

圣地红景天组织培养繁殖研究

周志疆^{1,2}, 陈明亮^{2*}, 杨佩娟² (1. 上海市农业科学院, 上海 201106; 2. 江苏丰收大地种业发展有限公司, 江苏盐城 224100)

摘要 [目的]建立圣地红景天组织培养繁殖体系。[方法]以圣地红景天叶片为外植体,接种在附加不同激素组合的MS培养基诱导愈伤组织和不定芽的形成,同时考察不同培养基对不定根形成的影响,优化种植基质、提高种苗移栽成活率。[结果]叶片在MS+30 g/L蔗糖+1.0 g/L 圣地红景天叶片+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA 培养基上的愈伤组织诱导率高达98%,随后的不定芽分化率为67%。壮苗生根培养基为1/2 MS,将种苗栽植于泥炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1的基质上,其移栽成活率为85%。[结论]利用该体系培育的圣地红景天种苗长势优良,移栽成活率高。

关键词 激素配比;圣地红景天;组织培养;移栽

中图分类号 S567.23⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)35-0103-02

Study on Tissue Culture and Reproduction of *Rhodiola sacra*

ZHOU Zhi-jiang^{1,2}, CHEN Ming-liang², YANG Pei-juan² (1. Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 2. Jiangsu Harvest Land Seed Industry Development Limited Company, Yancheng, Jiangsu 224100)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the tissue culture and rapid propagation of *Rhodiola sacra*. [Method] Using the leaves of *Rhodiola sacra* as material, callus and adventitious bud induction were studied on 1/2 MS medium supplemented with different hormone combinations, at the same time, the effect of different culture medium on rooting was investigated. In order to improve the survival rate in transplantation, composition of planting substrate was optimized. [Result] The leaves of *Rhodiola sacra* could induce callus when cultured in the MS medium supplemented with 30 g/L sugar, 1.0 g/L leaves of *Rhodiola sacra*, 0.5 mg/L 6-BA and 0.05 mg/L NAA; the highest induction rate could reach 98%, and the rate of adventitious bud differentiation was 67% with continuous cultured. *Rhodiola sacra* were easy to root on the 1/2 MS medium. Seedlings were planted in substrate, the substrate composed with peat, perlite and vermiculite in a ratio of 2:1:1, the survival percent of transplantation could reach 85%. [Conclusion] With this culture system, the seedlings of *Rhodiola sacra* have excellent growth and high survival rate.

Key words Hormones ratio; *Rhodiola sacra*; Tissue culture; Transplanting

圣地红景天[*Rhodiola sacra* (Prain ex Hamet) S. H. Fu]为景天科红景天属多年生草本植物^[1],产于德钦、中甸等地,大部分生于海拔2 700~4 100 m的山坡石缝,少部分可在海拔2 000 m左右的林下灌丛中生长^[2]。在我国主要分布于东北、华北、西北、西南等地区,在宁夏、甘肃、青海、四川、西藏等地有种植。圣地红景天具有多种药用价值^[3],研究表明,红景天中含有多种氨基酸和微量元素^[4],是一种免疫增强剂;红景天所含有效成分具有强心镇静、调节新陈代谢、调节神经系统和内分泌系统双向调节血糖、血压的作用,在治疗脑血管疾病,老年性心肌能衰竭、糖尿病、低血压等疾病中获得明显的效果^[5-6];红景天提取物与抗肿瘤药阿霉素的抗癌功效相似,且几乎无毒;红景天还被前苏联保健部审定为“人参型兴奋剂”,用于运动员、宇航员和各种特殊环境条件下的特殊工作者的必备保健品^[7]。

由于人类过度采挖以及其自身生长繁殖特点,红景天数量急剧下降,使得这一珍稀物种濒临灭绝^[8-9]。人们开始寻求使红景天快速繁殖的途径,组织培养就是其中的一种途径。目前关于对红景天其他品种的组培快繁方法的研究较多^[10-11],但对圣地红景天这一品种组培快繁研究鲜见报道。笔者以圣地红景天叶片为再生材料,建立完整的圣地红景天快速繁殖体系,为工厂化生产建立良好的基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 从圣地红景天植株中选取健康、无虫病害的叶片为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料获得。前14 d对红景天植株喷洒多菌灵,选择晴天采摘无病虫害的圣地红景天叶片,洗衣粉浸泡20 min,流水冲洗2 h,转移到超净工作台上,75%乙醇浸泡30 s,无菌水洗涤3次,然后利用0.1% (m/V)的升汞浸润10 min,无菌水洗涤4次后置于无菌吸水纸上吸干叶片表面水分,将叶片切成1 cm²的小片,并在中心位置划伤3道伤口。

1.2.2 不同激素对比对愈伤组织诱导分化的影响。以MS为基本培养基,含有30 g/L蔗糖、1.0 g/L圣地红景天叶片、6.5 g/L琼脂,添加不同浓度的激素6-BA(0.5、1.0 mg/L)和NAA(0.05、0.10 mg/L)。将得到的无菌叶片接种到含有不同激素配比的固体培养基,置于(24±1)℃黑暗条件下培养,45 d后转入光照强度为2 000 lx、光照时间14 h/d的无菌组培室中培养,每瓶中转接8个叶片,重复5次。30 d后统计其愈伤组织生长情况。

选取最优培养下的愈伤组织,添加到上述含不同比例激素培养基中,每瓶中转接5个愈伤组织,重复10次。30 d后统计其丛生芽分化情况。

1.2.3 不同种类培养基对无菌苗生根的影响。将长至1 cm左右的不定芽从愈伤组织上切下,接种到添加含不同种类培养基(MS、1/2 MS、1/2MS+3 g/L AC、1/2MS+0.2 g/L NAA),含有20 g/L蔗糖、6.5 g/L琼脂,每瓶中转接4个种苗,重复10次,培养60 d后统计其根系生长情况及其生根率。

1.2.4 驯化移栽。将装有生根苗的组培瓶整体放置在大棚中7 d,种苗取出后将根部培养基清洗干净,并用甲基托布津(稀释600倍)浸泡根部30 s,栽植于泥炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1营养土、原生土、混合土(混合土和混合基质1:1混合)中进

基金项目 江苏省大丰区科学技术局本级科技计划项目(DJZH201816)。
作者简介 周志疆(1963—),男,上海人,副研究员,硕士,从事遗传育种研究。*通讯作者,农艺师,从事植物组织培养研究。
收稿日期 2018-10-16

行驯化移栽培养。每个基质重复3次,每次移栽100颗植株,每天观察并记录种苗生长情况,60 d后统计种苗移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导及分化 分析不同激素配比对圣地红景天愈伤组织诱导及分化的影响(表1)发现,对当6-BA和NAA组合使用时,低浓度的NAA可以促进圣地红景天愈伤

组织及不定芽的形成,当NAA浓度过高时导致部分愈伤组织出现褐化或玻璃化现象并且有少许畸形不定芽产生。其中以添加0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA的培养效果最好,愈伤组织诱导率(98%)及不定芽分化率(67%)最高,诱导的愈伤成球状,质地紧密,生长旺盛,色泽鲜艳,随后愈伤组织逐渐有簇状不定芽出现,平均芽个数为5.13。

表1 不同激素配比对愈伤组织诱导分化的影响

Table 1 Effects of different hormone ratios on callus induction and adventitious

处理 Treatment	6-BA mg/L	NAA mg/L	诱导率 Inductivity %	愈伤生长 Callus growth	分化率 Differentiation rate/%	芽个数 Bud number	不定芽生长 Adventitious bud growth
①	0.5	0.05	98	球状,质地紧密,生长旺盛,色泽鲜艳	67	5.13	愈伤组织逐渐有簇状不定芽出现
②	1.0	0.05	92	大部分色泽鲜艳,少部分紫红色	65	3.25	部分不定芽出现黄化现象
③	0.5	0.10	83	大部分色泽鲜艳,部分出现褐化	55	1.46	少许畸形不定芽产生
④	1.0	0.10	85	结构紧密,亮绿色,部分玻璃化	56	1.82	少许畸形不定芽产生

2.2 生根培养 从表2可看出,1/2MS培养基相比于MS培养基可以显著促进种苗生根,且1/2MS培养基获得的种苗平均根长(4.56 cm)显著大于MS培养基获得的平均根长(0.68 cm),且根系较粗,主根上有较多须根。向1/2MS中添加3.0 g/L活性炭AC,可以显著促进种苗根的生长,其平均根长为6.72 cm。但种苗的根系较细,白色,无须根。向1/2MS中添加0.2 g/L NAA降低了种苗的生根率,抑制了种苗根的生长,使得根系产生时间较长,无须根。综上所述,以1/2MS为培养基,相对而言较适宜圣地红景天种苗的生根。

表2 不同种类培养基对无菌苗生根的影响

Table 2 Effect of different medium on rooting of aseptic seeding

处理 Treatment	培养基种类 Medium type	生根率 Rooting percentage %	根长 Root length cm	根系生长情况 Root growth situation
①	MS	93	0.68	根系较细,黑色,无须根
②	1/2MS	100	4.56	根系较粗,且主根上有较多须根
③	1/2MS+3.0 g/L AC	100	6.72	根系较细,白色,无须根
④	1/2MS+0.2 g/L NAA	98	1.56	根系产生时间较长,无须根

2.3 驯化移栽 将预处理后的种苗移栽至不同基质中,得到移栽苗的成活率有显著的不同,其具体结果如表3所示,以营养土和混合土为基质,移栽苗的适应期较短且长势较好,但营养土为基质,种苗成活率为85.0%,远高于混合土。以原生土为基质,所得种苗的移栽成活率最低(44.2%),且移栽苗的适应期较长,长势较差。

表3 不同移栽基质对种苗移栽生长的影响

Table 3 Effect of different transplanting matrices on the transplantation growth of seedling

处理 Treatment	移栽基质 Transplanting matrix	移栽成活率 Transplant survival rate/%	生长情况 Growth situation
①	原生土	44.2	适应期较长,长势较差
②	营养土	85.0	适应期短,长势好
③	混合土	72.0	适应期较短,长势较好

3 讨论与结论

植物细胞和组织培养被认为是生产有价值的植物特异性代谢物的有效技术,相比于大田生长的植物具有更高的代

谢速率^[12]。激素是植物组织器官分化的关键因素,有研究表明6-BA/NAA的比值高时有利于圣地红景天不定芽的分化^[13]。该研究中愈伤组织诱导及分化培养基为MS+30 g/L蔗糖+1.0 g/L圣地红景天叶片+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA。6-BA/NAA的比值为10,促进了圣地红景天愈伤组织及不定芽的形成。不定根的形成影响种苗的移栽成活率,是植物组织培养成败的关键。康联伟等^[14]研究菱叶红景天组织培养及植株再生发现,试管苗生根的最佳培养基为1/2MS+1.0 mg/L IBA,生根率可达90%以上。刘海军等^[15]研究表明,长鞭红景天和库叶红景天在添加IBA的MS培养基上容易生根形成完整植株,生根率分别达87%和73%。该研究中以1/2MS为培养基,相对而言较适宜圣地红景天种苗的生根。可能是由于红景天品种的不同导致试验的差异。炼苗移栽成活率是影响工业化生产组培苗的主要因素,该研究在获得较为健壮种苗的基础上,通过考察不同基质对种苗驯化移栽的影响,进一步提高种苗移栽成活率。将种苗栽植于泥炭:珍珠岩:蛭石=2:1:1的基质上,其移栽成活率高达85%,种苗长势好。

该试验以圣地红景天叶片为外植体,不同激素及其浓度对愈伤组织的诱导、分化、生根及不同种类培养基对生根具有不同程度的影响,通过该试验优化建立了圣地红景天的快繁体系,具有培养周期短、增殖系数高、生根效果好、移栽成活率高等特点,为圣地红景天实现高效、快速、工业化生产奠定了一定的研究基础。

参考文献

- [1] 李建民,李福安,雷梅莉,等.狭叶红景天的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(4):472.
- [2] 李青.红景天组织培养研究进展[J].西藏科技,2011(5):70-73.
- [3] 胡挺松,马兰青,郭万里,等.长鞭红景天的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(3):335.
- [4] 尹文兵,李伟,杜桂森,等.西藏红景天组织培养研究[J].西北植物学报,2004,24(8):1506-1510.
- [5] 张明发,沈雅琴.红景天苷及其苷元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用[J].药物评价研究,2013,36(3):228-234.
- [6] 李凤林.红景天苷药理作用的研究现状[J].现代食品科技,2013(4):916-920.
- [7] 耿欣.红景天抗疲劳作用研究进展[J].中医药学报,2011,39(3):95-97.

$$Y_1 = -0.486 3X_5 - 11.353 2X_6 + 1.120 2X_7 - 5.121 6X_{10} + 0.130 1X_{16} + 16.095 1 (R^2 = 0.326 8^*)$$

$$Y_2 = 0.258 7X_7 - 0.478 4X_{13} + 13.127 7 (R^2 = 0.101 3)$$

$$Y_3 = -3.556 8X_6 + 0.244 5X_7 - 1.953 3X_{10} + 6.845 2 (R^2 = 0.228 0^*)$$

$$Y_4 = 0.164 2X_5 - 10.277X_6 + 0.594 3X_7 - 1.873 2X_{10} + 0.113 4X_{16} + 8.083 9 (R^2 = 0.437 7^{**})$$

$$Y_5 = 0.190 4X_5 - 6.425 8X_6 + 0.225 9X_7 - 2.590 4X_{10} - 0.577 7X_{13} + 8.629 8 (R^2 = 0.427 3^{**})$$

$$Y_6 = 0.156 7X_5 - 4.311 7X_6 + 0.122X_7 - 0.062 5X_{11} + 2.22 9X_{17} + 3.326 (R^2 = 0.454 5^{**})$$

$$Y_7 = 0.075 5X_5 - 3.769X_6 + 0.192 5X_7 - 1.235 8X_{10} - 0.226 1X_{13} + 0.882 5X_{17} + 3.307 7 (R^2 = 0.531 3^{**})$$

$$Y_8 = 0.026 3X_2 - 4.912 8X_6 + 0.191 2X_7 - 1.161 3X_{10} + 0.028 2X_{16} + 3.414 9 (R^2 = 0.384 2^{**})$$

$$Y_9 = -1.888 5X_6 + 0.116 9X_7 - 0.138 2X_{13} + 0.008 5X_{15} + 3.209 7 (R^2 = 0.195 5)$$

经显著性检验,香气质(Y_1)、余味(Y_3)、杂气(Y_4)、刺激性(Y_5)、回甜感(Y_6)、干燥感(Y_7)、细腻度(Y_8)回归方程呈显著或极显著,香气量(Y_2)、成团性(Y_9)多元线性方程经检验未达到显著水平,线性关系不成立。干燥感(Y_7)方程决定系数最高,为0.531 3,其次是回甜感(Y_6)。

香气质(Y_1)得分与亚油酸(X_7)、柠檬酸(X_{16})含量呈正相关,14-甲基十六烷酸(X_5)、十七酸(X_6)、花生酸(X_{10})含量与香气质得分呈负相关。余味(Y_3)得分与亚油酸含量呈正相关,与十七酸、花生酸呈负相关。杂气(Y_4)得分与14-甲基十六烷酸、亚油酸、柠檬酸呈正相关,与花生酸、十七酸呈负相关。刺激性(Y_5)得分与14-甲基十六烷酸、亚油酸呈正相关,与十七酸、花生酸、延胡索酸(X_{13})呈负相关。回甜感(Y_6)与14-甲基十六烷酸、亚油酸、异柠檬酸(X_{17})呈正相关,与十七酸、乙二酸(X_{11})呈负相关。干燥感(Y_7)与14-甲基十六烷酸、亚油酸、异柠檬酸呈正相关,与十七酸、花生酸、延胡索酸呈负相关。细腻度(Y_8)得分与2,4-庚二烯酸(X_2)、亚油酸、柠檬酸呈正相关,与十七酸、花生酸呈负相关。

2.2 感官质量与非挥发性有机酸、高级脂肪酸含量灰色关联度分析 按照文献[9]方法,采用灰色关联度分析方法分析感官质量与非挥发性有机酸、高级脂肪酸含量之间的关系,以确定各成分对感官质量指标的贡献大小顺序。在筛选出的各因子中,亚油酸与各筛选出的因变量之间的关联系数均为最大,表明亚油酸含量对香气质、余味、杂气、刺激性、回

甜感、干燥感、细腻度影响最大;其次是十七酸;花生酸对香气质、余味、杂气、细腻度的影响仅次于十七酸。在筛选出的影响因子中,14-甲基十六烷酸对香气质、杂气、刺激性、回甜感、干燥感得分的影响均是最小的。

3 结论与讨论

(1)亚油酸对香气质、香气量、杂气、刺激性、回甜感、干燥感、细腻度正向影响最大,而十七酸对各个因变量负向影响最大。一般认为不饱和脂肪酸会增加刺激性^[10],该研究发现亚油酸对刺激性起到正向影响,但与刘帅帅等^[11]、胡建军等^[12]的研究结果一致,可能是因为不饱和脂肪酸含量对刺激性的影响呈现分段性,并非不饱和酸含量越低越好,此外能否使用亚油酸/十七酸比值来衡量不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸对感官质量的影响,有待进一步验证。

(2)柠檬酸对香气质、杂气得分具有的正向影响,对细腻度也有一定改善。异柠檬酸对回甜感、干燥感有正向影响,而在欧美国家很重视在卷烟中添加二元或三元羧酸达到促进唾液分泌的效果,以消除干渴感^[13]。乙二酸对于回甜感的负向影响仅次于十七酸。花生酸对香气质、余味、杂气、刺激性、干燥感、细腻度均有负面影响。在配方设计时,考虑使用柠檬酸、异柠檬酸含量高,花生酸、乙二酸含量低的烟叶或者通过制丝加料时添加柠檬酸盐、异柠檬酸盐来改善烟支吸烟细腻度、回甜感及干燥感,进一步满足消费者需求。

参考文献

- [1] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [2] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [3] 王利杰,卢红. 烟草有机酸研究进展[J]. 贵州农业科学,2007,35(3):142-144.
- [4] 烟草化学与分析编写组. 烟草化学与分析[M]. 北京:中国财政经济出版社,1992.
- [5] 周冀衡,朱小平,王彦亭,等. 烟草生理与生物化学[M]. 合肥:中国科技大学出版社,1996.
- [6] 史宏志,刘国顺,刘惠娟,等. 烟草香味学[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [7] 刘百战,徐亮,胡便霞,等. 卷烟中非挥发性有机酸及某些高级脂肪酸的分析[J]. 烟草科技,2000(1):25-27.
- [8] 卢秀萍,许议,许自成,等. 不同烤烟基因型非挥发性有机酸和高级脂肪酸含量的变异分析[J]. 中国烟草学报,2007,13(3):47-51.
- [9] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002:294-327.
- [10] DAVIS D L. Waxes and lipids in leaf and their relationship to smoking quality and aroma[J]. Recent advances in tobacco science,1976,2:80-106.
- [11] 刘帅帅,王允白,王志华,等. 南平特色烤烟非挥发性有机酸(盐)与感官质量的相关性分析[J]. 中国烟草科学,2012,33(3):32-36.
- [12] 胡建军,周冀衡,李文伟,等. 烤烟香味成分与其感官质量的典型相关分析[J]. 烟草科技,2007(3):9-15,22.
- [13] 周正红,高孔荣,张水华. 烟草中化学成分对卷烟香气品质的影响及其研究进展[J]. 烟草科技,1997(2):22-25.
- [14] VERPOORTE R, CONTIN A, MEMELINK J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites[J]. Phytochemistry reviews,2002,1(1):13-25.
- [15] 邢苗苗,沈漫,高退虹,等. 2种景天植物组培快繁的研究[J]. 北京农学院学报,2010,25(1):65-68.
- [16] 康联伟,李翠芹,王喆. 藜叶红景天组织培养及植株再生[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3250-3254.
- [17] 刘海军,郭斌,晏琼,等. 4种红景天植物的组织培养研究[J]. 西北植物学报,2006,26(10):2023-2027.

(上接第104页)

- [8] 尼玛次仁,刘青,多杰仁青,等. 青藏高原红景天研究进展及存在问题[J]. 中华中医药杂志,2013,28(9):2675-2678.
- [9] 吴雪莲,王文华,邱诚,等. 植物激素对西藏大花红景天组培苗生根诱导的影响[J]. 西藏农业科技,2012,34(2):12-15.
- [10] 王云美,王元忠,张仲凯. 云南野生大花红景天的组织培养与快速繁殖[J]. 安徽农业科学,2009,37(17):7865,7867.
- [11] 陈彦芹,姚霞珍,邢震,等. 西藏长鞭红景天炼苗及移栽技术研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12009-12010.