

大花红景天再生体系的优化及抗性筛选

王莉莎¹, 蔡翠萍¹, 常 凯^{2,4}, 廖志华^{2,3}, 兰小中^{1*}

1. 西藏大学农牧学院, 西藏 林芝 860000

2. 西南大学 天然产物与代谢工程实验室, 重庆 400715

3. 重庆市甘薯工程技术研究中心, 重庆 400715

4. 成都军区总医院 临床实验医学研究与保障中心, 四川 成都 610083

摘要:目的 优化大花红景天再生体系并建立抗性筛选最佳条件, 为建立大花红景天高效遗传转化体系奠定基础。方法 以大花红景天叶片为外植体, 观察再生过程各阶段在不同配比的 6-BA、NAA、IBA 诱导下的诱导率及生长状况, 并利用梯度筛选出外植体对卡那霉素(Kan)和抗潮霉素(Hyg)的抗性。结果 MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro 为叶片不定芽分化的最佳培养基, 分化率达到 92%; MS+700 mg/L L-Pro 为根培养基; 200 mg/L Kan、10 mg/L Hyg 为大花红景天遗传转化的最佳筛选压; 培养过程中添加 10 mg/L Vc 能有效抑制酚类物质的外泌。结论 优化了大花红景天植株再生体系, 筛选出适宜于大花红景天遗传转化体系的 Kan 和 Hyg 筛选压。

关键词: 大花红景天; 再生体系; 褐化; 抗性筛选; 遗传转化

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)04-0558-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.020

Optimization of regeneration system and resistance screening of *Rhodiola crenulata*

WANG Li-sha¹, CAI Cui-ping¹, CHANG Kai^{2,3}, LIAO Zhi-hua^{2,3}, LAN Xiao-zhong¹

1. Agricultural and Animal Husbandry College of Tibet University, Linzhi 860000, China

2. Laboratory of Natural Products and Metabolic Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

3. School of Life Sciences, Chongqing Engineering & Technology, Research Center for Sweetpotato, Chongqing 400715, China

4. Center of Clinical Laboratory Medicine Research and Services, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China

Abstract: Objective To optimize the regeneration system of *Rhodiola crenulata*, to establish the optimal conditions for resistance screening, and to lay the foundation for the establishment of the efficient genetic transformation system of *R. crenulata*. **Methods** The leaves of *Rhodiola crenulata* were used as explants. The influences of different ratios of 6-BA, NAA, and IAA in the medium on callus induction and growth conditions were observed, and the implant resistance of Kanamycin (Kan) and hygromycin (Hyg) was screened by gradient method. **Results** MS + 3.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA + 700 mg/L L-Pro was the optimal medium for the differentiation of leaf adventitious bud and the differentiation ratio of adventitious bud reached 92%; MS + 700 mg/L L-Pro was the medium for adventitious roots; The best selection of genetic transformation system for *R. crenulata* was 200 mg/L Kan and 10 mg/L Hyg; Adding 10 mg/L Vc could effectively inhibit the phenolic substances secretion. **Conclusion** The regeneration system of *R. crenulata*, is optimized, and the pressure of Kan and Hyg for genetic transformation system of *R. crenulata* is screened.

Key words: *Rhodiola crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba; regeneration system; browning; resistance screening; genetic transformation

大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba 是景天科 (Crassulaceae), 红景天属 *Rhodiola* L. 多年生的草本, 具有肉质匍匐根

状茎, 为珍稀的药用植物。大花红景天的主要药用成分是红景天苷和酪醇, 被誉为“高原人参”^[1]。药理研究表明, 大花红景天具有抗缺氧、抗疲劳、

收稿日期: 2013-11-05

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI13B06); 国家中医药管理局公共卫生专项 (20120716-540000)

作者简介: 王莉莎 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为高原生理生态研究。E-mail: lisa0894@163.com

*通信作者 兰小中 E-mail: lanxiaozhong@163.com

网络出版时间: 2014-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.html>

抗辐射、抗病毒、抗肿瘤^[2]、改善心血管系统等多种功效,此外还具有延缓机体衰老,防止老年疾病之功效,是一种具有广阔的发展前途的适用于特殊地区开发的环境适应性药物。

近年来,随着对大花红景天的过度开发利用,野生状态的大花红景天资源受到了严重的威胁。采用组织培养技术,快速繁育大花红景天植株幼苗是解决资源短缺的重要途径^[3]。本实验以大花红景天无菌苗为实验材料,优化再生体系,建立抑制褐化方法并筛选出叶片对卡那霉素(Kan)、抗潮霉素(Hyg)的抗性临界点,为大花红景天代谢工程与次生代谢相关研究及叶盘法的遗传转化提供了基础。

1 材料

样品采自西藏林芝地区色季拉山,经西藏大学兰小中副教授鉴定为大花红景天 *Rhodiola crenulata* L. 的种子。

2 方法

2.1 种子消毒及无菌苗组培苗的获得

挑选粒大饱满的大花红景天种子,经过4℃低温放置3周,用无菌水浸泡24 h,经75%乙醇和0.6% NaClO消毒后,接种到含700 mg/L L-脯氨酸(L-Pro)的MS固体培养基上,置于温度为(20±3)℃的恒温培养室中光照培养。3~5 d后长出2片子叶,发芽率达99%,且无污染。

2.2 愈伤组织的诱导与出芽

将20 d苗龄的大花红景天无菌苗剪去根部,切成0.5~1.0 cm²小块,用不同质量浓度的生长素NAA(1.0、2.0、3.0 mg/L)与细胞分裂素6-BA组合诱导的培养基(浓度均为3.0 mg/L)或用不同浓度的6-BA(0.5、1.0 mg/L)与生长素NAA组合诱导的培养基(质量浓度均为2.0 mg/L)培养。

2.3 生根培养

丛生芽长到5~7 cm时切下,放置在加入MS+700 mg/L L-Pro、MS+0.5 mg/L NAA、MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA培养基诱导生根。

2.4 培养条件的优化

由于大花红景天自身伤口分泌酚类有色物质,致使材料褐化死亡,采用以下解决方案:在MS基本培养基中分别添加抗氧化剂维生素C(Vc):5、10、15、20 mg/L;添加活性炭:0.5、1.0、1.5 mg/L;在MS基本培养基中添加灭菌的滤纸培养^[4]。

2.5 大花红景天对抗生素的敏感性的测定

将大花红景天叶片切成0.5~1 cm²小块,分别

放置到含不同浓度Kan、Hyg的再生培养基MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro上,观察不同浓度的Kan、Hyg对大花红景天愈伤组织诱导和分化的影响,以确定最优的筛选压,筛选出合适的浓度用于遗传转化。Kan的浓度设定为50、100、200、300 mg/L,Hyg的浓度为5、10、15、20 mg/L,40 d后统计筛选的效果。

2.6 培养条件

以MS为基本培养基,培养基的pH值均为5.8,附加蔗糖30 g/L、琼脂7.2 g/L。培养温度为20℃,每日光照14 h,培养周期为28 d,光照强度为3 000 lx。

3 结果与分析

3.1 不同激素浓度对红景天再生芽的诱导

实验结果表明(表1)在所选MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro培养基中不定芽的诱导率达到92%,分化愈伤组织呈现出紫红色,质地疏松,丛生芽较多,无褐化或玻璃化现象出现。MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro培养基中不定芽的诱导率为52%,分化愈伤组织多为青绿色,质地紧密,丛生芽少,偶有褐化或玻璃化现象。另两种培养基(MS+3 mg/L 6-BA+3 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro和MS+1 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro)的分化效率极低,分别为40%和30%,且分化的愈伤组织质地紧密,玻璃化与褐化现象严重,并伴有提前衰老的迹象。分析可得,MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro培养基能够短时高效地诱导大花红景天的叶芽分化,能够更好的应用于植物基因工程研究。

在大花红景天再生芽的诱导实验中发现存在愈伤组织的色泽差异(图1),表现出质地蓬松的紫红色愈伤和质地略为紧密的绿色愈伤,通过显微观察发现,几乎所有丛生芽的分化均始于紫红色愈伤,长期继代发现紫红色愈伤生长迅速,含水量大,而绿色愈伤组织生长缓慢,干燥,易老化。由实验结果分析可见,随着NAA浓度的减少,6-BA/NAA浓度配比的增大,诱导率和愈伤的生长状况均有极大地提升,表明较高浓度的细胞分裂素6-BA有助于提高丛生芽的分化效率,这与四裂红景天的相关研究一致^[5]。L-Pro在本研究中合理的应用能够有效地提高植物愈伤组织质量,延长继代时间,保持再生能力^[6]。

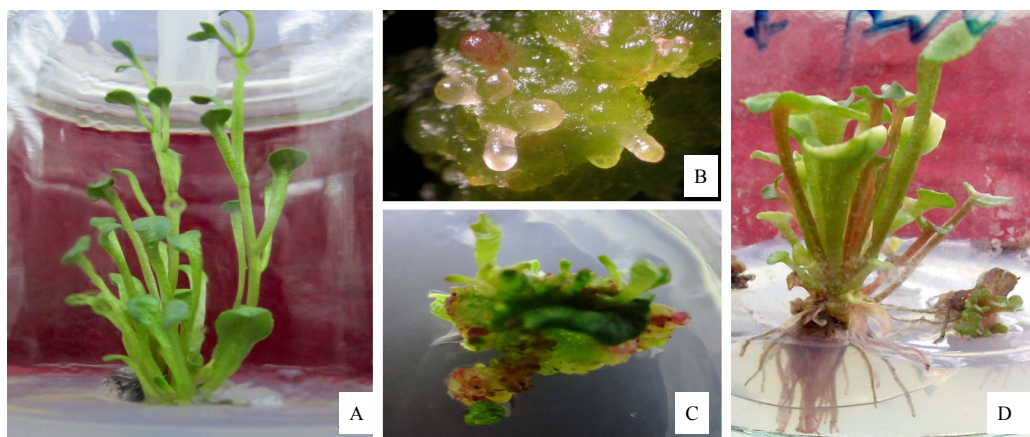
3.2 不定根的诱导

在植株再生体系中,不定根的诱导至关重要^[7],

表1 6-BA 和 NAA 不同配比培养基中不定芽诱导情况

Table 1 Adventitious induction in culture media with 6-BA and NAA at different ratios

编号	培养基成分	接种总数	诱导个数	诱导率 / %
1	MS+3.0 mg/L 6-BA+3.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro	50	20	40
2	MS+3.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro	50	26	52
3	MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro	50	46	92
4	MS+0.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro	50	30	60
5	MS+1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro	50	15	30



A-无菌苗 B-再生芽点显微图 C-丛生芽 D-不定根诱导

A-sterile plants B-micrographs of regeneration buds C-bud clumps D-induction of adventitious root

图1 大花红景天再生过程不同时期的生长状态

Fig. 1 Growth state of *R. crenulata* in different regeneration periods

本研究应用 4 种不同的培养基诱导生根 (MS, MS+700 mg/L L-Pro、MS+0.5 mg/L NAA、MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA), 结果表明 (表 2), MS+700 mg/L L-Pro 培养基诱导率高, 生根迅速, 分枝多。MS 和 MS+0.5 mg/L NAA 两种培养基虽能有效的诱导不定根的生成, 但存在分枝较少的缺点, MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA 培养基中, 诱导率仅为 16%, 根分枝少, 生长慢。NAA 具有促进细胞分裂和不定根生成的作用, 但在本实验中表明 MS 培养基中添加 0.5 mg/L NAA 不能显著地提高大花红景天不定根的诱导率, 然而 700 mg/L L-Pro

的添加却有促进不定根生成的功效。在木本植物中成功应用添加 IBA 和 NAA 的培养基不能促进根的生成, 相反, 有着极大地抑制作用。表明木本植株与草本植株的生根培养存在较大差异。

3.3 褐化现象的防止

在大花红景天培养过程中, 创伤处时常分泌一些黑褐色酚类物质, 该物质直接影响叶片的生长及愈伤组织的形成, 最终导致叶片的死亡。为消除该现象影响大花红景天的再生效率, 设计 3 种常用方法预防褐化现象: 加入不同质量浓度 Vc、活性炭和滤纸。结果表明 (表 3), 10 mg/L 的 Vc 能

表2 不同培养基中诱导不定芽的生根情况

Table 2 Rooting situations of adventitious buds induced in different media

编号	培养基成分	接种总数	诱导个数	诱导率 / %	生长状态
1	MS	50	42	84	根分较少多, 生长快, 白色
2	MS+700 mg/L L-Pro	50	48	96	根分之多, 生长快, 暗红色
3	MS+0.5 mg/L NAA	50	41	82	根分枝较少, 生长快, 白色
4	MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA	50	8	16	根分枝少, 生长慢, 白色

表 3 不同培养基对褐变的影响

Table 3 Effects of different culture media on browning

编号	培养基成分	接种总数	褐化个数	褐化率 / %
1	MS+5 mg/L Vc	50	8	16
2	MS+10 mg/L Vc	50	1	2
3	MS+15 mg/L Vc	50	6	12
4	MS+20 mg/L Vc	50	7	14
5	MS+0.5 mg/L 活性炭	50	9	18
6	MS+1.0 mg/L 活性炭	50	3	6
7	MS+1.5 mg/L 活性炭	50	6	12
8	MS+滤纸	50	10	20

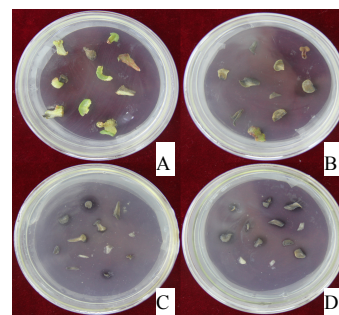
够有效防止叶片的褐化现象产生。随 Vc 质量浓度的升高和降低,褐化率明显增高。活性炭能够吸附酚类等有害物质,添加活性炭的 MS 固体培养基能够降低叶片褐化率,但同时也会吸附培养基中的营养物质,改变 pH 值与固体培养基硬度,影响叶片的生长。滤纸能够吸附酚类物质,同时也直接影响叶片对营养物质的吸收利用,不能有效消除褐化现象^[8]。

Vc 又名抗坏血酸,具有直接清除植物体内因氧化代谢产生的活性氧,保护植物有机体及其正常代谢免于氧化胁迫造成伤害的作用,通过还原作用消除有害氧自由基的毒性,Vc 防止褐化的方法能够有效的应用于多个物种:100 mg/L Vc 防止香蕉茎尖褐变;500 mg/L 的 Vc 抑制无花果的褐化效果最明显^[9],而在大花红景天中 10 mg/L 的 Vc 能够有效防止褐化。

3.4 Kan 和 Hyg 抗性浓度的筛选

将外植体置于分别含有不同浓度的 Kan (图 2) 和 Hyg (图 3) 的 MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro 培养基上培养 40 d 后观察致死率,发现随着 Kan 浓度的增加,致死率增大,50 mg/L Kan 致死率 13.3%,100 mg/L Kan 致死率 77.7%,200 mg/L Kan 致死率 95.5%,300 mg/L Kan 致死率为 100%。Hyg 的结果为 5 mg/L Hyg 致死率 27%,10 mg/L Hyg 致死率 80%,15 mg/L Hyg 致死率 100%,20 mg/L Hyg 致死率为 100%。考虑经济因素,因而得到 Kan 和 Hyg 的最佳抗性浓度分别为 200 mg/L 和 10 mg/L。

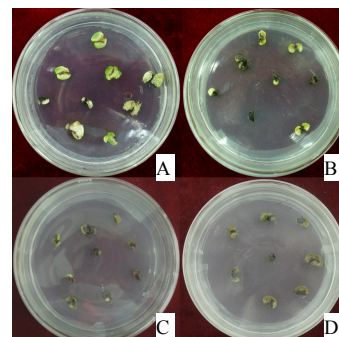
农杆菌介导的植株转化方法已广泛应用于植物基因工程,对带有抗性的转基因植株(载体携带)进行筛选有助于提高转化效率,降低劳动成本。因



A-50 mg/L Kan B-100 mg/L Kan C-200 mg/L Kan D-300 mg/L Kan

图 2 Kan 的抗性筛选

Fig. 2 Resistance screening of Kan



A-5 mg/L Hyg B-10 mg/L Hyg C-15 mg/L Hyg D-20 mg/L Hyg

图 3 Hyg 的抗性筛选

Fig. 3 Resistance screening of Hyg

而 Kan 和 Hyg 抗性浓度的筛选工作显得尤为重要,过高的浓度会抑制植株的生长,过低的浓度会失去筛选的价值并增大后期检测的工作量。

4 讨论

西藏大花红景天生长于海拔约 4 500 m 的高海拔地带,常年严寒、缺氧、强日照,条件恶劣,从而造就了其强适应性的遗传特征^[10]。这使得大花红

景天的再生条件不同于多数草本植物,在各生长阶段,6-BA/NAA的较高浓度配比能够有效地促进大花红景天的丛生芽分化,因而得到最佳丛生芽诱导培养基为MS+3.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+700 mg/L L-Pro。最佳生根培养基为MS+700 mg/L L-Pro。

大花红景天叶片为肉质化叶片且富含多糖多酚,在培养过程中会出现酚类物质外泌的现象,使得叶片褐化最终死亡^[11]。为有效防止褐化,最终发现在培养基中添加10 mg/L Vc能够抑制这一现象。

在本研究中成功筛选出大花红景天叶片对Kan和Hyg抗性的浓度分别为200 mg/L和10 mg/L。为大花红景天应用于植物基因工程,培育出高产红景天苷的转基因植株打下基础。

参考文献

- [1] 张祖荣,廖志华. 红景天苷的生物合成途径及生物技术研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1571-1574.
- [2] 姜建伟,章红燕,芦柏震. 藏药红景天抗肿瘤作用机制及临床应用研究进展 [J]. 江西中医药, 2010, 41(5): 74-76.
- [3] 尹文兵,李伟,周燕,等. 大花红景天的组织培养和快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 493.
- [4] Peng M, Liao Z, Zheng Y, *et al.* Establishment of a high frequency plant regeneration system of *Rauvolfia verticillata* via somatic embryogenesis [J]. *J Med Plant Res*, 2011, 5(18): 4452-4455.
- [5] 沈梦圆,易丽娟,李春. 激素对四裂红景天愈伤组织诱导及其继代培养的影响 [J]. 生物加工过程, 2008, 6(3): 57-60.
- [6] 李海菊. 简述玉米体细胞组织培养中影响愈伤组织诱导的因素 [J]. 吕梁教育学院学报, 2011, 28(3): 44-45.
- [7] Sivakumar G, Yu K W, Paek K Y. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures [J]. *Eng Life Sci*, 2005, 5(4): 333-342.
- [8] Ahamed A, Vermette P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei* morphology and cellulase production [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(23): 5979-5987.
- [9] 孙丽娟,关洪斌,赵晶,等. 无花果组织培养中防止外植体褐化的研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 535-536.
- [10] 滕静如,熊佳鹏,肖诚,等. 红景天的现代药理学研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(4): 319-320.
- [11] 冯丽,宋曙辉,赵霖,等. 植物多酚种类及其生理功能的研究进展 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 105-107.