

研究报告

Research Report

催眠睡茄的离体快繁及四倍体的诱导

林春来¹ 汪卫星¹ 梁国鲁^{1*} 郭启高¹ 聂振鹏² 向素琼¹ 李晓林¹ 梁君¹ 秦川³

1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400716; 2 浙江省柑桔研究所, 台州, 318020; 3 西南大学药学院, 重庆, 400716

* 通讯作者, lianggl@swu.edu.cn

摘要 以催眠睡茄腋芽为外植体建立快繁体系, 利用秋水仙素进行催眠睡茄四倍体诱导, 并将其与二倍体进行了初步的形态学和细胞学方面的比较。结果发现: 催眠睡茄二倍体($2n=2x=48$)最适增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L; 生根培养基为 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L; 四倍体($2n=4x=96$)诱导率因秋水仙素浓度和处理时间的不同而异, 其中用 0.5% 的秋水仙素对丛生芽浸泡处理 48 h 诱导率最高, 诱导率可达 13.79%。四倍体与二倍体相比: 叶片明显变厚, 颜色加深, 叶片气孔及其保卫细胞大小增大, 气孔密度减小, 且保卫细胞内叶绿体数目增加。

关键词 催眠睡茄, 离体, 快繁, 四倍体, 诱导

Rapid Propagation and Tetraploid Induction of *Withania somnifera*

Lin Chunlai¹ Wang Weixing¹ Liang Guolu^{1*} Guo Qigao¹ Nie Zhenpeng² Xiang Suqiong¹ Li Xiaolin¹
Liang Jun¹ Qin Chuan³

1 Horticulture and Landscape College, Southwest University, Chongqing, 400716; 2 Zhejiang Citrus Research Institute, Taizhou, 318020; 3 College of Pharmaceutical Science, Chongqing, 400716

* Corresponding author, lianggl@swu.edu.cn

Abstract An effective protocol for plant generation was developed from axillary shoot of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Tetraploid ($2n=4x=96$) was induced in *Withania somnifera* (L.) Dunal by using colchicine treatment method. Comparison of plants between tetraploid and diploid ($2n=2x=48$) by morphology and cell method. The results showed that the proper media MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+3% sucrose is for multiplication, and 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+1.5% sucrose for rooting. The induction rate of tetraploid *in vitro* depended on concentration of colchicine and duration of treatment. The highest induction rate of tetraploid, 13.79%, was obtained from *in vitro* plantlets with 0.5% colchicine for 48 h. Tetraploid of *Withania somnifera* was characterized by thicker leaves and deeper colours; Its size of stomata and guard cell were larger and the density of stomata was lower than diploid.

Keywords *Withania somnifera* (L.) Dunal, *In vitro*, Rapid propagation, Tetraploid, Induction

催眠睡茄属茄科(*Solanaceae*)睡茄属(*Withania*)植物, 高约 1.5 m, 叶为卵形, 花绿色或灰黄色, 浆果为红色。它的别名众多, 如印度人参、南非醉茄、心叶青牛胆、冬樱桃等。主要生长在印度、南非、巴基斯坦等地。催眠睡茄用于印度草医学已有 3 000 多年历史, 可全草入药, 其中主要的药用成分集中在植株的根部。催眠睡茄主要用作壮阳药和肝脏滋补品。临床和动物实验证明它可用于治疗支气管炎、哮喘、溃疡、衰弱、失眠、老年痴呆、焦虑、认知和神经混乱、帕金森症等。在抗菌、抗炎症、细胞毒和细胞免疫等方面表现出显著的生理作用 (Archana and Namasivayam,

1998; Devi, 1996; Dhuley, 1998; Davis and Kuttan, 2002)。新的研究发现它还具抗癌作用和放射增敏作用, 即低剂量放疗便可增加癌细胞的死亡, 从而减少放疗副作用(Sharad et al., 1996)。此外, 催眠睡茄含有大量铁, 可用于贫血症(Davis and Kuttan, 1998)。随着催眠睡茄的在保健及医药中的应用, 市场前景非常广阔。

目前, 国内外对催眠睡茄的研究大多集中在其二倍体药理应用方面, 而在通过倍性育种提高其药用成份方面的研究尚属空白。本研究结合组织培养和多倍体诱导技术, 一方面建立催眠睡茄离体快繁

体系, 为其工厂化生产育苗提供理论支持; 另一方面, 利用秋水仙素溶液离体诱导, 摸索最适的诱导条件, 并获得四倍体突变类型, 为今后催眠睡茄倍性育种以及由此获得单株药用成份更高的多倍体新种质等相关研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 外植体的准备及培养条件的选择

供试材料为我校农业综合开发实验室从印度引种的催眠睡茄(*Withania somnifera* (L.) Dunal), 选择田间当年生、健壮枝条上带腋芽的茎段为外植体, 常规表面消毒, 接种到 MS 培养基上。

以 MS 培养基为增殖培养基, 植物生长调节剂选择 6-BA (0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L) 和 NAA (0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L), 组合成 9 个浓度梯度(表 1), 蔗糖为 3%, pH 5.6~5.8, 卡拉胶 0.6%; 1/2 MS 培养基为生根培养基, 植物生长调节剂选择 IBA (0 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L) 和 NAA (0 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L), 组合为 9 个浓度梯度(表 2), 蔗糖为 1.5%, pH 5.6~5.8, 卡拉胶 0.6%。培养温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 光照强度 1 500~2 000 lx, 光照时间 10~12 h/d。

表 1 增殖培养基的植物生长调节剂浓度

Table 1 Concentration of plant growth regulators for multiplication

激素	编号									
Concentration	Serial No.									
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	
6-BA (mg/L)	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	1	1	1	
NAA (mg/L)	0.02	0.05	0.1	0.02	0.05	0.1	0.02	0.05	0.1	

表 2 生根培养基的植物生长调节剂浓度

Table 2 Concentration of plant growth regulators for rooting

激素	编号									
Concentration	Serial No.									
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	
IBA (mg/L)	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	
NAA (mg/L)	0	0.1	0.2	0	0.1	0.2	0	0.1	0.2	

1.2 四倍体的诱导

利用秋水仙素溶液浸泡法对丛生芽进行处理, 设定 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 等 6 个处理浓度。从刚长出来的 1 cm 的生长健康旺盛的丛生芽上取 0.3~0.5 cm 的茎尖分别浸泡 24 h、48 h 和 72 h 后, 用无菌水清洗 3~5 次, 接种到增殖培养基上。待新生

的茎尖长至 3~5 cm, 转入生根培养基中生根。

1.3 四倍体与二倍体倍性鉴定及比较

染色体数目检测采用改良压片法进行染色体数目检测(李懋学和陈瑞阳, 1985)。

形态学特征比较主要是比较四倍体与二倍体之间在植株形态、生长势、叶色、气孔特征、叶绿体数目等方面的差异。随机统计在 16 倍物镜 10 个视野的气孔数目及在 40 倍物镜下统计 50 对保卫细胞叶绿体数目(张凌媛等, 2005), 计算单位面积平均气孔数, 并进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对催眠睡茄增殖和生根的影响

以带腋芽的茎段作为外植体, 培养 20 d 左右就可获得高 1~2 cm 健壮的无菌苗, 把它们切割下来分别接种在培养基 M₁₋₉ 上。实验表明, M₅ 增殖培养基 (MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+3% sucrose) 最利于催眠睡茄丛生芽的分化和生长, 芽的分化率最高, 可达 90% 以上, 而且长势也最旺盛(图 1a)。M₁、M₇ 和 M₄ 号培养基上情况类似, 愈伤生长不好, 颜色多呈淡黄色, 少数为绿色, 芽分化率相对较低, 在这三种培养基中, M₄ 的分化率要比另外两个略高; M₃ 培养基中, 愈伤较好, 但分化率低; M₆ 号培养基上愈伤较大, 多为绿色, 也有较好的分化, 分化率为 83% 不及 M₅ 的高; M₂、M₈ 和 M₉ 号培养基上愈伤都比较好, 但分化却不太好, 特别是 M₉, 分化出许多畸形的簇状叶片, 很难长大形成独立的再生小植株。生根培养基的筛选结果表明: 在没加激素的 1/2MS 培养基上长出的根少且细, 很难移栽存活。在含有 IBA 的培养基上, 一个星期左右就能长出 2~3 条健壮的小根, 一个月左右就能长到 4~6 cm 长, 而且还有须根长出, 移栽存活率可达 90% 以上(图 1b)。而加入了 NAA 的培养基, 长出的根虽也健壮, 但通常都伴有愈伤, 且容易从植株上脱落下来, 从而降低了存活率。因此最好的生根培养基为 R₄ 号培养基(1/2 MS+IBA 0.2 mg/L+1.5% sucrose)。

2.2 不同浓度和处理时间对催眠睡茄四倍体诱导的影响

采用了秋水仙素处理丛生芽的方法对催眠睡茄进行了四倍体诱导(表 3)。结果发现, 催眠睡茄经秋水仙素处理后, 生长速度明显减慢。在 0.1%~0.6% 这几个浓度中, 用 0.5% 的秋水仙素溶液处理 48 h 诱导率最高, 且得到了较多的纯合体, 纯合体诱导率为

13.79%。对未经秋水仙素处理得催眠睡茄中未发现四倍体植株,说明秋水仙素能有效诱导催眠睡茄四倍体产生。从表3可以看出催眠睡茄用秋水仙素诱导时常出现嵌合体现象,植株表现为混倍体($2x\sim 4x$),此时我们为了防止它回复突变,应尽快地进行切割繁殖和筛选四倍体。继续多次进行检测,直到四倍体植株逐渐趋于稳定,不再分化出二倍体植株。

2.3 催眠睡茄四倍体的鉴定和形态学比较

催眠睡茄四倍体的染色体数目检测,采用了压片



图1 催眠睡茄组织培养

注: a: 芽分化; b: 生根

Figure 1 Tissue culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal

Note: a: Shoot proliferation; b: Rooting

表3 秋水仙素的不同浓度和不同处理时间对诱导多倍体的影响

Table 3 Effect of colchicine at different concentration and different long time on polyploid induction

处理时间(h) Duration of treatment (h)	秋水仙素(%) Concentration of colchicines (%)	处理数(个) Treated numbers	存活率(%) Live ratio (%)	四倍体株数(个) Number of tetraploid plants	混倍株数(个) Number of chimeras	诱导率(%) Inducing ratio (%)
24	0.1	30	100	0	0	0.00
24	0.2	30	100	0	0	0.00
24	0.3	28	100	0	0	0.00
24	0.4	27	100	0	1	0.00
24	0.5	30	96.67	0	1	0.00
24	0.6	30	86.67	0	2	0.00
48	0.1	30	100	0	0	0.00
48	0.2	29	100	0	0	0.00
48	0.3	30	100	0	1	0.00
48	0.4	30	93.33	0	2	0.00
48	0.5	29	82.76	4	6	13.79
48	0.6	28	64.29	1	3	3.57
72	0.1	30	100	0	1	0.00
72	0.2	30	96.67	0	3	0.00
72	0.3	27	81.48	0	2	0.00
72	0.4	30	73.33	0	2	0.00
72	0.5	30	50	1	3	3.33
72	0.6	28	32.14	0	1	0.00

法对二倍体和四倍体的再生植株进行染色体数目检测。结果发现,催眠睡茄的四倍体染色体数为 $2n=4x=96$ (图2a),二倍体染色体数为 $2n=2x=48$ (图2b)。

植株、气孔特征及根比较,四倍体植株生长势

强,茎更加粗壮,节间变短,叶片增大,且明显变厚,颜色变深,出现褶皱(图3)。将二者的气孔密度、保卫细胞长度、宽度及叶绿体数进行统计分析,结果发现:在催眠睡茄的四倍体和二倍体的气

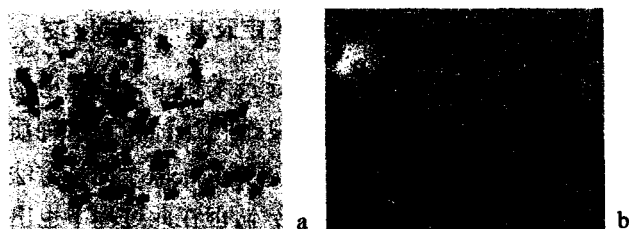


图2 体细胞的中期染色体

注: a: 四倍体; b: 二倍体

Figure 2 Chromosomes of tetraploid and diploid

Note: a: Tetraploid; b: Diploid



图3 四倍体和二倍体植株比较

注: a: 四倍体植株; b: 二倍体植株

Figure 3 Comparison of plants between tetraploid and diploid

Note: a: Tetraploid; b: Diploid

孔保卫细胞长度和气孔密度上存在明显的差异(图4),四倍体的气孔长度明显大于二倍体,长度为二倍体的171.72%,保卫细胞中的叶绿体数目明显增

多,为二倍体的188.87%,气孔密度下降,为二倍体的55.83%。经方差分析,各项指标均达显著水平(表4)。

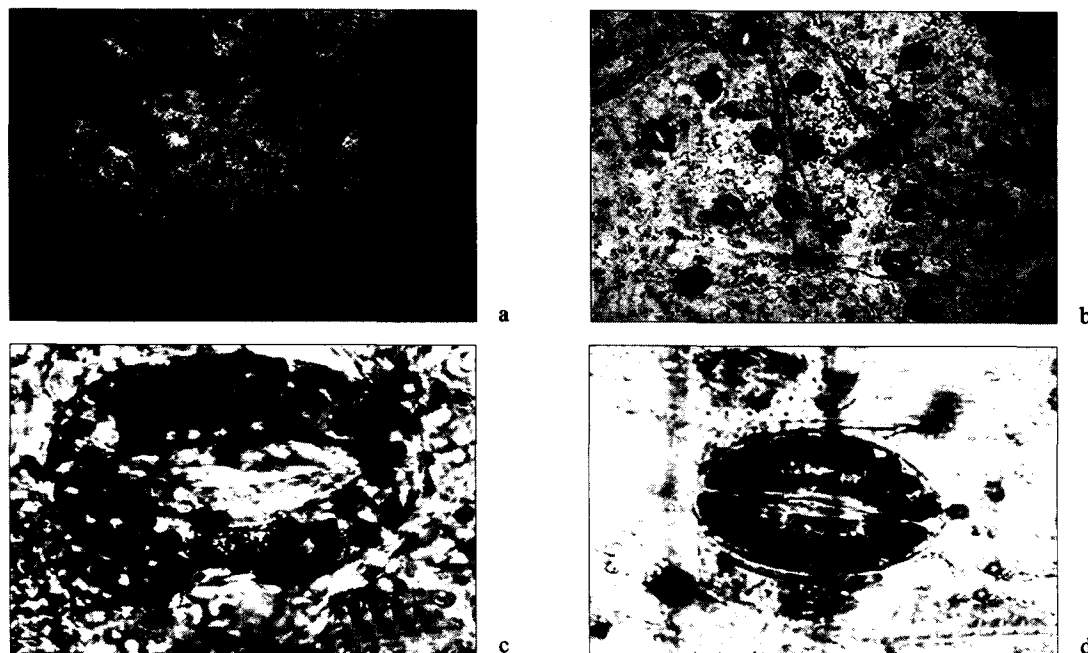


图4 四倍体及二倍体气孔密度及叶绿体数目

注: a: 四倍体气孔密度; b: 二倍体气孔密度; c: 四倍体叶绿体; d: 二倍体叶绿体

Figure 4 Density of stoma and chloroplasts of tetraploid and diploid

Note: a: Density of stoma of tetraploid; b: Density of stoma of diploid; c: Chloroplasts of tetraploid; d: Chloroplasts of diploid

表4 四倍体和二倍体气孔差异显著性比较

Table 4 Comparison of significance of difference of stomata between tetraploid and diploid

倍性	保卫细胞长度(μm)	保卫细胞宽度(μm)	气孔密度(个/ mm^2)	叶绿体(个)
Ploidy	Length of guard cell (μm)	Width of guard cell (μm)	Density of stoma	Chloroplasts
四倍体	$62.25 \pm 3.82\text{Aa}$	$26 \pm 1.41\text{Aa}$	$52.28 \pm 3.10\text{Aa}$	$44.6 \pm 1.96\text{Aa}$
Tetraploid				
二倍体	$36.25 \pm 2.20\text{Bb}$	$15.75 \pm 1.58\text{Bb}$	$93.65 \pm 4.82\text{Bb}$	$23.7 \pm 1.49\text{Bb}$
Diploid				

注: 表中数据为平均值 $\pm$ 标准差; 数字后的大、小写字母表示显著水平为0.01和0.05

Note: The data is means $\pm$ SD; The capital letter and lowercase after the numbers mean the significant level is 0.01 and 0.05

3 讨论

3.1 催眠睡茄离体快繁研究

增殖系数和增殖周期一直是人们关心的问题,只有增殖速度快,在生产实践中才有应用价值。本试验表明:通过合适的细胞分裂素和生长素的浓度组合,催眠睡茄组培可以取得理想的增殖效果。如组培苗用于扩繁,两星期转接一次,而用于生根则一个月转接一次,因为在两个星期时,丛生芽的增长率达到了最大值,而在一个月左右时,丛生芽大部分都长到

了2~3 cm,此时用去生根正好。

3.2 催眠睡茄四倍体的诱导、鉴定及其形态学比较

组织培养和秋水仙素诱导技术相结合培养植物多倍体在短期内可以达到改良植物品种和丰富种质资源的目的(谭德冠等,2005)。本试验采取了此种方法虽然获得催眠睡茄的纯合多倍体,但在此过程中也出现了嵌合体现象,如果对嵌合体没有及时的分离,很容易发生回复突变,在以后的试验中,希望能找到一种比秋水仙素诱导催眠睡茄效果更好的诱导剂。

植物多倍体的鉴定方法从原理上是依据其外在和内在的特征特性衍生而来的。在本文中,一般而言,可以形态外形观察为基础,组织化学、叶绿体计数为辅助,细胞学观察染色体数来确定(王丽艳和梁国鲁,2004)。在本文中,不仅用改良压片法观察催眠睡茄染色体加倍,而且对其叶片下表皮进行观察,发现保卫细胞大小,单个保卫细胞中叶绿体数量和气孔密度等都有了明显的变化,从而从形态学对催眠睡茄倍性变异作了鉴定,为以后催眠睡茄的倍性鉴定,找到了简易的、可靠的形态学辅助参数。

3.3 催眠睡茄四倍体的应用前景

多倍体在植物中广泛存在,由于其具有一些独特的性质,历来受到广大育种工作者的重视。由于同源多倍体更易直接与经济效益相关,因此多倍体育种研究主要集中在同源多倍体尤其是同源四倍体上(邓云等,2006)。同源多倍体构成基因多次重复基础上的可靠遗传系统,提高了基因功能的保险性,显著降低了突变和隐性基因纯合表现的可能性,在严酷的自然条件下为生存竞争提供了稳定的系统空间(Soltis and Soltis, 2000),增强了其抗逆境的能力。多倍体由于基因倍增、基因组冲击而引起基因表达变化,因此不仅会使原有的次生代谢产物含量提高,还可能会产生新的次生代谢产物(Soltis and Soltis, 1999; Dhawan and Lavania, 1996)。对于药用植物,这一点有非常重要的影响。目前人们利用这一点,成功地运用到了药用植物上,已得到几十种优品质的多倍体药用植物(乔传卓和崔熙, 1981),如丹参、当归、杜仲、福寿考等。催眠睡茄作为一种多用途的药用植物,开展多倍体育种,是培育含更高药效成分和更强抗性的催眠睡茄新品种的一条非常重要的途径。本研究建立了催眠睡茄离体快繁体系并结合秋水仙素诱导技术得到了催眠睡茄的四倍体植株,丰富了种质资源,为我国优质催眠睡茄的保存和推广提供了条件。由于同源多倍体对种间、属间远缘杂交的可交配性有一定的促进作用,本研究由体细胞人工加倍所得的同源四倍体,还可用作远缘杂交的桥梁。

参考文献

Archana R., and Namasivayam A., 1998, Antistressor effect of *Withania somnifera*, *Ethnopharmacol*, 64(1): 91-93
Davis L., and Kuttan G., 1998, Suppressive effect of cyclophosphamide-induced toxicity by *Withania somnifera* extract in mice, *Ethnopharmacol*, 62: 209-214
Davis L., and Kuttan G., 2002, Effect of *Withania somnifera* on

CTL activity, *J. Exp. Clin. Cancer. Res.*, 21(1): 115-118
Deng Y., Zhang S.N., Sun M.H., and Zhang Z.C., 2006, Induction of autotetraploid non-heading Chinese cabbage with high-quality and heat tolerance by coichicine, *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 24(2): 159-162 (邓云, 张蜀宁, 孙敏红, 张振超, 2006, 采用秋水仙碱创制优质抗热同源四倍体不结球白菜, *武汉植物学研究*, 24(2): 159-162)
Devi P.U., 1996, *Withania somnifera* Dunal (*Ashwagandha*): potential plant source of a promising drug for cancer chemotherapy and radiosensitization, *India J. Exp. Biol.*, 34(10): 927-932
Dhawan O.P., and Lavania U.C., 1996, Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy, *Euphytica*, 87(2): 81-89
Dhuley J.N., 1998, Effect of *Ashwagandha* on lipid peroxidation in stress induced animal, *Ethnopharmacol*, 60: 173-178
Li M.X., and Chen R.Y., 1985, A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants, *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research)*, 4: 297-302 (李懋学, 陈瑞阳, 1985, 关于植物核型分析的标准化问题, *武汉植物学研究*, 4: 297-302)
Qiao C.Z., and Cui X., 1981, The application of the polyploidization medicinal plants, *Zhongyaocai Keji (Journal of Chinese medicinal materials)*, 4(4): 4 (乔传卓, 崔熙, 1981, 药用植物多倍体的作用, *中药材科技*, 4(4): 4)
Sharad A.C., Solomon F.E., Devi P.U., Udupa N., and Srinivasan K.K., 1996, Antitumor and radiosensitizing effects of withaferin A on mouse Ehrlich ascites carcinoma *in vivo*, *Acta Oncol*, 35(1): 95-100
Soltis P.S., and Soltis D.E., 1999, Polyploidy: recurrent formation and genome evolution, *Trends in Ecology & Evolution*, 14 (9): 348-352
Soltis P.S., and Soltis D.E., 2000, The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97(13): 7051-7057
Tan D.G., Zhuang N.S., and Huang H.S., 2005, A review of *in vitro* induction of polyploid plants with colchicines, *Yaredai Zhiwu Kexue (Subtropical Plant Science)*, 34(1): 77-80 (谭德冠, 庄南生, 黄华孙, 2005, 组织培养与秋水仙碱诱导相结合培育植物多倍体的应用, *亚热带植物科学*, 34(1): 77-80)
Wang L.Y., and Liang G.L., 2004, Mechanism of plant polyploid formation and its identification, *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, 1: 61-62 (王丽艳, 梁国鲁, 2004, 植物多倍体的形成途径及鉴定方法, *北方园艺*, 1: 61-62)
Zhang L.Y., Guo Q.G., Li X.L., Zeng H., Tan J.M., and Liang G.L., 2005, Study on the relationship between the number of chloroplast in stomata guard cell and the ploidy of loguati cultivars, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 22(3): 229-233 (张凌媛, 郭启高, 李晓林, 曾洪, 谭健明, 梁国鲁, 2005, 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究, *果树学报*, 22(3): 229-233)