

新疆雪莲组培苗的染色体观察

张蜀敏^{1,2}, 王晓军¹, 陈阳^{1,2} (1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 [目的]为雪莲的组织培养奠定细胞学基础。[方法]以新疆雪莲无菌苗的根部、下胚轴、真叶及种胚为外植体进行组织培养, 观察愈伤组织和不定芽阶段的染色体变异。[结果]4种外植体形成的愈伤组织细胞中有二倍体、少量四倍体、六倍体、非整倍体及其他倍性细胞。以种胚为外植体的愈伤组织中染色体数目异常的频率最高, 但愈伤组织不出芽或出芽量极少, 且芽形态不正常。以根部、下胚轴和真叶为外植体的愈伤组织出芽比例高, 茎尖、根尖细胞染色体大多数为二倍体, 少数为嵌合体, 嵌合体苗中四倍体细胞比例很小。愈伤组织中存在异常的有丝分裂现象, 不定芽中难以发现。[结论]雪莲组织培养中的染色体变异是由激素引起的, 非整倍性的愈伤组织细胞分化能力低。

关键词 新疆雪莲; 染色体; 激素

中图分类号 Q343.2⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)03-00971-02

Observation on the Chromosome in Tissue Culture Seedlings of *Saussurea involucrata*

ZHANG Shu-min et al (Xinjiang Institute of Physical & Chemical Technology, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830000)

Abstract [Objective] The aim of the study was to lay cytological foundation for tissue culture of *Saussurea involucrata*. [Method] With root, lower hypocotyl, leaf and seed embryo of asepsis seedlings of *S. involucrata* as explants, the tissue culture was conducted to observe chromosome variation in callus and adventitious bud stages. [Result] The callus cells formed from 4 kinds of explants had diploid, a few tetraploid, sextuploid, aneuploid and cells with other ploidies. The abnormal rate of chromosome number was highest in the callus with seed embryo as explant, but the callus grew out no bud or very few buds with abnormal bud shape. The budding ratios of callus with root, lower hypocotyl and leaf as explants were high. Most chromosome in cells of stem and root tips were diploid, a few were mixoploid. The tetraploid cell ratio was very small in mixoploid seedlings. Callus had abnormal mitosis, which was difficult to find in adventitious bud. [Conclusion] The chromosome variation in *S. involucrata* tissue culture was induced by hormone and the differentiation ability of callus cells with aneuploid was low.

Key words *Saussurea involucrata*; Chromosome; Hormone

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.) ($2n = 2x = 32$ ^[1]), 菊科凤毛菊属多年生草本植物, 是名贵中药材^[2]。由于雪莲生长环境特异, 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, 导致目前雪莲资源日益匮乏。很多专家学者对其组织培养技术展开了研究, 国内外均有大量报道^[3-5]。染色体变异是组织培养过程中常见的一种变异现象, 其一方面影响了遗传稳定性, 另一方面却成为培育植物新品种的一条途径。笔者首次对新疆雪莲组培过程中的愈伤组织阶段、不定芽阶段进行染色体观察, 探索其组培过程中的染色体变异现象, 以期对雪莲的组织培养奠定一定的细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料 ①无菌苗。雪莲种子来自新疆和静县。用 75% 乙醇消毒种子表面 30 s, 后用 0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒 10 min, 再用 15% H_2O_2 溶液消毒 30 min, 将消毒后的种子用灭菌水漂洗 4~6 次, 播种于 MS 培养基上。10 d 后大量无菌苗发生, 将无菌苗切割成根部、下胚轴、真叶。②种胚。将消毒后的种子经灭菌水浸泡 4 h, 剥去种皮, 得到种胚。

1.2 方法 ①愈伤组织的诱导。将无菌苗的根部、下胚轴、真叶及种胚分别接种到愈伤诱导培养基上诱导愈伤生成。培养基配方为: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L。②不定芽的增殖。将以上诱导产生的不定芽切下进行继代培养, 每 15~20 d 继代一次, 培养基配方为: MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L。③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

培养基配方为: 1/2MS + NAA 0.1 mg/L。

1.3 染色体的鉴定 ①愈伤染色体鉴定。切取愈伤依次置于 4℃ 蒸馏水中 6 h; 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液, 2 h; 卡诺氏固定液(乙醇: 冰乙酸体积为 3:1), 室温, 24 h; 58℃ 下, 1 mol/L HCl, 6 min; 45% 乙酸软化, 2 min; 蒸馏水漂洗; 改良苯酚品红溶液染色, 20 min。压片, 在显微镜下镜检观察并拍照。②茎尖染色体鉴定。与愈伤染色体鉴定步骤相同。③根尖染色体鉴定。切取根尖依次置 0.002 mg/L 8-羟基喹啉溶液, 5 h; 卡诺氏固定液 24 h; 蒸馏水漂洗; 58℃ 1 mg/L HCl, 5 min; 改良苯酚品红, 20 min; 压片, 在显微镜下镜检观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 雪莲愈伤组织细胞染色体数目的观察 无菌苗的根部、下胚轴、真叶及种胚接种到愈伤诱导培养基上, 20 d 后, 愈伤生成。不同外植体愈伤形成率都在 98% 以上。对不同外植体所形成的愈伤组织细胞进行染色体鉴定, 结果发现: 各外植体形成的愈伤组织细胞中, 除正常的二倍体细胞外, 都包括了少量四倍体、六倍体、非整倍体细胞及其他倍性的细胞(图 1)。在 4 种外植体类型中, 以种胚为外植体得到的愈伤组织细胞中二倍体细胞比例最低, 仅为 62%, 其他倍性细胞比例最高, 达 38%, 特别是非整倍体细胞比例最高(25%), 而以根部、下胚轴、真叶为外植体得到的愈伤组织细胞中, 二倍体细胞比例均在 75% 左右, 其他倍性细胞比例在 25% 左右(表 1)。表 1 显示, 以种胚为外植体的愈伤组织中异常染色体数目的细胞比例最高。

2.2 雪莲不定芽茎尖细胞染色体数目的观察 对 4 种外植体诱导的愈伤组织进一步培养一段时间后, 愈伤出芽。其中, 以根部、下胚轴、真叶为外植体诱导的愈伤组织出芽比例高, 芽形态正常, 变异小, 但以种胚为外植体诱导的愈伤组织不出芽或出芽量极少, 且芽形态不正常, 变异高, 难以扩繁,

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 张蜀敏(1982-), 女, 四川南充人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传育种。

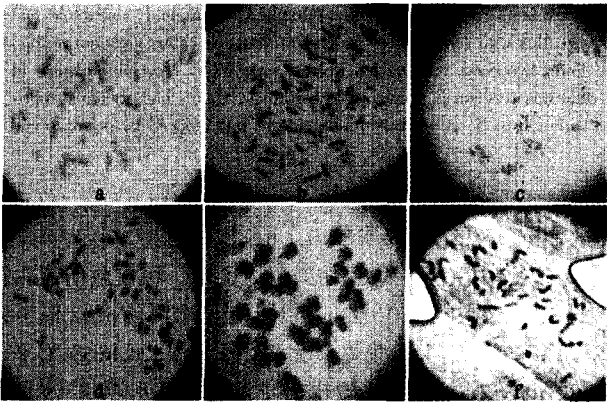
收稿日期 2007-09-11

无法对其进行染色体鉴定。以根部、下胚轴、真叶为外植体的不定芽进行茎尖染色体鉴定,大多数的不定芽为二倍体植株,达 91% 以上,少数为嵌合体植株,未发现完全纯和的四倍体植株。原因可能是不定芽是由表皮单细胞或邻近几个细胞共同发育而来,该试验以根部、下胚轴、真叶为外植体诱导

的愈伤组织中二倍体细胞比例高达 75%,四倍体细胞比例低至 25% 左右,因此不同倍性不定芽发生的概率表现为:二倍体不定芽>嵌合体不定芽>四倍体不定芽。另外,在这些嵌合体植株中,二倍体细胞比例保持在 85% 左右,四倍体细胞比例在 11% 左右(表 2),六倍体、八倍体及非整倍体细胞极少。

表 1 雪莲愈伤组织中染色体倍性的变化
Table 1 Changes of chromosome ploidy in callus of Saussurea involucrata

外植体类型 Explant type	观察细胞总数//个 Total cells observed	二倍体细胞比例//% Proportion of diploid cells	四倍体细胞比例//% Proportion of tetraploid cells	非整倍体细胞比例//% Proportion of aneuploid cells	高倍体细胞比例//% Proportion of more polyploid cells
根部 Root	200	75	9	14	2
下胚轴 Lower hypocotyl	200	75	9	15	1
真叶 leaf	200	72	10	15	3
种胚 Embryo	200	62	11	25	2



注:a:2n=32;b:4n=64;c:6n=96;d:2n=37;e:2n=35;f:2n=30;图片皆是在 10×100 的放大倍数下拍摄。

Note: All above photographs were screened under 10×100 magnifier.

图 1 雪莲愈伤组织中不同倍性细胞的染色体

Fig. 1 Chromosome in different ploidy cell in callus of Saussurea involucrata

2.3 雪莲不定芽根尖细胞染色体数目的观察 以根部、下胚轴、真叶为外植体得到的不定芽大量扩繁,然后进行生根,对根尖细胞进行染色体鉴定,二倍体苗占大多数,少数为嵌合体苗,且发现嵌合体苗比例与四倍体细胞比例与茎尖染色体检测结果相比基本保持一致,无明显上升或下降趋势。嵌合体苗中,六倍体、八倍体及非整倍体细胞极少见(表 2)。

2.4 雪莲细胞有丝分裂行为的观察 观察发现有染色体桥、染色体落后、微核等异常有丝分裂现象。这些异常有丝分裂行为主要存在于愈伤组织细胞(特别是以种胚为外植体诱导的愈伤组织细胞出现的频率最高),而在不定芽茎尖、根尖细胞中难以发现。

3 讨论

3.1 雪莲愈伤组织细胞中染色体数目异常的分析 一般认为,植物组织培养过程中,染色体数目的变异现象普遍存在^[6]。并且生长素对于染色体数目的变异起了重要作用,其中尤以 2,4-D、NAA 对其影响最为显著,例如在伊贝母^[6]、大

表 2 雪莲不定芽茎尖及芽根尖中染色体倍性的变化

Table 2 Changes of chromosome ploidy in shoot-tip of adventitious buds and in root-tip of bud of Saussurea involucrata

外植体类型 Explant type		二倍体苗比例//% Proportion of diploid seedlings	嵌合体苗比例//% Proportion of mixoploid seedlings	嵌合体苗中不同倍性细胞的比例 Different ploidy cell in mixoploid seedlings	
				二倍体细胞比例//% Proportion of diploid cells	四倍体细胞比例//% Proportion of tetraploid cells
				87	13
芽茎尖 Shoot-tip of bud	根部 Root	91	9		
	下胚轴 Lower hypocotyl	94	6	90	10
	真叶 leaf	93	7	89	11
	根部 Root	90	10	89	11
芽根尖 Root-tip of bud	下胚轴 Lower hypocotyl	93	7	86	14
	真叶 leaf	92	8	88	12

注:观察不定芽均为 50 株。

Note: Fifty plants were observed for adventitious buds.

麦^[7]、马铃薯^[8]等植物中,2,4-D、NAA 都能导致愈伤染色体数目变异,且效果表现为 2,4-D>NAA。前人研究认为,导致染色体数目变异的原因之一可能是在离体培养条件下,外源

激素远高于植物体内正常的激素水平,这必然对细胞某些代谢过程产生干扰或抑制效应,使细胞分化不能正常进行,出
(下转第 987 页)

特性有待进一步研究。

参考文献

[1] 景士西. 园艺植物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 220 - 230.

244 - 248.

[2] 包满珠. 园林植物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 139 - 159.

[3] 汪隆植, 何启伟. 中国萝卜[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2005.

(上接第 972 页)

现有有丝分裂的异常, 导致各种倍性细胞的产生^[5]。因此, 该试验中愈伤组织细胞出现的明显的染色体数目变异现象, 与愈伤诱导培养基中 2,4-D、NAA 的作用密不可分。

以种胚为外植体诱导得到的愈伤组织细胞中, 染色体数目的变异频率最高, 可能是由于种胚具有更强的分化潜能, 在激素的作用下, 细胞更容易发生各种分化变异。同时也说明雪莲不同外植体对激素的敏感性不同, 导致愈伤组织细胞中染色体变异程度不同。在该试验中, 以种胚为外植体的愈伤组织细胞染色体变异频率高, 但难以得到分化的不定芽, 针对种胚的这一特性, 一方面, 可通过改变试验条件, 特别是激素配比, 进一步提高愈伤组织中各种染色体数目的细胞, 如果能将这些细胞游离, 就能获得各种染色体数目变异的无性系^[8], 这对于染色体的研究及丰富雪莲遗传多样性都有重要意义。另一方面, 一些植物分子生物学试验需要结合组织培养, 由于分子水平上的试验, 要求材料具有稳定的染色体状态, 所以在以雪莲为对象的分子生物学试验上, 应尽量避免采用种胚为材料, 以保证染色体的稳定性。

3.2 雪莲不定芽茎尖、根尖细胞中染色体数目异常的分析

在该试验中, 虽然以种胚为外植体得到的愈伤组织中, 染色体数目变异的细胞比例高(非整倍体细胞比例高), 但其愈伤组织却难以分化出芽。而以根部、真叶、下胚轴为外植体得到的愈伤组织中, 染色体数目变异的细胞比例低, 但其愈伤组织却大量出芽。这证实了愈伤组织得以分化的前提是染色体的整倍性^[6], 对于雪莲而言, 愈伤组织中变异的细胞, 特别是非整倍性的细胞比例越高, 愈伤组织越难分化。前人的研究也证实了这一结论, 王伦山^[6]在对伊贝母的研究中发现, NAA + KT 的组合中, 由于非整倍性细胞的比例低, 使得愈伤组织分化的能力高; Ziauddin^[7]对大麦的研究进一步支持了这一观点, 正常的芽不可能来自于异常的细胞。

不定芽是由表皮单细胞或邻近几个细胞共同发育而来, 在嵌合体不定芽中难以发现非整倍性的细胞, 进一步说明了非整倍性细胞分化能力低, 难以分化出不定芽。可通过调整培养基配方, 特别是调整各种激素配比, 达到提高愈伤组织中整倍体细胞比例, 降低非整倍体细胞比例的目的, 从而提高愈伤组织的分化潜能。

3.3 雪莲细胞有丝分裂行为的分析 有文献报道, 愈伤组织中存在有丝分裂异常的现象, 如染色体桥、染色体落后、微核现象等。这些异常的有丝分裂现象同样存在于雪莲的愈伤组织中。外源激素对这些异常的有丝分裂现象影响很大, 如 A. Ziauddin^[7]对大麦的研究指出, 外源激素导致大麦愈伤组织细胞产生异常的有丝分裂行为, 其表现为 NAA > 2,4-D。这些异常的有丝分裂行为是导致染色体数目变异的途径之一。胡含等^[9]认为, 离体培养容易引起植物体细胞的核内有

丝分裂、核融合、多极有丝分裂以及染色体断裂等现象。而这些有丝分裂的异常过程, 是产生染色体加倍、混倍体以及染色体变异的各种新类型的重要原因; Staesh^[10]也认为, 染色体落后、纺锤体不分离可导致形成染色体数目低的细胞核; 总之, 针对雪莲愈伤组织中出现的有丝分裂异常的现象, 可以认为是外源激素影响了植物正常的生理生化过程, 从而干扰了正常有丝分裂过程, 导致变异的有丝分裂行为产生, 变异的有丝分裂行为进一步促使了不同染色体数目的细胞核形成, 但具体的作用机制还需要进一步探讨。另外, 该试验以种胚为外植体得到的愈伤组织细胞中, 染色体数目变异的细胞比例最高, 同时异常的有丝分裂行为出现的频率也是最高, 这也与上述的观点相吻合, 即异常有丝分裂行为是导致异常的染色体数目途径之一。

4 小结

该试验中, 笔者观察了从雪莲愈伤组织到不定芽根尖的染色体变化, 根据试验结果, 虽然最终得到的组培苗中包含有少量的嵌合体植株, 但这些嵌合体植株中的四倍体细胞比例很低。由于二倍体细胞较四倍体细胞分裂速度快, 若四倍体细胞不占到绝对比例, 则最终会在长期的生长过程中被二倍体细胞所“淹没”, 嵌合体植株最终变为二倍体植株^[11]。因此, 组培苗中少量的嵌合体植株是可以忽略, 从而认为该组织培养的配方能保证雪莲组培苗染色体的稳定性, 有利于对雪莲做进一步的研究分析。另外, 优化激素配比、通过组织培养途径得到多倍体植株多有报道。并且该途径较之采用秋水仙素诱导法, 能显著降低嵌合体的比例, 得到大量纯合的多倍体植株。可以进一步调整激素比例, 尝试通过组织培养途径得到多倍体雪莲。

参考文献

- [1] 马兴华, 覃若林, 刑文斌. 新疆某些药用植物的染色体观察[J]. 植物分类学报, 1984, 22(3): 243 - 249.
- [2] 陈玉珍, 李凤兰. 药用资源植物雪莲化学成分及药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(3): 1 - 4.
- [3] 杨林, 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.
- [4] 赵德修. 雪莲花组织培养的初步研究[J]. 中草药, 1997, 28(11): 682 - 684.
- [5] BIN GUO, MIN GAO, CHUNZHAO LIU. In vitro propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir[J]. Plant Cell Reports, 2006, 26(3): 261 - 265.
- [6] 王伦山, 王亚馥, 杨汉民, 等. 不同激素对伊贝母组织培养中染色体不稳定性的研究[J]. 西北植物学报, 1987, 7(4): 226 - 234.
- [7] ZIAUDDIN A, KASHA K J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*) II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants[J]. Euphytica, 1990, 48: 279 - 286.
- [8] 王清, 王蒂, 戴朝曦, 等. 茶乙酸、2,4-D 对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 1997, 32(4): 304 - 307.
- [9] 胡含, 邵子英, 贾双娥. 小麦花粉愈伤组织植株体细胞染色体的变异[J]. 遗传学报, 1978, 5(1): 23 - 29.
- [10] SATYESH CHANDRA ROY. Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *A. Cepa*[J]. Protoplasma, 1980, 102: 171 - 176.
- [11] 匡全, 梁国鲁. 秋水仙素诱导多倍体[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 157 - 158.