

# 天山雪莲组织培养体系的优化

丁黛灵, 陈 芸, 魏炯河, 张振霞, 郑玉忠

(韩山师范学院, 广东 潮州 521041)

**摘要:** 通过研究天山雪莲种子消毒萌发条件、愈伤组织培养和继代培养条件, 优化出了一套能获得总黄酮成分含量较高的天山雪莲愈伤组织的组织培养体系。结果表明: 将种子用 70% 乙醇处理 30 s、0.1% 升汞溶液处理 10 min, 并种植于 MS 培养基, 可获得生长状态良好的雪莲苗。比较了 7 种培养基对天山雪莲无菌苗叶片愈伤组织的诱导情况, 愈伤诱导率均能达到 100%, 其中 4 种培养基获得愈伤组织适合继代培养。在继代培养中, ①号培养基的愈伤组织易分化出根, ②号培养基、③号培养基的愈伤组织易分化出芽; ④号培养基可得到较多黄绿色致密愈伤组织。对①号、②号、③号、④号培养基获得愈伤组织的总黄酮含量检测, 发现其总黄酮含量为 1.14%~7.37%, 远高于《中华人民共和国药典(2015版)》不少于 0.15% 的规定, 以②号培养基的愈伤组织总黄酮含量最高。

**关键词:** 天山雪莲; 组织培养; 总黄酮

**中图分类号:** S567 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)06-0025-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.06.007

## Optimization of Tissue Culture System of *Saussurea involucrata*

DING Dailing, CHEN Yun, WEI Jionghe, ZHANG Zhenxia, ZHENG Yuzhong

(Hanshan Normal University, Chaozhou Guangdong 521041, China)

**Abstract:** By studying the germination conditions, callus culture conditions and secondary culture conditions of *Saussurea involucrata*, we optimized the tissue culture system to obtain the callus with high content of total flavonoids. The results showed that the seeds were treated with 70% ethanol for 30 seconds and 0.1% mercury solution for 10 minutes, and planted on MS medium, the seedlings of *Saussurea involucrata* in good growth condition could be obtained. The induction of callus from leaves of *Saussurea involucrata* Sterile seedlings on 7 media was compared. The induction rate of callus could reach 100%. Among them, 4 the obtained callus were suitable for subculture. In subculture, callus of No. 1 medium was easy to differentiate into roots, callus of No. 2 and No. 3 were easy to differentiate into buds, and callus of No. 4 medium could obtain more yellow-green dense callus. The content of total flavonoids in callus obtained from medium No. 1, No. 2, No. 3 and No. 4 was determined. It was found that the content of total flavonoids was 1.14%~7.37%, which was much higher than that stipulated in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition). The content of total flavonoids in callus obtained from callus of No. 1 medium was the highest.

**Key words:** *Saussurea involucrata*; Tissue culture; Total flavonoids

天山雪莲 [*Saussurea involucrata* (Kar.et Kir.)Sch.-Bip.] 为菊科凤毛菊属多年生高山

收稿日期: 2019-02-25; 修订日期: 2019-03-19

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A030304067); 韩山师范学院大学生创新创业训练计划项目 (2017150)。

作者简介: 丁黛灵 (1995—), 女, 广东潮州人, 实习生, 主要从事植物组织培养技术研究。  
Email: 1416088809@qq.com。

通信作者: 郑玉忠 (1977—), 男, 广东潮阳人, 副研究员, 博士, 主要从事中药药理及药物分析等研究工作。Email: zhengyuzhong@gmail.com。

草本植物，其地上部分是中国维吾尔族习用药材。性温、微苦，具有温肾助阳、祛风胜湿、通经活血等功效，主要用于风寒湿痹痛、类风湿性关节炎及小腹冷痛、月经不调<sup>[1]</sup>。天山雪莲生境特异，自然繁殖率低，生长慢，人工栽培困难，长期掠夺性采挖使其野生资源濒临灭绝。1996 年中国已将天山雪莲列为国家二级保护植物。2000 年国务院 13 号文件已明令禁止采挖野生雪莲。

天山雪莲含有多种黄酮类物质<sup>[2]</sup>，组织培养技术可为天山雪莲次生代谢产物的生产提供切实可行的手段<sup>[3]</sup>，是解决天山雪莲资源短缺的有效途径。20 世纪 90 年代开始，就有雪莲组织培养的相关文献报道。近年来对雪莲的组织培养、药用成分测定的报道较多，取得了一定进展。我们利用植物组织培养技术对天山雪莲幼苗进行诱导增殖，同时对天山雪莲培养物成分进行分析比较研究，得出合适的组织培养条件和测定方法，有利于天山雪莲的资源化和保护化研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

野生天山雪莲种子由香港科技大学中药研发中心提供。选取健壮饱满、无病虫害的种子(千粒重 3.544 g)。

以 MS 为基本培养基，附加蔗糖 30 g/L，琼脂 7 g/L，不同浓度 2, 4-D、NAA、6-BA 等激素，pH 5.8。所有培养基均在 121℃ 条件下高压灭菌 15 min。

培养室温度(20±2)℃，空气湿度 50%~60%，光照时间 12 h/d，光照强度 1 000~1 500 lx。

### 1.2 方法

1.2.1 天山雪莲种子萌发条件优化 自然条件萌发：种子用蒸馏水浸泡过夜，置于湿滤纸上，发芽后移至装有土壤的花盆继续生长。消毒后萌发：种子在 70%乙醇浸泡 30 s，用无菌水冲洗 2~3 次后在 0.05%升汞溶

液或 0.1%升汞溶液中消毒 10 min，然后用无菌水清洗 4 次后并浸泡过夜，置于含有湿滤纸的灭菌培养皿中，发芽后移至 MS 基础培养基中培养，5 d 时统计不同处理的种子萌发率，30 d 时统计不同处理的幼苗存活率。

1.2.2 不同植物激素配比对天山雪莲无菌苗叶片外植体诱导的影响 在 MS 培养基中加入不同剂量植物激素，配制 7 种不同的愈伤组织诱导培养基，具体配比及剂量详见表 1<sup>[4-7]</sup>。将在无菌环境培养的雪莲无菌苗叶片剪成约 0.5 cm×0.5 cm 大小的外植体，分别接种到①号、②号、③号、④号、⑤号、⑥号、⑦号诱导培养基上，于 20℃，12 h/d 光照条件下培养观察。同时将所有愈伤组织收集，以备后续检测。

表 1 7 种 MS 培养基的植物激素配比

培养基 编号	6-BA /(mg/L)	NAA /(mg/L)	2,4-D /(mg/L)	生长素 /细胞分裂素
①	0.1	2.0	0	20 : 1
②	1.0	2.0	0	2 : 1
③	2.0	0.5	0	1 : 4
④	1.5	0	0.5	1 : 3
⑤	0.5	0	1.0	2 : 1
⑥	0.5	0	2.0	4 : 1
⑦	0.5	0	3.0	6 : 1

1.2.3 天山雪莲愈伤组织培养物总黄酮成分测定 精密称取芦丁对照品 5 mg，置于 25 mL 容量瓶中，用 60%甲醇溶解定容，作为 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL，置于 25 mL 容量瓶，加蒸馏水至 6.0 mL；加 5%亚硝酸钠 1 mL，混匀后静置 6 min；再加 10%硝酸铝 1 mL，混匀后静置 6 min；然后加 4%氢氧化钠 10 mL，再加蒸馏水定容。用分光光度计在 510 nm 波长处测吸光度，绘制标

准曲线<sup>[8]</sup>。

精密称取干燥的天山雪莲固体培养物细粉 10 mg, 置于 15 mL 离心管中, 加 60% 甲醇 10 mL, 称重记录, 超声提取 15 min, 用 60% 甲醇补足失重, 离心, 取上清液为供试品溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 天山雪莲种子的萌发

由表 2 结果显示, 天山雪莲种子在自然条件与 0.1% 升汞溶液消毒下的萌发率相近, 远高于 0.05% 升汞溶液消毒的萌发率。由于广东潮州地区气温高, 自然条件下的雪莲苗基本无法存活, 采用消毒和培养基培养的方法获得的萌发苗存活较理想。比较 3 种方法, 采用 70% 乙醇处理 30 s, 0.1% 升汞溶液处理 10 min、无菌水清洗 4 次的方案效果较好, 存活率高且污染率低。

### 2.2 不同培养基对天山雪莲无菌苗叶片外植体诱导培养的影响

从 7 种培养基对天山雪莲无菌苗叶片愈伤组织诱导的情况(表 3)可以看出, 7 种不

同的培养基对天山雪莲无菌苗叶片的愈伤组织诱导效果都理想, 均为 100%, 但⑤号、⑥号、⑦号培养基培养愈伤组织偏黄褐色, 比较干, 不太适合后期的培养生长。

### 2.3 不同固体培养基继代培养天山雪莲的情况

取上述①号、②号、③号、④号培养基的愈伤组织, 用相应的培养基进行继代培养。表 4 和图 1 结果显示, ①号培养基的愈伤组织易分化出根, 文献未有报道此现象<sup>[4]</sup>; ②号培养基和③号培养基的天山雪莲愈伤组织均可分化出芽, 而③号培养基的愈伤组织分化出的芽多且成活率较高, 文献中未有报道此现象<sup>[5-6]</sup>; 在④号培养基可得到较多绿色致密性愈伤组织。可见, 若要得到更多的再生植株, 可使用①号培养基诱导愈伤组织, 再分化生根, 然后转移至③号培养基使其分化生芽; 若要得到较多的绿色致密性愈伤组织, 可选用④号培养基, ④号培养基继代培养时愈伤组织生长速度快, 颜色由绿色转变成黄绿色。

表 2 不同萌发条件下天山雪莲种子萌发的结果

种子批次	升汞溶液消毒	种植条件	发芽用时/d	萌发数/接种数 /个	种子萌发率 /%	30 d存活率 /%	污染率 /%
1	无	土壤培养	5	22/104	21.15	0	0
2	0.1%	MS培养基	5	19/95	20.00	57.89	2.11
3	0.05%	MS培养基	5	26/392	6.63	43.15	3.32

表 3 不同培养基天山雪莲无菌苗叶片愈伤组织诱导情况

培养基编号	出愈数/接种数	出愈率 /%	愈伤组织状况	适合继代培养
①	13/13	100	淡绿色, 较疏松, 生长较好	是
②	10/10	100	暗黄绿色, 较致密, 生长好	是
③	16/16	100	暗黄色, 较致密, 生长较好	是
④	16/16	100	黄绿色, 致密, 生长极好	是
⑤	13/13	100	黄白色, 较疏松, 生长一般	否
⑥	18/18	100	黄褐色, 较致密, 生长一般	否
⑦	14/14	100	深黄褐色, 较致密, 生长一般	否

表4 不同固体培养基继代培养天山雪莲的情况

培养基编号	愈伤组织状况	褐化难易程度 <sup>①</sup>
①	分化出根	+
②	分化出芽(少, 不易培养)	+++
③	分化出芽	++
④	绿色, 致密	+++

① +表示褐化一般, ++表示不易褐化, +++表示很难褐化。

#### 2.4 不同培养基上的天山雪莲愈伤组织中的总黄酮成分测定

以芦丁标准溶液浓度( $X$ )为横坐标, OD值( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线, 标准曲线方程:  $Y=12.05X-0.005$ ,  $R^2=0.9998$ 。当芦丁浓度在  $0\sim 0.05$  mg/mL 内, 呈良好的线性关系。

精密称取干燥的天山雪莲固体培养物, 测定其总黄酮含量, 结果显示, ①号、②号、③号、④号培养基中总黄酮含量分别为 2.59%、7.37%、5.76%、1.14%(表5), 远高于《中华人民共和国药典(2015版)》中总黄酮含量不少于 0.15%的规定。说明应用组织培养

表5 不同培养基上的天山雪莲愈伤组织中的总黄酮含量

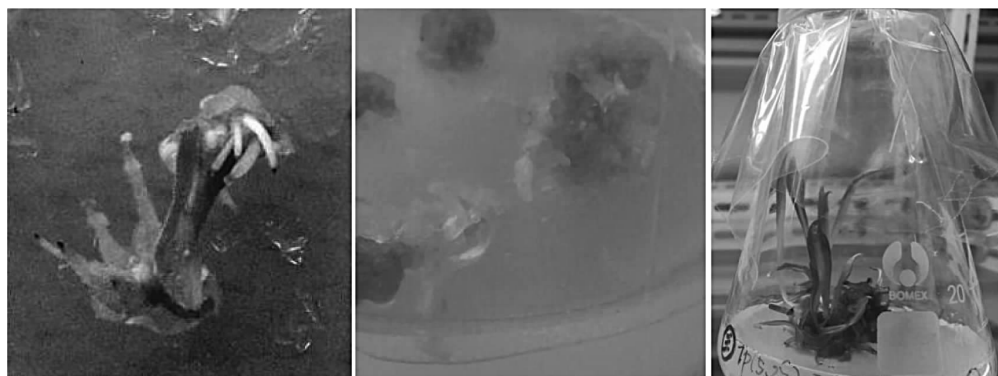
培养基编号	总黄酮百分含量 /%
①	2.59
②	7.37
③	5.76
④	1.14

获得的天山雪莲愈伤组织是具备药用价值的。

### 3 结论与讨论

资源问题依然是限制新疆雪莲开发利用的瓶颈, 植物的组织细胞培养已经成为解决此问题的有效途径<sup>[5]</sup>。雪莲的人工栽培已取得初步成效, 组织培养研究已有较多成果<sup>[9]</sup>, 寻找一种较优的天山雪莲组织培养体系非常必要。从对天山雪莲种子采用 70%乙醇 30 s, 0.1%升汞 10 min, 无菌水冲洗 4 次和接种无菌湿滤纸的处理方法不仅可以获得与自然条件下相近的萌发率, 且污染率较低, 萌发苗存活率较好。无菌萌发苗最好是在环境温度( $19\pm 2$  °C)和湿度(57%以上)较为适宜且稳定的条件下在培养基中进行无菌培养(光照 12 h/d)。

从对天山雪莲叶片的愈伤组织的诱导率来看, 几种培养基的诱导效果都很好, 其中①号培养基诱导和培养的天山雪莲愈伤组织易分化出根; ③号培养基可较好诱导和培养天山雪莲愈伤组织分化出芽, 且在黑暗条件下更容易分化出芽; 在④号培养基上诱导和培养可得到较多黄绿色致密性愈伤组织。由此可见, 不同培养基可用于天山雪莲分化苗不同阶段的生产培育。②号培养基和③号培养基的生长素/细胞分裂素的比值是有差异的, ②号培养基为 2:1, ③号培养基为 4:1, 但也都出现分化芽, 可能与天山雪莲内



①号培养基的愈伤分化出根 ③号培养基分化出芽(黑暗条件) ③号培养基分化出苗  
(光照 12 h/d 培养)

图1 不同培养基的天山雪莲愈伤组织的继代培养

# 山桃外植体的安全消毒方法研究

张雪冰, 王 鸿, 张 帆, 陈建军, 李宽莹  
(甘肃农业科学院林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以甘肃山桃为材料, 采用 75% 的乙醇、0.1% 的氯化汞( $\text{HgCl}_2$ )、消毒片(有效氯 500 mg/片)、新型植物组织培养防污染杀菌剂植培灵和益培隆, 对材料茎段消毒效果行进比较, 以筛选出合理有效的消毒方法来替代氯化汞消毒。结果表明: 采用 0.1% 的氯化汞( $\text{HgCl}_2$ )与 75% 乙醇组合使用的消毒效果要明显好于消毒片, 植培灵和益培隆的污染率均为 0%, 其中益培隆的死亡率高于植培灵。综合考虑污染率、死亡率、对植物生长的影响以及废液对环境的影响等因素, 植培灵为替代传统氯化汞( $\text{HgCl}_2$ )消毒的最佳选择。

**关键词:** 山桃; 外植体; 消毒方法; 组织培养

**中图分类号:** S662.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)06-0029-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.06.008

核果类果树是我国果树栽培的重要种类。随着科学技术的发展和人民生活水品的

**收稿日期:** 2019-04-01

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760558); 国家桃产业技术体系(CARS-30-1-6); 农业农村部西北地区果树科学观测实验站(S-10-18)。

**作者简介:** 张雪冰(1990—), 女, 甘肃成县人, 研究实习员, 主要从事种苗的组培快繁体系研究工作。联系电话: (0)13893680163。Email: 460332042@qq.com。

**通信作者:** 王 鸿(1973—), 男, 甘肃灵台人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事果树生理栽培与育种。Email: wanghong@gsagr.ac.cn。

源激素有关, 需做进一步研究<sup>[5]</sup>。

各个条件下天山雪莲组织培养物总黄酮测定结果均符合《中华人民共和国药典(2015版)》规定的含量, 不同培养基的天山雪莲培养物总黄酮的含量均有差异, 可为天山雪莲总黄酮的生产提供参考依据。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 53-54.
- [2] 王 强, 刘运权, 王 涛, 等. 不同产地雪莲中绿原酸和芦丁含量测定及其煎煮提取工艺优化[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3539-3541.
- [3] 陈日道, 刘 晓, 邹建华, 等. 雪莲悬浮培养细胞中紫丁香苷、绿原酸和 1, 5-二咖啡酰奎尼酸的生物合成调控[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2275-2280.
- [4] 胡雪梅, 秦 丽, 贺 宾, 等. 新疆雪莲组织培养体系的优化[J]. 新疆农业科学, 2007(3): 333-335; 385
- [5] 覃建兵, 庞红霞, 祝长青. 植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2009, 43(4): 633-636.
- [6] 刘 莹. 雪莲组织培养及次生代谢调控研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [7] 林 侃, 王晓军, 赵民安, 等. 新疆雪莲体胚诱导与分化研究[J]. 西北植物学报, 2006(7): 1351-1354.
- [8] 吕亚丽, 王艳芳, 张福生, 等. 不同理化因素对雪莲组培苗生长及总黄酮量的影响[J]. 中草药, 2012, 43(1): 173-177.
- [9] 韦善君, 武运芳, 罗云燕, 等. 濒危药用植物新疆雪莲资源的研究进展[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2014, 23(2): 10-15.

(本文责编: 郑立龙)