

太子参生长点离体培养与快速繁殖

林丛发, 钟爱清, 魏泽平, 罗仰奋, 王少华

(宁德市农业科学研究所, 福建 福安 355003)

摘要: 利用太子参0.2~0.5 mm大小的生长点进行离体培养获得了再生植株, 通过正交试验和单因子试验, 确定了茎尖诱导成芽初代培养基为MS+6-BA 2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1~0.2 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹; 适于愈伤组织及不定芽增殖的继代培养基为MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹; 再生植株的快速繁殖可通过愈伤组织不断分化不定芽和单茎节切段繁殖2种途径进行; 单茎节切段快繁培养基为MS基本培养基; 适于试管微形形成的培养基为MS+蔗糖60 g·L⁻¹, pH 6.0, 最适培养条件为20℃, 光照16 h·d⁻¹; 生根培养基为MS+蔗糖30 g·L⁻¹。在气温15~20℃、空气相对湿度90%条件下, 试管苗定植于细沙土中的成活率达98.6%; 太子参茎尖组培苗田间花叶病发病率比普通苗低94.75%。

关键词: 太子参; 生长点; 离体培养; 快速繁殖

中图分类号: S 567.53

文献标识码: A

Study on in vitro culture and rapid propagation of *Pseudostellaria heterophylla* growing point

LIN Cong-fa, ZHONG Ai-qing, WEI Ze-ping, LUO Yang-fen, WANG Shao-hua

(Ningde Institute of Agricultural Sciences, Fuan, Fujian 355003, China)

Abstract: The regeneration plants were acquired by culturing in vitro the growing points (in 0.2~0.5 mm length) of *Pseudostellaria heterophylla*. The orthogonal experiments and single factor experiments showed that the optimum medium for calli induction and shoot buds from calli was MS+6-BA 2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1~0.2 mg·L⁻¹+sugar 30 g·L⁻¹. The medium suitable for calli subculture was MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹+sugar 30 g·L⁻¹. The plantlets' propagation had been done by 2 ways i.e. continuous calli differentiation and plantlets cuttage propagation. Basic MS medium was suitable for plantlets cuttage propagation. Medium MS (pH 6.0) containing 60 g·L⁻¹ sugar was suitable to induce micro-root tuber, under the condition of 20℃ and 16 hours of light everyday. Medium MS containing 30 g·L⁻¹ sugar was suitable for roots differentiation. The survival rate of the tissue culture plantlets exposed to air for 10~15 days reached 98.6% in the sandy soil under the condition of 15~20℃ and the relative moisture more than 90%. The mosaic disease rate of virus-free roots was 94.75% lower than that of conventional culture system in the field.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* Miq; Growing point; In vitro culture; Rapid propagation

太子参(*Pseudostellaria heterophylla* Miq)属石竹科(Caryophyllaceae)多年生草本, 以块根入药, 具有益气、补肺健脾、生津养胃等功效。闽东地区是我国太子参的主产区之一, 多年来太子参以块根进行无性繁殖, 体内侵染并积累了多种病毒, 发病率在30%~60%, 造成减产30%~50%, 已成为制约太子参发展的重要因素。据有关资料表明, 太子参发病植株体内含有TMV(烟草花叶病毒)、CMV(黄瓜花叶病毒)、PVY(马铃薯Y病毒)、BBWV

(蚕豆萎蔫病毒)、TuMV(芜菁花叶病毒), 发病植株叶片斑驳、皱缩、块根变小, 甚至整株死亡绝收^[1]。利用离体培养对植株进行脱毒复壮, 已广泛应用于多种植物, 在石竹科植物中也已见报道, 如利用康乃馨、满天星0.2~0.8 mm生长点进行离体培养, 均获得脱毒成功^[2]。然而, 国内利用生长点对太子参进行离体培养迄今尚无完整、系列的报道, 如张昭(1988年)报道了太子参茎段培养^[3], 宋荣浩等(1994年)报道了太子参病毒病的防治途径^[4], 都没

收稿日期: 2003-11-07 初稿; 2004-02-03 修改稿

作者简介: 林丛发(1966—), 男, 副研究员, 主要从事植物生物技术研究。

基金项目: 福建省宁德市科技局资助项目(3522Z0104-1)。

对太子参茎尖培养和快繁技术做进一步的研究。本试验以太子参0.2~0.5 mm大小的茎尖,即以太子生长点为外植体进行离体培养,探讨了影响太子参茎尖诱导再生植株、试管微形参形成的主要因素及其最适培养条件,为培育优质、无病毒太子参种苗提供新的有效途径,也为太子参花叶病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

太子参顶芽和腋芽,切取0.2~0.5 mm大小的生长点。

1.2 生长点诱导成芽最佳培养基的筛选

以影响芽诱导的主要因素组成9种培养基组合(3因素3水平)进行正交试验 $L_9(3^4)$ 。3因素设为:6-BA、NAA、GA₃;3水平设为:6-BA 1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹;NAA 0.1、0.2、0.5 mg·L⁻¹;GA₃ 0、0.1、0.2 mg·L⁻¹。各处理均以MS为基本培养基,碳源为蔗糖30 g·L⁻¹,pH 6.0,加琼脂7.0 g·L⁻¹,每个组合培养基接种90个外植体,重复3次。培养40 d后,统计各处理外植体的出芽率(发生芽的外植体占外植体总数的百分率,简称SFF),选出最佳诱导培养基组合,并以此为基础进行单因子试验,确定最佳培养条件。

1.3 太子参不定芽继代培养基的筛选

将太子参不定芽置于9种培养基组合(4因素3水平)进行正交试验 $L_9(3^4)$ 。4因素设为:6-BA、KT、NAA、IAA;3水平设为:6-BA 0.5、1.5、3.0 mg·L⁻¹;KT 0、0.5、1.0 mg·L⁻¹;NAA 0、0.01、0.1 mg·L⁻¹;IAA 0、0.05、0.1 mg·L⁻¹。各处理均以MS为基本培养基,加蔗糖30 g·L⁻¹,pH 6.0。每个组合培养基接种不定芽(连同基部愈伤组织)50个,重复3次。继代培养28 d以后,统计各处理的出芽指数(发生不定芽的外植体上的平均出芽数,简称SFI),筛选出最佳培养基组合,并以此为基础进行单因子试验,确定不定芽继代培养最适条件。

1.4 诱导微形参形成的培养基的确定

以MS为基本培养基,将影响试管内微形参形成的因素:6-BA、蔗糖、光照时间和温度4因素组成16个处理进行正交试验 $L_{16}(4^5)$,各因素水平设为:6-BA 0、2、5、8 mg·L⁻¹;温度15、20、28、33℃;光照时间0、12、16、24 h·d⁻¹;蔗糖15、30、

45、60 g·L⁻¹。每个处理接种88个单节茎切段,重复3次,60 d后,统计各处理的微形参数量,选出最佳培养基组合和培养条件。

1.5 太子参带毒状况对花叶病发生情况的影响

分别以太子参常规块根(经检测含CMV和PVY病毒)和脱毒块根(由检测后无病毒的茎尖组培苗经1代繁殖而得)各3 000株作为种苗进行繁殖,2种块根于2002年1月种在未种过任何作物的山地新土壤上,至生长后期,统计二者的花叶病发病率;待苗倒伏后分别收取2种块根的繁殖后代各100株,洗净、称鲜重,重复5次,统计分析二者产量的差异性。

2 结果与分析

2.1 影响生长点诱导成芽的主要因素

2.1.1 茎尖诱导成芽初代培养基的筛选及正交试验结果 不同培养基组合对太子参茎尖的诱导结果列于表1。由表1可知,太子参茎尖在9种培养基上均可形成愈伤组织并分化成芽。对表1数据进行正交分析(应用q测验法)^[5],结果列于表2。从表2可看出,NAA影响茎尖出芽率的极差值最大(为26.6),说明NAA的水平变化值对茎尖出芽率影响最大,在0.1~0.2 mg·L⁻¹范围内为正影响,在0.2~0.5 mg·L⁻¹范围内呈负影响,且NAA浓度为0.1 mg·L⁻¹和0.2 mg·L⁻¹时对茎尖出芽率的影响差异不显著,但都与0.5 mg·L⁻¹时的出芽率差异达极显著,以0.2 mg·L⁻¹时的平均出芽率最高,达到44.3%,超过0.2 mg·L⁻¹后开始下降;6-BA在1.0~2.0 mg·L⁻¹范围内随浓度的增加,出芽率也逐渐增加,以2.0 mg·L⁻¹时的茎尖出芽率最高,达46.5%,比1.0 mg·L⁻¹和3.0 mg·L⁻¹时的平均出芽率分别增加15.9和22.0个百分点,差异达极显著;GA₃浓度为0.1 mg·L⁻¹和0.2 mg·L⁻¹时的出芽率差异不显著,但二者的出芽率比浓度为0时的分别高8.0和8.1个百分点,差异达显著水平。因此,太子参茎尖诱导成芽初代培养基的最佳组合为:MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1~0.2 mg·L⁻¹。

2.1.2 茎尖初代培养诱导成苗单因子试验 以MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+GA₃ 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹为培养基,各单因子对茎尖诱导成苗的影响试验结果如下:**①温度:**0.2~0.5 mm大小茎尖在10~28℃范围内均可正

常生长, 但最适为24~28℃, 茎尖在35~38℃条件下培养14 d后, 全部停止生长, 并逐渐黄化致死; ②培养基相态: 茎尖分别在固相培养基(内加67.0 g·L⁻¹琼脂)和液相培养基上(内加滤纸桥)的培养效果明显不同, 前者在10~15 d内增大明显, 但30 d后, 不见茎尖继续增大, 且逐渐褐化而死; 后者前期生长增大虽慢, 但20 d后基部可产生愈伤组织并分化出不定芽。因此, 固相培养基较适于茎尖的初代培养。

表1 不同培养基组合对太子参茎尖诱导出芽率的影响

Table 1 Effects of different media combinations on shoot forming frequency (SFF)

试验号	各因素水平(mg·L ⁻¹)			三重复出芽率(%)		
	6-BA	NAA	GA ₃	I	II	III
1	1.0	0.1	0	37.3	32.5	27.4
2	1.0	0.2	0.1	42.9	43.7	35.6
3	1.0	0.5	0.2	21.6	18.4	15.8
4	2.0	0.1	0.1	52.8	60.2	56.0
5	2.0	0.2	0.2	61.3	54.6	67.7
6	2.0	0.5	0	23.6	16.9	25.4
7	3.0	0.1	0.2	34.2	35.3	20.5
8	3.0	0.2	0	30.3	27.0	36.0
9	3.0	0.5	0.1	9.4	12.8	15.2
K ₁ (%)	275.2	356.2	256.4			
K ₂ (%)	418.5	399.1	328.6			
K ₃ (%)	220.7	159.1	329.4			

注: K₁、K₂、K₃分别表示3因素6-BA、NAA、GA₃的3个水平下的出芽率总和。

表2 不同处理对茎尖出芽率的影响

Table 2 Shoot forming frequency of different treatments

因素	水平 (mg·L ⁻¹)	出芽率均值 (%)	差异显著性	
			0.05	0.01
6-BA	2.0	46.5	A	a
	1.0	30.6	B	b
	3.0	24.5	C	c
NAA	0.2	44.3	A	a
	0.1	39.6	A	a
	0.5	17.7	B	b
GA ₃	0.2	36.6	A	a
	0.1	36.5	A	ab
	0	28.5	B	b

2.2 影响不定芽增殖的主要因素

2.2.1 正交试验 L₉(3⁴)结果 试验结果列于表3。应用正交试验方差分析^[5]可知(图1), 6-BA是影响分化和增殖的主要正因素; IAA是主要的负因素, 不利于不定芽的分化和增殖, 浓度达到0.1 mg·L⁻¹时, 不定芽停止分化、生长, 当IAA浓度为0时出芽指数最高, 达3.20; KT并不是主要的影响因素, 但以0 mg·L⁻¹时出芽指数最高, 为2.94; 6-BA浓度为1.5 mg·L⁻¹时出芽指数最多, 达3.19, 与0.5 mg·L⁻¹时相比达到显著差异, 与浓度为3.0 mg·L⁻¹时相比达到极显著差异, 且当6-BA浓度3.0 mg·L⁻¹时, 趋向于愈伤组织的增殖; NAA对不定芽的增殖在浓度0~0.1 mg·L⁻¹内没有显著差异, 但当NAA浓度达到0.1 mg·L⁻¹时, 容易出现玻璃化苗, 叶片肥厚透明。从中可以得出各因素的最优组合为MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0~0.01 mg·L⁻¹。通过进一步的试验证实该组合的平均出芽指数为7.3。太子参试管苗的继代培养也可在MS基本培养基上进行单茎节切段快繁, 温度为24~28℃增殖倍数为3.4倍, 且试管苗长得较健壮。因此, 在移栽前的最后一次增殖可采用MS基本培养基单茎节切段快繁。

表3 不同培养基对太子参不定芽继代培养增殖效果的影响

Table 3 Effects of different media on buds subculture

试验号	各因素水平(mg·L ⁻¹)			三重复出芽指数		
	KT	6-BA	NAA	IAA	I	II
1	0	0.5	0	0	4.2	5.3
2	0	1.5	0.01	0.05	3.4	5.8
3	0	3.0	0.10	0.10	0.3	0
4	0.5	0.5	0.01	0.10	1.0	0.4
5	0.5	1.5	0.10	0	4.1	4.2
6	0.5	3.0	0	0.05	1.8	2.3
7	1.0	0.5	0.10	0.05	1.6	1.1
8	1.0	1.5	0	0.10	2.4	0.3
9	1.0	3.0	0.01	0	2.7	0.8
K ₁	26.5	18.6	21.7	28.8		
K ₂	17.2	28.7	19.7	22.5		
K ₃	14.4	10.8	16.7	6.8		

注: K₁、K₂、K₃分别表示4因素KT、6-BA、NAA、IAA的3个不同水平下的出芽指数总和。

2.2.2 单因子试验 以MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹为培养基, 各单一因子对不定芽增殖的影响试验结果如下: ①

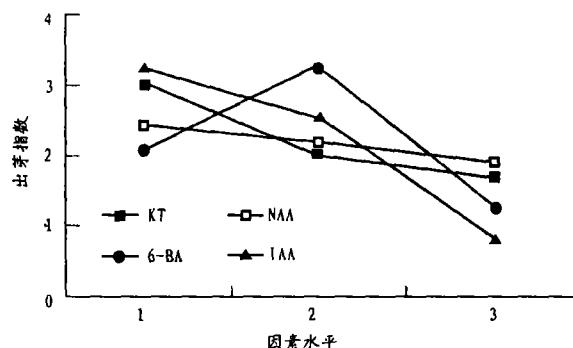


图1 KT、6-BA、NAA、IAA 对不定芽继代培养增殖的影响
Fig. 1 Effects of KT, 6-BA, NAA, IAA on buds subculture

温度：温度在24~28℃条件下，不定芽分化及生长较快，一般25~30 d 继代培养1次，而在15~20℃条件下，若要获得同样的倍数，须40~45 d 继代培养1次，且转代周期较长；②培养基相态：不定芽增殖的静止培养的继代培养周期比固体培养基短10~15 d，且苗长得较健壮；③光：光质条件对不定芽的增殖倍数无明显的影响，但与成苗质量有较大的关系，即自然散射光（光照强度6 000~10 000 lx）下培养的太子参试管苗叶片宽大、浓绿、节间短，苗健壮，移栽后成活率高，而日光灯下（光照强度1 600~2 000 lx）培养的试管苗节间长、叶片窄、苗长得较瘦弱。

2.3 试管内微形参诱导结果分析

$L_{16}(4^5)$ 正交试验结果列于表4，其方差分析^[5]结果（图2）显示，在影响微形参形成的4个因素中，6-BA水平的变化（极差值最大，为55.3）对诱导微形参形成的影响最大，以浓度为0时，微形参形成数量最多，平均为57.9条（88个外植体，下同），它和其它3个水平（2、5、8 mg·L⁻¹）相比，均达极显著差异；温度条件下，以20℃条件下形成的微形参数量最多，平均为53.1条，与其它3个温度水平（15、28、33℃）相比，均达极显著差异，而28℃和15℃条件下形成的微形参数量无明显差异，但它们与33℃条件下形成的微形参数量相比达显著差异；光照条件以16 h·d⁻¹为最好，它与其它3个光照条件（0、12、24 h·d⁻¹）下形成的微形参数量相比，达到极显著差异；蔗糖量以60 g·L⁻¹条件下形成的微形参数量较多，平均为40.9条，与其它3个水平（15、30、45 g·L⁻¹）相比，达到显著差异。因此，试管内微形参诱导的最佳培养基为：MS+蔗糖60 g·L⁻¹；最佳培养条件为：温度20℃，光周期为光

照16 h·d⁻¹。在该培养条件下，以MS为培养基，以不同蔗糖浓度对微形参诱导进一步试验（蔗糖浓度设为60、90、120 mg·L⁻¹），重复3次，结果表明，蔗糖浓度为60 mg·L⁻¹时的效果最好，平均每株试管苗可形成3.4条微形参。

表4 不同培养条件对诱导微形参形成的影响

Table 4 Effects of 4 culturing factors on inducing micro-root tube

试验号	各因素水平				三重复块根数		
	6-BA (mg·L ⁻¹)	温度 (℃)	光照 (h·d ⁻¹)	蔗糖 (g·L ⁻¹)	I	II	III
1	0	15	0	15	0	0	2.0
2	2	20	12	30	38.2	42.2	50.0
3	5	28	16	45	13.6	10.3	14.0
4	8	33	24	60	0	0	0
5	0	20	16	60	136.3	146.0	153.4
6	2	15	24	45	27.5	25.8	22.5
7	5	33	0	30	0	0	0
8	8	28	12	15	2.0	0	0
9	0	28	24	30	58.7	69.3	62.3
10	2	33	16	15	5.2	9.3	8.2
11	5	15	12	60	11.0	9.7	11.3
12	8	20	0	45	2.0	0	1.0
13	0	33	12	45	20.4	25.0	21.5
14	2	28	0	60	10.1	8.3	5.0
15	5	20	24	15	25.1	20.4	22.8
16	8	15	16	30	10.0	8.0	8.0
K_1	694.9	135.8	28.4	95.0			
K_2	252.3	637.4	231.3	346.7			
K_3	138.2	253.6	522.3	183.6			
K_4	31.0	89.6	334.4	491.1			

注： K_1 ~ K_4 分别表示因素6-BA、温度、光照、蔗糖4个不同水平条件下微形参根数总和。

2.4 试管苗的生根试验

将太子参试管苗茎切段扦插于①MS+蔗糖30 g·L⁻¹和②1/2MS(大、微量元素减半)+NAA 0.5 mg·L⁻¹+1.5%蔗糖两种培养基上，接种茎段均为96个，重复3次，光强提高到6 000~10 000 lx。20 d后培养基①上，每个茎段可产生3~4条不定根，且苗较健壮；培养基②上，每个茎段都可产生4~5条不定根，并可产生少量愈伤组织，且在同样光强下，苗虽长得较正常，但不如培养基①上的健壮。说明MS基本培养基的生根效果好。将生根的太子参瓶苗经自然散射光炼苗10~15 d后，在气温15~20℃

时移栽于细沙土中, 盖上薄膜, 外层加罩50%遮阳网, 空气相对湿度在90%以上, 14 d后揭去薄膜和遮阳网, 30 d后调查结果显示, 移栽成活率为98.6%。

2.5 脱毒块根与常规块根在繁殖过程中花叶病发生率及产量差异比较

在新土壤上, 以常规块根繁殖时, 生长中期(2月下旬)就开始出现花叶病, 至生长后期发病率99.4%, 5月下旬99.0%的植株枯死; 而用脱毒块根繁殖的, 从苗期至生长后期植株生长正常, 只有零星发病, 发病率仅为1.65%, 至6月下旬以后地上茎叶自然枯萎, 生长期比常规种可延期1个月以上。试验表明, 以常规块根繁殖时田间自然发病率高, 并且病毒可在块根中积累, 传至下一代, 使病情逐年加重。对产量的影响见表5, 经差异显著性分析, 脱毒种和常规种之间达到极显著差异($t=16.56 > t_{0.01} = 4.6$), 脱毒种比常规种增产28.2%。

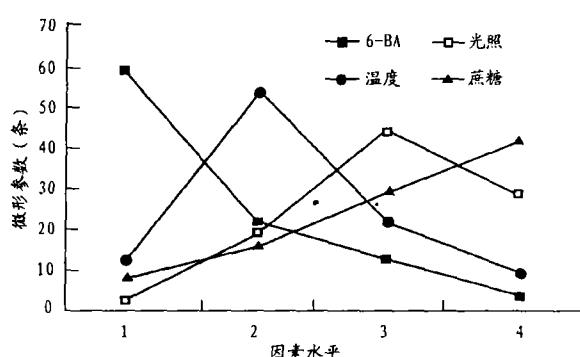


图2 不同因素不同水平条件对微形参形成的影响

Fig. 2 Effects of 6-BA, temperature, light and sugar content on inducing micro-root tuber

注: 纵坐标为每88个外植体形成的平均微形参数。

表5 脱毒种和常规种对产量的影响

Table 5 Effect of conventional-roots and virus-free roots on yield

处理	重 复					\bar{x}	Sd	t	$t_{0.01}$
	I	II	III	IV	V				
常规块根	670	394	520	593	497	534.8			
脱毒块根	800	528	669	772	660	685.8			
差数	130	134	149	179	163	151.0	9.12	16.56	4.6

注: 表中数据为100株的产量(g)。

3 小结与讨论

太子参无毒苗的获得可通过两种途径: 一是利用太子参种子进行繁殖, 但采后干燥使种子发芽率降低, 且种子产量较低, 故该方法不常用; 二是利用茎尖组培和无病毒试管微形参诱导, 该方法一年四季均可进行, 炼苗定植成活后的试管苗或微形参可直接替代生产种供大田生产, 缩短品种改良时间。利用太子参茎尖进行离体培养, 能成功地通过愈伤组织分化得到再生植株, 再通过再生植株培养诱导形成试管微形参。本研究确定了影响太子参茎尖离体培养的主要因素, 为改良太子参品种提供了切实可行的方法。

参考文献:

- [1] 宋荣浩, 潘祖芹. 太子参病毒病病原鉴定 [J]. 上海农业学报, 1991, 7 (2): 80—85.
- [2] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996. 166—167.
- [3] 张昭. 太子参的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1988 (6): 42.
- [4] 宋荣浩, 潘祖芹. 太子参病毒病的防治途径 [J]. 上海农业学报, 1994, 10 (4): 59—62.
- [5] 马育华. 田间实验和统计方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1986. 186—191.

(责任编辑: 林树文)