

太子参快繁技术的优化及同源四倍体的诱导与鉴定

谢 燕, 高山林^①, 曾 杨, 王 蔚, 刘 蓁

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 以太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 二倍体组培苗为实验材料, 运用正交实验设计和组织培养方法, 对太子参试管苗快速繁殖技术进行优化, 并进行了同源四倍体的诱导与鉴定。结果表明, 太子参最佳的繁殖培养基为含 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基; 最佳生根培养基为含 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABT 或 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABT 的 1/2MS 培养基。诱导同源四倍体的最佳处理方法为: 用 0.2% 秋水仙素处理 22 h 或用 0.3% 秋水仙素处理 12 h, 所诱导的同源四倍体染色体数目为 $2n=4x=64$ 条。

关键词: 太子参; 快繁; 多倍体; 诱导; 鉴定

中图分类号: S567.5+3.035 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)02-0050-05

The optimization of rapid propagation technique and the induction and identification of autotetraploid of *Pseudostellaria heterophylla* XIE Yan, GAO Shan-lin^①, ZENG Yang, WANG Wei, LIU Zhen (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(2): 50–54

Abstract: The method of rapid propagation in tissue culture of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax was optimized by using orthogonal experiment. The autotetraploid induction and identification were carried out *in vitro*. The results indicated that the best multiplying medium was MS containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. The strong root was induced on the 1/2 MS medium containing $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABT and 0.1 or $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA. The autotetraploid strains could be induced by immersing buds in 0.2% colchicine solution for 22 h or in 0.3% colchicine solution for 12 h. The chromosome number of autotetraploid strain was $2n=4x=64$.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax; rapid propagation; autotetraploid; inducing; identification

太子参是石竹科植物孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 的干燥块根, 有益气健脾、生津润肺等功效; 主治脾胃虚弱、食欲不振、倦怠无力或神经衰弱、心悸失眠。现代药理研究表明, 太子参具有抗疲劳、抗应激、免疫促进、延长寿命、镇咳、抗病毒等作用^[1,2]。近年来, 太子参广泛应用于食疗保健品和化妆品的研制开发, 市场需求不断增加。在实际生产中, 长期采用无性繁殖方法进行太子参的繁殖, 导致病毒病严重发生, 药材产量和质量下降, 因此有必要进行太子参品种选育和提纯复壮。有关太子参脱毒繁育技术已有报道^[2,3], 作者利用组织培养技术进行了太子参快速繁殖体系的优化, 并对同源四倍体进行诱导和鉴定, 以期从中选育出有效成分含量高、根部药材产量高的优良太子参品种。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自中国药科大学药用植物园。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 取生长健壮的太子参外植体顶芽, 肥皂水清洗 15 min, 流水冲洗约 1 h, 先置于 75% 酒精中浸泡 30 s, 后于 0.1% HgCl_2 溶液 (加 3~5 滴吐温-20) 灭菌 15~20 min, 无菌水冲洗 3 次, 接种于含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

收稿日期: 2005-10-23

作者简介: 谢燕(1981-), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

^① 通讯作者

NAA 的 MS 固体培养基上。培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$; 光照强度 1 500 lx, 每天光照 12 h。30 d 后转代 1 次, 约 60 d 后, 获得太子参无菌试管苗。

1.2.2 培养基筛选

1.2.2.1 繁殖培养基的筛选 根据文献报道^[4,5], 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验, 设置 A、B、C 3 个因子为 6-BA、NAA 和 IAA 浓度, A、B、C 各因子的水平分别为 0.5、1.0、2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.0、0.1、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.0、0.1、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将生长 30 d 的太子参无菌试管苗顶芽接种于添加了上述不同浓度激素的培养基中, 培养条件同上。30 d 后, 以生长率为指标进行分析。

1.2.2.2 生根培养基的筛选 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验, 设置 A、B、C 3 个因子为 IAA、NAA 和 ABT 浓度, A、B、C 各因子的水平分别为 0.0、0.1、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.0、0.1、0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.0、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将高约 2 cm、含 2~3 个茎节的太子参试管苗接种于含上述不同浓度激素的培养基中, 培养条件同上。30 d 后观察根的状态, 以根数和根长为指标进行分析。

1.2.3 根尖染色体的观察方法 太子参试管苗在生根培养基上培养约 15 d, 待根长至 0.5~1.0 cm 时, 切下幼根用于根尖细胞染色体观察。

分别于上午的 8:30 至 9:00、9:00 至 9:30 和 9:30 至 10:00 切取太子参的幼根, 蒸馏水冲洗 3 次, 随机分组, 于室温下分别置于不同浓度秋水仙素 (0.1%、0.2% 和 0.3%) 中预处理 2 和 5 h, 水洗 3 次, 卡诺氏固定液 0°C 固定 2~24 h, 用蒸馏水洗 3 次, 60°C 下于 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 中离析不同时间 (5 min、10 min 和 15 min), 蒸馏水清洗后低渗 0.5 h, 改良苯酚-品红染液染色 30 min, 压片, 用 Olympus BX 40 显微镜观察并摄影。

1.2.4 多倍体的诱导和鉴定

1.2.4.1 多倍体的诱导 切取生长 15~20 d 的太子参试管苗顶芽分别于不同浓度秋水仙素 (0.1%、0.2% 和 0.3%) 中浸泡 12、24、36、48 和 60 h, 无菌水冲洗 3 次, 每处理 25 个芽, 接种于含 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中。培养条件同上。30 d 后统计各处理组芽的存活率。扩大繁殖后, 建立株系并编号。

1.2.4.2 多倍体的鉴定 将诱导所得株系在生根培养基中诱导生根, 待根长至 0.5~1.0 cm 时切取

根尖进行染色体鉴定, 淘汰二倍体、嵌合体和非整倍体。在第 1 次实验的基础上, 调整不同浓度秋水仙素的处理时间, 进行了第 2 次诱导实验, 并统计各处理组的存活率和诱导率。

2 结果和分析

2.1 快速繁殖体系的建立和优化

2.1.1 繁殖培养基的筛选 采用正交实验设计方法对太子参试管苗的繁殖培养基进行筛选, 结果见表 1。

表 1 太子参繁殖培养基筛选的正交实验设计及结果
Table 1 Design and result of orthogonal experiment on multiplying medium selection of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax shoot-tips

实验号 No.	因子和水平 Factor and level				平均生长率/% Average of growing rate
	6-BA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of 6-BA (A)	NAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of NAA (B)	IAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of IAA (C)	误差列 Error column (D)	
1	0.5	0.0	0.0	1	20.21
2	0.5	0.1	0.1	2	17.51
3	0.5	0.2	0.2	3	19.74
4	1.0	0.0	0.1	3	18.72
5	1.0	0.1	0.2	1	16.65
6	1.0	0.2	0.0	2	25.41
7	2.0	0.0	0.2	2	14.34
8	2.0	0.1	0.0	3	18.99
9	2.0	0.2	0.1	1	21.99
K_1	57.45	53.27	64.60	58.85	$\sum_{i=1}^9 y_i = 173.56$
K_2	60.78	53.14	58.22	57.26	
K_3	55.32	67.14	50.73	57.45	
R	1.82	4.67	4.62	0.53	$B > C > A$

由表 1 中的 R 值分析可以看出, 3 个因素对生长率的影响从高至低依次为 NAA 浓度、IAA 浓度、6-BA 浓度。方差分析结果显示, 繁殖培养基中 NAA 和 IAA 的浓度对太子参试管苗的生长率有非常显著的影响, 而 6-BA 的浓度也有显著影响 (表 2)。因此, 根据实验结果可以确定, 太子参繁殖培养基的最佳组合为 $A_2B_3C_1$, 即在 MS 基本培养基中添加 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

2.1.2 生根培养基的筛选 采用正交实验设计方法对太子参试管苗的生根培养基进行筛选, 结果见表 3。

由表 3 中平均根数的 R 值分析可以看出, 3 个因素对太子参试管苗平均根数的影响从高至低依次

表2 太子参试管苗生长率的方差分析¹⁾Table 2 Variance analysis of growing rate of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax plantlets¹⁾

方差来源 Source of variance	离均差平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F	P
A	5.06	2	2.53	10.11	$p < 0.1$
B	43.17	2	21.58	86.32	$p < 0.05$
C	32.13	2	16.07	64.25	$p < 0.05$
D	0.50	2	0.25		
SE = SC + SD	32.63	4	8.16		

¹⁾ A: 6-BA 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of 6-BA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); B: NAA 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: IAA 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration of IAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D: 误差列 Error column; SE: 误差的离均差平方和 Sum of square of error. $F_{0.10}(2,2) = 9.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$.

为 NAA 浓度、ABT 浓度、IAA 浓度。方差分析结果显示(表4),生根培养基中 NAA 和 ABT 的浓度对太子参试管苗的平均根数有显著影响,而 IAA 浓度无显著影响。所以,就平均根数这一指标而言,可以确定太子参生根培养基的最佳组合为 $A_2B_3C_3$,即以 1/2MS 为基本培养基,添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABT。

根据表3中平均根长的 R 值分析可以看出,3

个因素对太子参试管苗平均根长的影响从高至低依次为 NAA 浓度、IAA 浓度、ABT 浓度。方差分析结果显示(表5),生根培养基中 NAA、IAA 和 ABT 的浓度均对太子参试管苗的平均根长有显著影响。所以,就平均根长这一指标而言,可以确定太子参生根培养基的最佳组合为 $A_3B_3C_3$,即以 1/2MS 为基本培养基,添加 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABT。

综合分析上述结果,根据单项分析的2组最佳激素浓度组合,太子参试管苗生根培养基中 NAA 和 ABT 浓度可以确定为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IAA 浓度可以确定为 0.1 或 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 根尖细胞染色体观察

通过多次的实验和比较观察发现,太子参试管苗的根尖细胞在上午 8:30 左右处于分裂旺盛时期,分裂中期细胞居多,染色体清晰可见,可确定这一时间段为太子参根尖细胞染色体观察的最佳取材时期;用 0.2% 秋水仙素溶液处理 5 h,并且在盐酸中离析 10 min,能观察到分散较好、着色效果最佳的分裂相。因此,太子参试管苗根尖细胞染色体观察的实验步骤确定为:上午 8:30 左右切取太子参试管苗

表3 太子参试管苗生根培养基筛选的正交实验设计及结果

Table 3 Design and results of orthogonal experiment on rooting medium selection of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax plantlets

实验号 No.	因子和水平 Factor and level				平均根数 Average number of root	平均根长/cm Average length of root
	IAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of IAA (A)	NAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of NAA (B)	ABT 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of ABT (C)	误差列 Error column (D)		
1	0.0	0.0	0.0	1	11.30	16.18
2	0.0	0.1	0.5	2	18.00	32.06
3	0.0	0.2	1.0	3	35.00	67.33
4	0.1	0.0	0.5	3	15.00	20.23
5	0.1	0.1	1.0	1	26.50	39.33
6	0.1	0.2	0.0	2	32.80	47.51
7	0.2	0.0	1.0	2	20.00	54.14
8	0.2	0.1	0.0	3	22.10	49.09
9	0.2	0.2	0.5	1	28.00	65.69
平均根数 Average number of root	K_1	64.3	46.3	66.2	65.8	$\sum_{i=1}^9 y_i = 208.7$ B > C > A
	K_2	74.3	66.6	61.0	70.8	
	K_3	70.1	95.8	81.5	72.1	
	R	3.33	16.50	6.83	2.10	
平均根长 Average length of root	K_1	115.57	90.55	112.78	121.20	$\sum_{i=1}^9 y_i = 391.56$ B > A > C
	K_2	107.07	120.48	117.98	133.71	
	K_3	168.92	180.53	160.80	136.65	
	R	20.617	29.993	16.007	5.150	

的根,用蒸馏水洗净,0.2%秋水仙素溶液室温下处理5 h,卡诺氏固定液0℃固定2~24 h,蒸馏水洗3次,于0.2 mol·L⁻¹ HCl 中60℃离析10 min,蒸馏水清洗后低渗30 min,小心切取根尖,置载玻片中央,改良苯酚-品红染液染色30 min后压片,显微观察并摄影。

表 4 太子参试管苗平均根数的方差分析¹⁾
Table 4 Variance analysis of average root number of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax plantlets¹⁾

方差来源 Source of variance	离均差平方和 Sum of square	自由度 Freedom degree	方差 Variance	F	P
A	16.81	2	8.40	2.28	
B	412.78	2	206.39	55.97	P<0.05
C	75.71	2	37.85	10.26	P<0.1
D	7.38	2	3.69	1	
SE	7.38	2	3.69		

¹⁾ A: IAA 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of IAA (mg·L⁻¹); B: NAA 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of NAA (mg·L⁻¹); C: ABT 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of ABT (mg·L⁻¹); D: 误差列 Error column; SE: 误差的离均差平方和 Sum of square of error. F_{0.10}(2,2)=9.00, F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00.

表 5 太子参试管苗平均根长的方差分析¹⁾
Table 5 Variance analysis of average root length of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax plantlets¹⁾

方差来源 Source of variance	离均差平方和 Sum of square	自由度 Freedom degree	方差 Variance	F	P
A	749.32	2	374.66	16.70	P<0.1
B	1 399.80	2	699.90	31.20	P<0.05
C	462.95	2	231.47	10.32	P<0.1
D	44.87	2	22.44	1	
SE	44.87	2	22.44		

¹⁾ A: IAA 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of IAA (mg·L⁻¹); B: NAA 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of NAA (mg·L⁻¹); C: ABT 浓度(mg·L⁻¹) Concentration of ABT (mg·L⁻¹); D: 误差列 Error column; SE: 误差的离均差平方和 Sum of square of error. F_{0.10}(2,2)=9.00, F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00.

染色体观察结果表明,太子参二倍体试管苗的根尖细胞染色体数目为2n=4x=32(见图1)。

2.3 多倍体的诱导与鉴定

2.3.1 多倍体的诱导 用不同浓度秋水仙素处理太子参试管苗顶芽,诱导同源四倍体株系,诱导率和成活率见表6。结果表明,用0.1%秋水仙素处理24 h,0.2%秋水仙素处理12~24 h或0.3%秋水仙素处理12 h,同源四倍体的诱导率和试管苗存活率均较佳。为确定秋水仙素处理的最佳浓度和时间,根据上述实验结果进行了第2次诱导实验,根据2次诱导实验的结果确定太子参试管苗同源四倍体

诱导的最佳处理方法为:0.2%秋水仙素处理22 h或0.3%秋水仙素处理12 h。

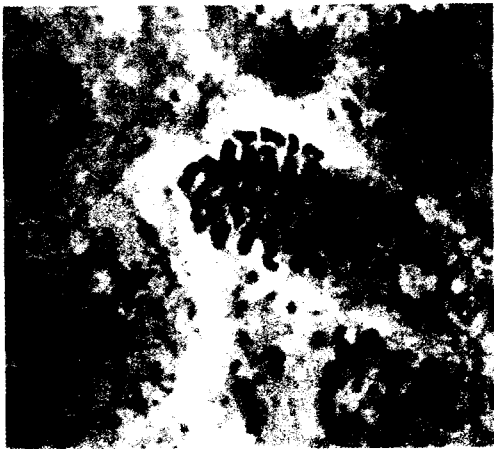


图 1 太子参二倍体试管苗根尖细胞染色体观察
Fig. 1 Chromosome observation of somatic cell of root-tip from diploid plantlet of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

表 6 不同浓度秋水仙素对太子参同源四倍体株系诱导效果的影响
Table 6 Effects of different concentrations of colchicine on autotetraploid inducing of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

浓度/% Concentration	处理时间/h Treating time	存活率/% Rate of survival bud	诱导率/% Rate of induction
第 1 次实验 First experiment			
0.1	12	82.35	5.88
	24	61.90	9.52
	36	37.04	3.70
	48	21.74	4.35
	60	15.00	0.00
0.2	12	85.00	5.00
	24	42.10	10.53
	36	30.00	5.00
	48	27.27	0.00
	60	5.56	0.00
0.3	12	76.19	14.29
	24	41.18	5.88
	36	38.10	4.76
	48	22.73	4.54
	60	13.51	2.70
第 2 次实验 Second experiment			
0.1	23	80.00	8.00
	28	57.14	10.71
	33	52.94	14.71
0.2	14	75.00	8.33
	18	58.33	12.50
	22	56.52	17.39
0.3	12	55.56	16.67
	15	45.45	9.09
	18	39.13	8.70

2.3.2 同源四倍体的鉴定 将诱导得到的多倍体株系在生根培养基上诱导生根,待根长至0.5~1.0 cm时切取根尖,进行染色体鉴定,经3次以上观察确认为四倍体的株系予以保留。观察可见(图2),太子参同源四倍体植株根尖细胞染色体数目为 $2n=4x=64$ 条,染色体数目比二倍体增加了1倍。

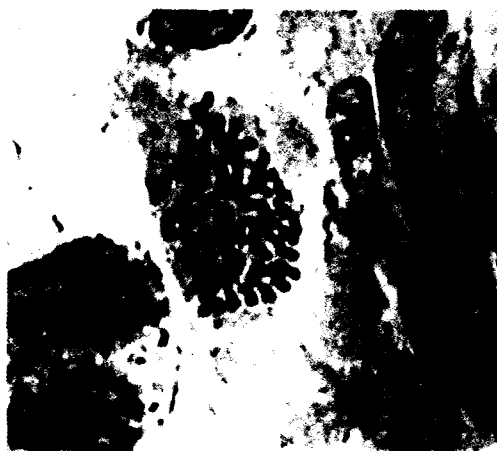


图2 太子参同源四倍体试管苗根尖细胞染色体观察
Fig. 2 Chromosome observation of somatic cell of root-tip from autotetraploid plantlet of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

3 讨 论

植物激素的种类、浓度和对比对植物生长具有显著的影响,通过正交设计筛选太子参试管苗繁殖和生根培养基配方,能大大减少实验次数,增加实验准确度。结果表明,NAA对太子参试管苗的繁殖和生根都有明显影响,是太子参生长过程中不可缺少

的激素之一;IAA和ABT在太子参的生根过程起着不同的作用,作为植物内源生长素之一的IAA,有促进植物细胞伸长的作用,因此,在以平均根长为指标时,IAA的最佳水平为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

染色体鉴定是多倍体育种过程中的重要步骤,为从诱导处理的群体中准确筛选出四倍体提供了可靠依据。不同植物种类的染色体观察所需的条件也各有不同。作者通过对取材时间、不同浓度秋水仙素的浸泡时间、解离时间的筛选确定了太子参根尖染色体观察鉴定的最佳条件。

利用组织培养方法进行药用植物多倍体诱导,能够有效培育出药用成分含量高、药材产量高的优良株系,并且具有节省育种时间、大大加速育种进程的作用,这为解决目前野生药用植物资源日益减少、药用植物品质不断下降等问题提供了有效的方法,也为提高中药材的质量和产量提供了有效途径。采用秋水仙素诱导太子参同源四倍体,成功获得了多倍体株系,诱导效果良好,为下一步田间农艺性状和化学成分的测定奠定了基础。

参考文献:

- [1] 龚祝南,戴 岳. 8个不同太子参对脾虚及免疫功能的影响[J]. 中药材,2001,24(4): 281-282.
- [2] 陈芦根,林丛发. 脱毒太子参种苗繁育及高产栽培技术[J]. 福建农业,2005(1): 18-19.
- [3] 朱 艳,秦民坚,周小华. 太子参脱病毒技术研究[J]. 植物资源与环境学报,2005,14(4): 25-29.
- [4] 余春香,郑小峰,邓燕红,等. 太子参的组织培养研究[J]. 贵州农业科学,2004,32(5): 16-17.
- [5] 谈献和,巢建国,张 瑜,等. 太子参快速繁殖研究[J]. 中药材,2003,26(2): 82-83.