朝辉, 罗 充, 刘 彬, 等. 曼陀罗药用价值的开发和利用 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 7(11): 1394-1398.
- [3] 李瑞明, 王振月, 王谦博, 等. 曼陀罗和毛曼陀罗花的最佳采收期评价 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 96-100.
- [4] 慕小倩, 史 雷, 赵云青, 等. 曼陀罗种子休眠机理与破眠方法研究 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(4): 683-689.
- [5] 黄 静, 赵 琦, 赵玉锦, 等. 曼陀罗茎段愈伤组织诱导和再生植株的研究 [J]. 生物技术通报, 2007, 5: 181-183.
- [6] 郭晔红, 蔺海明. 赤霉素和细胞激动素对白刺种子萌发的调控研究 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1196-1199.
- [7] 史 雷, 慕小倩. 曼陀罗种子破眠方法研究 [J]. 种子, 2010, 9(29): 40-43.
- [8] 邓洪平, 赵 红, 王 馨. 预处理促进药用植物马齿苋种子萌发的研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 10(32): 70-74.
- [9] 罗正伟, 张 来, 吕翠萍, 等. 竹节参离体培养及植株再生 [J]. 中药材, 2011, 34(12): 1818-1823.