

文章编号: 1001-4675(2008)02-0248-06

新疆雪莲体外直接器官发生的快繁研究

傅晓春, 王晓军, 赵民安, 刘敏, 赵海清, 贾莉芳

(中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要:以新疆雪莲无菌苗的下胚轴、子叶、真叶和根为外植体,在MS基本培养基上培养,探索新疆雪莲体外直接器官发生的快繁途径。结果表明:新疆雪莲不同外植体直接再生不定芽的效果不同,以真叶为外植体,直接再生芽频率最高,在MS+6-BA1.0 mg/L(单位下同)+NAA0.1+2,4-D0.1上,30 d芽诱导率可达66%;在MS+6-BA0.5+NAA0.05上,芽的增殖生长效果好;在1/2MS+NAA0.1上,25 d内生根率达84.7%;在珍珠岩:腐叶土为1:3的基质中炼苗,成活率达89.1%。

关键词:新疆雪莲 *Saussurea involucrata*; 直接器官发生; 无菌苗; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)为菊科凤毛菊属多年生草本植物,主要分布于海拔3 500~4 000 m的高寒地带^[1],具有多种药效^[2,3],是一种稀有名贵的中药材。由于雪莲生境恶劣,生长缓慢,加上长期掠夺式的采挖,野生资源已近告罄^[4,5]。雪莲3~5年才能开花结果,每年8~9月种子成熟,而7~8月则是盗采雪莲的高峰时期,流入市场的新疆雪莲种子成熟度低,数量少,大规模人工栽培存在困难。因此,人工繁育新疆雪莲只能靠组织培养方式。现有新疆雪莲再生途径大都是器官发生途径,其中以间接器官发生途径居多^[6~9],该途径繁殖周期长,产生体细胞变异概率高。与其相比较,直接器官发生途径省时,产生变异少。新疆雪莲的器官直接再生途径国内外研究较少^[10,11],本试验分别以新疆雪莲无菌苗的下胚轴、子叶、真叶和根为材料,研究了外植体类型和不同激素组合对其器官直接发生的影响,首次建立了重复性较好的新疆雪莲器官快速高效直接再生系统,为生产应用和进一步的遗传转化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取购自新疆和静县的雪莲种子,取其萌发的无菌苗的子叶、真叶、下胚轴和根为外植体。

1.2 种子的灭菌

选取颗粒饱满的雪莲种子用洗涤剂浸泡 10

min,然后用纱布袋裹好,自来水冲洗 1.5 h,75%的酒精浸泡 50 s,无菌水冲洗 3 次,然后转入 0.2%的氯化汞溶液中灭菌 15 min,无菌水冲洗 3~4 次,最后用无菌水浸泡 3 min。

1.3 不定芽的诱导

种子消毒后接种到无激素 1/2MS 基本培养基中,5 d 左右开始萌发。切取生长 20 d 无菌苗的下胚轴(长 0.5~1 cm)、子叶(0.5 cm²)、真叶(0.5 cm²)和根(长 1~2 cm),分别接种于以 MS 为基本培养基,附加 6-BA0.5~2.0, NAA0~0.2, 2,4-D0~0.5 的分化培养基上。每个处理 10 瓶,30 d 后统计实验结果,诱导出的芽以肉眼可清晰分辨为准。

培养基蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂 7 g/L,灭菌前 pH 调至 5.85~5.90 之间。培养温度 25℃,光照 16 h/d,光照强度 2 500 lx。

1.4 丛生芽的增殖和复壮

将诱导产生的不定芽切下进行固体继代培养,每 15~20 d 继代一次,培养温度 22℃,光照 16 h/d,光照强度 2 500 lx。

1.5 生根培养

不定芽长至 3~4 cm 时,将其切下转入生根培养基中诱导生根。生根培养以 1/2MS 为基本培养基,附加激素 NAA, IBA, 蔗糖浓度 15 g/L,培养温度 25℃,光照 16 h/d,光强增加到 3 500 lx。

1.6 移栽及管理

待不定芽长出白色 2 cm 左右壮根后,在温度

收稿日期: 2007-02-14; 修订日期: 2007-03-23

基金项目: 中国科学院西部行动高新技术项目; 新疆雪莲规模化组培快繁技术研究(KGCX2-SW-506)

作者简介: 傅晓春(1980-),男,硕士研究生,主要从事新疆雪莲快繁技术的研究, E-mail: skystarlight@126.com

通讯作者: 王晓军, E-mail: lhskj@ms.xjb.ac.cn

20℃,空气湿度 90% 的环境中开瓶炼苗 3 d,洗净琼脂,在 1/1 000 多菌灵中浸泡 20 min 后,移栽入珍珠岩与园土 1:3 的培养介质中,在温度 23℃,空气湿度 70% 的环境中炼苗。

2 结果与分析

2.1 新疆雪莲不同部位外植体不定芽的直接诱导

2.1.1 激素对不定芽直接诱导的影响 不同激素不同水平对新疆雪莲不同部位外植体的芽诱导率有一定差异(表 1~2)。2,4-D 与 6-BA 组合时,随着 6-BA 浓度升高,芽诱导率也随之上升,2,4-D 为 0.1,6-BA 为 1.0~2.0 时,芽诱导率高;2,4-D 为 0.3~0.5 时,大部分外植体形成愈伤,只有极少

数有芽发生。NAA 与 6-BA 组合时,NAA 为 0.05~0.1,6-BA 为 1.0~2.0 时,芽诱导率高。

选取芽诱导率较高的几种激素组合进行 3 因素实验发现,2,4-D 和 NAA 对芽诱导存在协同效应,当低浓度的 2,4-D 和 NAA 同时存在与 6-BA 组合时,芽诱导率明显高于其单独与 6-BA 组合(表 2)。故从培养成本、芽诱导率等方面综合考虑,选择 MS+6-BA1.0+NAA0.1+2,4-D0.1 作为新疆雪莲下胚轴、子叶和真叶直接诱导芽的最适培养基,选择 MS+6-BA2.0+NAA0.1+2,4-D0.1 作为新疆雪莲根的最佳出芽培养基。

2.1.2 外植体类型对不定芽直接诱导的影响 新疆雪莲不同部位外植体的芽诱导率有一定的差异

表 1 不同浓度的 NAA,2,4-D 单独与 6-BA 组合对新疆雪莲不同外植体器官发生的影响(30 d)
Tab.1 Effects of various concentrations of NAA,2,4-D and mixed with 6-BA on organogenesis from different explants of *Saussurea involucrate* Kar. et Kir (30 days)

激素浓度			下胚轴		子 叶		真 叶		根	
6-BA	NAA	2,4-D	NEB	BIR	NEB	BIR	NEB	BIR	NEB	BIR
0.5	0	0.1	9	18	1	2	4	8	0	0
0.5	0	0.3	7	14	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0.5	6	12	0	0	0	0	0	0
0.5	0.05	0	6	12	0	0	0	0	0	0
0.5	0.1	0	4	8	0	0	0	0	0	0
0.5	0.2	0	4	8	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0.1	17	34	4	8	13	26	2	4
1.0	0	0.3	14	28	0	0	4	8	0	0
1.0	0	0.5	12	24	0	0	0	0	0	0
1.0	0.05	0	12	24	0	0	6	12	0	0
1.0	0.1	0	18	36	0	0	6	12	2	4
1.0	0.2	0	10	20	0	0	0	0	0	0
2.0	0	0.1	18	36	6	12	17	34	10	20
2.0	0	0.3	17	34	5	10	10	20	9	18
2.0	0	0.5	12	24	3	6	4	8	4	8
2.0	0.05	0	12	24	2	4	8	16	7	14
2.0	0.1	0	16	32	3	6	6	12	6	12
2.0	0.2	0	7	14	3	6	3	6	2	4

注:NEB 表示诱导出芽的外植体数;BIR 表示芽诱导率

表 2 低浓度 NAA,2,4-D 联合与 6-BA 组合对新疆雪莲不同外植体器官发生的影响(30 d)
Tab.2 ffects of low concentrations of NAA,2,4-D and mixed with 6-BA on organogenesis from different explants of *Saussurea involucrate* Kar. et Kir (30 days)

激素浓度			下胚轴		子 叶		真 叶		根	
6-BA	NAA	2,4-D	NEB	BIR	NEB	BIR	NEB	BIR	NEB	BIR
1.0	0.05	0.1	15	30	7	14	20	40	10	20
1.0	0.1	0.1	22	44	13	26	33	66	15	30
2.0	0.05	0.1	16	32	10	20	22	44	17	34
2.0	0.1	0.1	20	40	13	26	29	58	20	40

注:NEB 表示诱导出芽的外植体数;BIR 表示芽诱导率

(表1,2)。真叶直接诱导出芽的频率最高,达到了66%,明显高于其他3种外植体(图3),且再生的丛生芽比例高,增殖系数高;下胚轴容易被直接诱导出芽,在所有激素组合下都能被诱导一定比率的不定芽直接发生,且再生芽时间短(20 d 出现明显再生芽),但再生的不定芽大部分是单芽(图1),增殖系数较低;子叶的芽诱导率低(图2);根不能被直接诱导出芽,它是先形成愈伤,其后在愈伤上产生大量芽点,最后形成不定芽,属于器官间接发生(图4)。故从芽诱导率,芽诱导数量等方面进行综合评价,真叶为最好的新疆雪莲直接诱导出芽的外植体。

表3 两种激素不同水平组合对新疆雪莲
真叶不定芽增殖和生长的影响

Tab.3 Effect of different combinations of two kinds of hormones on the multiplication and growth of adventitious buds of leaves of *Saussurea involucre* Kar. et Kir

激素组合		平均增殖 倍数	平均株高 /cm	生长情况
BA	NAA			
0.3	0.05	3.2	3.2	健壮,叶直,色绿,基部无愈伤
0.3	0.1	2.2	3.0	健壮,叶直,色绿,基部有少量愈伤
0.3	0.2	1.6	2.3	健壮,叶直,色绿,基部有少量愈伤
0.3	0.5	1.1	1.7	健壮,叶直,色黄绿,基部有大量愈伤
0.5	0.05	5.7	5.4	健壮,叶直,色绿,基部无愈伤
0.5	0.1	5.2	5.1	健壮,叶直,色绿,基部有少量愈伤
0.5	0.2	3.4	4.8	健壮,叶直,色绿,基部有少量愈伤
0.5	0.5	1.7	1.9	健壮,叶直,色黄绿,基部有大量愈伤
1.0	0.05	5.6	4.2	瘦弱,叶细,色黄绿,基部无愈伤
1.0	0.1	6.4	4.1	瘦弱,叶细,色黄绿,基部有少量愈伤
1.0	0.2	4.0	2.5	瘦弱,叶细,色黄绿,基部有少量愈伤
1.0	0.5	2.2	2.1	瘦弱,叶细,色黄绿,基部有大量愈伤
2.0	0.05	6.6	4.3	瘦弱,玻璃化苗多,色黄绿,基部无愈伤
2.0	0.1	6.1	4.4	瘦弱,玻璃化苗多,色黄绿,基部有少量愈伤
2.0	0.2	5.2	3.4	瘦弱,玻璃化苗多,色黄绿,基部有少量愈伤
2.0	0.5	4.5	2.1	瘦弱,玻璃化苗多,色黄绿,基部有大量愈伤

2.2 两种激素不同水平组合对真叶不定芽增殖和生长的影响

将生长旺盛的真叶不定芽切下,转入不同浓度激素组合的增殖培养基上。经过20 d 生长后,随机取样20株,调查不同激素组合对材料分化增殖的影响,结果见表3。

随着6-BA浓度的提高,以及6-BA与NAA浓度比值的提高,增殖率有提高的趋势。但6-BA为1.0~2.0时,继代培养后期,叶片窄细,茎细长,苗畸形,成苗率有下降趋势,而且随着继代次数的增加,部分芽分化的叶出现玻璃化的比率升高。6-BA为0.3~0.5时,叶片宽,叶柄短,茎粗,成苗率较高。NAA为0.5时,在丛生芽基部容易形成大块愈伤,且部分芽分化出的叶颜色发黄,出现早衰。故从增殖率、成苗率、试管苗质量、培养成本等方面进行综合评价,选取MS+6-BA0.5+NAA0.05为新疆雪莲真叶的最适增殖培养基。新疆雪莲真叶不定芽增殖情况如图5所示。

2.3 不同激素种类和水平对试管苗生根的影响

选取长至3~4 cm的健壮增殖苗,切成单芽诱导生根。每处理接种20瓶,每瓶接种5株。7~12 d部分处理根开始萌发,25 d后随机抽样统计生根率及根生长情况(表4)。结果表明,新疆雪莲不易自然生根,NAA诱导其生根的效果较好,在1/2MS中附加NAA0.1的培养基,其生根率最高,达到84.7%,且根生长健壮,根长最长。

表4 不同激素种类和水平对试管苗生根的影响

Tab.4 Effect of different combinations of different kinds of hormones on root germination

激素种类 与水平	调查株 /个	生根率 /%	单株均根 数(条/株)	根长	根生长情况
NAA0.05	60	79.3	7	+++	长势旺,健壮
NAA0.1	54	84.7	9	+++	长势旺,健壮
NAA0.2	60	82.0	13	++	健壮
NAA0.5	51	80.0	16	+	长势弱
IBA0.1	60	6.5	3	+++	健壮
IBA0.5	56	51.5	11	++	一般
IBA1.0	60	43.0	13	+	长势弱
IBA3.0	32	19.7	17	+	长势弱
1/2MS(CK)	50	4	1	+++	健壮

注:“+”表示根最短;“++”表示根较长;“+++”表示根最长

2.4 炼苗及移栽

当试管苗根长至2 cm时,敞开瓶口,在温度20℃,空气湿度70%的环境中炼苗3d,洗净根部的



图1 下胚轴诱导出的不定芽

Fig.1 Adventitious buds induced from hypocotyl explants



图2 子叶诱导出的不定芽

Fig.2 Adventitious buds induced from cotyledon explants



图3 真叶诱导出的不定芽

Fig.3 Adventitious buds induced from leaf explants



图4 根诱导出的不定芽

Fig.4 Adventitious buds induced from root explants



图5 真叶不定芽的增殖

Fig.5 Multiplication of adventitious buds of leaves



图6 生根

Fig.6 Adventitious buds of roots



图7 移栽成活及生长

Fig.7 Survival and growth of transplant

培养基,在 500 ~ 1 000 倍的多菌灵中浸泡 20 min 后,栽入珍珠岩:腐叶土为 1:3 的基质中,移至温室中。前 7 d 覆盖保鲜膜,早晚揭开透气,之后 6 d 逐步将覆膜揭开,使其逐渐适应自然条件下的环境。每 5 ~ 7 d 喷施一次多菌灵,根据盆土干湿度,每 7 ~ 10 d 浇灌 1/4MS 大量元素,30 d 后统计炼苗成活率可达 89.1% (图 6,7)。

3 结论与讨论

植物的器官发生途径有两种再生方式,即器官间接发生方式和器官直接发生方式。器官间接发生需要经过愈伤组织阶段,再诱导愈伤分化才能得到不定芽;器官直接发生方式无愈伤组织产生,直接从外植体产生不定芽。本试验采用器官直接发生方式,以新疆雪莲无菌苗的下胚轴、子叶和真叶为外植体,直接诱导出了大量不定芽。器官直接发生方式与间接发生方式相比,其优势在于缩短了从外植体到获得完整植株的周期,降低了组培成本,同时这一途径的变异频率相对较低,确保了克隆的再生植物的遗传稳定性^[12]。

瓦·古巴诺娃等^[6]报道用新疆雪莲小头状花序作为外植体诱导出愈伤组织,再经过分化处理诱导出不定芽,在无根苗诱导生根的过程中需经过低温处理;武利勤等^[10]直接利用新疆雪莲的胚芽诱导出不定芽,再诱导出不定根;Guo Bin 等^[11]用新疆雪莲无菌苗的叶片经过低温预处理,直接诱导出了不定芽。本实验采用低浓度的 2,4-D 联合低浓度 NAA,与 6-BA 组合,在常温下不需低温处理即可诱导新疆雪莲不同外植体直接出芽,重复性好,再生频率高。

培养基相同的条件下,以真叶为外植体,芽诱导率最高,诱导出的丛生芽数量最多。组培快繁的目的是用最少的材料,在最短的时间获得数量最多的再生植株,以新疆雪莲无菌苗的真叶为外植体,建立器官直接发生方式的快繁体系,为新疆雪莲的快速繁殖提供了一条省时高效的途径。

参考文献 (References):

- [1] 魏岩,谭敦炎,朱建雯. 天山 1 号冰川冻原植被带种子植物区系[J]. 干旱区研究, 1998, 15(1): 49-53. [Wei Yan, Tan Dunyan, Zhu Jianwen. Studies on the flora of seed plants in freezing vegetation zone near Glacier No. 1 in Tianshan Mountain[J]. Arid Zone Research, 1998, 15(1): 49-53.]
- [2] 刘力生,肖显华,张龙弟,等. 雪莲黄酮对癌细胞 DNA 合成的影响[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1985, 21(1): 80-83. [Liu Lisheng, Xiao Xianhua, Zhang Longdi, et al. Effect of the flavonoids from *Saussurea involucrata* on DNA synthesis of cancer cells[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 1985, 21(1): 80-83.]
- [3] Li Guanhai, Liu Fa, Zhao Rongchun. Studies on pharmacological actions of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. ex Max-in [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1980, 15: 368-369.
- [4] 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[M]. 北京: 科学出版社, 1987. [Regulations for Shallow Ground Disposal of Solid Low-and Intermediate-Level Radioactive Wastes, Chinese Academy of Sciences Institute of Botany. China Rarely and Preciously and Endangered Plantname List [M]. Beijing: Sciences Press, 1987.]
- [5] 杨戈,阿布力米提·阿布都卡迪尔. 中国天山山区药用植物资源及其保护与利用[J]. 干旱区研究, 2001, 18(2): 31-37. [Yang Ge, Ablimit·Abdukadir. The resources of medical plants and their protection and utilization in Tianshan Mountains area, China [J]. Arid Zone Research, 2001, 18(2): 31-37.]
- [6] 瓦·古巴诺娃,刘杰龙,石玉瑚. 新疆雪莲的组织培养[J]. 新疆农业科学, 1990(5): 221-222. [Wo Gubanova, Liu Jielong, Shi Yuhu. Tissue culture of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 1990(5): 221-222.]
- [7] 赵德修. 雪莲花组织培养的初步研究[J]. 中草药, 1997, 28(11): 682-684. [Zhao Dexu. Initial studies on tissue culture of Snow Lotus (*Saussurea involucrata*) [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1997, 28(11): 682-684.]
- [8] 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. [Piao Rizi, Cao Hounan, Chen Yannan, et al. Study on the technology of rapid propagation in vitro for *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. [J]. Journal of Agricultural Science Yanbian University, 2003, 25(2): 117.]
- [9] 杨林,覃筱燕. 新疆雪莲的组织培养及植株再生[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2006, 15(1): 26-29. [Yang Lin, Qin Xiaoyan. In vitro tissue culture and plantlet regeneration of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. [J]. Journal of the Central University for Nationalities (Natural Sciences Edition), 2006, 15(1): 26-29.]
- [10] 武利勤,郭顺星,肖培根. 新疆雪莲胚芽的组织培养和植株再生[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(11): 814. [Wu Liqin, Guo Shunxing, Xiao Peigen. Tissue culture and plantlet regeneration from embryo of *Saussurea involucrata* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(11): 814.]
- [11] Guo Bin, Gao Min, Liu Chunzhao. In vitro propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. Plant [J]. Plant Cell Rep, 2006, 26: 261-265.
- [12] 白书农. 植物发育生物学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2003. [Bai Shunong. Plants Developmental Biology [M]. Beijing: Peking University Publishing House, 2003.]

Research on Rapid Micro-propagation Via Direct Organogenesis of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.

FU Xiao-chun, WANG Xiao-jun, ZHAO Min-an, LIU Min, Zhao Hai-qing, JIA Li-fang
(Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

Abstract: This study researches the rapid micro-propagation of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. with adventitious buds induced from hypocotyls, cotyledons, leaves, and roots by applying Murashige-Skoog (MS) as the basic medium. The effects of different kinds of external hormones and explants on the rapid micro-propagation through direct organogenesis are explored. The experimental results show that the efficiencies of the direct organogenesis and budding regeneration are different from different explants, and the direct budding frequency is the highest when leaves are used as the explants. The induced budding ratio can be as high as 66% during 30 days in MS medium supplemented with 6-benzyladenine (6-BA) of 1.0 mg/L and α -naphthalene acetic acid (NAA) of 0.1 mg/L, and in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) of 0.1 mg/L; the budding multiplication is quick and ideal in MS medium supplemented with 6-BA of 0.5 mg/L and NAA of 0.05 mg/L, and the induced rooting ratio can be as high as 84.7% during 25 days. If the sprouts are transplanted into the substrate containing perlite and humus soil (1:3), the survival ratio can be as high as 89.1%.

Key words: *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.; direct organogenesis; rapid micro-propagation.

罗布泊成为我国重要的钾盐生产基地

国土资源部副部长、中国地质调查局局长汪民在2008年2月23日召开的全国地质调查工作会议上说:我国新一轮国土资源大调查开展9年来,新发现矿产地800余处,其中,大型以上60余处;提交的一批新增资源量中,铜 3.2×10^7 t、铅锌 7.8×10^7 t、铁矿石 7.6×10^8 t、钾盐 4.0×10^8 t、磷矿石 8.5×10^8 t,形成若干国家级矿产资源基地雏形,有力拉动了商业性矿产勘查。

据介绍,在这些新发现中,新疆罗布泊钾盐新探获资源量 7.0×10^7 t,总资源量达到 3.5×10^8 t,成为我国重要的钾盐生产基地。西藏驱龙铜矿探获资源量超过 1.0×10^7 t,成为我国第一大铜矿床。长江中下游、晋冀、辽吉等重要成矿区带发现多处隐伏富铁矿,显示深部找矿潜力巨大。沿扬子陆块周缘发现一系列沉积改造的“扬子型”铜锌矿,开辟了新的找矿领域。

汪民说,与此同时,我国基础地质工作程度明显提高,为资源勘查、重大工程建设提供了重要基础资料。地下水资源勘查评价取得重要进展,为国家水资源配置、地质环境整治提供了依据。

王立彬