

小果雪兔子的组织培养

祝建波^{1,2}, 王 重³, 周 鹏¹

(1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101;

2. 石河子大学 兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003;

3. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 小果雪兔子分布于新疆帕米尔高原, 是一种濒临灭绝植物。利用组织培养的方法研究和保存珍稀的种质资源, 是一种有效途径。以小果雪兔子无菌苗下胚轴为外植体, 在含有 6-BA(0.2 mg/L) 和 NAA(2 mg/L) 的 MS 固体培养基上, 20 d 后可诱导出紫红色愈伤组织。当经 4℃ 处理的愈伤组织转移到含 6-BA(2 mg/L) + NAA(0.2 mg/L) + 水解乳蛋白(250 mg/L) 的 MS 培养基上, 25 d 后在愈伤组织上即可诱导出芽, 出芽率为 240%, 继代培养后形成丛生苗, 增殖率可达 3~5 倍。将 2~3 cm 长的幼苗, 转移到 IAA(0.5 mg/L) + 活性炭(0.5%) 的 1/2MS 固体培养基上, 20 d 即可从茎基部生根, 生根率 74%。

关键词: 小果雪兔子; 组织培养

中图分类号: S949.783.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)06-0059-04

Tissue Culture of the Alpine Plant *Saussurea simpsoniana*

ZHU Jian-bo^{1,2}, WANG Zhong³, ZHOU Peng¹

(1. National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101, China;

2. Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Bingtuan, Shihezi 832003, China;

3. Biology College of Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: *Saussurea simpsoniana* was a kind of plant which was close to die out. It is an effective approach that researched and preserved the sources of species by tissue culture. In this experiment, *Saussurea simpsoniana* callus was induced from the hypocotyls of sterile seedling, which collected from the Pamirs in XinJiang and was cultured on solid MS medium contained 0.2 mg/L 6-BA and 2 mg/L NAA for 20 days. Only pink Callus had differentiation capability. Adventitious buds were induced from pink Callus, which were disposed in 4℃, on solid MS medium contained 6-BA 2 mg/L and NAA 0.2 mg/L and 250 mg/L Lactalbumin Hydrolysate for 25 days, the budding rate was 240%. Cluster shoots were set up through subculturing. The propagation times were up to 3-5. When the shoot developed 2-3 cm Length, they were cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L IAA and 0.5% active carbon for 20 days. Roots were formed from cauline base, then the rate of rooting was up to 74%.

Key words: *Saussurea simpsoniana*; Tissue culture

小果雪兔子(*Saussurea simpsoniana*)属菊科(*Compositae*)凤毛菊属(*Saussurea* DC)雪兔子亚属(*subgen. Eriocoryne*)植物, 是通称雪莲的一种, 为我国名贵中草药。雪莲是一种极其珍贵的抗逆资源, 蕴含有丰富的抗寒基因, 研究其抗寒机理, 克隆其抗寒基因, 对于植物抗寒育种具有重要意义^[1]。小果雪兔子生于高海拔 4 900~5 000 m 高山荒漠石坡, 生境特异, 人工栽培困难, 加上长期以来对雪莲资源的掠夺开发, 已使这

一珍贵资源濒临灭绝。目前, 国内外利用组织培养技术保存和快速繁殖珍稀动植物已成为种质研究的重要途径^[2~5], 但在新疆境内仅发现在帕米尔高原中巴边界禁区有少量分布的小果雪兔子还未见报道, 因此本试验旨在研究解决这一珍稀植物资源的保存和快速繁殖进行了初步的探讨。

我国雪莲植物有 40 多种及 3 个变种, 因为其良好的药用价值, 一直是人们研究的重点^[6]。到目前

收稿日期: 2006-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(39960008; 30360007); 兵团科技攻关项目(NKB025DXNK01SW)

作者简介: 祝建波(1967-), 男, 山东烟台人, 副教授, 硕士, 主要从事基因工程方面研究; 周鹏为通讯作者。

为止,已有关于新疆雪莲(*Saussurea inuoluorat*)^[7~9]、水母雪莲(*Saussurea medusa*)^[10,11]、苞叶雪莲(*Saussurea obvallata*)^[12]、绵头雪莲(*Saussurea laniceps*)^[13]、雪兔子(*Saussurea gossypiflora*)^[14]组织培养研究的相关报道,而本试验对在新疆境内的帕米尔高原首次发现的一种小果雪兔子进行了再生体系建立的初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料来源

采自帕米尔高原塔什库尔县红其拉甫海拔4 900 m的小果雪兔子种子由石河子大学生命工程学院阎平教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 将采集的小果雪兔子种子先经过低温处理(放在冰箱中-20℃,48 h),然后取出经70%酒精消毒10 s~1 min,0.1%升汞消毒5~15 min,无菌水洗4~5次,每次2~3 min。

1.2.2 无菌苗的获得 将高压消毒的滤纸片放入1/2 MS附加6-BA 0.5 mg/L,琼脂5.5 g/L,pH 5.8的无蔗糖的培养基中,然后将消毒的种子接种于无蔗糖培养基上,放至培养箱中培养,温度控制在15~20℃,7 d后萌发出无菌幼苗。

1.2.3 诱导愈伤组织 将培育出的无菌苗胚轴和子叶切成数段,接种于基本培养基MS附加不同浓度6-BA与NAA激素,6-BA 0.2 mg/L和NAA 0.5,1.0,1.5,2.0 mg/L组成的4种培养基。蔗糖30 g/L,琼脂5.5 g/L,pH 5.8的培养基上诱导愈伤组织。培养条件:温度为18~20℃,光照时间每日14~16 h,光照强度1 500~2 000 lx。由于小果雪兔子采种困难,用于试验的小果雪兔子子叶和下胚轴不足,所以接种样本量较小。

1.2.4 愈伤组织芽的分化 以20℃培养为对照,将培育出的愈伤组织经低温4℃处理培养7 d后,选用MS基本培养基+蔗糖30 g/L、琼脂5.5 g/L、pH 5.8、水解乳蛋白250 mg/L,并以不同浓度的6-BA与NAA搭配,6-BA 0,0.5,1.0,1.5,2.0,4.0 mg/L与NAA 0,0.2 mg/L组成11种组合,以选出最适宜的培养基。培养条件:50 mL三角瓶内含20 mL固体培养基,每瓶接种愈伤组织鲜重(0.25±0.2) g,温度为18~20℃,放置光照培养箱中,光照时间每日14~16 h,光照强度1 500~2 000 lx,每隔20 d继代一次。

1.2.5 再生芽继代培养和生根培养 将再生的丛生芽从愈伤组织上取下,然后接种于MS,3/4MS和1/2 MS基本培养基中,附加水解乳蛋白250 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,pH为5.8,琼脂5.5 g/L,蔗糖30 g/L。接种后于光照培养箱中培养,培养箱温度(昼/夜)控制在20/18℃。调查丛生苗的增殖率和生长状态;将高度2~3 cm的无根苗经4℃培养5 d,转移至1/2MS+IAA(0.5,1,1.5 mg/L)+0.5%活性炭的生根培养基上,调查生根率。

2 结果与分析

2.1 小果雪兔子种子无菌苗的建立

小果雪兔子种子在1/2MS附加6-BA 0.5 mg/L,无蔗糖培养基上萌发,酒精消毒20~30 s,升汞消毒时间为7~8 min为宜。在接种时,将高压灭菌过的滤纸(1 cm×1 cm)放在此培养基上,再将经过消毒的小果雪兔子种子接种于滤纸上,经过7 d后种子萌发。由于种子成熟度不好,接种45粒种子,萌发17粒,萌发率37.8%。

2.2 不同浓度的6-BA,NAA对小果雪兔子愈伤组织诱导率的影响

将子叶展开的无菌幼苗的子叶和下胚轴,按0.5 cm大小切块或切段,接种于不同浓度的6-BA,NAA的培养基中(表1),继代培养20 d观察。结果表明:在设计激素范围内,无菌幼苗的子叶和下胚轴在MS附加6-BA 0.2,NAA 2.0 mg/L,诱导率最高。子叶的诱导率为56%,下胚轴的诱导率为100%。其他激素组合的培养基中,愈伤组织的诱导率相对较低。

2.3 不同浓度的6-BA与NAA搭配对愈伤组织生长的影响

将诱导的愈伤组织,选用MS基本培养基,附加不同浓度6-BA和NAA,配成5种组合(表2),每组接种5瓶,每瓶(50 mL三角瓶内含20 mL固体培养基)接种愈伤组织鲜质量(0.25±0.2)g。继代培养20 d。实验表明:6-BA在0.2 mg/L水平,在0.2~2.0 mg/L范围内,随着NAA水平的提高,愈伤组织生长逐步增加。其中在MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L的培养基上生长速度较快,质量增加较多。当在NAA 2.5 mg/L水平时,愈伤组织开始出现褐化现象。在NAA在0.2 mg/L水平时,随着6-BA浓度的增加,愈伤组织生长减缓,并开始有芽的分化。

表1 不同浓度的6-BA,NAA对雪莲愈伤组织诱导率的影响(20 d)

Tab.1 The effects of various medium on inducing rate of *Saussurea inuoluorat* callus

培养基(mg/L) Medium	接种外植体数 Explant number		诱导愈伤数 Callus number		愈伤组织诱导率(%) Inducing ratio	
	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	下胚轴 Hypocotyl
MS + 6-BA 0.2 + NAA 0.5	12	15	6	8	50	53
MS + 6-BA 0.2 + NAA 1.0	10	12	4	9	40	75
MS + 6-BA 0.2 + NAA 1.5	10	12	5	10	50	83
MS + 6-BA 0.2 + NAA 2.0	9	10	5	10	56	100
MS + 6-BA 0.2 + NAA 4.0	9	8	4	6	44	75

表2 不同浓度的6-BA,NAA浓度对
愈伤组织生长的影响Tab.2 The effects of different 6-BA and NAA
concentration on growth of *Saussurea inuoluorat* callus

细胞分裂素 6-BA(mg/L)	生长素 NAA(mg/L)	愈伤组织鲜质量(g) Weight of callus
0	0.2	少数愈伤死亡
0.2	0.5	3.42
0.2	1.0	3.68
0.2	1.5	3.66
0.2	2.0	3.76
0.2	2.5	少数愈伤组织发褐
0.5	0.2	愈伤组织生长缓慢并呈颗粒
1.0	0.2	少数芽产生,畸形
2.0	0.2	较多芽产生,畸形

2.4 低温处理对愈伤组织器官分化的影响

继代的愈伤组织存在白色、淡绿色和紫红3种类型。根据文献报道^[15],只有紫红色的愈伤组织具有分化能力。将正常培养和经4℃低温处理7 d的紫红色愈伤组织接种至MS+0.5~4.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA培养基上都有产生不定芽的能力。

表4 不同浓度的6-BA,NAA浓度对愈伤组织再生芽的影响

Tab.4 The effects of different 6-BA and NAA concentration on inducing Adventitious buds of callus

6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	接种愈伤组织数(块) Callus explant number	愈伤组织再生芽数 Bubs number	出芽率(%) Inducing ratio
0	0	30	0	0
0	0.2	30	0	0
0.5	0	30	0	0
0.5	0.2	30	29	96.6
1.0	0	30	24	80.0
1.0	0.2	30	17	56.0
1.5	0	30	31	100.0
1.5	0.2	30	59	196.6
2.0	0	30	48	160.0
2.0	0.2	30	72	240.0
4.0	0.2	30	0	0

2.5 不同浓度的6-BA与NAA组合对愈伤组织再生芽诱导率的影响

愈伤组织同上,经4℃低温处理后,选用MS基本培养基+水解乳蛋白250 mg/L,并以不同浓度的6-BA与NAA搭配(表4),每组接种6瓶,每瓶接种愈伤组织5块。结果表明:25 d后,在MS+水解乳蛋

紫红色的愈伤组织培养14 d后,愈伤组织紫红色加深,质地变得紧密,并开始出现绿色芽点,在MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA培养基上的芽点最多。20 d后将带芽点的愈伤组织块转接到2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA上继续培养,不经低温处理的紫红色愈伤组织虽能产生较多的芽点,但芽点畸形,且不能正常伸长。经4℃处理过的紫红色愈伤组织不仅能诱导出密集的芽点,且继续培养芽点能较快长出叶片形成叶丛,并长大成芽(表3)。

表3 低温处理对愈伤组织器官分化的影响

Tab.3 The influence of low temperature on
inducing callus differentiation

激素组合(mg/L) Hormone Combination	粉红色愈伤组织 Pink callus	
	20℃	4℃
6-BA 0.5 + NAA 0.2	无分化	芽点少,正常芽
6-BA 1.0 + NAA 0.2	芽点少,畸形芽	芽点少,正常芽
6-BA 2.0 + NAA 0.2	芽点多,畸形芽多	芽点多,正常芽
6-BA 4.0 + NAA 0.2	无分化	无分化

白250 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的培养基上,生成再生芽的数目最多,总出芽率可达240%。而在其他组合的培养基中,愈伤组织生成再生芽的数目相对较少。表明愈伤组织适宜在MS+水解乳蛋白250 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的培养基上形成再生芽。



2.6 再生芽继代培养和生根培养

再生的丛生芽继代培养 MS, 3/4 MS 和 1/2 MS 基本培养基中, 附加水解乳蛋白 250 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L, pH 5.8, 琼脂 5.5 g/L, 蔗糖 30 g/L, 所有处理丛生芽都能继续分化增殖, 增殖倍数都可达 3~5 倍。但在 MS 培养基中, 丛生芽生长较慢, 而 1/2 MS 中丛生芽培养 30 d 后, 叶片很容易白化。只有在 3/4MS 培养基中, 多次继代, 生长状况良好。

将高度 2~3 cm 的无根苗接种至 1/2MS + IAA (0.5, 1, 1.5 mg/L) + 0.5% 活性炭的生根培养基上, 在 IAA 0.5~1.5 mg/L 范围内, 幼苗培养 20 d 左右开始都在基部长出乳白色根, 但随着 IAA 浓度升高, 在幼苗基部的会形成较大的愈伤组织块。其中以 IAA 0.5 mg/L 形成的量最小, 生根率达 74%, 单株根数介于 4~8 条。小果雪兔子适应在较低温度条件下生长, 移栽至室外后, 在 $\geq 25^{\circ}\text{C}$ 条件下很难生存, 移栽至室外 14~21 d 后, 全部死亡, 移栽成活率为 0。

3 讨论

根据当前的研究资料表明^[6-17], 雪莲的组织培养主要以 MS 为基本培养基, 在愈伤组织诱导和芽的分化中最适合的细胞分裂素为 6-BA。而对生长素种类要求不严格, 主要以 NAA 为主。使用的糖源一般是蔗糖。适合诱导愈伤组织的外植体类型主要是下胚轴和叶片, 诱导的愈伤组织有形态上的差异, 而只有紫红色疏松型的愈伤组织才能分化成苗, 分化的方式主要是不定芽, 增殖方式基本上以丛生芽为主。

小果雪兔子是喜低温植物, 无论是愈伤组织还是组培苗都需在较低温度下才能生长良好。超过 25°C 愈伤组织逐渐变褐, 组培苗枯死, 较大温差也是促进其生长的有利因子。本研究也表明, 小果雪兔子在超过 20°C 时, 叶片极易黄化死亡, 而且生根苗移栽后难以在室温下培养存活。在雪兔子亚属中的水母雪莲^[11,15]、雪兔子^[14]、小果雪兔子不论是不定芽的分化还是根的诱导, 都需要经过一定条件的低温处理才能正常分化, 而雪莲亚属中的新疆雪莲可在较高的温度下进行器官分化^[18,19], 其原因究竟跟脱分化过程中失去了对低温的严格要求, 还是跟雪莲的不同亚属之间存在着不同的生理差异, 有待于

进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈发菊, 扬映根, 赵德修, 等. 我国雪莲植物的种类、生境分布及化学成分的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 561-566.
- [2] 霍秀文, 魏建华, 张辉, 等. 冰草属植物组织培养再生体系的建立[J]. 华北农学报, 2004, 19(1): 17-20.
- [3] 张磊, 王震星, 刘贵仁. 小枣发育枝愈伤组织类型及细胞学观察[J]. 华北农学报, 1998, 13(2): 117-121.
- [4] 贾利敏, 张红梅, 贾利欣. 玉米组织培养和植株再生的研究[J]. 内蒙古农业科技, 2002, (3): 10-13.
- [5] 郝云凤, 史有国, 韩金梅, 等. 不同培养基对春小麦花药培养愈组率及绿苗率的影响[J]. 内蒙古农业科技, 1998, (增刊): 40-43.
- [6] 谭敦炎. 雪莲的生殖生态学研究[J]. 新疆农业大学学报, 1998, 21(1): 1-5.
- [7] 瓦·古巴诺娃, 刘杰龙, 石玉朔. 新疆雪莲的组织培养[J]. 新疆农业科学, 1990, (5): 221-222.
- [8] 赵德修. 雪莲花组织培养的初步研究[J]. 中草药, 1997, (11): 682-684.
- [9] 宋锋惠, 史彦江, 卡德尔. 新疆雪莲茎尖组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 256.
- [10] 陈玉珍, 卢存福. 高山植物水母雪莲的组织培养[J]. 特产研究, 2000, (1): 9-10.
- [11] 杨金玲. 水母雪莲体细胞胚胎发生及其植株再生[J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 252-256.
- [12] Dhar U, Joshi M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew: effect of explant type, age and plant growth regulators[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24(4): 195-200.
- [13] 瓦·古巴诺娃. 西藏绵头雪莲的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 300-301.
- [14] 陈发菊, 李志红, 涂璇. 雪兔子叶的组织培养及植株再生[J]. 湖北三峡学院学报, 2000, 22(5): 64-67.
- [15] 陈发菊, 赵德修, 杨映根, 等. 水母雪莲愈伤组织的多态性及其再分化条件的研究[J]. 华中师范大学学报, 2002, 34(3): 331-335.
- [16] 赵德修, 乔传令, 汪沂. 水母雪莲的组织培养和高产细胞系的筛选[J]. 植物学报, 1998, 40(6): 515-520.
- [17] 陈亚琼, 金治平, 赵德修, 等. 水母雪莲两种再生系统的建立[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 57-58.
- [18] 李毅. 水母雪莲的幼根培养及植株再生植物[J]. 植物生理学通讯, 2001, (2): 39-40.
- [19] 朴日子, 曹后男, 陈艳秋, 等. 新疆雪莲的离体培养及其快速繁殖[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(2): 121-128.