

水母雪莲两种再生系统的建立

陈亚琼^{1,2}, 金治平¹, 赵德修^{1,①}, 李名扬²

(1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093; 2. 西南农业大学农业生物技术中心, 重庆 400716)

Establish of two kinds of regeneration system on *Saussurea medusa* Maxim. CHEN Ya-qiong^{1,2}, JIN Zhi-ping¹, ZHAO De-xiu^{1,①}, LI Ming-yang² (1. Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 2. The Center of Agricultural Biotechnology, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(4): 57-58

Abstract: Two kinds of regeneration system on *Saussurea medusa* Maxim. have been established. The shoots can be induced from cotyledons, leaf segments and somatic embryos at 25°C. The regeneration system by organic have advantages such as shorter period, higher efficiency, better synchronism and bigger average number of shoot than the others. The content of total flavonoids in shoots is 4%, which is 3-4 times of it in wild type.

关键词: 水母雪莲; 再生; 总黄酮

Key words: *Saussurea medusa* Maxim.; regeneration; flavonoids

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)04-0057-02

雪莲具有清热解毒、强阳补血、抗炎镇痛等众多疗效,是汉、藏、蒙等多个民族传统使用的名贵植物药材,近年来又发掘出延缓衰老、抗肿瘤、抗辐射^[1]等效用,但已被列为国家二级濒危植物,资源日渐匮乏使雪莲的单方和复方产品难以满足市场需要。目前仅新疆雪莲^[2]和西藏棉头雪莲^[3]有再生成功的报道,但缺乏不同再生系统特征的比较和再生苗中总黄酮含量变化的描述。因此本文尝试了水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim.)的组培再生研究,以期水母雪莲总黄酮的人工生产、突变体筛选、外源基因的遗传转化和种质保存等工作提供稳定的无性繁殖实验体系。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

水母雪莲的全草干品于2001年10月购自甘肃省肃南县,由中国科学院植物研究所陈艺林先生鉴定。

1.2 培养基与培养条件

基本培养基MS,其他培养基为:①诱导体细胞胚胎发生培养基(MSS)为MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+GA₃ 2.0 mg/L;②诱导子叶出苗培养基(MSOC)为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+Gly 20~50 mg/L;③诱导叶片出苗培养基(MSOL)为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Gly 20~50 mg/L;④诱导丛生苗生根培养基(MSR)为1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L+0.2%活性炭;⑤诱导愈伤组织培养基(MSC)为MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L;⑥再生苗保持培养基(MSK)为MS+6-BA(1.0~1.5 g/L)+NAA(0.5 mg/L)+0.2%活性炭+KCl 10 mg/L。

培养于25°C、光强2000 lx条件下,光照周期根据不同培养时期确定。

1.3 培养方法

经5.0 mg/L GA₃预处理的种子常规消毒后置于无激素的1/2MS培养基上,连续光照。萌发后3 d的子叶切成0.5 cm²,置于诱导愈伤组织培养基(MSC)上,暗培养5~10 d。挑选初生愈伤组织培养于诱导体细胞胚胎发生培养基(MSS)上,每天光照16 h,暗培养8 h,25 d更换培养基。进行器官发生再生时,将子叶(带0.5 cm子叶柄)接种于诱导子叶出苗培养基(MSOC)上,或取新发叶片切段(0.5 cm²)接种于诱导叶片出苗培养基(MSOL)上诱导丛生苗。继代时,丛生苗分开并插于再生苗保持培养基(MSK)中,每天光照16 h,暗培养8 h,每25 d继代1次,可以长期保存丛生苗。高1.0~1.5 cm丛生苗用诱导丛生苗生根培养基(MSR)诱导生根,每天光照14 h,暗培养10 h。将生根后的再生苗于组培室自然光下炼苗3~5 d,洗净根部的培养基,移栽到育苗杯的珍珠岩中,灌足清水并以薄膜覆盖,20°C自然光下生长,1月后测定再生苗的移栽成活率。

1.4 水母雪莲试管苗总黄酮含量测定

收获已继代25 d的再生苗全株,于65°C烘干,研磨,称取0.5 g干粉用10 mL 60%乙醇于75°C提取4~5 h,再以60%乙醇定容至10 mL待用。提取液用紫外分光光度法^[4],测定波长510 nm的吸光值,利用标准品的回归方程 $C = 0.0959A - 0.00540$ ($r = 0.999$; A 为吸光度, $1.29 > A > 0.056$; C 为总黄酮浓度(mg/mL),线性范围0.1184~0.7104 mg/mL),计算样品中总黄酮的百分含量(干重)。

收稿日期: 2003-06-05

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目(KSCXI-09)

作者简介: 陈亚琼(1975-),女,重庆人,硕士研究生,专业方向为细胞生物学,现为中国科学院昆明植物研究所在读博士生。

① 通讯作者

2 结果与分析

2.1 种子萌发条件的比较

水母雪莲种子消毒7~10d后陆续发芽,发芽率达78%。用GA₃浸泡能解除水母雪莲种子的休眠状态,缩短萌发时间和提高发芽率(见表1),但5.0 mg/L GA₃预处理时间以16 h较佳,短于8 h效果不明显,而超过24 h则易诱导畸形芽。

表1 不同GA₃(5.0 mg/L)预处理时间对水母雪莲种子萌发的影响
Table 1 Effects of different time of GA₃(5.0 mg/L) pretreatment on germination of *Saussurea medusa* Maxim. seeds

预处理时间(h) Time of pretreatment	萌发时间(d) Time of germination	萌发率(%) Germination rate	子叶正常率(%) Percentage of normal cotyledon
0	7-10	70-80	90
8	6-10	71-82	90
16	2-4	80-91	84
24	4-5	66.80	61
30	8-16	32-50	23

表3 水母雪莲2种再生系统的比较¹⁾

Table 3 The comparison between two kinds of regeneration system from *Saussurea medusa* Maxim.¹⁾

再生系统 Regeneration system	再生周期 Regeneration period (d)	成苗率 Percentage of regeneration shoot (%)	平均成苗数 Average number of shoot	畸形苗频率 Percentage of abnormal shoot (%)	均匀度 Equitability	同步性 Synchronism
体细胞胚胎发生系统 System of somatic embryos	30~40	70~85	5~18	8~16	-	-
器官发生系统 System of organ genesis	子叶 cotyledon	5~10	85~95	15~30	+	+++
	叶片 leaf	10~15	90~93	20~40	++	++

¹⁾ -: 差 bad; +: 较好 good; ++: 好 better; +++: 很好 best.

2.3 丛生苗诱导生根和移栽

丛生苗培养于诱导丛生苗生根培养基(MSR)中,10 d后生根,生根率达100%,添加GA₃会使最早出根时间延迟到15 d,但是促进形成更多的侧根和根毛。实验说明水母雪莲根的形成需要NAA,而且GA₃对维持根的正常形态是必要的。如保持弱酸性砂质土的良好通透性和10℃左右的昼夜温差,可使水母雪莲再生苗移栽成活率达90%。

2.4 试管苗总黄酮含量分析

经测定水母雪莲再生苗中总黄酮含量约为4.0%,高于本研究室所保存水母雪莲高产黄酮细胞系的最高含量(3.2%)^[5],并远高于野生水母雪莲干品(0.6%)的含量。可能由于在恒温 and 养分丰富的人工环境下,水母雪莲的再生植株能够很快完成营养器官的完全分化和充分生长,从而迅速进入次生代谢产物的大量合成和积累期,这与其愈伤组织的总黄酮含量与生长量呈正相关^[6]的现象相一致。由于总黄

2.2 不同再生系统的比较

试验结果表明,在中浓度的6-BA与低浓度的NAA组合的条件下,水母雪莲器官发生系统的成苗率均较高(表2)。比较2种再生系统(表3),可见体细胞胚胎发生系统的畸形苗频率最低,而器官发生系统具有周期短、均匀度高、同步性好、平均成苗数高等优势。但由于子叶出苗的时间更短、同步性更好,叶片上的平均成苗频率则比子叶多5~10株。

表2 6-BA和NAA浓度组合对子叶和叶片器官发生的影响¹⁾
Table 2 Effects of content of 6-BA and NAA on organ genesis from cotyledon and leave of *Saussurea medusa* Maxim.¹⁾

激素浓度 Photohormone(mg/L)		I	II	激素浓度 Photohormone(mg/L)		I	II
6-BA	NAA			6-BA	NAA		
1	0.00	-	-	3	0.05	+	☆*
1	0.01	40	☆	3	0.50	+	☆*
1	0.05	35	80	3	0.10	+	+
1	0.20	51	95	4	0.10	-	*
2	0.01	90	60	4	0.50	-	*
2	0.05	91	45	4	1.00	-	-

¹⁾ I: 子叶成苗率 percentage of regeneration from cotyledon (%); II: 叶片成苗率 percentage of regeneration from leaves; -: 无分化 no differentiation; +: 丛生苗愈伤化 callus shoots; *: 丛生苗玻璃化 vitrification shoots; ☆: 畸形苗 deformity shoots.

酮含量高、操作简单、设备要求低并且增值倍数高,水母雪莲的再生苗也是继水母雪莲高产黄酮细胞系以后又1种获得天然雪莲黄酮的生物资源,具有巨大的潜在市场价值。

参考文献:

- [1] 王沛,杨继红,王雁军. 雪莲对正常及辐射损伤小鼠细胞功能的影响[J]. 中国微生态杂志, 1998, 10(1):32-33.
- [2] 瓦·古巴诺娃,刘杰龙,王玉瑚. 新疆雪莲的组织培养[J]. 新疆农业科学, 1990, (5):221-222.
- [3] 罗明,瓦·古巴诺娃,刘杰龙. 西藏棉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.
- [4] 关家彦,王玮文,马慕提,等. 天山雪莲浸提液制备工艺的考察[J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(3):209-210.
- [5] 赵德修,汪沂,赵敬芳. 不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮形成的影响[J]. 生物工程学报, 1998, 14(3):259-264.
- [6] 李茂寅,赵德修,邢建民,等. 水母雪莲愈伤组织培养和黄酮类化合物的形成[J]. 云南植物研究, 2000, 22(1):65-67.