

# 矮紫杉种子的后熟处理对其体胚萌发的影响

关丽霞,刘淑芳

(辽宁农业职业技术学院,辽宁 营口 115009)

**摘要:**为了提高矮紫杉种子萌发率,以矮紫杉种子为试验材料,采用  $L_9(3^4)$  正交试验,以  $GA_3$ 、培养基、培养温度为正交试验的 3 因素,进行了种子的后熟处理,后取体胚接种于  $MS+AC\ 0.5\ g\cdot L^{-1}+琼脂\ 7\ g\cdot L^{-1}+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}$  上培养,研究后熟处理对矮紫杉种子体胚萌发的影响。结果表明: $GA_3$ 、培养基、培养温度对矮紫杉体胚的诱导影响显著,其中  $GA_3$  是主要因素,培养温度、培养基类型次之;矮紫杉体胚萌发前,种子后熟处理的最佳方式是将消毒好的种子接到  $MS+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}+GA_3\ 1.0\ mg\cdot L^{-1}+加医用脱脂棉\ 3.5\ g\cdot 10\ mL^{-1}$  的液体培养基中,置于白天  $23\ ^\circ C\ 10\ h$ 、夜间  $13\ ^\circ C\ 14\ h$  的条件下培养,萌发率可达 94.44%。

**关键词:**矮紫杉;体胚;诱导

矮紫杉(*Taxus cuspidate* cv. Nana)是东北红豆杉(紫杉)的栽培变种。红豆杉是国家一级保护树种,体内所含的生物碱、精油可以消炎杀菌、美容,体内所含的紫杉醇可以有效地阻止癌细胞的繁殖、抑制肿瘤细胞的迁移。红豆杉还可以防辐射、调节空气的温湿度、全天释放氧气、保护肺部,因此红豆杉被誉为“肺的卫士”“天然的活化石”“黄金树”。矮紫杉除了具有红豆杉的功效作用外,还具有极高的观赏价值,是珍稀的盆栽和绿化树种,受到消费者的高度青睐。

矮紫杉的繁殖以播种、扦插为主。矮紫杉扦插繁殖受母本限制、生根率低、成苗周期长;种子受后熟、休眠等因素影响,在自然条件下要经过两冬一夏才能萌发,即使层积处理也要 1 年以上才能发芽,在长期的贮存过程中多数种子失去了生命力,萌发率不高,造成了有限种子资源的极大浪费。组织培养是珍稀植物快速繁殖和种质保存的有效途径,有关矮紫杉组织培养快速繁殖的报道极少<sup>[1-2]</sup>,目前尚未见其体胚诱导的相关报道。本文研究了后熟处理对矮紫杉种子体胚萌发的影响,旨在提高其萌发率,有效保护珍贵树种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

矮紫杉(*Taxus cuspidate* cv. Nana)假种皮鲜红时的种子,采集于辽宁农业职业技术学院行政楼前绿化带,采集时期为 2014 年 9 月。

### 1.2 方法

1.2.1 种子的选取与处理 2014 年 9 月,从健康、无病虫害的矮紫杉中龄树上,选取假种皮鲜红且一碰即掉的种子,采用手拔和手搓的方式将假种皮去除干净,之后置于流水下冲洗 1 h,然后在无菌超净工作台上用 70% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 2.6% NaClO 溶液进行表面灭菌 7 min,最后用无菌水反复冲洗 5 遍,沥干水分备用。

1.2.2 种子的不同后熟处理方式对矮紫杉体胚萌发的影响 以  $MS+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}$  作为基本培养基,附加不同浓度的外源激素  $GA_3$ ,配制成固体培养基(加琼脂  $7\ g\cdot L^{-1}$ )、液体培养基(加医用脱脂棉  $3.5\ g\cdot 10\ mL^{-1}$ )、半固体培养基(加琼脂  $3.5\ g\cdot L^{-1}$ )共 3 种培养基。之后在无菌条件下将消毒好沥干水分的矮紫杉种子接种至各个处理的培养基上,置于不同的温度条件下进行后熟培养。 $GA_3$ 、培养基、培养温度选用正交表  $L_9(3^4)$  前三列设计,每个因素设 3 个水平(表 1),每瓶接种 6 粒,每处理接种 5 瓶,共接种 30 粒,重复 3 次。

表 1 种子后熟处理的供试因素及水平

Table 1 Factors and levels of seed post-ripening treatment

水平 Levels	因素 Factors		
	A	B	C
	$GA_3$ / ( $mg\cdot L^{-1}$ )	培养基 Medium	培养温度(白天/夜间) Culture temperature (daytime/ night)
1	0	固体培养基	$23\ ^\circ C\ 10\ h/13\ ^\circ C\ 14\ h$
2	1.0	液体培养基	$23\ ^\circ C\ 24\ h/12\ ^\circ C\ 0\ h$
3	2.0	半固体培养基	$23\ ^\circ C\ 0\ h/12\ ^\circ C\ 24\ h$

收稿日期:2018-10-08

基金项目:辽宁农业职业技术学院科研资金项目(20140403)。

第一作者简介:关丽霞(1978-),女,硕士,实验师,从事花卉、树木的组织培养研究工作。E-mail:674401702@qq.com。

矮紫杉种子后熟处理 35 d 后,在无菌条件下沿着种脐纵向切开,取出种胚,接种于 MS+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>上培养,每瓶接种一个胚,做好处理的对应标记,35 d 后统计胚的萌发率及生长状况。

1.2.3 培养条件 后熟处理培养条件:光照强度 800~1 000 lx,培养温度及光照时间依据试验设计调控;体胚培养的培养条件:温度 23 ℃,光照时间 12 h·d<sup>-1</sup>,光照强度 1 500~2 000 lx。

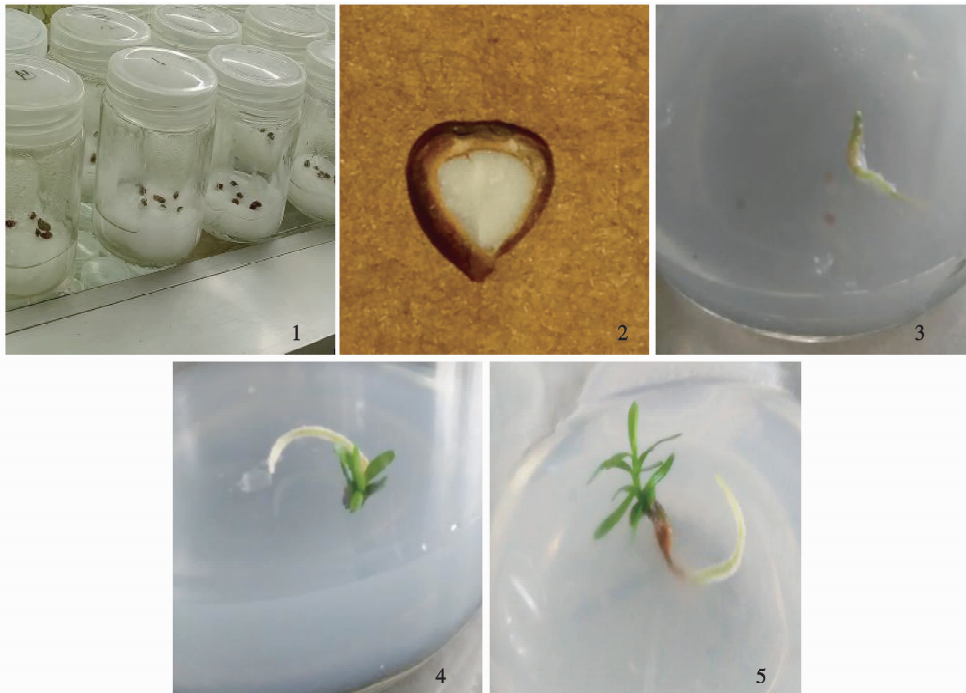
1.2.4 数据分析 萌发率(%)=体胚萌发的数量/接种体胚的总数×100。采用 Microsoft Excel 2003 对数据进行基本统计计算,采用 PASW

Statistics 18(中文版)统计分析软件对试验数据进行处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 矮紫杉试材的培养过程

矮紫杉种子后熟培养(图 1-1)35 d 后,将其沿着种脐纵向切开(图 1-2),取出中心体胚接到萌发培养基上培养,7 d 后体胚胚轴伸长,胚根开始迅速生长,胚芽萌动(图 1-3);20 d 后胚根长 1.5 cm 左右,胚芽生长出 4~5 叶(图 1-4);35 d 后,矮紫杉体胚发育成高 1.5 cm 以上的完整植株(图 1-5)。



1: 种子后熟处理; 2: 种子后熟处理后切开; 3: 体胚胚根生长; 4: 体胚胚芽生长; 5: 矮紫杉完整植株。  
1:Seed post-ripening treatment;2:Cut seed after post-ripening;3: Somatic embryo radicle growth;4: Somatic embryo germ growth; 5: Complete plant of *Taxus cuspidate*.

图 1 矮紫杉种子后熟处理及体胚发育过程

Fig. 1 Seed post-ripening treatment and somatic embryo development of *Taxus cuspidate* cv. Nana

## 2.2 种子的不同后熟处理方式对矮紫杉体胚萌发的影响

2.2.1 种子后熟处理对体胚萌发的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)试验结果 体胚接种培养 35 d 后,观察统计试验结果,由表 2 可知,9 个试验处理中,以处理 6(A2B3C1)矮紫杉体胚萌发率最高、效果最好,处理 5 次之,且与其它处理差异显著,以因素列来看,其水平组合为 A2B2C1,分别是各因素中影响最大的水平。通过验证试验最终确定本试验中各因素最优组合为 A2B2C1。

由表 2 可以看出,A(GA<sub>3</sub>)、B(培养基)、C(培养温度)三因素的极差(R)均较大,表明三因素对试验结果影响显著。按三因素 R 值确定三因素影响的主次顺序为 A>C>B(表 1),即影响矮紫杉体胚萌发的最主要因素是 GA<sub>3</sub>,其次是培养温度和培养基类型。

由表 2 可知,表中 9 个处理的萌发率差异显著,处理 6 即 A2B3C1 组合处理诱导率最高。而从试验结果因素列优水平来看:组合为 A2B2C1,应为该试验结论优组合,该组合并不在供试的

9 个处理之列。为证明试验结果的有效性,按供试 9 个处理组合中的最佳组合、结论得出的因素水平优组合配制培养基,在同样条件下以同样的方法进行验证试验。观察统计,结果见表 3。由表 3 可知,因素优组合 A2B2C1 上的平均诱导率显著高于供试最佳处理组合 A2B3C1,可见 A2B2C1 因素优组合是有效的。因而由正交试验

得出矮紫杉胚培养影响最大的因素是 GA<sub>3</sub>,有利于胚萌发的种子后熟处理的最佳方式是将消毒好的种子接到 MS + 蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup> + 加医用脱脂棉 3.5 g·10 mL<sup>-1</sup> 的液体培养基中,置于白天 23 ℃ 10 h、夜间 13℃ 14 h 的条件下培养。

表 2 种子的不同后熟处理方式对矮紫杉体胚萌发的影响

Table 2 Effects of different post-ripening treatments on germination rate of somatic embryos of *Taxus cuspidate* cv. Nana

编号 No.	处理组合 Treatment combination			萌发率/% Germination rate
	A	B	C	
	GA <sub>3</sub> / (mg·L <sup>-1</sup> )	培养基 Medium	培养温度(白天/夜间) Culture temperature(day/night)	
1	1(0)	1(固体培养基)	1(23 ℃ 10 h/ 13 ℃ 14 h)	22.22 e
2	1(0)	2(液体培养基)	2(23 ℃ 24 h)/12 ℃ 0 h)	4.44 f
3	1(0)	3(半固培养基)	3(23 ℃ 0 h/ 12 ℃ 24 h)	8.89 f
4	2(1.0)	1(固体培养基)	2(23 ℃ 24 h/12 ℃ 0 h)	63.33 c
5	2(1.0)	2(液体培养基)	3(23 ℃ 0 h/12 ℃ 24 h)	90.00 a
6	2(1.0)	3(半固培养基)	1(23 ℃ 10 h/13 ℃ 14 h)	94.44 a
7	3(2.0)	1(固体培养基)	3(23 ℃ 0 h/12 ℃ 24 h)	66.67 c
8	3(2.0)	2(液体培养基)	1(23 ℃ 10 h/13 ℃ 14 h)	81.11 b
9	3(2.0)	3(半固培养基)	2(23 ℃ 24 h/12 ℃ 0 h)	56.67 d
k1	11.85	50.74	65.92	
k2	82.59	58.52	41.48	
k3	68.15	53.33	55.19	
极差(R)	70.74	7.78	24.44	

不同小写字母表示差异显著  $P<0.05$ 。  
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

表 3 验证试验  
Table 3 Verification test

组合来源 Combination source	组合(因素水平) Combination(level and factor)	诱导率/% Inductivity			平均 Average
		1	2	3	
最佳处理组合	A2+B3+C1	91.1	94.4	94.4	93.4
因素优组合	A2+B2+C1	94.4	97.7	97.7	96.6

2.2.2 种子后熟处理对体胚萌发 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)试验结果的方差分析 对矮紫杉体胚诱导的 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)试验结果进行方差分析(表 3),结果表明:在忽略供试因素间互作效应的前提下,GA<sub>3</sub>(A)、培养基(B)、培养温度(C)对矮紫杉体胚的诱导均达到显著水平(GA<sub>3</sub> Sig. = 0.000,  $P<0.05$ ,培养基

Sig. = 0.001,  $P<0.05$ ,培养温度 Sig. = 0.000,  $P<0.05$ );3 个供试因素影响种子后熟至体胚萌发的主次关系为 GA<sub>3</sub>>培养基>培养温度,此方差分析结果与上述 2.2.1 极差分析所得结论相吻合。

表 3 种子后熟处理对体胚诱导  $L_9(3^4)$  试验结果的方差分析

来源 Source	III 型平方和 Type III quadratic sum	<i>df</i>	平均值平方 Mean square	<i>F</i>	Sig.
模型	107438.522 <sup>a</sup>	7	15348.360	1180.287	0.000
GA <sub>3</sub>	25146.784	2	12573.392	966.893	0.000
培养基	282.293	2	141.147	10.854	0.001
培养温度	2701.836	2	1350.918	103.885	0.000
误差	260.078	20	13.004		
总计	107698.600	27			

a:  $R^2=0.998$ (调整  $R^2=0.997$ )。  
a:  $R^2=0.998$ (adjustment  $R^2=0.997$ ).

3 结论与讨论

矮紫杉是东北红豆杉的一个变种。东北红豆杉的种子在假种皮鲜红时即已成熟,具有胚的完整结构,但此时多数种子的体胚,不具备萌发能力,需要后熟;矮紫杉体胚发育要在通气良好,且在一定的温湿条件下完成,否则将进入休眠状态,停止发育<sup>[3]</sup>。将矮紫杉种子接种到附加不同浓度 GA<sub>3</sub> 的固、液培养基中,在不同温度条件下进行后熟培养,然后取体胚转接到萌发培养基上,培养 65 d,体胚最高萌发率可达 94.44%,大大缩短了矮紫杉种子的萌芽时间、提高了种子的利用效率,同时建立的无菌体系完整植物可以直接移栽驯化,也可以作为组培无性系进行扩繁,为组培工厂化生产矮紫杉种苗建立了夯实的材料基础。通过

试验得出以下结论:GA<sub>3</sub>、培养基、培养温度对矮紫杉体胚萌发的影响显著,矮紫杉体胚萌发诱导前将消毒好的种子接到 MS+蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+加医用脱脂棉 3.5 g·10 mL<sup>-1</sup> 的液体培养基中,置于白天 23 ℃ 10 h、夜间 13 ℃ 14 h 的条件下后熟培养,可使萌发率达到 94.44%。

参考文献:

[1] 关丽霞. 矮紫杉一步成苗离体培养技术[J]. 北方园艺, 2012 (3): 80-81.  
[2] 孙筱筠, 张宗申. 东北矮紫杉人工种子的制备[J]. 大连工业大学学报, 2010, 29(5): 321-324.  
[3] 程广有, 唐晓杰, 高红兵, 等. 东北红豆杉种子休眠机理与解除技术探讨[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26 (1): 1563-1568.

Effects of the Seeds Post-ripening Treatment on the Somatic Embryo Germination of *Taxus cuspidate* cv. Nana

GUAN Li-xia, LIU Shu-fang

(Liaoning Agricultural Vocation-technical College, Yingkou 115009, China)

**Abstract:** In order to explore the after-ripening on *Taxus cuspidate* cv. Nana seed embryo germination, the influence of body with *Taxus Cuspidate* cv. Nana seed as material, using  $L_9(3^4)$  orthogonal test table, with GA<sub>3</sub>, culture medium, culture temperature for the orthogonal experiment of three factors, the seed cooked after processing, after take body embryo inoculation on MS+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>+agar 7 g·L<sup>-1</sup>+cultivated in sugar 30 g·L<sup>-1</sup>. The results showed that GA<sub>3</sub>, culture medium and culture temperature had a significant influence on the induction of the embryo of the *Taxus cuspidate* cv. Nana, with GA<sub>3</sub> being the main factor, and the culture temperature and culture medium were secondary. *Taxus cuspidate* cv. Nana body after-ripened seeds before germination embryos processing was the best way to set up good seed disinfection MS+ sugar 30 g·L<sup>-1</sup>, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+GA<sub>3</sub> and medical absorbent cotton 3.5 g·10 mL<sup>-1</sup> of liquid medium, 23 ℃ in the daytime 10 h, 14 h 13 ℃ at night under the conditions of cultivation, germination rate can reach 94.44%.

**Keywords:** *Taxus cuspidate* cv. Nana; somatic embryo; induction