

高山红景天叶片愈伤组织诱导与植株再生¹⁾

刘剑锋 阎秀峰

(东北林业大学, 哈尔滨, 150040)

李霞 程云清

(吉林师范大学)

摘要 以高山红景天叶片作为外植体,研究了影响愈伤组织诱导、芽增殖、生根的主要因素。结果表明:高山红景天叶片切块诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L,诱导率达 88.33%;高山红景天叶片切块经诱导可产生 3 种色泽的愈伤组织,其中只有绿色愈伤组织诱导容易,绿色愈伤组织在附加 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基中有利于芽的分化和增殖,培养 7 周左右,平均每个外植体分化形成的再生小植株数达到 21.33 个;增殖苗转入 1/2 MS 培养基中生根率高达 100%。

关键词 高山红景天;组织培养;叶片

分类号 Q945.79

Callus Induction and Plantlet Regeneration from Leaf Explants of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor./Liu Jianfeng, Yan Xiufeng(Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China); Li Xia, Cheng Yunqing(Jilin Normal University)//Journal of Northeast Forestry University. - 2007, 35(2). - 33~34

The main factors affecting callus induction, bud proliferation and rooting were studied using leaves of *Rhodiola sachalinensis* as explants. Result showed that the optimal medium for callus induction from leaf segments was MS supplemented with 2 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA, and the callus induction rate reached 88.33 percent. Yellow, green and red callus could be induced from leaf segments, but only green callus could be induced to bud easily. The MS medium supplemented with 1 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA was favorable for the differentiation and proliferation of buds, and the average regeneration plantlets for each explant was 21.33 after 7 weeks of culture. All the regenerative plantlets could take root after being transferred to 1/2 MS.

Key words *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.; Tissue culture; Leaves

高山红景天(*Rhodiola sachalinensis*)是景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola*)多年生草本植物^[1],也是我国著名药用植物。它具有抗疲劳、抗衰老、抗缺氧、抗辐射等功能,在运动医学、军事医学、航天医学等领域备受重视^[2-3]。但高山红景天生境特殊,分布区范围十分狭窄,经济贮量少,自然萌发率低,加之近年来一些地区大量收购,致使其资源遭到严重破坏,蕴藏量急剧下降,种群处于严重濒危状态^[4]。因此,组织培养快繁与离体保存相结合是进一步开发利用高山红景天的重要途径。本研究以叶片为外植体,对影响高山红景天愈伤组织诱导、芽诱导及生根条件进行了探讨,为高山红景天的快速繁殖及离体保存研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2004年2月取来长白山的高山红景天2年生苗,移栽于吉林师范大学生命科学院药用植物标本园中,3月芽体开始萌动,5月取小苗顶端幼嫩叶片作为供试材料。

1.2 试验方法

材料消毒处理:将高山红景天叶片剪下,在流水下冲洗1 h,在无菌工作台上,用70%的酒精浸泡30 s,再用0.1%的升汞溶液浸泡8~10 min,无菌水冲洗5次。

愈伤组织诱导:用消毒滤纸吸干叶片的表面水分,将其基部剪成1 cm × 1 cm左右的小片,以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的植物生长调节剂进行愈伤组织诱导培养。

不定芽诱导与增殖:将绿色颗粒状愈伤组织切成0.3 cm ×

0.5 cm的小块,转接到附加不同质量浓度植物生长调节剂的MS培养基上进行不定芽诱导。待诱导出的不定芽长至2~3 cm,切下接入增殖培养基MS中,添加不同质量浓度植物生长调节剂进行培养。每个处理接5瓶,每瓶接2个不定芽,重复3次。

生根培养:将增殖培养所得的2 cm以上的健壮苗切割下来,转入生根培养基中,进行生根培养,基本培养基选用1/2 MS。

移栽:移栽前将生根苗的三角瓶盖打开,于25℃、散射光下炼苗3~4 d,然后取出小苗洗净根部培养基,移栽于疏松腐殖质壤土中,并加盖透光塑料杯,1周后移栽至大田。

培养条件:以上培养基pH值均为5.8,琼脂6 g/L,蔗糖25 g/L,在1.2 kg·cm⁻²压力下灭菌20 min。接种后置于培养温度(22±2)℃,光照强度为1 000~1 500 lx,每天光照12 h的GXZ-160型智能光照培养箱(北京北方科仪)中培养。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂组合的培养基对愈伤组织诱导的影响

高山红景天叶片外植体在接种至附加不同质量浓度植物生长激素的MS培养基后,经过一段时间培养均可产生愈伤组织,但叶片在不同培养基上愈伤组织诱导率存在十分明显的差异(表1)。培养8周后,在添加1.0 mg/L 6-BA和0.2 mg/L NAA的MS培养基上开始形成绿色愈伤组织,但愈伤组织诱导率很低,仅为21.67%;而在添加2.0 mg/L 6-BA和0.5 mg/L NAA的MS培养基上形成了黄、红、绿等不同色泽的愈伤组织,其中黄色与红色愈伤组织结构疏松,而绿色愈伤组织相对致密,且诱导率高达88.33%(图1中a~c),其中绿色、黄色与红色愈伤组织分别占65.98%、12.67%与9.67%。随着6-BA与NAA质量浓度的上升,愈伤组织诱导率迅速下降,其形成的愈伤组织色泽有黄、绿2种,且生长较为迅速。添加不同质量浓度的2,4-D对愈伤组织的诱导能力较低,生成的愈伤组织均为绿色,生长十分缓慢。综上所述,不同植物激素组合的培养基对叶片外植体的愈伤组织率均有明显影

1) 黑龙江省博士后基金资助(No. LBH-Z05014)。

第一作者简介:刘剑锋,男,1976年10月生,东北林业大学生命科学院做博士后研究,现任吉林省师范大学生命科学院,副教授。

通讯作者:阎秀峰,东北林业大学生命科学院,教授。

收稿日期:2006年4月7日。

责任编辑:潘华。

响,但添加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基对叶片愈伤组织诱导最为有效。

表1 不同质量浓度的生长调节剂对叶片愈伤组织形成的影响 mg·L⁻¹

2, 4D	6-BA	NAA	外植体个数	愈伤组织诱导率%	愈伤色泽
0	1	0.2	60	21.67	绿
0	2	0.5	60	88.33	黄、红、绿
0	3	0.7	60	45.00	黄、绿
0	5	1.0	60	25.00	黄、绿
1	0	0.2	60	20.00	绿
2	0	0.5	60	23.33	绿

2.2 不同生长调节剂组合的培养基对愈伤组织出芽率的影响

以添加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基诱导产生的愈伤组织作为外植体,以相同成分的培养基进行 3 次继代培养后,愈伤组织生长十分旺盛,此时将不同色泽的愈伤组织转移到不同的芽分化培养基上进行培养,结果表明黄色与红色的出芽率均极低,在不同芽分化培养基上平均每个外植体出芽数低于 3 个,而绿色的出芽率相对则要高得多;将绿色愈伤组织转至不同诱导培养基后,2 周内愈伤组织体积显著增大,4~5 周后形成丛生不定芽(图 1 中 d),部分产生白色不定根,不同培养基对愈伤组织出芽率的影响如表 2 所示,在不添加 6-BA 和 NAA 的培养基上,出芽外植体数目很少,在附加 1.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 或 2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上,外植体出芽率均达到 100%;但在附加 1 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上,平均每个外植体出芽数目较后者高得多。此后,随着 6-BA 和 NAA 质量浓度的升高,出芽外植体比例明显降低,平均每个外植体出芽数目很少。因此,附加 1.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基作为高山红景天诱芽培养基是较为适宜的。

表2 高山红景天愈伤组织在不同培养基的成芽率

培养基	外植体个数	出芽外植个数	出芽率%	平均每个外植体出芽个数
6-BA0+NAA0	30	7	23.33	1.20 d
6-BA1.0+NAA0.1	30	30	100.00	21.33 a
6-BA2.0+NAA0.2	30	30	100.00	12.50 b
6-BA3.0+NAA0.3	30	14	46.67	5.57 c
6-BA4.0+NAA0.4	30	18	60.00	7.56 c
6-BA5.0+NAA0.5	30	15	50.00	4.27 c

注:外植体出芽数中相同字母表示邓肯氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异不显著。

2.3 继代培养

将愈伤组织产生的丛芽分别接种到附加 1.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上,芽开始增殖,每 30~60 d 继代 1 次,增殖 4~6 倍。分生芽逐渐形成独立小植株,部分丛芽可长出幼根。

2.4 生根与移栽

切取高 2~3 cm 的芽体,接种于 1/2 MS 培养基上,5~7 d 即可产生根原基突起。10~15 d 后,根长 5~6 cm,平均每株生根 9 条,生根率达 100% (图 1 中 e)。待苗高达 4 cm 以上进行移栽,移栽成活率达 95% 以上(图 1 中 f)。

3 讨论

激素是植物组织培养器官分化的关键因素,形成器官的类型由培养基中不同激素的相对浓度控制,而不是这些物质的绝对浓度决定^[5]。Skoog 和 Miller 在 1957 年的经典实验已表明在烟草组织培养中,器官的形成可由培养基中所含细胞

分裂素浓度与生长素浓度的比值控制^[6]。在本研究中,以高山红景天叶片作为外植体,全面研究其愈伤诱导形成的适宜条件:在愈伤组织诱导方面,以附加 2.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS 为愈伤诱导培养基,6-BA 与 NAA 比值为 4,愈伤组织诱导容易,诱导率可达 88.33%,在形成不同颜色的愈伤组织中,分化成芽能力存在巨大差异,其中以绿色愈伤组织最易诱导成芽;在芽诱导与增殖方面,采用附加 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的 MS 作为芽分化和增殖培养基,6-BA 与 NAA 比值为 10,可促进芽的大量形成;在根诱导方面,使用简单 1/2 MS 培养基可使芽体 100% 生根。本研究过程中所获得的大量愈伤组织和试管苗,直接为高山红景天种质资源离体保存提供了材料;其愈伤诱导、芽诱导增殖及根诱导条件为高山红景天离体保存材料的植株再生与快速繁殖提供了技术平台。

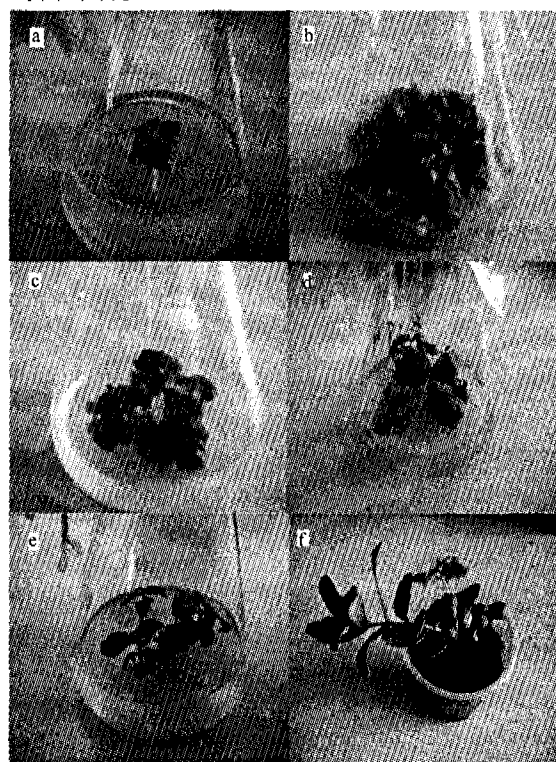


图1 高山红景天叶片组织培养

a. 黄色愈伤; b. 绿色愈伤,表面形成大量的芽; c. 红色愈伤; d. 愈伤诱导形成丛生芽,愈伤下面已经有根形成; e. 芽经根诱导形成大量根系; f. 移栽后成活的高山红景天试管苗

参 考 文 献

- [1] 张萍,申家恒. 高山红景天胚胎学研究[J]. 植物研究,1998,18(1):38-45.
- [2] 明海泉,夏光成,张瑞钧. 红景天研究进展[J]. 中草药,1988,18(5):37-42.
- [3] 吴双秀,尚辛亥,戴绍军,等. 高山红景天添年龄与根部红景天甙含量的关系[J]. 植物研究,2001,21(2):252-257.
- [4] 祖元刚,唐艳. 高山红景天有性生殖过程及濒危原因的生态学分析[J]. 植物研究,1998,18(3):336-340.
- [5] 崔澄. 植物激素与细胞分化及形态发生的关系[J]. 细胞生物学杂志,1983,5(2):1-5.
- [6] Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro [J]. In Biological Action of Growth Substances, Symp Soc Exp Biol,1957,11:118-131.