

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201903059

陈瑶, 周寒梅, 何兵, 等. 华重楼离体胚培养及植株再生初探 [J]. 广西植物, 2020, 40(11): 1681–1690.

CHEN Y, ZHOU HM, HE B, et al. *In vitro* embryos culture and growth of regenerated plants in *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. *Guihaia*, 2020, 40(11): 1681–1690.

华重楼离体胚培养及植株再生初探

陈瑶^{1,2}, 周寒梅¹, 何兵^{1*}, 李维¹

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101; 2. 成都文理学院 现代农业学院, 成都 610401)

摘要: 为探明华重楼离体胚培养及植株再生的基本体系, 该文以华重楼离体幼胚为试验材料, 以 MS 培养基为基本培养基, 研究不同光照、不同浓度梯度组合的植物生长调节剂对华重楼离体幼胚萌发、成苗的影响。结果表明: 培养到 60 d 时, 暗培养条件下华重楼离体幼胚的生长率和萌发率分别比光培养条件下高 45.25%、19.17%, 故暗培养比光培养更有利于华重楼离体幼胚生长发育。当 GA₃ 浓度相同时, 离体幼胚萌发所需时间随 IAA 浓度增加而延长。不同浓度的 GA₃ 都可促进离体幼胚萌发, 促进作用由强到弱依次为 5 mg · L⁻¹ GA₃ > 1 mg · L⁻¹ GA₃ > 10 mg · L⁻¹ GA₃。在黑暗条件下, 优选得到最适华重楼离体幼胚生长发育配方为 1/2 MS+30 g · L⁻¹ 蔗糖+7 g · L⁻¹ 琼脂+0.5 g · L⁻¹ 活性炭+5 mg · L⁻¹ GA₃+1 mg · L⁻¹ IAA。此配方可诱导华重楼离体幼胚在 2 个月左右萌发, 萌发率达 50% 需 80 d 左右。在华重楼成熟胚出苗培养时发现, 高浓度的植物生长调节剂会抑制华重楼成熟胚生长发育, 高浓度 GA₃ 甚至会导致华重楼成熟胚死亡。优选得到最适华重楼成熟胚出苗配方为 MS+30 g · L⁻¹ 蔗糖+6.2 mg · L⁻¹ 硼酸+7 g · L⁻¹ 琼脂+0.7 g · L⁻¹ 活性炭+0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D+1.5 mg · L⁻¹ IAA + 1.5 mg · L⁻¹ ZT+5 mg · L⁻¹ GA₃, 诱导成熟胚出苗需 43 d 左右, 75 d 左右可形成真叶。

关键词: 胚培养, 离体幼胚, 成熟胚, 光照, 植物生长调节剂

中图分类号: Q945 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)11-1681-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



In vitro embryos culture and growth of regenerated plants in *Paris polyphylla* var. *chinensis*

CHEN Yao^{1,2}, ZHOU Hanmei¹, HE Bing^{1*}, LI Wei¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; 2. College of Modern Agriculture, Chengdu College of Arts and Sciences, Chengdu 610401, China)

Abstract: Light and plant-growth regulators have a great influence on the regeneration efficiency of somatic embryos and the growth of regenerated plants. In this study, the effects of light and plant-growth regulators on the regeneration of *in vitro* embryos and the growth of regenerated plants were examined in immature *in vitro* embryos from *Paris polyphylla*

收稿日期: 2019-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31271332); 四川省教育厅重点项目(15ZA0038) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271332); Key Program of Sichuan Provincial Department of Education (15ZA0038)].

作者简介: 陈瑶(1989-), 女, 四川成都人, 硕士, 研究实习员, 主要从事植物生理生态学研究, (E-mail) enya3106@sina.com。

*通信作者: 何兵, 硕士, 副教授, 主要从事植物生理生态学研究, (E-mail) yummy3000@163.com。

var. *chinensis* seeds. The main purpose was to explore the basic system of *in vitro* embryos culture and growth of regenerated plants in *P. polyphylla* var. *chinensis*. In order to study the effects of plant-growth regulators on the growth and development of immature *in vitro* embryos and the growth of regenerated plants, supplemented with plant-growth regulators with different kinds and concentrations to MS mediums. In order to study the effect of light on the growth and development of immature *in vitro* embryos of *P. polyphylla* var. *chinensis*, the immature *in vitro* embryos were cultured in light and dark conditions. The results showed that dark conditions were more conducive to the growth and development of immature *in vitro* embryos in *P. polyphylla* var. *chinensis* than light conditions. When cultured for 60 d, the growth rate and germination rate of immature *in vitro* embryos of *P. polyphylla* var. *chinensis* under dark culture conditions were 45.25%, 19.17% higher than those under light culture conditions, respectively. When the concentration of GA₃ was the same, the germination time of immature *in vitro* embryos was prolonged as the concentration of IAA increased. Different concentrations of GA₃ promoted the germination of immature *in vitro* embryos. The promoting effect was 5 mg · L⁻¹ GA₃ > 1 mg · L⁻¹ GA₃ > 10 mg · L⁻¹ GA₃. Under dark conditions, the best formula for immature *in vitro* embryos of *P. polyphylla* var. *chinensis* germination was 1/2 MS + 30 g · L⁻¹ sucrose + 7 g · L⁻¹ agar + 0.5 g · L⁻¹ activated carbon + 5 mg · L⁻¹ GA₃ + 1 mg · L⁻¹ IAA. This induced *in vitro* embryo *P. polyphylla* var. *chinensis* germination in about two months. The germination rate reached 50% after about 80 d. In the mature embryos emergence experiment, a high concentration of plant-growth regulators inhibited the growth and development of mature embryos in *P. polyphylla* var. *chinensis*. A high concentration of GA₃ in particular led to the death of mature embryos. The best formula for seedlings of mature embryos was MS + 30 g · L⁻¹ sucrose + 6.2 mg · L⁻¹ boric acid + 7 g · L⁻¹ agar + 0.7 g · L⁻¹ activated carbon + 0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D + 1.5 mg · L⁻¹ IAA + 1.5 mg · L⁻¹ ZT + 5 mg · L⁻¹ GA₃. Mature embryos could produce seedlings within only 43 d. True leaves were formed after around 75 days.

Key words: embryos culture, immature *in vitro* embryos, mature embryos, light, plant-growth regulator

华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis*) 是我国Ⅱ级保护植物、名贵中药材。重楼中主要活性物质为甾体皂苷, 具有抗肿瘤 (Huang et al., 2007; Wu et al., 2013)、抗菌 (Qin et al., 2012)、抗氧化 (张宁, 2016)、止血 (李洪梅等, 2017) 等作用。干燥重楼根茎是云南白药、季德胜蛇药片、宫血宁等 65 种中成药的重要原料 (武珊珊等, 2004; 杨天梅等, 2017; 张翔宇等, 2017)。由于重楼药用功效不断被开发, 市场价格不断攀升, 导致重楼野生资源遭到无规律、大量的采挖, 野生资源急剧减少。20 世纪 80 年代, 干燥重楼根茎价格约每千克 2.5 元 (何良艳等, 2011), 近年来已上涨到每千克 400 元 (赵庭周等, 2014)。在巨大经济利益的驱使下, 重楼野生资源陷入“越挖越少、越少越贵、越贵越挖”的恶性循环。我国 80% 的野生重楼已被开发利用 (黄希等, 2016)。为缓解重楼野生资源困境, 必须加快重楼人工繁殖速度。但如何打破重楼种胚形态休眠和生理休眠、提高种子萌发率等方面仍没有取得突破性进展。因此, 研究重楼属植物组织

培养技术是解决重楼属植物快繁瓶颈的有效途径。不同学者分别以重楼根状茎 (熊海浪等, 2012; 宋发军等, 2013; 王跃华等, 2014; 刘银花等, 2015b)、茎尖、子房、茎段 (李群等, 2006)、芽 (杨丽云等, 2008; 王跃华等, 2014)、芽轴 (刘银花等, 2015a)、叶片 (熊海浪等, 2012; 王跃华等, 2014)、种胚 (熊海浪等, 2012; 王跃华等, 2015)、种子 (宋发军等, 2013; 杨淋等, 2013) 等为材料建立了重楼组织培养体系, 但都存在愈伤组织诱导和增殖率低、幼苗移栽成活率低等问题, 实用价值不高。

胚培养是在离体无菌条件和适宜培养基中使离体胚发育成苗的技术 (王蒂, 2004), 且对促进植物育种和遗传学研究具有重要意义 (Yao et al., 2016; Liu et al., 2016)。进行胚培养的主要目的之一是打破种子休眠加速萌发, 缩短育种周期 (王雪玲, 2014)。胚培养受很多条件的影响, 如胚的品种、胚龄、培养基种类、激素种类和浓度、碳水化合物种类和浓度、光照、温度、pH 值等 (田玲, 2007; 雷秀娟, 2013)。胚培养技术已经在浙贝母

表 1 华重楼离体幼胚生长发育 $L_9(2^3)$ 因子水平表Table 1 Factors and levels $L_9(2^3)$ of *Paris polyphylla* var. *chinensis* in vitro embryos growth and development

植物生长调节剂 Plant-growth regulator ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	处理组编号 Treatment number									
	CK	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
赤霉素 3 GA ₃	0	1	1	1	5	5	5	10	10	10
吲哚乙酸 IAA	0	1	4	8	1	4	8	1	4	8

表 2 华重楼成熟胚诱导出苗 $L_9(3^4)$ 因子水平表Table 2 Factors and levels $L_9(3^4)$ of *Paris polyphylla* var. *chinensis* embryos induction seedling

植物生长调节剂 Plant-growth regulator ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	处理组编号 Treatment number									
	CK	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
二氯苯氧乙酸 2,4-D	0	0.5	0.5	0.5	1	1	1	3	3	3
吲哚乙酸 IAA	0	0.5	1.5	3	0.5	1.5	3	0.5	1.5	3
玉米素 ZT	0	0.5	1.5	3	1.5	3	0.5	3	0.5	1.5
赤霉素 3 GA ₃	0	1	5	10	10	1	5	5	10	1

(苏新, 1995)、人参(雷秀娟, 2013)、伊贝母(李丽, 2017)、橄榄(Germana et al., 2014)等药用植物研究中取得成功。目前未见有关华重楼种子离体胚培养的报道。

重楼属(*Paris*)植物结籽量大, 种子数量多, 是繁殖的好材料。但由于其植物本身特殊的生物学特性, 种子在自然条件下, 需要两冬一夏才能萌发并且萌发率低、植株生长缓慢(李运昌, 1982), 常规育种难以保证市场的需要。能否利用重楼种子数量多的特点和组织培养具有高繁殖效率的优点, 直接诱导重楼离体幼胚发育形成植株? 本试验通过离体胚培养技术来克服重楼种子难以萌发的缺点, 缩短育种周期。用胚培养技术研究光照和植物生长调节剂对华重楼种子离体幼胚萌发及成苗的影响, 旨在使发育不完全的胚快速发育, 缩短萌发时间和出苗时间, 同时也为重楼属植物的繁殖研究探索出一条新途径。

1 材料与方 法

1.1 材料

华重楼种子采自峨眉山生物资源实验站, 挑

选新鲜健康、大小均匀一致的华重楼种子备用。

1.2 方法

1.2.1 华重楼种子预处理 将去除外种皮的华重楼种子用流水冲洗 30 min, 用滤纸将种子表面的水分吸干, 在超净工作台中用 0.1% 的 HgCl_2 消毒 10 min、无菌水冲洗 5 次、每次 1 min。消毒后接种在 MS 培养基中, 放入人工气候箱培养 6 个月。人工气候箱条件设置: 温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 光照 1 500 lx, 11 h \cdot d⁻¹, 湿度 65%; 温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 光照 0 lx, 湿度 75%, 13 h \cdot d⁻¹。

1.2.2 华重楼种胚剥离 将双目体视镜下置于超净工作台中, 用手术刀和解剖针在双目体视镜下将处理 6 个月后的华重楼种胚取出并接种于装有“华重楼离体幼胚生长发育培养基”的培养皿中。

1.2.3 植物生长调节剂对华重楼离体幼胚生长发育的影响 离体幼胚生长发育培养基: 1/2 MS+30 g \cdot L⁻¹ 蔗糖+7 g \cdot L⁻¹ 琼脂+0.5 g \cdot L⁻¹ 活性炭+IAA+GA₃, pH 为 5.8~6。采用 2 因素 3 水平 $L_9(2^3)$ 实验设计研究 IAA、GA₃ 对华重楼离体幼胚生长发育的影响, 并以不添加 IAA、GA₃ 的“离体幼胚生长发育培养基”为对照组(表 1)。每个培养皿接种 4 颗华重楼离体幼胚, 用封口胶密封培养皿后倒置于人工气候箱中培养, 每个组重复 6 次。

1.2.4 光照对华重楼离体幼胚生长发育的影响

为研究不同光照对华重楼离体幼胚生长发育的影响,将1.2.3中接种的每组培养皿平均分为两部分,分别置于光培养和暗培养条件下进行培养。光培养条件:光照1 500 lx,温度20℃,湿度65%, $11\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$;光照0 lx,温度15℃,湿度75%, $13\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。暗培养条件:光照0 lx,温度20℃,湿度65%, $11\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$;光照0 lx,温度15℃,湿度75%, $13\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。此后,每隔2 d分别取样在双目体视镜下观察华重楼离体幼胚的形态变化。

1.2.5 植物生长调节剂对华重楼成熟胚出苗的影响

子叶长出0.1~0.2 cm视为离体胚发育成熟。将健康、长势一致的成熟胚转接到出苗培养基中诱导成熟胚出苗。出苗培养基:MS+30 g·L⁻¹蔗糖+6.2 mg·L⁻¹硼酸+7 g·L⁻¹琼脂+0.7 g·L⁻¹活性炭+2,4-D+IAA+ZT+GA₃,培养基pH为5.8~6,每组重复3次。采用4因素3水平L₉(3⁴)实验设计研究2,4-D、IAA、ZT、GA₃对华重楼成熟胚出苗的影响,并以不添加2,4-D、IAA、ZT、GA₃的“出苗培养基”为对照组(表2)。培养条件:光照1 500 lx,温度22℃,湿度60%, $11\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$;光照0 lx,温度15℃,湿度75%, $13\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 光照对华重楼离体幼胚发育的影响

由表3可知,光照条件下,培养到60 d时离体幼胚生长率仅为22.25%,萌发率仅为7.5%,绝大多数离体幼胚在生长过程中褐化死亡。暗培养条件下,培养到60 d时离体幼胚生长率为67.5%,萌发率为26.67%。由此可见暗培养更有利于华重楼离体幼胚生长发育。

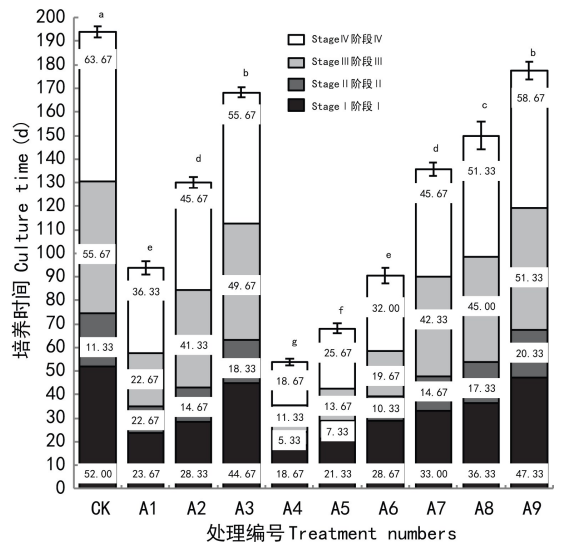
2.2 植物生长调节剂对华重楼离体幼胚萌发的影响

由图1可知,对照组处理下华重楼离体幼胚需要194 d才能萌发,不同浓度的GA₃+IAA组合处理都能显著促进华重楼离体胚萌发。当GA₃浓度相同时,离体幼胚萌发所需时间随IAA浓度增加而延长。说明低浓度IAA促进作用强于高浓度IAA。当IAA浓度相同时,不同浓度的GA₃都可促进离体幼胚萌发,促进作用由强到弱依次为

表3 光照对华重楼离体幼胚萌发生长的影响

Table 3 Effects of light on the *in vitro* embryo germination of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

光照条件 Light condition	光培养 Light culture		暗培养 Dark culture	
培养时间 Culture time (d)	45	60	45	60
胚生长率 Embryo growth rate (%)	10.00	22.50	52.50	67.50
胚萌发率 Embryo germination rate (%)	0	7.5	0	26.67



阶段 I. 球形胚分化所需时间; 阶段 II. 胚柄分化所需时间; 阶段 III. 胚根分化所需时间; 阶段 IV. 子叶分化所需时间。不同小写字母表示差异显著性 ($P < 0.05$)。下同。
Stage I. Time required for spherical embryos differentiation; Stage II. Time required for suspensor differentiation; Stage III. Time required for radicle differentiation; Stage IV. Time required for cotyledon differentiation. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

图1 植物生长调节剂对华重楼离体幼胚生长发育的影响

Fig. 1 Effects of plant-growth regulators on *in vitro* embryo growth of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

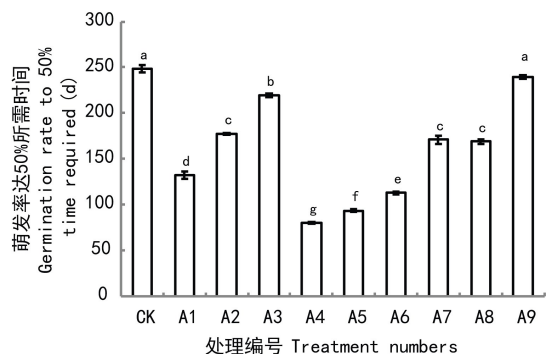
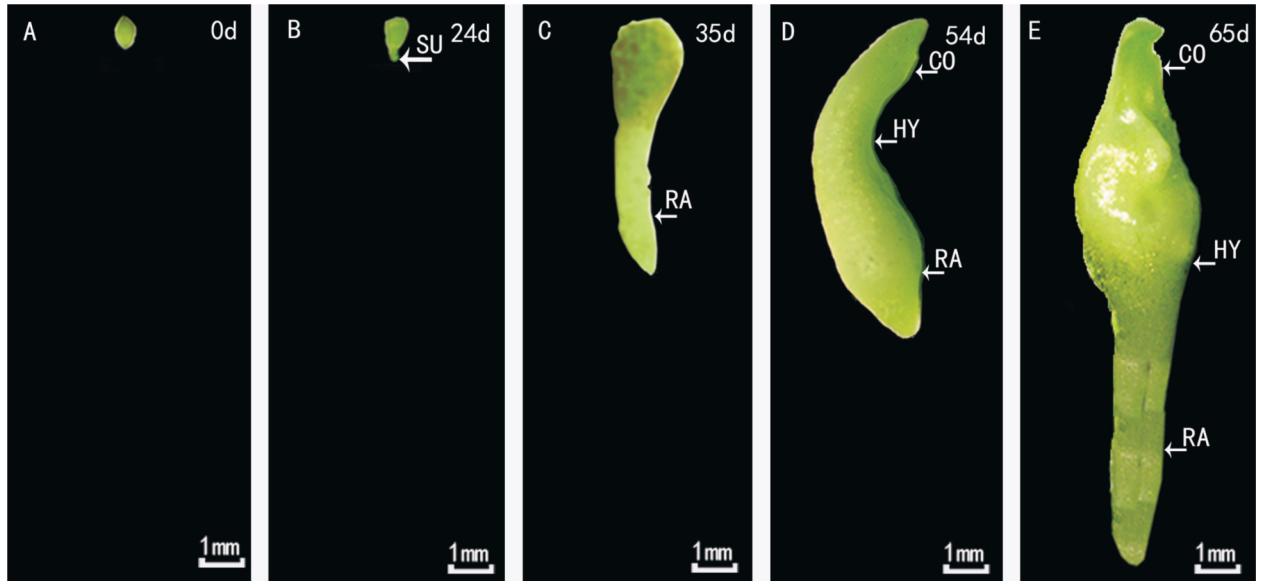


图2 植物生长调节剂对华重楼离体幼胚萌发的影响
Fig. 2 Effects of plant-growth regulators on *in vitro* embryo germination of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

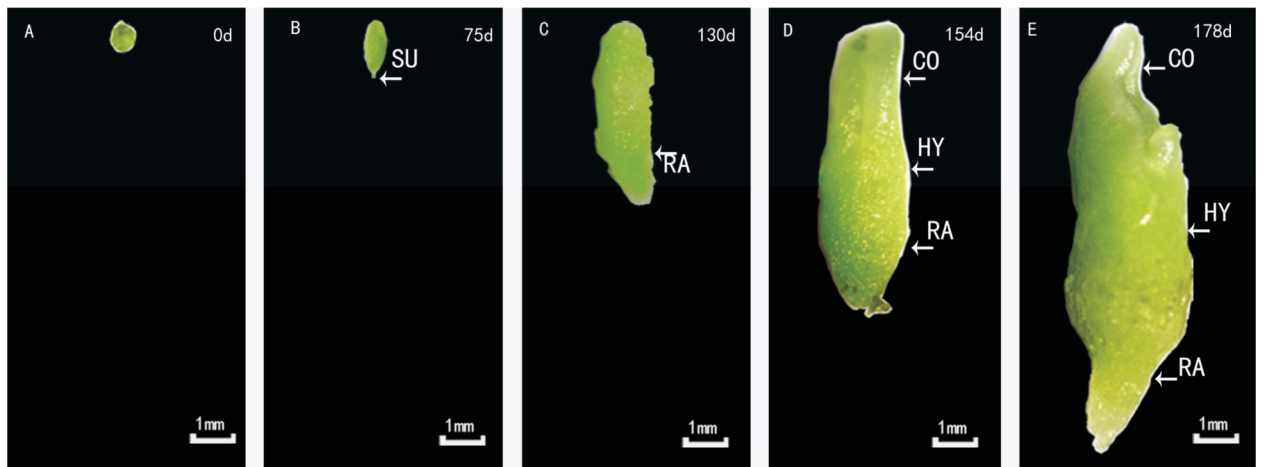


SU. 胚柄; RA. 胚根; HY. 胚轴; CO. 子叶。下同。

SU. Suspensor; RA. Radicle; HY. Hypocotyl; CO. Cotyledon. The same below.

图版 I A4 组中华重楼离体幼胚萌发过程的形态变化

Plate I Morphological changes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* in vitro embryo under A4 treatment



图版 II CK 组中华重楼离体幼胚萌发过程的形态变化

Plate II Morphological changes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* in vitro embryo under control treatment

$5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 > 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 > 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$ 。
A4 组处理下离体幼胚萌发最快, 仅需 54 d, 比对照组提前 140 d 萌发。

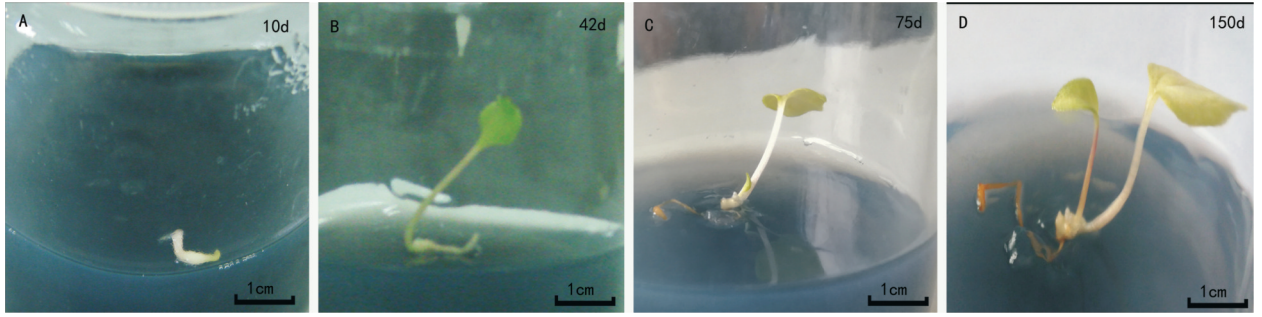
对不同处理组下华重楼离体幼胚萌发率达 50% 所需时间进行统计。除 A9 组外, 其他处理组都能显著促进华重楼离体幼胚萌发, A4 组萌发率达 50% 所需时间最短, 仅需 79.67 d, 比对照组提

前 168.66 d (图 2)。

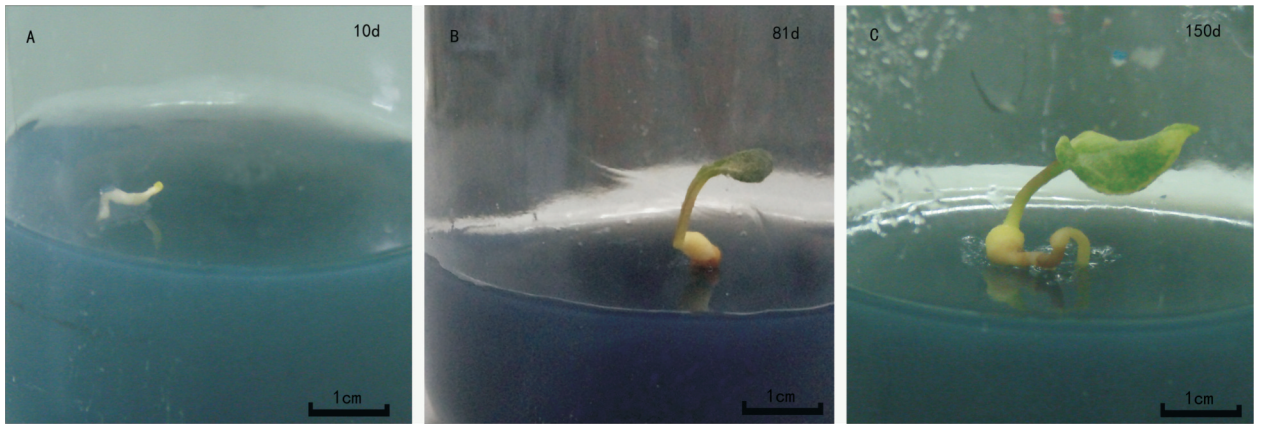
综上所述, A4 组配方 ($1/2 \text{ MS} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂 + $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭 + $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA}$) 最有利于华重楼离体幼胚萌发。

2.3 A4 组中华重楼离体幼胚形态变化

接种时华重楼离体胚为球形胚 (图版 I: A, 图



图版 III B2 组中华重楼幼苗生长过程

Plate III Seedling growth process of *Paris polyphylla* var. *chinensis* under B2 treatment

图版 IV CK 组中华重楼幼苗生长过程

Plate IV Seedling growth process of *Paris polyphylla* var. *chinensis* under control treatment

版 II :A)。在 A4 中培养 24 d 离体幼胚分化出胚柄(图版 I :B)。对照组需培养 75 d 才能分化出胚柄(图版 II :B),且其胚柄比 A4 组的胚柄短。在 A4 组中培养 35 d 离体幼胚分化出胚根,平均长 3 mm(图版 I :C),而对照组培养 130 d 才初步分化出胚根,平均长 0.5 mm(图版 II :C)。A4 组中培养 54 d 离体幼胚分化出子叶(图版 I :D),对照组培养 154 d 离体幼胚才可初步分化出子叶(图版 II :D)。在 A4 组中继续培养 11 d 离体幼胚继续长大,胚根、胚轴、子叶分化更明显,芽原基初步形成,离体幼胚发育成熟(图版 I :E)。此时子叶平均长 2 mm,胚根平均长 5 mm。离体幼胚在对照组中需继续培养 24 d 左右才可形成芽原基(图版 II :E)。

2.4 植物生长调节剂对华重楼成熟胚出苗的影响

由表 4 可知,B3、B4、B8 处理下成熟胚都不能

正常出苗,可能是由于这三组培养基中赤霉素浓度过高(GA_3 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。除这三组外,其他处理组都可诱导成熟胚出苗。B2 组平均出苗时间最短,仅需 43 d,比对照组快 38 d。在对照组中不能形成真叶。虽然 B2 组与 B9 组诱真叶形成所需时间最短且无显著差异,但是 B2 组中华重楼幼苗茎叶生长速度比 B9 组快。

综上所述,B2 组配方($MS+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $6.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸+ $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂+ $0.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT+ $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3)最有利于华重楼成熟胚出苗。

2.5 B2 组中华重楼成熟胚出苗过程

在 B2 组培养条件下 10 d 左右子叶可转绿且胚根明显变长(图版 III :A),43 d 左右子叶展开形成幼苗(图版 III :B),75 d 左右形成真叶(图版 III :

表 4 植物生长调节剂对华重楼成熟胚出苗的影响

Table 4 Effects of plant-growth regulators on seedling emergence of mature embryos of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

处理组编号 Treatment number	出苗所需时间 Seedling emergence time (d)	真叶形成 所需时间 True leaf formation time (d)	幼苗生长状况 Seedling growth condition
CK	81.00±1.63a	—	叶片嫩绿,不能形成真叶,茎叶生长缓慢 Leaves were green, it can't form true leaves, stems and leaves grow slowly
B1	60.67±2.49cd	91.33±2.05ab	叶片嫩绿,能形成真叶,茎叶生长缓慢 Leaves were green, it could form true leaves, stems and leaves grow slowly
B2	43.00±3.74e	74.67±2.87d	叶片嫩绿,长势良好,能形成真叶 Leaves were green and grew well, it could form true leaves
B3	—	—	成熟胚在培养前期褐化死亡 Mature embryos died in the early stage of culture because of browning
B4	—	—	成熟胚稍长大,但逐渐褐化死亡 Mature embryos grew slightly, but gradually browned and died
B5	71.67±1.89ab	84.33±3.68c	叶片偏黄,能形成真叶,茎叶生长缓慢 Leaves were yellow, it could form true leaves, stems and leaves grow slowly
B6	52.33±2.87de	95.33±2.62a	叶片嫩绿,能形成真叶,茎叶长势良好 Leaves were green, it could form true leaves, stem and leaves grew well
B7	57.00±4.90cd	89.00±2.16ab	叶片嫩绿,能形成真叶,茎叶长势良好 Leaves were green, it can form true leaves, stem and leaves grow well
B8	—	—	成熟胚能稍长大,但逐渐褐化死亡 Mature embryos grew slightly, but gradually browned and died
B9	66.00±2.94bc	77.67±2.49cd	叶片嫩绿,能形成真叶,茎叶生长缓慢 Leaves were green, it could form true leaves, stems and leaves grow slowly

注: 由于有 3 个处理组导致实验材料死亡, 仅对剩余数据进行多重比较。不同小写字母表示差异显著性 ($P<0.05$)。

Note: Because there were three treatment groups that cause experimental material died, multiple comparisons were made only for the remaining data. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

C), 培养到 150 d 时幼苗生长状况良好(图版 III: D)。在对照组培养条件下 10 d 左右子叶也可转绿(图版 IV:A), 但胚根生长缓慢, 81 d 左右才出苗(图版 IV:B), 培养到 150 d 时也未见真叶形成, 只见幼苗长大(图版 IV:C)。

3 讨论与结论

光照是植物生长发育过程中的重要环境因子, 在种子休眠过程中光通过光敏素系统对种子萌发起调控作用。虽然光照与离体胚生长发育间的关系还有待进一步探究, 但已有很多研究表明光照会导致愈伤组织褐化。李树丽(2014)发现光照强度越强, 中华红叶杨外植体褐化率越高, 而暗培养 10 d 可将其褐化率降低到 18%。杨爽等(2012)也发现野生手掌参离体芽暗培养 5~10 d 比直接光照培养好, 褐化较轻, 腋芽萌动时间早、

长势好。汤浩茹等(2000)在黑暗培养条件下成功取得了德国核桃 No.120 的幼胚、胚轴、子叶。本研究也表明黑暗培养条件更有利于华重楼离体胚生长发育。其原因可能是在离体胚培养条件下, 黑暗条件模拟了华重楼种胚在种子中的生长环境。另外, 采取完全黑暗培养可避免酚类物质的毒害(赖钟雄等, 1997)。但红豆杉(Yang et al., 2010)和伊贝母(李丽, 2017)的离体胚更适合在适宜光照条件下发育。

植物生长调节剂在植物组织培养中起关键作用, 对培养基中植物生长调节剂种类和浓度进行调整, 可有效地影响植物体内源激素水平, 影响培养物本身基因表达, 进而影响器官形成和组织分化过程, 影响培养物形态重建(李丽等, 2018; 穆璐雪等, 2018)。生长素会影响胚发生、根发育, 叶展开等植物生长发育过程(Woodward & Bartel, 2005; Zhao, 2010)。GA₃能显著提高西洋参杂种幼胚的

萌发率(雷秀娟,2013),低浓度的 IAA 有利于伊贝母离体胚生长发育,而高浓度的 IAA 则不利于其离体胚的生长发育(李丽,2017)。本研究结果与此类似。植物生长调节剂不同组合方式不仅影响出苗率还影响出苗方式和幼苗生长状态(李程,2013;Tang,2014;Raomai et al.,2014)。本研究中,离体胚成熟胚在 B2 配方中出苗所用时间最短,幼苗生长状态最好。高浓度的 GA₃会导致成熟离体胚褐化死亡,在不添加植物生长调节剂的情况下不能诱导形成真叶。离体幼胚 A4 配方中能快速萌发,成熟胚在 B2 配方中能快速出苗可能是因为植物生长调节(GA₃、IAA)调控了赤霉素和生长素信号转导通路和生物合成途径中相关基因的表达。本实验室对 GA₃和 IAA 组合调控华重楼种子萌发机理进行了探究。经高通量转录组测序和 pathway 通路分析发现,外源施加 GA₃和 IAA 可使 GA 分解代谢基因 GA2ox 下调表达,GA 合成基因 GA20ox 上调表达,GA 信号通路中 GID1 下调表达,PIF4 上调表达。外源施加 IAA 可使 IAA 合成通路中 YUCCA、ALDH 上调表达,生长素的受体蛋白 AUX1、AUX/IAA、SAUR 等上调表达。因此,在华重楼离体胚培养的培养基中添加 GA₃与 IAA 或许也可促进 GA、IAA 合成代谢和信号转导,从而加速离体幼胚成熟与出苗。

综上所述,黑暗条件有利华重楼离体胚的生长发育。在本研究条件下,适宜浓度的 GA₃与 IAA 组合可使华重楼离体胚快速生长发育,提前萌发。适宜浓度的 2,4-D+IAA+ZT+GA₃组合可缩短成熟华重楼成熟胚出苗时间,且诱导形成真叶。高浓度的 GA₃会导致成熟胚死亡。离体胚培养可明显缩短华重楼种胚萌发、出苗时间。

参考文献:

GERMANA, MARIA A, CHIANCONE B, et al., 2014. Olive embryo *in vitro* germination potential: Role of explant configuration and embryo structure among cultivars [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 118(3): 409-417.

HE LY, YU MR, CHEN JZ, 2011. The research progress of *Paris* [J]. *Res Pract Chin Med*, 25 (6): 94-97. [何良艳, 余美荣, 陈建真, 2011. 重楼的研究进展 [J]. 现代中药

研究与实践, 25 (6):94-97.]

HUANG X, LIANG SW, CAI HM, et al., 2016. Effects of combination of orange and blue LED on photosynthetic characteristics and fluorescence parameter of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chin Agric Bull*, 32 (22): 98-103. [黄希, 梁社往, 蔡虎铭, 等, 2016. 不同 LED 橙蓝光质对比对滇重楼叶片光合特性和叶绿素荧光参数的影响 [J]. 中国农学通报, 32(22):98-103.]

HUANG Y, CUI LJ, ZHAN WH, et al., 2007. Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines *in vitro*, from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 43(6): 672-677.

LAI ZX, PAN LZ, CHEN ZG, 1997. Establishment and maintenance of *Dimocarpus longan* Loureiro embryogenic cell lines [J]. *J Fujian Agric Univ*, 26(2): 160-167. [赖钟雄, 潘离镇, 陈振光, 1997. 龙眼胚性细胞系的建立与保持 [J]. 福建农业大学学报, 26(2):160-167.]

LEI XJ, 2013. Anther and hybrid embryo culture in *Panax ginseng* C. A. Mey and the characteristic evaluation based on ginsenoside content [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [雷秀娟, 2013. 人参花药、杂种胚培养及基于皂苷含量的特性评价 [D]. 北京: 中国农业科学院.]

LI C, 2013. Embryo development of 'Jintian Huangjia seedless' grape and study on embryo culture [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology. [李程, 2013. '金田皇家无核' 葡萄种子发育及胚培养研究 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院.]

LI HM, SUN JH, KANG LP, et al., 2017. Pharmacodynamics study on *Paris vietnamensis* [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 42 (18): 3465-3468. [李洪梅, 孙建辉, 康利平, 等, 2017. 重楼同属植物南重楼的药理研究 [J]. 中国中药杂志, 42(18):3465-3468.]

LI L, 2017. Tissue culture of two kinds of fritillaria and effect of exogenous GA₃, ABA upon the dormancy of *Fritillaria przewalskii* Maxim Bulb [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [李丽, 2017. 两种贝母的组织培养及外源 GA₃、ABA 处理对甘肃贝母鳞茎休眠的促抑效应 [D]. 兰州: 甘肃农业大学.]

LI L, SHI E, HUANG DJ, et al., 2018. Embryo culture on *Fritillaria pallidiflora in vitro* [J]. *J Gansu Agric Univ*, 53 (1):83-89. [李丽, 师娥, 黄登婧, 等, 2018. 伊贝母种胚的离体培养 [J]. 甘肃农业大学学报, 53(1):83-89.]

LI Q, CHEN LP, GE FL, 2006. Callus tissue induction and culture of *Pairs* [J]. *J Sichuan Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 29 (1):120-122. [李群, 陈丽萍, 葛方兰, 2006. 重楼属植物愈伤组织的诱导和培养 [J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 29(1):120-122.]

- LI SL, 2014. Effect of temperature and light condition on explants browning of *Populus* × *Euramericana* cv. *Zhonghuahongye* [J]. *N Hort*, (4): 94–96. [李树丽, 2014. 温度及光照条件对中华红叶杨外植体褐变的影响 [J]. *北方园艺*, (4): 94–96.]
- LI YC, 1982. Studies on the introduction cultivation of genus *Paris* L. I. A preliminary report on sexual propagation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 4 (4): 429–431. [李运昌, 1982. 重楼属植物引种栽培的研究 I. 滇重楼有性繁殖试验初报 [J]. *云南植物研究*, 4 (4): 429–431.]
- LIU H, ZWER P, WANG HB, et al., 2016. A fast generation cycling system for oat and triticale breeding [J]. *Plant Breed*, 135(1): 574–579.
- LIU YH, WANG YH, PENG SM, et al., 2015a. Somatic embryo induction of *Paris polyphylla* var. *chinensis* building [J]. *J Chin Med Mat*, 28(7): 1355–1357. [刘银花, 王跃华, 彭世明, 等, 2015a. 华重楼体细胞胚诱导研究 [J]. *中药材*, 28(7): 1355–1357.]
- LIU YH, WANG YH, TANG X, et al., 2015b. Rapid propagation of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. *Chin Trad Herb Drug*, 46(19): 2925–2931. [刘银花, 王跃华, 唐旭, 等, 2015b. 华重楼植株的快速繁殖研究 [J]. *中草药*, 46(19): 2925–2931.]
- MU RX, ZHAO DD, LIU YL, 2018. Study on *in vitro* culture of *Actinidia endosperm* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 46(1): 59–60. [穆璐雪, 赵丹丹, 刘永立, 2018. 猕猴桃胚乳培养研究 [J]. *安徽农业科学*, 46(1): 59–60.]
- QIN XJ, SUN DJ, NI W, et al., 2012. Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Steroids*, 77(12): 1242–1248.
- RAOMAI S, KUMARIA S, TANDON P, 2014. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of the medicinal plant, *Paris polyphylla* Sm. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 118(3): 445–455.
- SONG FJ, HUANG ZH, 2013. Study on tissue culturing and seed germination conditions of *Paris polyphylla* [J]. *J S Cent Univ Natl (Nat Sci Ed)*, 32(2): 51–54. [宋发军, 黄宗华, 2013. 七叶一枝花组织培养和种子萌发条件的研究 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 32(2): 51–54.]
- SU X, 1995. *In vitro* culture of the embryo of *Fritillaria thunbergii* [J]. *J Chin Med Mat*, 18(2): 62–63. [苏新, 1995. 浙贝母种胚的离体培养 [J]. *中药材*, 18(2): 62–63.]
- TANG AJ, 2014. *In vitro* embryo culture of rarely endangered *Musella lasiocarpa* (musaceae) with embryo dormancy [J]. *Pak J Bot*, 46(6): 2173–2177.
- TANG H, 2000. Somatic embryo genesis and genetic transformation of English walnut (*Juglans regia* L.) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University. [汤浩茹, 2000. 核桃的体细胞胚胎发生与转基因研究 [D]. 雅安: 四川农业大学.]
- TIAN L, 2007. Study on cultivation to immature embryo and heterozygote production of *Amygdalus communis* L. [D]. Yangling: Northwest A & F University. [田玲, 2007. 杂交扁桃幼胚培养及杂体和体繁育技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学.]
- WANG D, 2004. Plant tissue culture [M]. Beijing: China Agriculture Press; 69. [王蒂, 2004. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社; 69.]
- WANG YH, CHEN Y, ZHANG Y, et al., 2014. Callus induction and determination of steroidal saponin content of *Paris polyphylla* smith var. *chinensis* (Franch.) Hara [J]. *Hubei Agric Sci*, 53(8): 1936–1940. [王跃华, 陈燕, 张珏, 等, 2014. 华重楼愈伤组织培养及薯蓣皂苷含量测定 [J]. *湖北农业科学*, 53(8): 1936–1940.]
- WANG YH, LIU YH, CHEN Y, et al., 2015. Study on seed dormancy release and callus induction of *Paris polyphylla* smith var. *chinensis* [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 43(6): 223–225. [王跃华, 刘银花, 陈燕, 等, 2015. 华重楼种子休眠解除及愈伤组织诱导 [J]. *江苏农业科学*, 43(6): 223–225.]
- WANG XL, 2014. Study on the distant hybridization between tree poney cultivars and poney cultivars, and the embryo culture of 'FengDan' [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University. [王雪玲, 2014. 芍药牡丹组间远缘杂交及'凤丹'胚培养研究 [D]. 郑州: 河南农业大学.]
- WOODWARD AW, BARTEL B, 2005. Auxin: regulation action and interaction [J]. *Ann Bot*, 95(5): 707–735.
- WU SS, GAO WY, DUAN HQ, et al., 2004. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of rhizoma *Paridis* [J]. *Chin Trad Herb Drug*, 35(3): 344–347. [武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等, 2004. 重楼化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 35(3): 344–347.]
- WU X, WANG L, WANG GC, et al., 2013. Triterpenoid saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Carbohydr Res*, 368(5): 1–7.
- XIONG HL, 2012. Factors affecting the formation of callus of *Paris polyphylla* an endangered medicinal plant species [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 23(6): 1372–1374. [熊海浪, 2012. 影响濒危药用植物滇重楼愈伤组织发生的因素 [J]. *时珍国医国药*, 23(6): 1372–1374.]
- YANG F, ZHANG XP, SUN QW, 2010. *In vitro* embryo culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *J Anhui Nor Univ; Agric Sci Ed*, 33(3): 262–266.
- YANG L, HU K, ZHAO Y, et al., 2013. Studies on the germ-

- free germination of seeds of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and plant morphogenesis [J]. *Chin J Exp Trad Med Form*, 19(3): 151-154. [杨淋, 胡侃, 赵昱, 等. 2013. 滇重楼种子无菌萌发及植株形态发生的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 19(3): 151-154.]
- YANG LY, CHEN C, LÜ LF, et al., 2008. Tissue culture and plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz [J]. *Plant Physiol Commun*, 44(5): 947-948. [杨丽云, 陈翠, 吕丽芬, 等, 2008. 云南重楼的组织培养与植株再生 [J]. *植物生理学通讯*, 44(5): 947-948.]
- YANG S, FANG JP, WANG Y, 2012. Study on influencing factors on browning rate of explants in tissue culture of *Gymnadenia conopsea* [J]. *Guizhou Agric Sci*, 40(1): 22-25. [杨爽, 方江平, 王勇, 2012. 手掌参组织培养中外植体褐化的影响因素研究 [J]. *贵州农业科学*, 40(1): 22-25.]
- YANG TM, JIN H, YANG MQ, et al., 2017. Effects of combination of orange and blue LED on photosynthetic characteristics and fluorescence parameter of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *J Chin Med Mat*, 40(12): 2834-2838. [杨天梅, 金航, 杨美权, 等, 2017. 不同加工方法对滇重楼中 4 种重楼皂苷成分含量的影响 [J]. *中药材*, 40(12): 2834-2838.]
- YAO Y, ZHANG P, WANG HB, et al., 2016. How to advance up to seven generations of canola (*Brassica napus* L.) per annum for the production of pure line populations [J]. *Euphytica*, 209(1): 113-119.
- ZHANG N, 2016. The study on the extraction technology of *Paris polyphylla* and *Verbena* and protective effects on rats with alcoholic liver injury [D]. Changchun: Jilin University. [张宁, 2016. 重楼与马鞭草提取工艺研究及对酒精性肝损伤大鼠的保护作用 [D]. 长春: 吉林大学.]
- ZHAO TZ, WANG BQ, MA Q, et al., 2014. Study on best harvesting time of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Chin Wild Plant Res*, 33(5): 61-63. [赵庭周, 王卜琼, 马青, 等, 2014. 滇重楼采收期研究 [J]. *中国野生植物资源*, 33(5): 61-63.]
- ZHANG XY, HONG L, ZHA Q, et al., 2017. Investigation on *Paris* resources in Bijie Area [J]. *Guizhou Agric Sci*, 45(2): 134-137. [张翔宇, 洪林, 查钦, 等, 2017. 毕节地区野生重楼资源调查 [J]. *贵州农业科学*, 45(2): 134-137.]
- ZHAO Y, 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 61(9): 49-64.

(责任编辑 何永艳)