

红根草的组织培养与快速繁殖研究

唐凤鸾, 李 锋, 付传明, 黄宁珍

(广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)
中国科学院

摘要: 研究了红根草不同采集季节、外植体类型与消毒效果, 不同激素浓度和激素组合与芽及根的诱导, 及试管苗的移栽。结果表明, 不同外植体类型消毒效果为: 茎节 > 茎尖 > 植株抽茎前的生长点; 4~6 月份采样最佳; MS+BA 0.8~1.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L、MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L、MS+NAA 1.0 mg/L 分别用于初代、继代、生根培养效果最好; 试管苗移栽成活率达 90%。

关键词: 红根草; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0282-04

Tissue culture and rapid propagation of *Salvia prionitis*

TANG Feng-luan, LI Feng, FU Chuan-ming, HUANG Ning-zhen

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and Academia Sinica, Guilin 541006, China)

Abstract: Tissue culture and rapid propagation of *Salvia prionitis* were reported in this paper. Effects of several factors such as different explants, collecting periods on the influence of sterilization, different phytohormones concentration, medium on the induction of buds and roots, and transplantation of seedlings were studied. Results showed that stem was the best explant for sterilization, the next one was the tip of stem and the third one was the low tip on the ground before the stem outgrowth. The best collecting periods of explants was from April to June. The most suitable medium for bud induction was MS+BA 0.8~1.6 mg/L+NAA 0.2 mg/L, MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L was optimum for proliferation, and MS+NAA 1.0 mg/L was best for root induction. The survival rate of the seedlings was about 90%.

Key words: *Salvia prionitis*; tissue culture; rapid propagation

红根草(*Salvia prionitis*), 又名黄埔鼠尾、红根子、小丹参, 为唇形科鼠尾草属一年生草本植物。分布于浙江、安徽、江西、湖南及广西、广东等地。红根草是民间常用草药, 已收载于 1977 年版《中华人民共和国药典》中, 民间用于治疗腹泻、菌痢、急性扁桃腺炎、咽喉炎等(黄炼栋等, 1998)。随着对红根草化学成分及药理作用研究的深入, 发现它含有多种有效成份, 如红根草酮内酯、新红根草酮、二氢异丹参

酮 2 及红根草邻醌等, 其中红根草邻醌是首次从植物中分离得到的自然产物, 它对 P-(338) 白血病细胞有很强的抑制作用, 抗菌活性也很明显(张金生等, 1995; 杨保津等, 1988; 张锋等, 2003)。随着新的有效成分的发现和药用范围的扩大, 红根草已成为中药领域极具开发潜力的品种。因此, 我们对其进行组培快繁技术研究, 以便对今后的生产和研究提供技术和科学依据。

收稿日期: 2005-02-22 修回日期: 2005-10-23

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322024-3B)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0322024-3B)]

作者简介: 唐凤鸾(1978-), 女, 广西全州人, 研究实习员, 从事植物组织培养研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料

红根草材料采自于广西桂林雁山镇上屋村的野生植株。选取无病健壮植株的茎节、茎尖及植株没有抽茎前的生长点作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的采集及处理 外植体的采集季节分为 4~6、6~8、8~10 月 3 个阶段。在采集季节内把材料采回,去叶,用自来水冲洗干净,然后用纱布轻轻擦去材料表面的污物,放在 800 倍甲基托布津溶液中浸泡 20 min。捞出后用自来水重新冲洗干净,最后将材料分为茎节、茎尖和植株未抽茎前的生长点 3 种类型待用。

1.2.2 外植体的消毒及接种 在无菌条件下把处理好的外植体材料先用 70%(v/v)的酒精浸泡 1 min,无菌水冲洗 2 遍后用质量为 0.1%的升汞(HgCl_2)处理 5~10 min,再用无菌水冲洗 5~6 遍。把消毒好的材料切去两头接入不同处理的培养基上,每处理接种 30 管,每管接种一个材料。

1.2.3 培养基及培养条件 以 MS 为基本培养基,附加 3%蔗糖,0.5%琼脂及不同种类和浓度的植物激素,培养基 pH 值 5.8。培养条件:光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx,培养温度为 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 影响外植体消毒效果的因素

2.1.1 消毒时间对消毒效果的影响 用升汞(HgCl_2)分别处理材料 5、7、9、10 min,结果污染率和成活率无明显差异,这表明红根草对 HgCl_2 不敏感,可用它来消毒。但 HgCl_2 是一种剧毒物质,经它处理过的植物总会受到一定的伤害,且会随处理时间的延长而加重。因此在污染率和成活率无明显差异的情况下,应选择处理时间短的为宜。综上所述用 HgCl_2 处理 5 min 为红根草外植体的最佳消毒方法。

2.1.2 取材季节对消毒效果的影响 分别于 4~6、6~8、8~10 月 3 个时间段取茎节,经表面消毒后接种在诱导培养基中,30 d 内观察污染情况。结果不同季节所采的外植体,其灭菌效果差异较大。4~6 月份取材,外植体的污染率为 30%,而 6~8、8~10 月份的污染率分别为 78.3%、53.3%。这与外植体

表面携带的病原菌及气候有关。4~6 月份取材,植株的生长时间短,表面的微生物相对较少,因而污染率低;6~8 月份的植株生长时间较长,且在高温高湿环境中微生物繁殖快数量多,对植物的侵入能力也强,因此附着在植株上的微生物也多,难于消毒而污染率最高;而随着气候的变化 8~10 月份的材料污染率有所下降。

2.1.3 取材部位对消毒效果的影响 分别选择茎节、茎尖和植株未抽茎前的生长点作为外植体进行消毒接种,结果三者的差异很大。茎尖细嫩柔软,易受损伤,外加表皮毛生长浓密及幼叶包被,清洗难也不利于消毒药剂渗透,因而灭菌不彻底,受消毒药剂的伤害大,所以死亡率最高(25%),污染率也较高(60%)。茎节由于腋芽尚未抽长,表皮毛稀疏,相对容易清洗和消毒,污染率(46.7%)、死亡率(5%)最低,存活率最高(48.3%)。植株未抽茎前的生长点与泥土接触,带有较多的微生物且难于清洗,污染率最高(85%)。

2.2 不同激素浓度和组合对不同培养阶段芽诱导的影响

2.2.1 对初代培养材料芽的诱导 将消毒好的外植体(茎节)材料接种于不同激素组合、不同浓度的培养基上进行培养。培养过程中发现,材料在 BA 浓度为 0.8~1.6 mg/L 之间的生长最好,在培养 8 d 时材料开始长出新芽,此时各配方的培养基中材料生长情况无明显差异;到第 15 d 时,随着 BA 浓度的升高芽诱导率及芽的生长量也增加。随培养时间的延长各处理中材料的芽诱导率趋于一至;BA 在 0.8~1.6 mg/L 之内,随 BA 浓度的增加,芽生长快且较粗壮,但高浓度的 BA 会使材料在培养后期出现玻璃化,如当浓度达 2.0 时,材料在培养 30 d 左右有部分出现玻璃化。表 1 和表 2 是培养 25 d 的统计结果,每处理统计 30 管未被污染的材料。结果表明,在不同激素浓度和组合中,MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上的材料生长最好,芽生长较快且粗壮,叶颜色嫩绿,无玻璃化现象,因此这一配方是最佳的。

2.2.2 对继代增殖阶段丛生芽的诱导 把初代培养获得的无菌材料切成小段,每段带一个腋芽,后接种在继代培养基上。培养时发现材料在 BA 浓度为 0.5~1.0 mg/L 范围内均很容易玻璃化。在配方为 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L 的培养基上,材料快速生长,转接 7 d 后在材料与培养

基接触处就可见丛生小芽,20 d后即可转接继代,平均增殖倍数达到5倍/25 d。表3为培养25 d的统计结果。

表1 不同激素浓度对初代培养材料芽诱导的影响

Table 1 Effect of different phytohormones concentration on the buds induction of the first culture

培养基 Medium (mg/L)	芽诱导率 Induced rate of buds (%)	芽平均长 Average length of buds(cm)	玻璃化 Glassiness	生长 情况 Growth
BA0.2+NAA0.2	97.1	1.58	无	差
BA0.4+NAA0.2	96.77	1.61	无	一般
BA0.8+NAA0.2	98.85	1.78	无	好
BA1.2+NAA0.2	98.2	1.8	无	较好
BA1.6+NAA0.2	98.32	1.97	无	好
BA2.0+NAA0.2	97.8	2.12	有	一般

注:芽诱导率为出芽数与统计数的比率,下同。

Note: Bud inducing rate is the ratio of budding number to statistics number. The same as follows.

表2 不同激素组合对初代培养芽的诱导效果

Table 2 Effect of different phytohormone composition on the buds induction of the first culture

激素组合(mg/L) Combinations of phytohormone	芽诱导率(%) Induced rate of buds	芽平均长(cm) Average length of buds	生长情况 Growth condition
BA1.0	88.67	1.45	差
BA0.8+NAA0.2	98.53	2.01	好
BA0.8+IBA0.2	97.32	1.76	一般
BA1.0+NAA0.1	97.21	1.69	较好

表3 不同激素浓度对增殖节段丛生芽诱导的影响

Table 3 Effects of different hormones concentration on the multiple-shoot induction of proliferation

培养基 Medium (mg/L)	数量(管) Number	玻璃化程度 Glassiness	生长情况 Growth condition
BA0.2+NAA0.02	30	无	好
BA0.5+NAA0.02	30	轻度	一般
BA0.8+NAA0.05	30	中度	差
BA1.0+NAA0.1	30	严重	差

2.3 不同 NAA 浓度对红根草生根诱导的影响

材料经过增殖培养达到一定的数量后对其进行生根诱导。把丛生小芽分割成单芽接种在生根培养基上诱导生根。试验以不加任何激素的 MS 为对照,通过改变基本培养基中的 NAA 浓度设计方案。结果在添加 1.0 mg/LNAA 培养基上的材料根生长快、条数多且粗壮;而当 NAA 为 1.5 mg/L 时培养材料生根率降低,根系生长也差;但在 2.0 mg/LNAA 时添加 0.5% 的活性炭材料生根却较好,这是由于 AC 的吸附作用降低了培养基中 NAA 的有

效浓度,或是由于 AC 的存在使培养基变黑,产生了类似土壤的效果(崔德才等,2003),从而利于生根。表 4 为材料培养 20 d 时的观测结果,每处理随机统计 40 株。

表4 不同 NAA 浓度对试管苗生根的影响

Table 4 Effect of different NAA concentration on root induction

使用浓度 Concentration (mg/L)	根平均数 Average of roots (条)	主根平均长 Average length of main roots (cm)	根诱导率 Induced rate of roots (%)	根生长 情况 Root growth
MS	7.2	4.9	67	纤细
MS+NAA0.5	8.8	2.95	95	较壮,有少量须根
MS+NAA1.0	12	3.9	90	粗壮,须根多
MS+NAA1.5	8.64	2.22	72	纤细
MS+NAA2.0 +AC 0.5%	11.5	2.8	93	较壮,须根较多

注:根诱导率为长根株数与统计数的比率。

Note: Induced rate of roots is the ratio of rootings to statistics

2.4 红根草生根苗的移栽

生根试管苗的移栽是植物组织培养的一个重要环节。将生根苗从培养室移到室外炼苗,7 d 后移栽到经 800 倍甲基托布津消毒的基质上,基质由 2 份火烧土+1 份腐熟的猪粪构成。环境温度保持 20~30℃,湿度为 80% 左右,用 70% 的遮阳网遮阴。移栽后 5 d 苗长新根,30 d 后成活率达 90%。

3 讨论

红根草的取材季节和外植体类型对消毒效果的影响非常明显,通过试验证明在 4~6 月份采集茎节做外植体消毒效果最好,其次为 8~10 月份。虽然红根草在 0.1% 的 HgCl₂ 中处理 5~10 min,死亡率无明显差别,但在实际操作过程中一般用最低有效浓度(即达到预期杀菌效果的最低浓度),因为表面看来,无论死亡率有无差别,但 HgCl₂ 作为消毒杀菌剂其对植物的潜在伤害是不可避免的。

培养基中的激素组合和浓度与初代培养中芽的诱导效果关系密切,在此实验中,诱导出芽的激素范围较大,为 0.8~1.6 mg/L,但在实际应用中,为了降低培养过程中可能出现的异常和突变,培养基中的激素浓度应尽可能地偏低。因此,本实验采用 MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为初代培养的最佳培养基。

在对红根草继代培养过程中我们发现,继代培养与初代培养所需的 BA 浓度大不相同,初代为 0.8~1.6 mg/L,继代培养仅需 0.2 mg/L,若再升高则易出现玻璃化。此结果与黄炼栋等(1998)的研究结果有较大差异。在我们的实验中,玻璃化程度随 BA 浓度变化的现象与有关玻璃苗问题的研究结论相符合,即细胞激动素的过剩是玻璃苗发生的最初胁迫因子,及培养基中 BA 浓度与玻璃化成正相关(曹孜义等,2002)。因此红根草继代培养的 BA 浓度不能过高,以 0.2 mg/L 为佳,为了保证培养材料的质量,在继代培养中可以 MS 和 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 0.02 mg/L 两种培养基交替使用。

本试验通过系统研究已建立起了一套完整的红根草组培快繁技术,这对今后的工厂化育苗及对有效成分的提取和利用有重要意义。

参考文献:

- 崔德才,徐培文. 2003. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,32.
- 曹孜义,刘国民. 2002. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,68—72.
- 张 锋,张文娟. 2003. 红根草提取物对血小板膜流动性及 5-HT 释放的影响[J]. 中成药,25(7):U002.
- Zhang JS(张金生),Huang Y(黄 勇). 1995. Two new diterpenoids, prioketolactone and neopriotonite, from *Salvia prionitis* (红根草中的新二萜红根草酮内酯和新红根草酮)[J]. *Nat Product Res Development* (天然产物研究与开发),7(4):1—4.
- Yang BJ(杨保津),Huang XL(黄秀兰),Huang Y(黄 勇), et al. 1988. Study on the chemical constituents of *Salvia prionitis* (红根草化学成分的研究)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报),30(5):524—527.
- Huang LD(黄炼栋),Xu YZ(徐寅泽),Hu ZB(胡之璧). 1998. *In vitro* propagation of *Salvia prionitis* (红根草的离体快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯),34(5):365.
- ~~~~~
- (上接第 337 页 Continue from page 337)
- 1 947.
- Wang BL(汪炳良),Chen ZJ(陈竹君),Li SX(李曙轩). 1993. Analysis of combining ability of lycopene and carotene contents in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) (番茄果实内茄红素和胡萝卜素含量的配合力分析)[J]. *J Zhejiang Agri Univ* (浙江农业大学学报),19(1):82—86.
- Wang Q(王 强),Han YS(韩雅珊),Dai YQ(戴蕴青), et al. 1997. Simultaneous determination of five carotenoids in tomato by reversed-phase high performance liquid chromatography (反向高效液相色谱法同时测定番茄中 5 种类胡萝卜素)[J]. *Chin J Chromatography* (色谱),15(6):534—536.
- Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, et al. 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize[J]. *Thero Appl Genet*,108(2):349—359.
- World Health Organization. 1996. Trace elements in human nutrition and health[M]. Geneva:WHO.
- Wu MG(吴明光),Zhong CX(钟灿兴). 1993. Isolation and identification of the chemical constituents with biological activity in capsicum fruit (辣椒果实生物活性化学组分的分离与鉴定)[J]. *J Xiamen Univ* (Nat Sci) (厦门大学学报(自然科学版)),32(3):341—344.
- Wu ZR(吴增茹),Jin TM(金同铭). 1998. Determination of β -carotene in different pumpkin varieties by HPLC (用高效液相色谱法测定不同品种南瓜中的 β -胡萝卜素的含量)[J]. *Acta Agri Boreali-Sin* (华北农学报),13(3):141—144.
- Xu CJ(徐昌杰),Zhang SL(张上隆). 2000. Carotenoid biosynthesis and its regulation in plants (植物类胡萝卜素的生物合成及其调控)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯),36(1):64—70.
- Xu YZ(许彦枝),Li SC(李少成),Wang XL(王小玲), et al. 2001. An experimental study of the effects of natural carotene on DMBA-induced oral buccal mucosa premalignant lesion in golden hamsters (天然胡萝卜素对金黄地鼠颊黏膜癌前病变逆转作用的实验研究)[J]. *J Modern Stomatol* (现代口腔医学杂志),15(3):174—175.
- Yang XL(杨雪莲),Guo JB(郭敬斌). 2004. Prospects of development and use of Spirulina (螺旋藻的开发及利用前景)[J]. *Beverage Industry* (饮料工业),7(2):5—7.
- Ye L(叶 琳),Sui CS(隋春生),Ren SP(任淑萍), et al. 2003. Protective effect of β -carotene on alveolar macrophage of rats caused by cooking oil fume (β -胡萝卜素对大鼠肺泡巨噬细胞膜的保护作用)[J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生),19(10):1 218—1 219.
- Ye X, Al-Babili S, Klöti A, et al. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. *Science*,287:303—305.
- Zhang LM(张立明),Wang QM(王庆美),Wang YD(王荫桦). 2003. The main nutrient components and health care function of sweet potato (甘薯的主要营养成分和保健作用)[J]. *Rain Fed Crops* (杂粮作物),23(3):162—166.