植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (1): 85–88, www.chinbullbotany.com

·组织培养简讯·

新疆雪莲体细胞胚胎发生

贾莉芳[1, 2*], 王晓军[1], 赵民安[1]

[1] 中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; [2] 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 通过体细胞胚胎发生途径实现了新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar.et Kir.)的植株再生。选用新疆雪莲子叶为外植体, 接种于MS+0.5 mg·L^{-1} 2,4-D+0.05-1 mg·L^{-1} BA的固体培养基上, 进行愈伤组织的诱导。从第1次继代培养的愈伤组织中挑选出黄绿色、颗粒状、质地致密的胚性愈伤组织, 转移到含0.05-0.1 mg·L^{-1} 2,4-D 的MS液体培养基中进行悬浮培养, 20天后可分化产生大量球形胚。继代过程中相继加入PEG和GA_3, 可以促进体细胞胚的分化和生长。体细胞胚在含有5 mg·L^{-1} GA_3 的MS固体培养基上, 可发育成完整的植株。

关键词 植株再生, 新疆雪莲, 体细胞胚胎发生, 组织培养

贾莉芳, 王晓军, 赵民安 (2008). 新疆雪莲体细胞胚胎发生. 植物学通报 **25**, 85–88.

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar.et Kir.), 又名雪莲花、天山总苞雪莲, 为菊科凤毛菊属一次开花结实的草本药用植物, 在国内民族药行业中具有很高的知名度。经分析检测证明: 雪莲全草含生物碱、黄酮、挥发油、雪莲内酯、还原糖和16 种氨基酸等多种药用成分。近年来雪莲花在抗风湿、镇痛、强心、抗癌、降压、平喘、终止妊娠、清除自由基及抗疲劳等方面的研究取得了可喜进展。在治疗风湿疼痛症、防止心血管疾病、延缓衰老、抗癌和计划生育等方面显示出巨大应用潜力。除此之外, 雪莲还是一种具有独特香味的野生香料。用雪莲香精配制的高级护肤霜, 具有增强血液循环和抗皮肤衰老的作用(Guo et al., 2000)。但是近年来在经济利益的驱动下, 人为大规模的掠夺式采挖, 使得野生雪莲数量急剧下降。加上雪莲种子自然萌发率低、生长环境恶劣及人工栽培困难, 故雪莲被列为国家三级濒危物种而受到保护。

本实验以新疆雪莲为材料, 在诱导产生胚性愈伤组织后, 通过体细胞胚途径实现了新疆雪莲的植株再生, 为其大规模人工栽培奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)种子取自新疆和静地区。

1.2 愈伤组织的诱导

种子经75% 的乙醇消毒50-60 秒, 0.2% 的 $HgCl_2$ 溶液消毒 10 分钟, 无菌水浸泡和清洗后, 接种于附加 3% 蔗糖、0.5% 琼脂粉的MS 培养基(Murashige and Skoog, 1962)上。取生长 15 天左右的无菌苗子叶作为外植体, 将其切成 0.5-1 cm 的小段, 接种于含有不同激素组合的 MS 培养基上进行愈伤组织的诱导。培养室温度保持在 25°C 左右, 人工辅助光照 16 小时 / 天, 光照强度为 2 500 mol·L^{-1}·m^{-2}·s^{-1}。3 周后观察各种激素组合下愈伤组织的诱导频率及生长状况。

1.3 体细胞胚的分化及植株再生

诱导所得愈伤组织经继代培养20天后, 转入含有不同浓

收稿日期: 2006-12-12; **接受日期**: 2007-05-21
基金项目: 中国科学院西部行动高新技术项目(No. KGCX2-SW-506)
* **通讯作者**。E-mail: jlfhanxing@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-436

度激素的MS液体培养基中，诱导体细胞胚发生，接种量为3%(w/v)，每(7±2)天继代培养1次。继代培养2-3次后转入含有5-25 mg·L^{-1} PEG6000的体胚分化培养基中。待体细胞胚发育成熟，将其转入含有1-5 mg·L^{-1} GA_3的MS固体培养基上，促使体细胞胚的萌发。

1.4 细胞组织学观察

对培养材料定期取样，固定于FAA固定液中，常规石蜡法切片，苏木精染色，切片8-10 mm，在Leica DMIRB型荧光倒置显微镜下观察，用Canon EOS300D型数码照相机拍照。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

通过2组对比实验，着重对植物生长调节剂(BA和2,4-D)对愈伤组织诱导的影响进行分析。

随着BA浓度的不断增加，愈伤组织诱导率呈现递减的趋势(表1)。这表明过高浓度的BA会抑制2,4-D的作用，表现为5 mg·L^{-1}的BA对2,4-D的诱导效应产生了抑制，这与文献报道相一致(Guo and Zhang, 2005)。

2,4-D浓度在0.05-1 mg·L^{-1}范围内均可诱导出愈伤组织(表2)。但诱导出的愈伤组织形态有所不同。大致分为3种：(1)淡黄色，颗粒状，质地松散；(2)透明，水渍状，质地黏稠；(3)黄绿色，块状，质地密实。第1种为胚性愈伤，后2种均为非胚性愈伤。

2,4-D作为一种常用的生长素，应用于多数植物体胚发生(朱长甫等, 1997; 崔凯荣等, 1998)，但它也具有较强的畸化作用。因此，本实验尝试用与其作用相当的IBA与其它细胞分裂素配比来诱导愈伤。但后期实验结果表明：在IBA与BA实验组合中，诱导所得愈伤组织表面发白，质地坚硬，为非胚性愈伤。

2.2 体胚分化及植株再生

挑选黄绿色、颗粒状、质地紧实的胚性愈伤(图1A)转接到内含50 mL液态体胚分化培养基(MS+0.1 mg·L^{-1} 2,4-D)的250 mL摇瓶中，进行悬浮培养。(10±2)天继代1次。30天后，胚性愈伤表面产生大量颗粒状的白色突起，此为体细胞胚发育的球形胚(图1B, E)阶段。

此时从继代培养基中除去2,4-D，加入25 mg·L^{-1} PEG6000。培养过程中白色突起继续延伸，此时为体胚发育的鱼雷形胚(图1B)阶段。随后加入1 mg·L^{-1}

表1 不同浓度BA对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of BA on callus induction

Plant growth regulator (mg·L^{-1})		No. of inoculated explants	Callus induction rate (%)	Morphological character of callus
2,4-D	BA			
0.5	0.05	40	100	Yellowish-green or dark-green, loose
0.5	0.5	38	97.4	Yellowish-green, dense
0.5	1	39	79.5	Light-green, dense, partly-browned calli
0.5	5	41	9.8	A little calli produced, explant browned severely

表2 不同浓度2,4-D对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of 2,4-D on callus induction

Plant growth regulator (mg·L^{-1})		No. of inoculated explants	Callus induction rate (%)	Morphological character of callus
2,4-D	BA			
0.05	0.5	38	97.4	Yellowish-green, loose and dense
0.1	0.5	40	100	Yellowish-green, loose, granular
0.5	0.5	39	94.9	Light-green, dense, bulk
1	0.5	42	97.6	Dark-green, dense, bulk

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-436

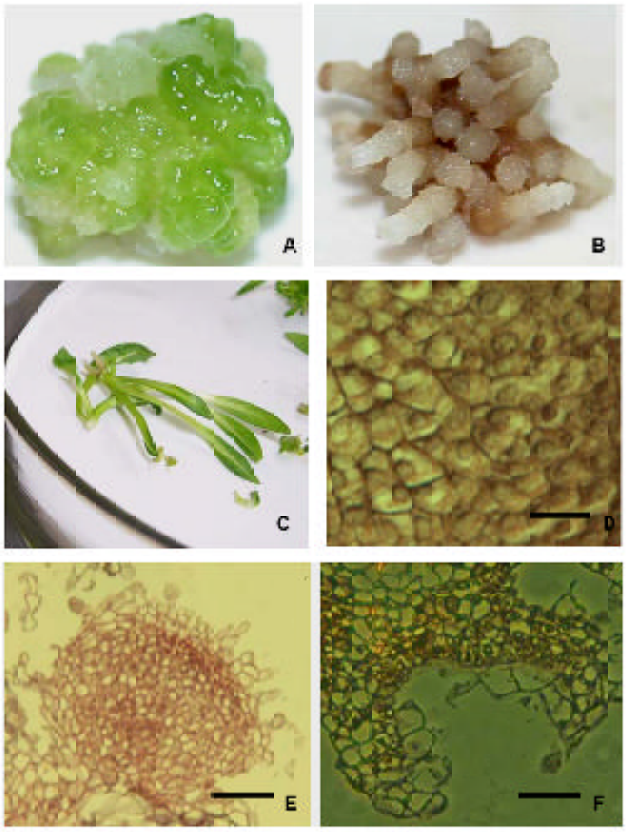


图 1 新疆雪莲体细胞胚胎发生的不同阶段

(A)胚性愈伤组织; (B)球形胚与鱼雷形胚; (C)具备根和芽的完整植株; (D)多核细胞; (E)球形胚; (F)子叶型胚
bar=0.1 mm

Figure 1 Stages of somatic embryogenesis of *Saussurea involucrate* Kar. et Kir.

(A) embryonic callus; **(B)** globular embryoid; **(C)** plantlet; **(D)** multinucleate cell; **(E)** globular embryoid; **(F)** cotyledon embryoid
bar=0.1 mm

GA_3, 培养 10 天后, 可见这些白色的小突起已分化为子叶状。

将成熟体胚转接到琼脂固化培养基 MS + 5 mg·L^{-1} GA_3(琼脂 0.7%)上。培养 20 天后, 体胚顶端产生萌发芽, 底部生根(图 1C), 直接获得完整植株。

在本研究中, 由于悬浮培养的愈伤组织水渍化程度高, 分化能力弱, 因而在悬浮培养后期加入了不同浓度的 PEG, 以促进体胚发育。与不添加 PEG 的空白组对比发现: 愈伤组织水渍化程度降低, 胚状体发生增多, 推测是 PEG 导致细胞含水量下降、贮藏物质积累增多, 细胞胚性增强所致。

GA_3含量较高的培养基可促进较大的胚状体在短期内生长, 呈喇叭形, 子叶型胚增多。本实验在体胚发育后期加入 GA_3, 以促进体胚成熟。但实验中我们也发现, 加入GA_3后体胚易于褐化, 且产生的畸形胚较多, 早期夭亡的也多, 影响成苗率。如何平衡其利弊还有待于进一步研究。

2.3 细胞组织学观察

新疆雪莲属菊科, 双子叶植物, 因而拥有类似被子植物合子胚发生的阶段性典型结构。从体胚发生的石蜡切片来看, 内部细胞首先形成多细胞的原胚(图 1D), 这些细胞表现为细胞核大, 有些细胞甚至有多个核, 且细胞质浓厚(染色深)。随后原胚逐渐突出于表皮之外, 形成具有独立结构的球形胚(图 1E)。在球形胚进一步发育中, 分化细胞不断向两端集中。经过心形、鱼雷形胚, 最终形成子叶型胚(图 1F)。

3 讨论

Sharp 等(1980)把体胚发生方式概括为 2 种: 一是体胚间接发生途径, 即由外植体先诱导愈伤组织再产生胚状体; 二是体胚直接发生途径, 即由外植体直接产生体细胞胚。

本实验选用新疆雪莲无菌苗的子叶为外植体, 因而主要通过间接发生途径获得体细胞胚, 对于从直接发生途径获得雪莲体细胞胚, 本实验也进行了初步的尝试, 但未获得成功。推测子叶作为植物的营养器官, 它已包含了一些分化型的非胚胎发生型的细胞, 因此必须经过脱分化形成愈伤组织后才能产生体细胞胚。

体细胞胚胎发生和植株再生体系在植物品种改良、

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-436

人工种子制作和苗木繁殖等方面有重要应用价值(Attree and Fowke, 1993)。但是，在体细胞胚发生系统中，萌发成苗难或成苗率低，是一个经常遇到的问题，萌发成苗常成为体胚应用的“瓶颈”环节。究其原因，一般认为是体胚的不正常发育造成的，有的也可能是体胚休眠所引起的(Tao, 2001)。新疆雪莲作为一种多年生植物，其合子胚具有休眠特性，推测与其发生途径类似的体细胞胚也具有休眠的特性。此外，在培养环境中加入大量的生长调节剂也可能会造成体胚的暂时休眠。

因此，在本实验中，尝试用打破种子休眠的方法，如对成熟体细胞胚进行冷冻处理或者加入生长调节剂赤霉素(GA)以打破其休眠。此外，合子胚在发育后期，随着水分的丧失而进入停止生长期，这是为将来的萌发所做的必要准备，体细胞胚在成熟后，一般也需经历一个类似脱水的过程才能萌发成正常的小植株。为此本实验在体胚发育后期采用干化法对其进行处理，也有效地提高了体胚的质量。然而如何进一步提高新疆雪莲成熟体胚的质量，减少畸形胚的发生率，将体胚再生苗大规模人工种植，还有待于进一步研究。

参考文献

崔凯荣, 任红旭, 邢更妹 (1998). 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性研究. 兰州大学学报 (自然科学版) **34**, 93-99.

朱长甫, 镰田博, 何奕昆 (1997). 胡萝卜胚性细胞蛋白分离的研究. 实验生物学报 **30**, 13-19.

Attree SM, Fowke LC (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **35**, 1-35.

Guo WC, Yang ST, Wang JX (2000). Alpine rare drug—*Saussurea involucrate*. *Special Econ Anita Plant* **4**, 37-38.

Guo YH, Zhang ZX (2005). Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the *Zingiber officinale* Rosc. *Sci Hortic* **107**, 90-96.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* **15**, 473-497.

Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort Rev* **2**, 268-310.

Tao M (2001). Studies on the abnormal embryoid and hypeahydric shoot in tissue culture. *Acta Bot Boreal Occident Sin* **21**, 1048-1058.

Somatic Embryogenesis of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.

Lifang Jia[1,2*], Xiaojun Wang[1], Minan Zhao[1]

[1] *Xinjiang Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China*

[2] *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

Abstract We used somatic embryogenesis to regenerate snow lotus (*Saussurea involucrata* Kar.et Kir.). For induction of calli, cotyledons were cultured on solid MS medium with 0.5 mg·L^{-1} 2,4-D and 0.05-1 mg·L^{-1} BA. Globe-shaped yellowish-green calli were chosen from the first subculturing for suspension culture in liquid MS medium containing 0.05-0.1 mg·L^{-1} 2,4-D. After 20 days of culture, many globular embryoids were produced. Polyethylene glycol and gibberellic acid (GA) were added during subculture for differentiation and growth of somatic embryos. Plantlets were regenerated when somatic embryos were transferred to MS medium with 5 mg·L^{-1} GA_3.

Keywords plant regeneration, *Saussurea involucrata* Kar. et Kir., somatic embryogenesis, tissue culture

Jia LF, Wang XJ, Zhao MA (2008). Somatic embryogenesis of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. *Chin Bull Bot* **25**, 85–88.

* Author for correspondence. E-mail: jlfhanxing@126.com

(责任编辑: 白羽红)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-436