



4 种红景天植物的组织培养研究

刘海军^{1,2}, 郭 斌^{1,3}, 晏 琼¹, 刘玉军², 刘春朝^{1,3*}

(1 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以大花红景天、云南红景天、长鞭红景天和库页红景天的茎和叶为外植体进行组织培养, 结果表明: 大花红景天以茎为外植体诱导芽效果最好, 其它 3 种红景天以叶为外植体诱导芽效果最好。云南红景天和长鞭红景天适合的芽诱导激素组合是 0.1 mg/L NAA 和 2.5 mg/L 6-BA 的组合, 在该激素水平下两种红景天的出芽频率分别达到 71% 和 84%; 大花红景天和库叶红景天适合的芽诱导激素组合是 0.5 mg/L NAA 和 2.5 mg/L 6-BA 的组合, 在该激素水平下两种红景天的出芽频率均达到 80%。长鞭红景天和库叶红景天在添加 IBA 的培养基上容易生根形成完整植株, 生根率分别达到 87% 和 73%; 经过炼苗后, 长鞭红景天再生苗能够成功移栽, 成活率达 66%。

关键词:红景天; 组织培养; 再生植株

中图分类号: Q813.1⁺ 2; Q949.751.1

文献标识码: A

Tissue Cultures of Four *Rhodiola* Species

LIU Hai-jun^{1,2}, GUO Bin^{1,3}, YAN Qiong¹, LIU Yu-jun², LIU Chun-zhao^{1,3*}

(1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: The stems and leaves of *Rhodiola crenulata*, *Rhodiola yunnanensis*, *Rhodiola fastigiata* and *Rhodiola sachalinensis* were *in vitro* cultured as the explants, the stems of *Rhodiola crenulata* and the leaves of *Rhodiola yunnanensis*, *Rhodiola fastigiata* and *Rhodiola sachalinensis* were found to be the best parts for shoot induction. The optimal hormone combination for shoot induction of *Rhodiola yunnanensis* and *Rhodiola crenulata* was 0.1 mg/L NAA plus 2.5 mg/L 6-BA and the shoot induction percentages of the two species were 71% and 84% with the optimal hormone combination, respectively; The optimal hormone combination for shoot induction of *Rhodiola fastigiata* and *Rhodiola sachalinensis* was 0.5 mg/L NAA plus 2.5 mg/L 6-BA and the shoot induction percentages of the two species reached 80% with the optimal hormone combination; the induced shoots of *Rhodiola fastigiata* and *Rhodiola sachalinensis* were easy to root on the medium with IBA added and the rooting percentages were 87% and 73%, respectively; After having been hardened the regeneration plantlets of *Rhodiola fastigiata* could be successfully transplanted and survive at the rate of 66%.

Key words: *Rhodiola*; tissue culture; regeneration plantlet

红景天始载于藏医药学著作《四部医典》, 为景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)植物的

根及根茎, 主要用于治疗肺炎、传染病的发烧和清血管热等。20 世纪 60 年代, 前苏联科学家布列赫曼

收稿日期: 2006-03-22; 修改稿收到日期: 2006-09-22

基金项目: 中国科学院与西藏自治区科技合作项目

作者简介: 刘海军(1978—), 男(满族), 植物学专业博士。

* 通讯联系人。Correspondence to: LIU Chun-zhao. E-mail: czliu@home.ipe.ac.cn

经研究发现红景天具有类似中医“扶正固本”的“适应原作用”,为红景天的滋补作用提供了有力的科学依据^[1]。近几十年来,国内外对红景天属植物的研究方兴未艾,目前已知其不仅具有抗氧化、抗疲劳、抗微波辐射等类似适应原的作用,还具有抑制肿瘤的活性^[2,3]。红景天的化学成分主要有甙类、黄酮类、香豆素类、生物碱类等,其中公认的药效活性成分为红景天甙、络塞维及其甙元酪醇^[4]。

随着人们对红景天药用价值的认识,野生红景天资源遭到了空前破坏,有些品种甚至濒临灭绝。花粉败育是高山红景天濒危的内在原因,恶劣的生态环境条件、人工栽培难和大量的滥采滥挖是其濒危的外在原因^[5]。红景天组织培养可以克服野生资源短缺、自然繁殖率低和人工栽培烂根等棘手问题,国内在红景天组织培养再生植株的研究方面取得了一定进展。刘世强^[6]等报道用高山红景天种子做外植体可诱导出具有分化能力的愈伤组织,但以胚轴为外植体诱导的愈伤组织不能分化。秦佳梅等^[7]采用高山红景天的叶片作为外植体,接种在 MS 培养基上诱导形成愈伤组织,在 MS 附加 6-BA (2 mg/L) 和 IAA (0.25 mg/L) 的培养基上可以分化出大量丛生芽,丛生芽培养于 B₅ 附加 IAA (0.5 mg/L) 的培养基上可诱导生根形成完整植株。泽仁旺姆^[8]等报道,以玫瑰红景天的叶片为外植体,接种到添加 6-BA (2 mg/L) 与 NAA (0.2 mg/L) 的 MS 培养基上 3 个月后分化出芽,并发现 1/2 MS 附加 IBA (0.3 mg/L) 为最佳的生根培养基。晏婴才^[9]等对云南几个红景天品种的组培进行了简要的报道。上述研究都没有对红景天再生植株过程中的每一个环节进行详尽的研究。本研究对 4 种珍稀红景天品种云南红景天、大花红景天、库页红景天和长鞭红景天的组织培养进行了系统研究,对芽诱导和生根过程中的激素比例配比进行了细致的考查,建立了快速再生组培苗工艺,为红景天资源的保护和可持续利用提供了技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大花红景天 (*Rhodiola crenulata*) 和长鞭红景天 (*Rhodiola fastigiata*) 采自西藏林芝地区,云南红景天 (*Rhodiola yunnanensis*) 采自四川省成都四姑娘山,库页红景天 (*Rhodiola sachalinensis*) 采自吉林省长白山。

1.2 方 法

1.2.1 外植体处理 分别选取 4 种红景天幼嫩的茎、叶作为外植体,自来水流水冲洗 1 h 后,在超净工作台上先用 70% 的乙醇漂洗 10 s,再用 10% 的 84 消毒液(北京柯林龙安医学技术有限公司生产,有效氯:5.5%~6.5%)浸泡 25 min,10 min 时更换一次消毒液,然后用无菌水冲洗 5 次,无菌滤纸吸干多于水分。将消毒过的茎、叶切成 0.5~0.7 cm 长的小段(块),接种到不同激素种类和浓度配比的诱导培养基上。

1.2.2 培养条件 选用的培养基为 MS 基本培养基^[10],每升培养基添加 30 g 蔗糖和 5.8 g 琼脂以及不同浓度种类配比的激素,芽诱导培养基(表 1)和生根培养基(表 2)具有不同的激素组合。pH 值灭菌前调到 5.8,培养室温度保持在 25℃ 左右,光照强度为 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$,每天光照 16 h。进行芽诱导试验时,每个处理用 24 个外植体,重复 2 次。培养 40 d 后进行再生芽诱导率和诱导个数的统计,此后每 30 d 继代培养一次。进行生根培养时,将长到 4 cm 以上的红景天再生芽切下接种到生根培养基中,30 d 后统计生根率。

1.2.3 炼苗与移栽 红景天组培苗经过 1 周散射光炼苗,清水洗去琼脂,移栽到事先灭好菌的河沙中,1/2 浓度 Hogland 营养液浇灌,以后每天喷洒 2 次,塑料袋覆盖保湿,60 d 后统计成活率。

1.2.4 数据处理 所有实验数据采用 SPSS10.0 进行方差分析,Duncan 检测方法,0.05 检测水平,所有百分数在统计分析前均进行反正弦数据转化。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对红景天再生芽诱导的影响

4 种红景天的幼茎和嫩叶对 BA 和 NAA 2 种激素的响应明显不同(其中 2 种激素单独处理效果很差,所以具体数据未进行统计):云南红景天的茎在本实验所采用的配方下均褐化死亡,而嫩叶比较容易地诱导出再生芽;以叶片为外植体,在含有 2.5 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的培养基上再生芽诱导率达到 71.4%,平均每个外植体可以产生 14 个再生芽(图版 I, A、B、C;表 1)。大花红景天茎和叶均表现出再生芽的诱导潜能,但是大花红景天叶片中含有内生真菌,给实验带来极大的麻烦,因此选用大花红景天的茎作为外植体;在添加 5.0 mg/L BA 和 0.5 mg/L NAA 组合的培养基上诱导率达到 85%,诱导的再生芽个数达到 15 个,明显优于其它

的激素组合(图版 I、D、E、F;表 1)。实验中发现库叶红景天和长鞭红景天的叶外植体比茎显示出更强的再生能力,在添加 2.5 mg/L BA 和 0.5 mg/L NAA 的培养基上,库叶红景天叶片再生芽诱导率为 80%,每个外植体可诱导出 4 个再生芽(图版 I、G、H、I;表 1);长鞭红景天叶片在添加 2.5 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 组合的培养基上再生芽诱导率达到 85%,再生芽诱导个数达到 5(图版 I、J、K;

表 1)。Skoog 和 Miller^[11]认为生长素和细胞分裂素水平的相对比例在调控外植体分化过程中起着重要的作用,一般情况下,生长素含量高时有利于向根的方向分化,细胞分裂素高时有利于向芽的方向分化。本实验中所选用的 4 种红景天对所选用的激素组合响应不完全相同,这可能是由于不同植物材料内源激素水平和对外源激素响应能力不同,从而导致不定芽诱导率和诱导个数存在差异。

表 1 NAA 和 6-BA 激素配方对红景天再生芽诱导率和个数的影响

Table 1 Regeneration shoot induction percentages rate and shoot numbers of *Rhodiola* species in different NAA and 6-BA combination

NAA+6-BA (mg/L)	云南红景天 <i>R. yunnanensis</i>		大花红景天 <i>R. crenulata</i>		库叶红景天 <i>R. sachalinensis</i>		长鞭红景天 <i>R. fastigiata</i>	
	诱导百分率 Rate of shooting (%)	不定芽个数 Number of shoots per explant	诱导百分率 Rate of shooting (%)	不定芽个数 Number of shoots per explant	诱导百分率 Rate of shooting (%)	不定芽个数 Number of shoots per explant	诱导百分率 Rate of shooting (%)	不定芽个数 Number of shoots per explant
0.1+1.0	28.6 b	1.8 b	25.0 d	1.2 d	26.7 d	1.5 d	27.1 d	1.7 d
0.1+1.0	71.4 a	14.4 a	33.3 d	3.0 cd	46.7 c	2.0 d	82.3 a	4.9 a
0.1+2.5	23.8 b	3.0 b	75.0 b	4.3 c	45.5 c	2.4 d	78.5 a	4.0 b
0.1+5.0	33.3 b	3.9 b	23.0 d	6.0 c	30.0 d	1.7 d	16.9 d	1.1 e
0.5+1.0	28.6 b	1.8 c	80.0 ab	9.0 b	80.0 a	5.0 a	32.6 c	2.1 d
0.5+2.5	14.3 c	1.3 c	85.0 a	15.0 a	60.0 b	4.1 b	40.5 b	2.8 c
0.5+5.0	9.5 c	2.5 b	16.0 d	5.3 c	20.0 d	1.5 d	8.8 d	1.3 e
1.0+1.0	19.0 c	1.8 c	57.1 c	4.5 c	50.0 c	2.0 d	38.6 b	1.5 d
1.0+2.5	16.0 c	3.0 b	75.0 b	8.3 d	66.7 b	3.4 c	39.5 b	2.2 c

注:基本培养基均为 MS;表中数字后不同的字母表示 0.05 水平差异显著性($P < 0.05$)。

Notes: The basic medium is MS; Different letters following the figures in the same columns means significant differences at $P < 0.05$.

2.2 红景天再生芽的生根和组培苗移栽

4 种红景天从不同的外植体上诱导出大量的不定芽后转移到新鲜的培养基上继代培养,再生芽不断生长和繁殖,产生大量的丛生芽,当再生芽高度达到 4 cm 以上时剪切下接种到添加不同浓度 IBA 的培养基上进行生根培养。实验结果表明:云南红景天和大花红景天再生芽在所选用添加 IBA 的生根培养基中很难生根;而库叶红景天和长鞭红景天再生芽生根比较容易,培养 30 d 后,库叶红景天再生芽在添加 0.5 mg/L IBA 的培养基上生根率达 73%(表 2);在添加 0.3 mg/L IBA 的 MS 培养基上,长鞭红景天的再生芽生根率达到 87%(表 2)。再生芽生根后获得完整的再生植株,在无菌条件下生长 2 个月后的再生植株置于散射光下炼苗一星期,然后移栽到灭菌的河沙中,定时喷洒 Hogland 营养液,保持组培苗驯化过程中环境湿度和营养供给,60 d 后长鞭红景天组培苗成活率为 66%;库叶红景天组培苗移栽成活率为 5%。Dimitrov 等^[11]在玫瑰红景天的组培过程中,也发现了同样的现象,诱导的玫瑰红景天再生芽也很难生根。因此,对于云南红景天和大花红景天的生根和库叶红景天的移栽成活将

成为今后亟待解决的重点问题。

表 2 含不同浓度 IBA 的生根培养基对长鞭红景天和库叶红景天组培苗生根的影响

Table 2 The rootings of the regeneration plantlets of *R. fastigiata* and *R. sachalinensis* on the media with IBA at different concentrations

IBA 浓度 IBA concentrations (mg/L)	生根率 Percentage of rooting(%)	
	长鞭红景天 <i>R. fastigiata</i>	库叶红景天 <i>R. sachalinensis</i>
0	74.8b	27.1c
0.1	85.5a	34.3c
0.3	87.4a	55.2b
0.5	69.1b	72.9a
1.0	62.3b	59.8b

注:基本培养基均为 MS;表中数字后不同字母表示 0.05 水平差异显著性($P < 0.05$)。

Notes: The basic medium is MS; Different letters following the figures in the same columns means significantly differences at 0.05.

3 讨论

本实验对云南红景天、大花红景天、库叶红景天和长鞭红景天的植株再生进行了研究。结果表明,大花红景天以茎为材料获得较高的芽诱导频率以及

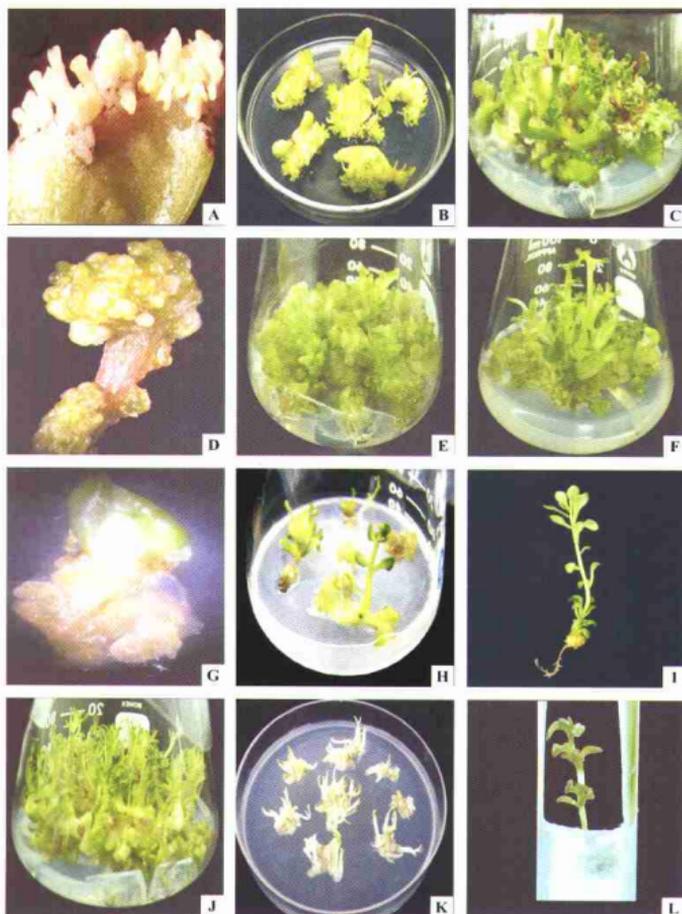
每个外植体上芽的数量最多,但晏婴才等^[9]用叶片为外植体获得了较好的结果,这可能与使用不同的激素有关。大花红景天、库叶红景天和长鞭红景天以叶为外植体结果较理想,这与尹文兵^[12]、胡挺松^[13]报道的相同,但是他们没有对芽的诱导频率和芽的个数以及根诱导情况进行报道。本研究采用了植物组织培养中比较常用的激素 NAA、BA、IBA 对 4 种红景天进行了快速繁殖,对该过程中激素浓度进行了比较详细的摸索,确定了在芽分化和生根过程中的激素配比,为这 4 种红景天的规模化繁育工作提供了有效的参数。在研究过程中发现云南红景天和大花红景天生根比较困难,生根频率不超过 10%(数据没有显示),这可能与植物本身的基因特性有关。在这方面,我们正在从这 2 种植物的生存环境特点出发,采用外界环境的刺激等方面来诱导其生根。

尽管在不同种红景天的快速繁殖方面有了很多

的报道,但是要通过组织培养技术进行红景天工厂化生产尚需要解决很多问题,其中比较关键的几个环节是:(1)针对每一种红景天详细筛选适合芽分化和根生长的激素配比,对再生过程中的每一个环节进行深入地研究;(2)植物组培苗的移栽一直是一个比较棘手的问题,红景天组培苗的移栽更是这样,所以必须重视这个环节,可以通过一些化学试剂如稀土等进行处理来提高组培苗的成活率;(3)红景天属于高山植物,在低海拔区生长时,其生长状态会受到一定的影响,最直接的表现是生长速度有可能减慢,而且红景天甙等有效成分的含量会发生变化,在这方面的研究还很少,很大程度上阻碍了红景天工厂化生产的进程。这几个关键性问题的解决不仅能为红景天这一重要的药用植物规模化生产提供可行的基础,而且能为其它珍稀濒危药用植物的开发和可持续生产提供很好的借鉴。

参考文献:

- [1] BROWN R P, GERBARG P L, RAMAZANOV Z. *Rhodiola rosea*, a phytomedicinal overview[J]. *Herbal. Gram.*, 2002, 56: 40-52.
- [2] SHEVTSOV V A, ZHOLUS B I, SHERVARLY V I, et al. A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work[J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(3): 95-105.
- [3] ZHAO W, JIANG D S, BIAN Q R, et al. Effects of *Rhodiola rosea* on immune function and its anti-tumor action in mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2000, 22, 1: 90-91.
- [4] MING H Q(明海泉), XIA G CH(夏光成), ZHANG R D(张瑞钧). Research progress in *Rhodiola*[J]. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*(中草药), 1988, 19(5): 37-42(in Chinese).
- [5] XU J F, SU Z G, FENG P S. Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production[J]. *Enzyme Micro. Tech.*, 1998, 23: 20-27.
- [6] LIU SH Q(刘世强), HAN S M(韩素敏). *In vitro* callus induction and plant regeneration of *Rhodiola sachalinensis*[J]. *Liaoning Agr. Sci.*(辽宁农业科学), 1991, 5: 17-22(in Chinese).
- [7] QIN J M(秦佳梅), ZHANG G(张弓), ZHANG W D(张卫东). Plant regeneration from leaf segments of *Rhodiola sachalinensis*[J]. *Chin. Wild Plant Resour.*(中国野生植物资源), 1999, 18(1): 45-46(in Chinese).
- [8] DIMITROW B, TASHEVA K, ZAGORSKA N, et al. *In vitro* cultivation of *Rhodiola rosea* L. [J]. *Genetics and Breeding*, 2003, 32: 3-6(in Chinese).
- [9] YAN Y C(晏婴才), CHENG ZH Y(程治英), YU H(虞泓). Tissue culture and rapid propagation of *Rhodiola* in Yunnan[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2005, 41(3): 341-341(in Chinese).
- [10] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiology Plant*, 1962, 15: 473-497.
- [11] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*[A]. In: Porter H K(ed). *The biological action of growth substances*[M]. Academic Press, New York, 1957, 118-131.
- [12] YIN W B(尹文兵), LI W(李伟), ZHOU Y(周燕), LI Y SH(李颖石), YIN L P(印莉萍), HUANG Q N(黄勤妮). Tissue culture and rapid propagation of *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) S. H. Fu[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2005, 41(4): 493(in Chinese).
- [13] HU T S(胡挺松), MA L Q(马兰青), GUO W L(郭万里), LI Y F(李彦舫). Tissue culture and rapid propagation of *Rhodiola fastigiata* [J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2004, 40(3): 335(in Chinese).



图版 1 4种红景天植物的组织培养过程

A. 云南红景天芽的发生; B. 云南红景天芽的增殖; C. 云南红景天芽的伸长; D. 大花红景天芽的发生; E. 大花红景天芽的增殖; F. 大花红景天芽的伸长; G. 库叶红景天芽的发生; H. 库叶红景天芽的增殖; I. 库叶红景天再生植株; J. 长鞭红景天芽的发生; K. 长鞭红景天芽的增殖; L. 长鞭红景天再生植株。

Plate 1 Tissue culture process of 4 *Rhodiola* species

A. Shoot occurrence of *R. yunnanensis*; B. Shoot multiplication of *R. yunnanensis*; C. Shoot elongation of *R. yunnanensis*; D. Shoot occurrence of *R. crenulata*; E. Shoot multiplication of *R. crenulata*; F. Shoot elongation of *R. crenulata*; G. Shoot occurrence of *R. sachalinensis*; H. Shoot multiplication of *R. sachalinensis*; I. Regeneration plantlets of *R. sachalinensis*; J. Shoot occurrence of *R. fastigiata*; K. Shoot multiplication of *R. fastigiata*; L. Regeneration plantlets of *R. fastigiata*.