

# 新疆天山雪莲组培快繁技术的建立

赵海清, 王晓军 (中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830011)

**摘要** [目的] 探讨新疆天山雪莲组培快繁技术。[方法] 以新疆雪莲切除根部的无菌苗, 或无菌苗的真叶, 或者直接采集野生的新疆雪莲幼嫩部位作外植体, 进行愈伤组织诱导培养及丛生芽分化、丛生芽增殖继代培养、生根培养和组培苗移栽试验。[结果] 新疆天山雪莲外植体在 MS + NAA 2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 和 MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L 培养基上可诱导产生大量的丛生芽; 在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L 和 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L 培养基上交替培养, 丛生芽继代快速增殖率达 1.0:3.5; 组培苗在 MS + NAA 0.2 mg/L 培养基上诱导生根, 生根率达 83%; 生根的雪莲组培苗经炼苗和移栽后成活, 生长健壮。[结论] 该研究建立的快繁技术为雪莲野生资源保护和产业化发展开拓了一条有效途径。

**关键词** 新疆雪莲; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号** S 567.23\*9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)07-02743-02

## Establishment of Rapid Propagation Technique in Tissue Culture of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. from Tianshan Mountain

ZHAO Hai-qing et al (Xinjiang Institute of Physical and Chemical Technique, Chinese Academy of Sciences, Urumchi, Xinjiang 830011)

**Abstract** [Objective] The aim was to discuss the rapid propagation technique in tissue culture of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. from Tianshan mountain. [Method] With aseptic seedlings excised root part, their leaves of *S. involucrata* or the tender parts of wild *S. involucrata* collected directly as explants, the callus induction culture, clustered bud differentiation and proliferation subculture, rooting culture and transplant experiment of tissue-cultured seedlings were conducted. [Result] On the media MS + NAA 2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L and MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L, the explants of *S. involucrata* from Tianshan mountain could be induced to generate plentiful clustered buds. In the alternate cultures on the media MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L and MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L, the rapid proliferation ratio of clustered bud subculture reached 1.0:3.5. The tissue-cultured seedlings were induced to take root on the medium MS + NAA 0.2 mg/L and the rooting rate reached 83%. The rooted tissue culture seedlings of *S. involucrata* could survive after domestication and transplant and grow healthily. [Conclusion] This rapid propagation technique set up in the study developed an effective approach for the protection and industrialized development of wild *S. involucrata* resources.

**Key words** *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.; Tissue culture; Rapid propagation

雪莲(*Saussurea* spp.)为菊科风毛菊属 5~8 年生草本植物,是我国典型的高山植物,具有重要的药用价值。独特的生长环境和生理特性孕育出雪莲独特的药效。据中医文献记载,雪莲性温,味微苦,入肝、脾、肾三经<sup>[1-2]</sup>,具有散寒除湿、活血通经、强筋助阳、抗炎镇痛、收缩子宫等功效。民间常用雪莲治疗风湿性关节炎、妇女宫寒腹痛、月经不调、胎衣不下、麻疹不透、肺寒咳嗽、阳萎、高山不适症、雪盲等病<sup>[3]</sup>。近年来,雪莲作为民族药和民间药在抗炎镇痛、抗早孕、抗衰老及抑制癌细胞增生方面的作用备受关注<sup>[4]</sup>。雪莲花原生植物种类较多,其中新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)的品质最佳<sup>[5-7]</sup>。该类药材主要含有黄酮类、生物碱、内酯甾醇、多糖及挥发油等化学成分,其中主要的次生代谢物是黄酮及黄酮苷类。近年来,野生雪莲因过度采挖、繁殖困难、生长缓慢,已被列为国家 3 级濒危物种<sup>[8]</sup>。雪莲生长缓慢,从种子发芽到开花结果约需 5 年时间。雪莲种子萌发率低,采用传统的播种方法进行大规模人工栽培存在困难。应用植物组织培养方法大规模人工繁育雪莲,可以不受季节和气候的限制,从而加快繁殖速度,快速扩大种质资源。为此,笔者对新疆天山雪莲组培快繁技术进行了研究,以期对新疆天山雪莲产业化发展开拓一条有效途径。

## 1 材料与方法

**1.1 培养条件** 共有 6 种培养基:①MS + 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 用于诱导愈伤;②MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D;③MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 用于诱导丛生芽;④MS + 0.5 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA;⑤MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 用于丛生芽增殖;⑥MS

+ 0.2 mg/L NAA 用于生根培养。以上培养基中均加入 0.5% 琼脂,3% 蔗糖,pH 值调至 5.85,培养间温度 25~26 ℃,光照时间 12~14 h/d,光强 2 500~3 000 lx,环境湿度 60%~70%<sup>[9]</sup>。

**1.2 处理方法** 选取颗粒饱满的成熟雪莲种子并放入烧杯中,加适量饮用纯净水,滴入 2 滴吐温 80,浸泡 24 h 后,进行灭菌处理。先用 75% 酒精浸泡 30 s,15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 40 min,无菌水冲洗 3~4 次,最后用无菌水浸泡 10 min。最后,将种子接种到无激素 1/2 MS 基本培养基中。

选取野生新疆雪莲的幼嫩部位(幼嫩叶片和幼嫩茎尖)作为外植体,进行灭菌处理。先用 75% 酒精浸泡 30 s,0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,最后用无菌水浸泡 10 min。切取幼嫩部位(0.5 cm<sup>2</sup>)接种于装有培养基①的罐头瓶中诱导愈伤。

## 2 结果与分析

**2.1 种子消毒培养无菌苗生长情况** 在无激素 1/2 MS 基本培养基中,约 5 d 种子开始萌发,23 d 后萌发率达 75%,30~40 d 得到带有 2~4 片真叶的无菌小苗。切取真叶(0.5 cm<sup>2</sup>)接种于装有培养基②的罐头瓶中,进行芽的诱导。在 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D 上进行初代培养,30~35 d 后转接到 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L 2,4-D 上继续培养,30 d 后可以得到大量的丛生芽。切除雪莲无菌苗的根部接种于装有培养基③的罐头瓶中,进行丛生芽的诱导;25 d 后转接到培养基④,可以得到大量的丛生芽。

**2.2 愈伤繁殖** 由表 1 可知,用 1.8 L 生物反应器培养雪莲愈伤时,3% 接种量比较合适,可以短期内得到大量雪莲愈伤(图 1A)。

**2.3 芽的继代快速繁殖** 将雪莲丛生芽转接至 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA 和 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.01

**作者简介** 赵海清(1975-),男,新疆乌鲁木齐人,助理研究员,从事生物化学方面的研究。

**收稿日期** 2007-09-03

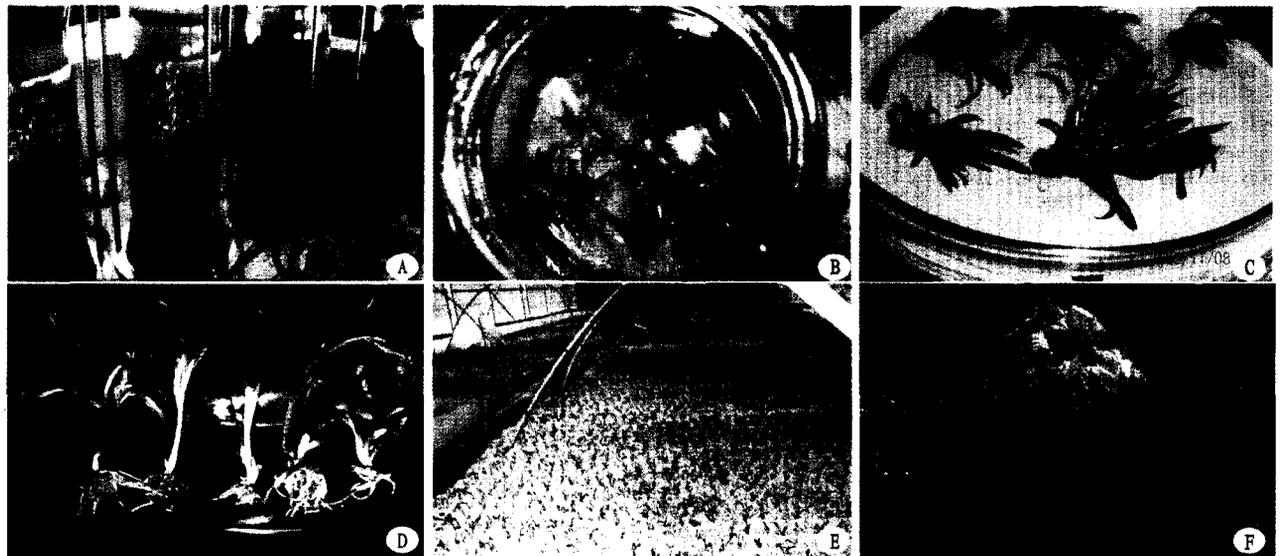
mg/L NAA 继代培养,2种培养基交替使用,使其快速增殖,20~25 d 转接1次。继代培养时每瓶4~5丛,每丛3个芽,随机抽取5瓶。

表1 愈伤繁殖统计结果

Table 1 Results of callus propagation

编号 No.	培养天数 Culture days d	接种量 Inoculation amount %	生物量增加倍数 Increased multiple of biomass
1	20	2.0	4.30
2	20	2.5	4.60
3	20	3.0	6.78
4	20	3.5	3.00
5	20	4.0	2.63
6	20	5.0	1.50

从表2可以看出,5瓶苗共有23丛,共计243棵苗,平均11棵/丛,继代培养增殖率可达1.0:3.5(图1B、1C)。



注:A.生物反应器繁殖愈伤;B.诱导丛生芽;C.继代培养;D.生根;E.温室炼苗;F.移栽天山3年后部分开始开花。

Note: A. callus propagation in bioreactor; B. induction of cluster buds; C. subculture; D. rooting; E. hardening-plantlets in greenhouse; F. some plants bloomed 3 years after transplanted to Taishan Mountain.

图1 新疆天山雪莲组培快繁的不同阶段图谱

Fig.5 Pictures of tissue culture and rapid propagation of *Saussurea* spp.

生根结果见表3。雪莲组培苗平均生根率达83%。

表3 雪莲组培苗生根情况

Table 3 Rooting of *Saussurea* spp. tissue culture plantlets

次数 Times	苗总数 Total plantlets	生根苗数 Rooted plantlets	生根率 Rooting rate//%
1	1 045	837	80
2	3 425	2 817	82
3	958	817	85
4	5 095	4 261	84
5	1 448	1 203	83
6	2 860	2 423	85
7	1 331	1 116	84

**2.5 炼苗、移栽** 将已经生根的雪莲组培苗移栽到温室苗床,苗床上铺有山土,山土表面铺4~5 cm厚洗净的蛭石或珍珠岩,种植密度为300~400株/m<sup>2</sup>。炼苗第1周要覆盖塑料薄膜;第2周逐渐增加透气,以便使组培苗尽快适应外部

**2.4 生根** 雪莲组培苗剥单苗接种于培养基生根(图1D)。

表2 继代培养第25天雪莲丛生芽发生情况

Table 2 The cluster buds of *Saussurea* spp. subcultured for 25 d

序号 No.	第1丛 1st cluster	第2丛 2nd cluster	第3丛 3rd cluster	第4丛 4th cluster	第5丛 5th cluster	每瓶总苗数 Total plantlets per flask
第1瓶 1st flask	3	7	10	6		26
第2瓶 2nd flask	8	11	15	13	6	53
第3瓶 3rd flask	16	11	17	9	13	66
第4瓶 4th flask	20	13	9	12	7	61
第5瓶 5th flask	13	9	11	4		37

环境;第3周去掉塑料薄膜,室温保持在25~30℃(图1E)。

炼苗40~50 d就可以移栽,上天山时间以6月中旬为好,上山后可以生长3个月,以便幼苗越冬,第2年返青率高。移栽3年后部分天山雪莲开始开花,见图1F。

### 3 结论与讨论

(1)在雪莲组培苗继代培养的过程中,发现长期在MS+2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA培养基上丛生继代繁殖会造成分裂素积累现象,主要表现在继代组培苗生长缓慢、死亡、黄叶、黑根等不良现象。这给后期生根移栽带来不便。当出现这种情况时,要适当调节培养基的激素配比,以便在出苗时得到适宜生根的优良组培苗。为了使雪莲组培苗能够连续多次继代培养繁殖,笔者进行了激素调节。MS+0.5 mg/L BA+2.0 mg/L NAA和MS+0.5 mg/L BA+0.01 mg/L NAA交替使用,可得到令人满意效果。

(下转第2746页)

PUC18。应用目标片段的引物,以白色菌落为模板,能够扩增到目标片段(1 400 bp)的条带(图 3),条带清晰且没有基因组、

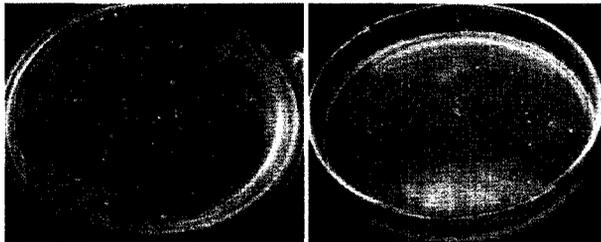


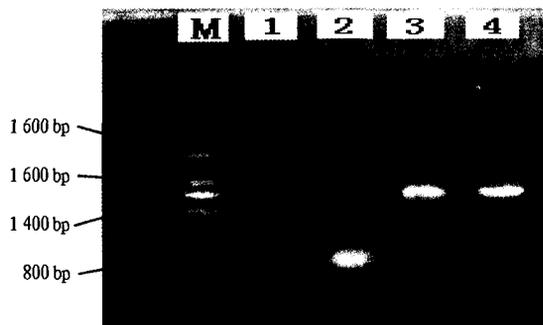
图 1 转化细菌的蓝白斑筛选结果

Fig.1 The screening results of transformed bacteria by blue-white spot assay



图 2 白斑细菌提取质粒

Fig.2 Plasmid from white spot bacteria



注:1-质粒;2-阴性对照;3,4-目标片段。

Note:1-plasmid;2-negative control;3,4-target fragments.

图 3 质粒 PCR 鉴定结果

Fig.3 PCR amplification results of plasmid

RNA 污染,表明这 2 种方法获得的白色菌斑为带有目标片段的阳性菌斑。

### 3 小结与讨论

电穿孔技术是一种转化方法,转化效率可以高达  $10^9 \sim 10^{10}$  cfu/ $\mu$ g。然而很多实验室没有电穿孔技术所需要的特殊仪器。自 20 世纪 70 年代早期科恩成功利用氯化钙法将质粒重组进入大肠杆菌的细胞内开始<sup>[4]</sup>,大肠杆菌感受态细胞转化质粒的系统一直被广泛应用。然而常规的  $\text{CaCl}_2$  溶液制备感受态细胞方法繁琐,对试剂纯度和试验用器皿洁净度要求很高,但是转化效率低,感受态细胞不易保存,通常现用现制备。目前也有商品化的感受态细胞制备试剂盒,但价格比较贵。而该改进方法制备感受态细胞操作简便,转化效率可高达  $10^5 \sim 10^6$ ,并且  $-70^\circ\text{C}$  保存可达 1 年。该方法是适于实验室操作的高效感受态细胞制备方法。

运用该方法进行感受态的制作过程中,一个关键的因素就是大肠杆菌的细胞密度  $OD_{600}$  值应为 0.3~0.4。若离心后出现很多黑色沉淀,即细菌碎片,则表明有多量细菌死亡,此时细菌状态不好,但若只有少量黑色沉淀或对转化效率要求不高,亦可继续进行。吴海燕等对不同转速下  $OD_{600}$  值达到 0.3~0.4 所需的时间段进行研究,认为转速为 220 r/min 时所需的时间段为 2.85~3.35 h<sup>[5]</sup>。影响转化效率的另一个重要的因素是  $\text{CaCl}_2$  浓度。一般认为,50~100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  都能使用。但涂知明等认为以 75 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶于 TB 溶液中为佳<sup>[6]</sup>。该研究加入 50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ -15% 甘油混合溶液后转化效率比常规方法提高了 30 倍左右。造成这一结果的机理仍有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王景雪,孙毅.农杆菌介导的植物基因转化研究进展[J].生物技术通报,1999(1):7-13.
- [2] J.萨姆布鲁克,D.W.拉塞尔.分子克隆实验指南[M].3版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2002:94-97.
- [3] 王珍,方宣钧.植物总 DNA 分离[J].分子植物育种,2003,1(2):281-288.
- [4] CHEN X, GUO P, XIE Z, et al. A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids[J]. Antonie VanLeeuwenhoek, 2001, 80(3/4):297-300.
- [5] 吴海燕,谢应柱,何雄斌,等.快速准确制备大肠杆菌高效感受态细胞中有关  $OD_{600}$  值的探讨[J].湘南学院学报:医学版,2006(8)3:13-15.
- [6] 涂知明,陈明洁,何光源.三种大肠杆菌高效感受态的制备及转化[J].华中科技大学学报:自然科学版,2006,34(4):112-115.

(上接第 2744 页)

(2)在雪莲组培苗规模化生产过程中,组培苗生根显得尤为重要。生根率将直接影响到下一步炼苗的成活率,最终影响组培苗成本。生根前 2 代可以将雪莲组培苗继代培养在空白的 MS 培养基上,经过 40~50 d 的培养,可以释放积累的激素,有利于生根,提高根的质量,最终提高成活率。

(3)用烧开的自来水代替蒸馏水,用琼脂条代替琼脂粉可以大大降低成本,而且培养效果不受影响。

### 参考文献

- [1] 吴征镒.全国中草药汇编[M].北京:人民卫生出版社,1997:785-761.

- [2] 中国药材公司.中国中药资源丛书[M].北京:科学出版社,1994.
- [3] 赵德修.高山宝药——雪莲花[J].植物杂志,1999(5):8.
- [4] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [5] 连文球,肖培根.雪莲花原植物的调查整理[J].中药材,1985,8(6):19.
- [6] 陈发菊,杨映根,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.
- [7] 赵德修,赵丽丽.雪莲花的研究进展[J].中草药,1996,27(6):372-374.
- [8] 国家环境保护局,中国科学院植物研究所.中国珍稀濒危保护植物名录(第 1 册)[M].北京:科学出版社,1987.
- [9] 朴日子,曹后南,陈燕秋,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):117-121.