

植物生长物质对大花红景天愈伤组织诱导及苗再生的影响

王梦亮, 张娜莎, 郭婷婷, 崔晋龙*

山西大学应用化学研究所, 太原030006

摘要: 以大花红景天植物的茎、叶、芽、种子为材料, 采用DPS软件正交设计法, 通过添加不同植物生长物质, 考察其对大花红景天愈伤组织形成及苗再生的影响, 为低海拔条件下建立大花红景天植株再生体系提供数据基础。结果表明: 种子和芽是诱导愈伤组织最适宜的外植体; 植物生长物质对愈伤组织形成的影响大小为6-BA>KT>2,4-D>NAA>IAA, 愈伤组织形成的最佳培养基为MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+KT 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IAA 0.2 mg·L⁻¹; 不定芽分化的最佳培养基为MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹, 诱导率达63.14%, 不定芽数平均为11.4。本试验获得的最佳培养基配方, 适宜在低海拔条件下进行快速诱导大花红景天的愈伤组织和植株再生。

关键词: 大花红景天; 组织培养; 正交设计; 植物生长物质

Effects of Plant Growth Substances on Callus Induction and Shoot Regeneration of *Rhodiola crenulata* Hook. f. et Thoms.

WANG Meng-Liang, ZHANG Na-Sha, GUO Ting-Ting, CUI Jin-Long*

Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: To investigate the effects of different plant growth substances on callus induction and shoot regeneration of *Rhodiola crenulata*, the infancy stems, leaves, buds and seeds were chosen as test materials. The optimum combination of plant growth substances in MS solid medium for plant regeneration was established by using DPS software designing the orthogonal tests. The results showed that the seeds and buds were the optimal explants; the effect of plant growth substances on callus formation was 6-BA>KT>2,4-D>NAA>IAA, the most effective medium was MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+KT 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IAA 0.2 mg·L⁻¹; the most appropriate medium for shoot regeneration was MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹, the induction rate was 63.14%, and the average number of adventitious bud was 11.4. The optimum combinations of plant growth substances in MS solid medium which were investigated in this project were avail to induce the callus and establish shoot regeneration system quickly in low altitude conditions.

Key words: *Rhodiola crenulata*; tissue culture; orthogonal design; plant growth substance

高山药用植物红景天是景天科(Crassulaceae)景天属多年生草本植物, 生长在海拔3 500~5 000 m的低温、高寒、强紫外山区, 是我国使用一千多年的传统中药, 也是近年来被深入研究的适应原性植物药(Panossian等2010), 被我国药典收录的种类是分布于青藏高原的大花红景天(*Rhodiola crenulata*) (国家药典委员会2010)。其根和茎为药用部位, 功能和主治为“益气活血, 通脉平喘; 用于气虚血瘀, 胸痹心痛, 中风偏瘫, 倦怠气喘”。近年来, 国内外药理研究表明, 红景天在抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、生理调节、安眠及镇静等方面具有独特功效(Zhang等2008; Shi等2013), 被广泛应用于药品、保健品、化妆品等领域。

由于多种因素, 如生存环境恶劣, 繁殖率低、

野生资源灭绝性采挖、低海拔条件下栽培困难等, 导致红景天供求关系突出, 急需开展大花红景天的人工快繁工作, 以解决资源的深度开发与有效保护的矛盾问题(Zhao等2012, 2013)。此外, 组织培养技术的成功, 在开展红景天的活性成分代谢机理、品质研究、细胞培养等方面都具有重要价值。

本文通过正交设计的方法, 以我国主产区大花红景天的不同外植体为试验材料, 重点考察不

收稿 2013-11-01 修定 2013-12-15

资助 国家自然科学基金(31270383)、高等学校博士学科点专项科研基金(20121401120001)和山西大学博士科研启动项目(2011BS01)。

* 通讯作者(E-mail: CJL717@163.com; Tel: 0351-7016101)。

同生长调节物质在大花红景天愈伤组织诱导和不定芽分化过程中的作用, 为高效、快速繁殖其细胞和植株材料提供数据基础。

材料与方法

1 材料

实验材料于2012年9月16日采集于西藏墨竹工卡县的米拉山口(海拔5 007 m, E 92°22'50", N 29°46'30"), 经崔晋龙鉴定为大花红景天(*Rhodiola crenulata* Hook. f. et Thoms.)。

2 方法

2.1 外植体处理

选取健康大花红景天的茎、叶、芽和种子作为外植体, 冲洗干净、晾干。无菌条件下, 用75%乙醇浸泡30 s, 随后用无菌水冲洗3次, 再用0.1% HgCl₂浸泡3~5 min, 最后用无菌水冲洗3次。放无菌滤纸上吸干水分, 切成大小约为5 mm的小块(段), 接入到含有植物生长物质的MS平板培养基上。

2.2 培养条件

以MS为基本培养基, 每升添加蔗糖30 g, 琼脂8 g, 调节pH值为5.7~5.8, 分别按试验要求添加植物生长物质。光照培养: 光14 h/暗10 h, 对应温度28 °C/22 °C, 光照强度30 μmol·m⁻²·s⁻¹, 湿度70%~75%。

2.3 愈伤组织诱导

利用DPS软件, 设计L₁₆(4⁵)正交试验, 以大花红景天的芽为外植体, 考查2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、3-吲哚乙酸(IAA)、α-萘乙酸(NAA)、6-呋喃甲基腺嘌呤(KT)和6-苄基腺嘌呤(6-BA)这5种生长物质对愈伤组织诱导的影响。每种处理接种4瓶, 每瓶接种3~5块, 重复3次, 定期观察记录, 30 d后进行成活数、诱导率和生长状况的直观统计分析。

2.4 芽诱导与增殖

选取新鲜的、生长快的愈伤组织, 分别接种于含有6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹、6-BA 2.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹、苯基噻二唑基脲(TDZ) 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹、TDZ 2.5 mg·L⁻¹的4种MS诱芽培养基, 比较6-BA与TDZ对大花红景天再生芽的诱导效果。每种处理接种10瓶, 每瓶接种3~5块, 重复4次, 30 d后进行诱芽率的统计。

实验结果

1 选择适宜诱导愈伤组织的外植体

本实验采用培养基MS+6-BA 2.5 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹, 对各外植体的脱分化能力做筛选试验。结果表明, 大花红景天叶片、茎、芽、种子诱导率分别达到48.2%、20.5%、60.7%和98.2%。试验过程发现, 叶组织培养过程中容易产生内生真菌的表生生长, 是导致愈伤组织不能成功的主要原因; 茎愈伤组织诱导过程褐化现象严重, 添加活性炭也不能提高诱导率。故选择种子和芽作为大花红景天愈伤组织诱导的基本材料。

2 不同植物生长物质组合对愈伤组织诱导的影响

通过对DPS软件设计的正交试验进行直观分析, 得到不同植物生长物质的添加量及相应处理结果。从表1中可以看出处理2的诱导率最高, 为75.8%, 诱导出的愈伤组织鲜绿, 较致密, 含水量较大, 表面有突起, 呈白毛状, 生长迅速, 组织块大, 褐化率低, 是进一步诱导不定芽的最佳活体细胞来源。处理11的诱导率也较高, 为64.2%, 其愈伤组织主要为紫红色颗粒状, 生长较迅速, 后期培养易褐化(图1-A~C)。

各生长物质最大平均数与最小平均数的差值为R, R值越大, 影响越大。比较这5种生长物质的差值R, 确定各生长物质对愈伤组织诱导的影响大小为6-BA>KT>2,4-D>NAA>IAA, 结果表明, 细胞分裂素6-BA和KT是影响大花红景天诱导率的关键性因子, 其次是生长素2,4-D、NAA和IAA。

T₁、T₂、T₃、T₄值分别表示各生长物质在同一因素水平下平均诱导率之和, \bar{X}_1 、 \bar{X}_2 、 \bar{X}_3 、 \bar{X}_4 为各生长物质各水平的平均数。取各试验因子的诱导率总和(T值)或平均数(\bar{X} 值)的最大值时的浓度(表1), 可以得出最优处理组合: MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+KT 0.1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IAA 0.2 mg·L⁻¹, 该条件下大花红景天愈伤组织诱导率最高。

3 不同生长物质组合对大花红景天再生芽诱导的影响

经过30 d的培养, 新鲜的绿色愈伤组织在4种培养基中均成功诱导出了不定芽, 利用DPS软件, 通过最小显著差数法(LSD法)对大花红景天不定芽的诱导率及个数进行方差分析。表2结果显示: TDZ在0.5 mg·L⁻¹ (III号)时, 其平均诱芽率极显著高于2.5

表1 正交设计及愈伤组织诱导结果

Table 1 The table of orthogonal design and callus induction result

处理编号	浓度/mg·L ⁻¹					诱导率/%	生长情况
	2,4-D	NAA	IAA	KT	6-BA		
1	0	0	0	0	0	0	全部褐化死亡
2	0	0.1	0.1	0.1	1.5	75.8	鲜绿色、较致密,长势快
3	0	0.3	0.2	0.3	2.5	56.2	鲜绿色、较致密,长势快
4	0	0.5	0.5	0.5	4.0	64.2	黄绿色,长势较快
5	0.5	0	0.1	0.3	4.0	33.3	黄绿色,长势较慢
6	0.5	0.1	0	0.5	2.5	42.5	黄绿夹杂紫红色颗粒状,长势较快
7	0.5	0.3	0.5	0	1.5	16.5	绿色夹杂紫红色颗粒状,长势较慢
8	0.5	0.5	0.2	0.1	0	14.6	绿色夹杂紫红色颗粒状,长势慢
9	1.0	0	0.2	0.5	1.5	40.2	绿色夹杂少量紫红颗粒状,长势较快
10	1.0	0.1	0.5	0.3	0	33.3	多褐化,浅褐色,长势慢
11	1.0	0.3	0	0.1	4.0	64.2	浅黄绿色夹杂紫红色颗粒状,长势较快
12	1.0	0.5	0.1	0	2.5	25.4	浅黄绿色夹杂紫红色颗粒状,长势慢
13	1.5	0	0.5	0.1	2.5	38.2	浅黄绿色夹杂紫红色颗粒状,长势慢
14	1.5	0.1	0.2	0	4.0	46.5	浅黄绿色夹杂紫红色颗粒状,长势较快
15	1.5	0.3	0.1	0.5	0	12.5	多褐化,褐色,长势慢
16	1.5	0.5	0	0.3	1.5	12.5	多褐化,褐色,长势慢
T ₁	196.2	111.7	119.2	88.4	60.4		
T ₂	106.9	198.1	147.0	192.8	145.0		
T ₃	163.1	149.4	157.5	135.3	162.3		
T ₄	109.7	116.7	152.2	159.4	208.2		
\bar{X}_1	49.05	27.93	29.80	22.10	15.10		
\bar{X}_2	26.73	49.53	36.75	48.20	36.25		
\bar{X}_3	40.78	37.35	39.38	33.83	40.58		
\bar{X}_4	27.43	29.18	38.05	39.85	52.05		
R	22.32	21.60	9.58	26.10	36.95		

mg·L⁻¹ 6-BA (I号)的诱芽率,不定芽数也显著高于6-BA, I号培养基诱导的不定芽数最多为17个,而III号最多不定芽数可达到20个; II与III号培养结果表明,相同浓度的NAA, TDZ的平均诱芽率极显著高于6-BA,不定芽数也显著差异;单独使用TDZ (IV号)诱导芽时,虽平均诱芽率和不定芽数均与I号差异不显著,但其诱导的不定芽数最高可达26个,且更易形成丛生苗(图1-D~G)。通过比较,TDZ对大花红景天不定芽的诱导表现出高的活性,最适宜诱芽的培养基为MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹。

将不定芽切割转接至新鲜培养基,逐渐分化为幼叶,形成紧簇的丛生苗,随着时间延长,分蘖数不断增加,但不易长高,适当的切分并转入新鲜培养基,丛生苗才能不断生长,平均高度约为2.5 cm。继代培养发现, III号和IV号丛生苗长势快,转接周期为20 d, IV号在诱导芽生长的同时,伴随着愈伤组织的快速繁殖。I号与II号继代培养时,长

势较慢,转接周期为30 d(图1-H~K)。

讨 论

在不同种属的红景天中,不同生长物质对愈伤组织诱导和植株再生的作用不同。Wu等(2003)和Xu等(1999)对库叶红景天(*Rhodiola sachalinensis*)的研究表明,生长素2,4-D可以诱导愈伤组织的形成并维持分散细胞的增殖,有利于产生颗粒状愈伤组织; NAA和IAA对愈伤组织的诱导和增殖都有积极作用; NAA在低浓度可有效维持致密性愈伤组织的生长。这3种生长素的效果与本实验结果类似。但是, Wu等(2003)认为,细胞分裂素6-BA对库叶红景天愈伤组织的诱导是必须的,而KT则是可有可无。而本研究结果表明, 6-BA和KT对大花红景天愈伤组织的诱导都有积极作用,只是6-BA起最主要的作用,这可能是因为品种差异造成实验结果的不同。

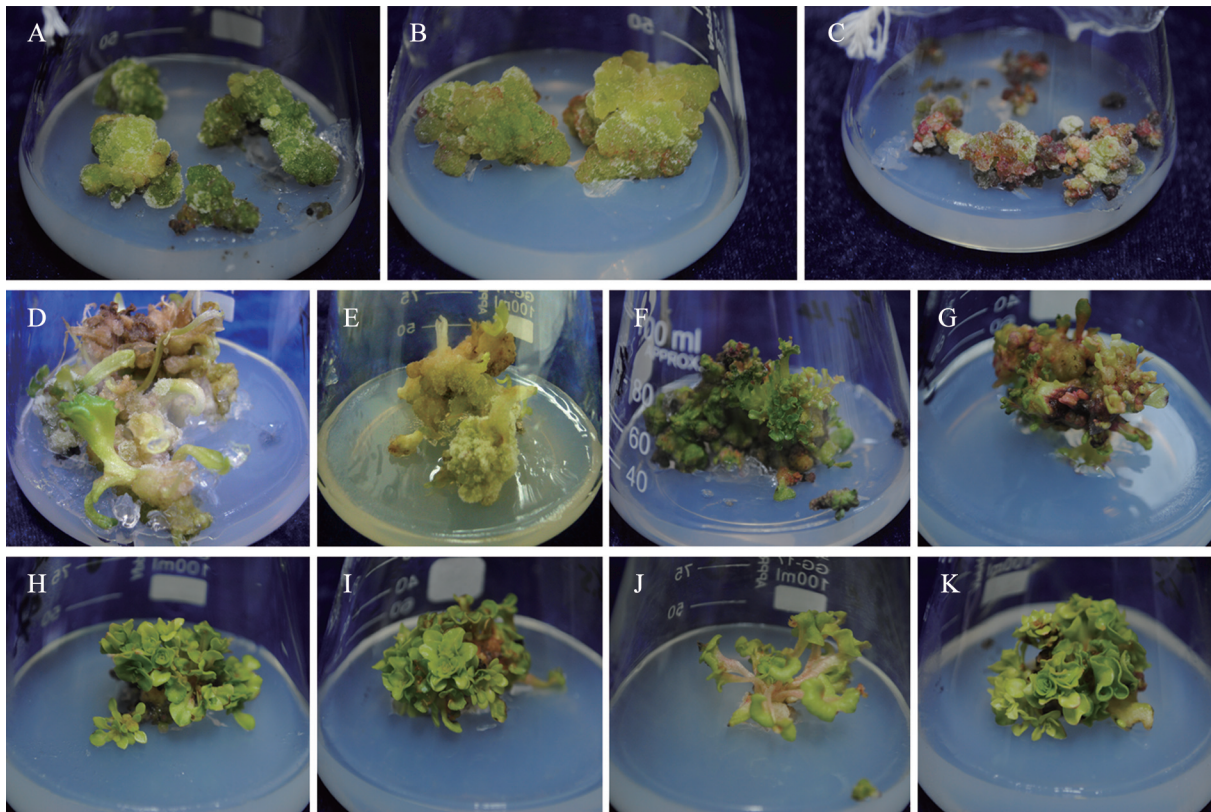


图1 大花红景天的愈伤组织、不定芽与再生苗

Fig.1 Callus, adventitious buds and the infant shoots of *R. crenulata*

A: 鲜绿色愈伤组织; B: 黄绿色愈伤组织; C: 紫红色颗粒状愈伤组织; D-G分别表示I-IV号培养基诱导出的不定芽形态; H-K分别为I-IV号培养基诱导出的再生幼苗。

表2 植物生长物质组合对愈伤组织再分化的影响

Table 2 Effect of plant growth substances combination on callus differentiation

编号	植物生长物质浓度/mg·L ⁻¹	诱芽率/%	不定芽数
I	6-BA 2.5+NAA 0.5	50.49±2.93 ^{Bb}	6.6 ^{ABb}
II	6-BA 0.5+NAA 0.5	21.53±6.46 ^{Cc}	2.0 ^{Cc}
III	TDZ 0.5+NAA 0.5	63.14±1.23 ^{Aa}	11.4 ^{Aa}
IV	TDZ 2.5	49.41±2.44 ^{Bb}	10.6 ^{ABb}

同列数字后不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

细胞分裂素在植物的生长发育过程中起到了最为根本的作用(Kunikowska等2013)。研究表明: 人工合成的新型细胞分裂素TDZ能够有效引起多种植物不定芽的分化。在组织培养过程中, 与其他细胞分裂素如腺嘌呤类物质6-BA等相比, 其在较低的浓度添加下即可引起同样甚至更高效率的芽再生效果, 表现出更高的细胞分裂活性(Subotić

等2009, Murthy等1998)。此外, 有关研究表明, 单独使用TDZ即可达到生长素与分裂素同时添加的诱导效果, 对外植体的再分化起关键作用(Guo等2011)。本研究利用细胞分裂素TDZ与6-BA对大花红景天芽进行诱导实验, 对比结果显示, TDZ对大花红景天不定芽的分化, 的确表现出了高活性, 比6-BA更能有效的诱导出丛生幼苗。

TDZ表现出的高细胞分裂活性, 可能在于3个方面的原因: (1)它抑制细胞分裂素氧化酶的活性, 而细胞分裂素氧化酶是使植物体内细胞分裂素不可逆失活的唯一酶(Victor等1999); (2)在不定芽形成时, 它可以同时作为细胞分裂素和生长素对不定芽的形成起作用(Hutchinson等1999); (3)它可以促使外植体中内源生长素和细胞分裂素的增加(Murthy等1998)。它在本实验研究中的作用尚不清楚, 需要在后续试验中逐步证明。

本实验通过系统研究, 在较低海拔条件下成

功建立起西藏大花红景天的无菌组织培养体系, 这为深入考察真菌诱导子对红景天活性成分的积累及影响、信号调控机理、种质资源的变异与资源开发等后续研究将具有重要意义。

参考文献

- 国家药典委员会(2010). 中华人民共和国药典(第一部). 北京: 中国医药科技出版社, 144
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol*, 10 (45): 8984~9000
- Hutchinson MJ, Murch SJ, Saxena PK (1996). Morphoregulatory role of thidiazuron: evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey). *Plant Physiol*, 149: 573~579
- Kunikowska A, Byczkowska A, Doniak M, Kaźmierczak A (2013). Cytokinins résumé: their signaling and role in programmed cell death in plants. *Plant Cell Rep*, 32: 771~780
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998). Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 34 (4): 267~275
- Panossian A, Wikman G, Sarris J (2010). Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*, 17: 481~493
- Shi LL, Wang CY, Zhou XJ, Zhang YX, Liu YJ, Ma C (2013). Production of salidroside and tyrosol in cell suspension cultures of *Rhodiola crenulata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 114: 295~303
- Subotić A, Jevremović S, Grubišić D (2009). Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaureum erythraea*—Valuable medicinal plant. *Sci Hort*, 120: 386~390
- Victor JMR, Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1999). Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Growth Regul*, 28: 41~47
- Wu SX, Zu YG, Wu M (2003). High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. *J Biotechnol*, 106: 33~43
- Xu JF, Ying PQ, Han AM, Su ZG (1999). Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth substances and sucrose. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 55: 53~58
- Zhang J, Chen XH, Wang P, Huo L, Shen ZD, Guo XR, Cheng WM, Bi KS (2008). LC-MS determination and pharmacokinetic study of salidroside in rat plasma after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation *Rhodiola crenulata* extract. *Chromatographia*, 67: 695~700
- Zhao Y, Sun W, Wang Y, Saxena PK, Liu CZ (2012). Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. *Appl Biochem Biotechnol*, 166: 1480~1490
- Zhao Y, Stiles AR, Saxen PK, Liu CZ (2013). Dark preincubation improves shoot organogenesis from *Rhodiola crenulata* leaf explants. *Biol Plant*, 57 (1): 189~192