



# 太子参子叶愈伤组织的诱导及分化

李 军,周 涛,廖全利,郑 伟

(贵阳中医学院,贵州 贵阳 550025)

**摘要:**为提高太子参的扩繁效率,以太子参子叶为外植体,研究不同激素配比对愈伤组织形成的影响。结果表明:太子参子叶诱导的最佳培养基为  $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ ,诱导率为 96.0%,可获得淡黄色、疏松的愈伤组织;丛生芽诱导培养基为  $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ TDZ}+3.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ AgNO}_3$ ;生根培养基为  $MS+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 。

**关键词:**太子参;子叶;激素;愈伤组织

太子参是石竹科植物异叶假繁缕 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.] 的干燥块根<sup>[1]</sup>,多年生草本植物,是一味清补中药,为贵州重要的大宗药材之一。由于太子参可作为许多中药的主、佐药成分,近年来在治疗肝炎、糖尿病、冠心病、心绞痛、继发性再生障碍性贫血、包细胞减少症、甲亢、淋巴结核等难治疾病方面取得新的进展,其需求量速增<sup>[2-5]</sup>。

太子参的种植方式分为有性繁殖和无性繁殖,无性繁殖(块根繁殖)是目前栽培太子参的主要繁殖方式。近年来,由于长期以种根进行无性繁殖,致使太子参病毒病普遍发生,产量降低,品质下降<sup>[6-8]</sup>。为了品种改良、稳定产量和提高品质,许多学者以太子参茎尖为外植体建立组织快繁技术<sup>[9-14]</sup>,但无法将单一优良株系快速扩繁。本研究拟以太子参子叶为外植体,探讨太子参子叶愈伤组织诱导的最佳培养基、丛生芽诱导培养基,建立太子参组织培养技术体系,为培育和繁殖优质高产的太子参种苗奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为贵州施秉常用种,采自贵州施秉县牛场大镇药材基地,种子收获后经自然晾晒、去杂后,干燥保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基和培养条件** MS培养基  $4.42\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,蔗糖  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,琼脂粉  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,设置 A、B 两个因子为 6-BA 和 NAA, A、B 各因子的常用浓度分别为  $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0$ 、 $0.1$ 、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,用  $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$  调 pH 至  $5.8\sim 6.0$ ,获得愈伤组织诱导培养基,丛生芽诱导培养基中加入  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  噻苯隆(Thidiazuron, TDZ)和  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AgNO}_3$  溶液,在  $121\text{ }^\circ\text{C}$  高压灭菌备用。

**1.2.2 太子参种苗的获得及消毒** 太子参种子低温层积以  $45\sim 50\text{ d}$  为宜,避免种子在层积过程中即打破休眠并萌芽。种子萌发的最适条件为  $10\text{ }^\circ\text{C}$  砂床上培养,暗培养  $10\text{ d}$  后太子参生长至  $3\sim 5\text{ cm}$ ,子叶展开时,取生长良好且无明显病态的健康植株在  $0.1\%$  升汞( $\text{HgCl}_2$ )消毒  $5\text{ min}$ ,无菌水冲洗  $3\sim 5$  次备用。

**1.2.3 愈伤组织的诱导** 在超净工作台上,将经过消毒的太子参种苗切除茎尖和生长点,保留子叶作为外植体,接种于愈伤组织诱导培养基上,每个组培养瓶接种  $8\sim 10$  个。先暗培养  $3\text{ d}$ ,培养温度  $25\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ,然后转入光照培养箱,每天光照  $12\text{ h}$ ,光强度为  $2\text{ }000\text{ lx}$ ,每  $10\text{ d}$  观察愈伤组织形成情况,  $25\text{ d}$  后统计愈伤组织形成的情况及统计诱导率。

**1.2.4 丛生芽的诱导及生根培养** 挑选浅黄、疏松正常愈伤组织,用手术刀切成  $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$  的小块接种至丛生芽诱导培养基 ( $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ TDZ}+3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ AgNO}_3$ ) 上,每个组培养瓶中接种  $3\sim 5$  个小块。待丛生芽长约  $2\sim 3\text{ cm}$ ,切下丛生芽接入生根培养基 ( $MS+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ ) 中,进行生根培养。

收稿日期:2018-07-25

**基金项目:**贵州省国内一流建设学科资助项目(GNYL[2017]008号);现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-21);国家中药标准化资助项目(ZYBZH-Y-ZY-45);贵州省基础研究计划资助项目(黔科合基础[2018]1010)。

**第一作者简介:**李军(1986-),男,博士,副教授,从事植物分子药学研究。E-mail:speker@163.com。

**通讯作者:**周涛(1968-),女,博士,教授,从事分子药学研究。E-mail:taozhou88@163.com。

2 结果与分析

2.1 太子参子叶愈伤组织的诱导

太子参子叶在诱导愈伤组织培养基中暗培养 3 d 后,观察发现子叶开始转绿增大;转入光照培养箱,每天光照 12 h,10 d 后发现子叶逐渐膨大并长出了部分愈伤组织,20 d 后出现了子叶的愈伤组织,25 d 后愈伤组织的诱导基本完成。由表 1 可知,在 6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的情况下,诱导率随着添加的 NAA 浓度增加而增加,但 6-BA 含量增大到 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,诱导率减少。当不添加 NAA 时,子叶的诱导率低于 30%;当添加 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 时,随着 6-BA 浓度增加,诱导率逐渐上升;当添加 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 时,随着 6-BA 浓度增加,出愈率先降低后升高。

表 1 子叶愈伤组织的诱导率

Table 1 Inductionrate of cotyledon callus					
编号 No.	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> ) 6-BA	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> ) NAA	成活数 Survival number	形成愈 伤组织 Callus formation	诱导率/% Induction rate
1	0.5	0	19	2	10.5
2	0.5	0.1	21	9	42.9
3	0.5	0.5	25	24	96.0
4	1.0	0	43	12	27.9
5	1.0	0.1	37	24	64.8
6	1.0	0.5	23	8	34.7
7	2.0	0	16	2	12.5
8	2.0	0.1	21	17	81.0
9	2.0	0.5	42	26	61.9

通过进一步观察发现,不同激素配比诱导的愈伤组织差异较大,如图 1 所示。0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶少数膨大,仅在切口处有少许愈伤组织;0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶均膨大,仅有少许愈伤组织;0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶膨大形成淡黄色或乳白色、疏松的愈伤组织;1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶发黄,形成少许愈伤组织;1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶少许膨大形成愈伤组织;1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶可形成蓬松的愈伤组织,但数量较少;2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶褐化严重,形成极少量的愈伤组织;

2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶膨大显著,但仅切口处有少量愈伤组织形成;2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素诱导下,子叶膨大显著,形成少量愈伤组织,个别外植体形成单个丛生芽。由此看来,6-BA 是子叶膨大的关键,NAA 的添加有利于形成愈伤组织。

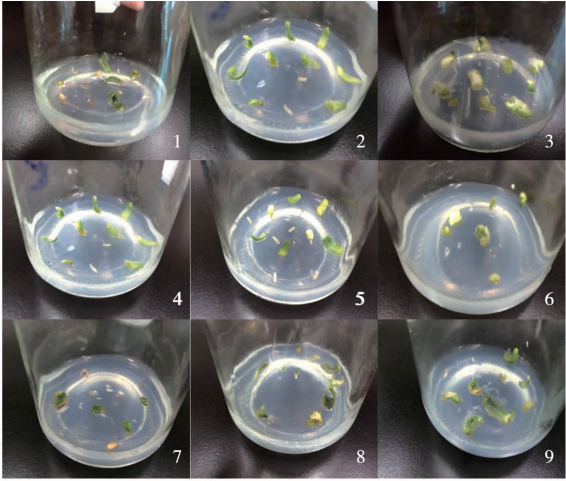
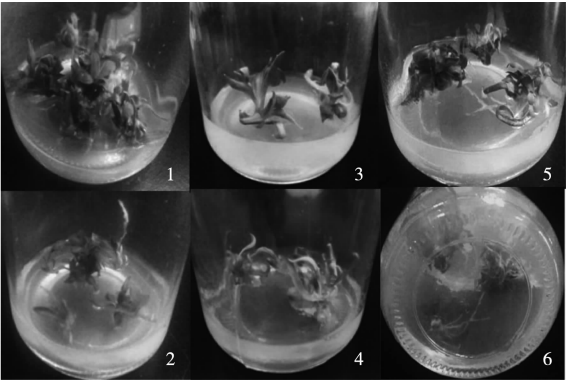


图 1 不同激素比例诱导子叶愈伤组织

Fig. 1 Cotyledoncallus induced by different hormone ratios

2.2 丛生芽的获得

以 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的激素配比为基准,加入 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 噻苯隆及 3.0 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> 后形成丛生芽诱导培养基。将愈伤组织切成小块,接种于丛生芽诱导培养基中,观察丛生芽的形成情况。培养 14 d 后,随着基部增大,幼芽数量逐渐增多,形成丛芽簇如图 2 所示。待丛生芽生长至 3~5 cm 时,移植生根培养基上培养 15~20 d,可见不定根生长。



1~2: 丛生芽簇; 3~4: 单个丛生芽; 5~6: 丛生芽生根  
1-2: cluster buds; 3-4: single cluster bud; 5-6: cluster buds take root

图 2 丛生芽及生根培养

Fig. 2 Cluster buds and rooting culture

### 3 结论与讨论

传统的太子参组织快繁技术主要以茎尖为外植体<sup>[12-13]</sup>,其具有取材方便、出芽率高等特点,但由于单株太子参茎尖数量少,在组织快繁中很难将一株优势种苗快速扩大。太子参主要以自花授粉为主,单株产种子数量较多<sup>[15]</sup>,以种子作为材料进行组织培养,可以获得更多优良种苗,且不受季节影响。

植物组织培养成功与否跟植物激素配比密切相关,不同种类的外源激素对外植体的诱导作用不同<sup>[16]</sup>。生长素与细胞分裂素是形成愈伤组织最主要的影响因素。本研究发现不添加 NAA 的条件下,太子参子叶几乎无法形成愈伤组织,当 6-BA 达到  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,子叶膨大迅速,但并不形成愈伤组织,可能因为生长素作用是促进细胞伸长和生长,细胞分裂素则能促进细胞组织分化<sup>[17]</sup>。太子参子叶愈伤组织诱导的最佳培养基为:MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA。但是,丛生芽在培养基 MS+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 中很快生根,与其它植物生根培养基<sup>[18-19]</sup>具有较大差异,可能与植物的内源激素含量相关<sup>[20]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010.
- [2] 黄伏顺. 太子参的药效特点[J]. 江苏中医,1993,14(4): 29-30.
- [3] 刘维俊,黄光才,叶小青,等. 太子参胶囊的药效学研究[J]. 中药新药与临床药理,1994,5(3): 51-58.
- [4] 刘玉翠,邹岳奇,陈英珠. 复方太子参口服液强壮身体的药

理研究[J]. 河北省科学院学报,1997,14(2): 32-34.

- [5] 龚祝南,戴岳. 8 个不同产地太子参对脾虚及免疫功能的影响[J]. 中药材,2001,24(4): 281-282.
- [6] 吴朝峰,林彦铨. 药用植物太子参的研究进展[J]. 福建农林大学学报,2004,34(4): 426-430.
- [7] 张昭,孙国栋,张琪,等. 太子参的组织培养[J]. 植物生理通讯,1988(6): 42-43.
- [8] 宋吉清,王继振. 太子参栽培技术[J]. 中国农技推广,2003(1): 40.
- [9] 刘卫平,李玉华,孙秀梅,等. 马铃薯离体茎尖生长点对几种培养因子的生长反应[J]. 中国马铃薯,2001,15(2): 81-82.
- [10] 郭忠新,缪森,张云孙. 云南罗平小黄姜的茎尖脱毒组培快繁[J]. 云南大学学报(自然科学版),2002,24(6): 473-474.
- [11] 顾沛雯,龚玉梅,关晓庆. 葡萄茎尖培养和快速繁殖技术研究[J]. 中外葡萄和葡萄酒,2002(4): 16-18.
- [12] 林丛发,罗仰奋,魏泽平,等. 太子参脱毒种苗的繁殖体系[J]. 闽东农业科技,2003(2): 18-20.
- [13] 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.
- [14] 汪良驹,刘友良,马凯,等. 高温高压灭菌对 MS 培养基 pH 的影响[J]. 植物生理学通,1997,33(1): 10-14.
- [15] 叶祖云,阮少江,高文,等. 太子参种子特性及种胚离体诱导培养技术研究[J]. 种子,2010,29(11): 6-8.
- [16] 何恩铭,齐香君,陈秀清,等. 大豆愈伤组织的诱导与离体培养[J]. 陕西科技大学学报,2005(5): 34-36.
- [17] 杨春. 生长素和细胞分裂素在马铃薯愈伤组织分化中的作用[J]. 山西农业科学,2008,36(7): 40-42.
- [18] 佟金凤,高南,李凝,等. 大麻试管苗生根培养基的优化[J]. 安徽农业科学,2008,36(33): 14438-14440.
- [19] 朱彦涛,胡新强,李殿荣. 甘蓝型油菜生根培养基的筛选[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(1): 86-88.
- [20] 田士林,李莉. 植物激素对愈伤组织形成和根芽分化的影响[J]. 安徽农业科学,2007,35(14): 4132.

## Induction and Differentiation of Cotyledon Callus of *Pseudostellaria heterophylla*

LI Jun, ZHOU Tao, LIAO Quan-li, ZHENG Wei

(Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**Abstract:** In order to improve the propagation efficiency of *Pseudostellaria heterophylla*, cotyledons of *Pseudostellaria heterophylla* were used as explants to study the effects of different hormone combinations on callus formation. The results showed that the best medium for cotyledon induction of *Pseudostellaria heterophylla* was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, and the induction rate was 96.0%. Light yellow and loose callus could be obtained. Cluster bud induction medium was MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ+ $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  AgNO<sub>3</sub>, and rooting medium was MS+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA.

**Keywords:** *Pseudostellaria heterophylla*; cotyledon; hormones; callus