

新疆雪莲的组织培养及植株再生

杨 林, 覃筱燕

(中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081)

摘 要: 本文通过研究培养基的种类、植物生长调节物质对新疆雪莲愈伤组织诱导、再生苗形成的影响, 结果表明: 在新疆雪莲愈伤组织诱导过程中, NAA 和 6-BA 组合使用比 NAA、6-BA、2,4-D 单独使用更有利于愈伤组织的形成, MS 培养基对新疆雪莲愈伤组织诱导和生长均最为有利; 6,7-V 培养基有利于诱导不定芽的形成; 生长在 $1/2MS + NAA_{0.5}$ 培养基上 90% 以上的不定芽可在 28 天内形成不定根。

关键词: 愈伤组织的形成; 不定芽; 不定根; 再生苗; 新疆雪莲

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8036(2006)01-0026-04

新疆雪莲(*Saussurea involucreata* Kar. et Kir.) 主要分布在 4000m 以上的高原寒带山区, 为国家二级濒危植物, 民间多用于风湿性关节炎、散热除湿、活血通络、抗疲劳等症的治疗。由于新疆雪莲生境特异, 生长缓慢, 人工栽培困难, 加上长期以来对雪莲的粗放型和掠夺性采挖, 使雪莲资源严重匮乏^[1-2], 自然资源难以满足临床日益增长的需要。新疆雪莲组织培养再生植株的成功, 不仅可以保护野生种质资源, 而且为新疆雪莲规模化生产提供了新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

新疆雪莲种子购自新疆和静县。

1.2 无菌苗的获得

筛选颗粒饱满的种子, 表面消毒后接种于无激素的 MS 培养基上, 3d 后开始萌发, 20d 后统计种子萌发率可达 80%。

1.3 培养条件

将无菌苗的幼叶剪成小片或小段接种在培养基上诱导愈伤组织, 将获得的愈伤组织转移到 $MS + NAA_{2.0} + 6-BA_{0.5} +$ 苯丙氨酸 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上进行固体继代培养, 培养温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照培养时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照强度 $1500 \sim 2000\text{ lx}$ 。

1.4 培养基

采用 MS、6,7-V、B₅ 培养基, 另外附加 NAA、6-BA、2,4-D 等不同的植物生长调节物质, 蔗糖用量为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂用量为 $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 培养基在消毒前 pH 值均调至 5.8, 121°C 消毒 20 min。

收稿日期: 2005-11-01

基金项目: 中央民族大学 211 项目资助。

作者简介: 杨林(1972-), 女(汉族), 河南南阳人, 中央民族大学生命与环境科学学院讲师, 主要研究方向: 植物细胞工程。

1.5 统计方法

形成愈伤组织的外植体是指形成了肉眼可见的愈伤组织的外植体,愈伤组织形成频率 = 形成愈伤组织的外植体/接种的未污染的外植体数 100%,所有数据均于外植体接种 1 个月后统计。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节物质对新疆雪莲愈伤组织形成的影响

以生长 40d 的无菌幼苗的叶作为外植体,在附加不同浓度、不同种类生长调节物质的 MS 培养基上进行愈伤组织的诱导,经 14d 后愈伤组织开始形成,30d 后统计愈伤组织发生频率及生长状态,结果(表 1)表明,不同种类的植物生长调节物质及其浓度对新疆雪莲愈伤组织形成的影响不一样, NAA 所诱导的愈伤组织生长状态较好,愈伤组织的形成随各种生长调节物质浓度的高低也呈现出一定的规律性。同时观察到由 2,4-D 诱导出来的愈伤组织呈水渍状,继代培养时生长较慢;由 6-BA 诱导出来的愈伤组织呈墨绿色,质地较硬,继代培养时生长也较慢;NAA 诱导出来的愈伤组织呈黄绿色,质地较疏松,继代培养时生长较好。

表 1 植物生长调节物质对新疆雪莲愈伤组织形成的影响

Tab.1 Effects of plant growth regulators on the callus formation of *Saussurea involucrata*

激素 Hormones	激素浓度 Hormones concentration($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种外植体数 No. of explants	愈伤组织发生频率(%) Frequencies of callus formation(%)	愈伤组织生长状态 growth state of callus
6-BA	0.5	34	29.4%	+
	1.0	30	60.0%	+
	2.0	28	71.7%	++
	3.0	33	90.9%	+++
NAA	0.5	34	50.6%	++
	1.0	32	68.8%	++
	2.0	28	77.1%	++
	3.0	24	86.7%	+++
2,4-D	0.5	34	52.9%	+
	1.0	38	52.6%	++
	2.0	32	68.7%	++
	3.0	38	78.9%	+

注: 1) + 表示愈伤组织生长状况的级别; 2) 基本培养基为 MS 培养基

Note: 1) + stands for the grade of growth state of callus; 2) Basal medium was MS

2.2 培养基种类对新疆雪莲愈伤组织形成的影响

以 MS、6,7-V、 B_5 培养基为基本培养基对新疆雪莲无菌苗的叶进行愈伤组织的诱导,结果(表 2)表明,这三种培养基对无菌苗叶的愈伤组织的诱导不存在显著性的差异,但在 MS 培养基上的愈伤组织生长状态较其他两者为好。其中,MS、 B_5 培养基上诱导出来的愈伤组织均呈黄绿色,质地较疏松,继代培养时生长较好;6,7-V 培养基上诱导出来的愈伤组织呈乳白色,质地较硬,继代培养时生长较慢。

表 2 不同的培养基对新疆雪莲叶愈伤组织形成的影响

Tab.2 Effects of different media on the callus formation of *Saussurea involucrata*

培养基 Media	接种外植体数 No. of explants	愈伤组织发生频率(%) Frequencies of callus formation(%)	愈伤组织生长状态 growth state of callus
MS	42	87.5%	++++
6,7-V	40	90.0%	+++
B_5	49	85.3%	+++

注: 三种培养基中均添加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA

Note: $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA were added in the three media

2.3 再生苗的获得

2.3.1 不定芽的分化 以生长 40 d 的幼苗作外植体分别接种于附加一定浓度的植物生长调节物质(见表 3)MS、6,7-V、B₅ 培养基上,经 14 d 左右愈伤组织开始形成,25 d 左右部分瓶中的愈伤组织上开始形成绿色芽点,34 d 左右不定芽丛大量发生。以形成不定芽的愈伤组织统计,结果(表 3)表明,6,7-V 培养基有利于诱导不定芽的形成。

表 3 不同的培养基对新疆雪莲不定芽形成的影响

Tab.3 Effects of different media on the adventitious bud formation of *Saussurea involucrata*

培养基 Media	愈伤组织的块数 No. of callus	不定芽发生频率(%) Frequencies of bud formation(%)
MS	33	36.4%
6,7-V	35	77.1%
B ₅	40	22.5%

注:三种培养基中均添加 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA

Note: $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA were added in the three media

2.3.2 不定根的分化 将长约 3~8 cm 不定芽分别接种于如下培养基(表 4)上,约 14 d 后,生长在 1/2MS + NAA_{0.5} 培养基上 90% 以上的不定芽可长出 2~5 条、1~3 cm 长的不定根,28 d 后根的长度可达到 10 cm 左右,形成完整的再生植株,生长良好。而生长在其他培养基上的无根苗在 30 d 左右才开始形成少数、长度仅有 1 cm 左右的不定根,生长欠佳。

表 4 培养基对新疆雪莲的不定芽上形成不定根的影响

Tab.4 Effects of different media on the adventitious root formation from adventitious buds of *Saussurea involucrata*

培养基 Media	生根率(%) Frequencies of adventitious root formation(%)	生根个数/个不定芽 Number of adventitious root per bud
MS + NAA _{0.5} + IAA _{0.5}	28.6%	2.00 ± 0.000
1/2MS + NAA _{0.5} + IAA _{0.5}	25.0%	1.50 ± 0.577
1/2MS + NAA _{0.2} + IAA _{0.5}	40.4%	2.00 ± 0.000
1/2MS + NAA _{0.5}	90.3%	4.07 ± 0.372
1/2MS + IAA _{0.5}	48.6%	1.33 ± 0.467

注:所有培养基均添加 0.2% 活性炭;接种的芽数均为 30 个

Note: 0.2% activated charcoal were added in all media; The number of adventitious buds of inoculating was 30.

2.4 试管苗的移栽

将生长在 1/2MS + NAA_{0.5} 培养基上 28 d 后已生根的试管苗,先打开瓶塞炼苗 5 d,然后取出洗净根部残存的培养基,移栽于花盆(将愈伤组织蛭石、泥土、细砂混匀灭菌)内,覆盖塑料薄膜,2 周后揭开薄膜放在室内生长。试管苗移栽成活率达 50%。

3 讨论

在新疆雪莲和水母雪莲的组织培养过程中,发现雪莲愈伤组织存在多态性,不仅表现在外形特征上,更重要的是各种类型愈伤组织再分化能力上有差异^[3-5],有的芽可在愈伤组织上自动发生。作者在实验中发现类似现象,从 6,7-V 培养基上诱导出的愈伤组织质地较硬,不定芽的分化频率较高。

有关新疆雪莲快速繁殖的报道已有数篇报道^[6-7]。瓦·古巴诺娃等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;武利勤等直接利用新疆雪莲的胚芽诱导出不定芽,进一步再诱导出不定根。本实验则是以来源于新疆

雪莲种子的无菌幼苗幼叶为外植体,诱导出大量生长良好的愈伤组织,不经处理即可形成大量的不定芽,同时,在无根苗诱导生根的过程中不需低温处理即可形成大量的不定根。这些实验结果为新疆雪莲的快速繁殖提供了另一条有效途径。

参考文献:

- [1] 李茂寅. 水母雪莲的愈伤组织和黄酮类化合物的形成[J]. 云南植物研究, 2000(22):65.
- [2] 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.
- [3] 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]. 延边大学农学学报, 2003, 25(2):117.
- [4] 关家彦,张淑媛. 天山雪莲浸提液制备工艺的考察. 沈阳药科大学学报[J]. 1995, 12(3):209.
- [5] 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. 华中师范大学学报:自然科学版, 2000, 34(3):331.
- [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.
- [7] 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.

In Vitro Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.

YANG Lin, Qin Xiao-yan

(College of Life and Environmental Sciences, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

Abstract: The combination of NAA and 6-BA was better for the callus induction of *Saussurea involucrata* than single NAA, 6-BA, and 2,4-D. MS medium was most effective for callus induction from leaves; 6,7-V medium was most effective for adventitious buds induction from callus; 90% of the adventitious buds rooted well after they were planted on the 1/2 MS containing $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA for 28 days.

Key words: callus induction; adventitious buds; adventitious roots; plantlet regeneration; *Saussurea involucrata*

[责任编辑:白 玲]

(上接第 24 页)

It contained β -glucosidic bonds by IR analysis. It was composed of Xyl, Ara, Glc, Man, Gal and its molar ratio is: 1.0 : 2.1 : 2.9 : 5.3 : 3.7. It is the first time to isolate SJ₂₁ from leave in *Hippochaerhamnoides* L.

Key words: leave in *Hippochaerhamnoides* L; polysaccharide; isolation purification; composition

[责任编辑:白 玲]