

# 南板蓝根离体快繁中的褐变控制

姚焱<sup>1</sup>, 张英<sup>2</sup>, 汪珍春<sup>1</sup>, 曾翠银<sup>1</sup>, 樊国建<sup>1</sup>, 石海亮<sup>1</sup>, 李秀芳<sup>1</sup>

(1. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510405)

**摘要:**从取材方式、灭菌前预处理、培养基添加抗褐变剂 3 方面研究降低南板蓝根芽体褐变的方法。结果表明:掰芽取材和及时流水冲洗处理对减轻南板蓝根芽体褐变有显著的效果;培养基中添加 0.5% 活性炭吸附剂对减轻褐变有一定作用,添加抗氧化剂柠檬酸 300~500 mg/L 浓度对褐变的抑制效果不明显。掰取芽体后立即流水冲洗 2 h,培养基中添加 0.5% 活性炭,能有效减轻芽褐变和利于快速增殖。

**关键词:**南板蓝根;芽;褐变

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9,Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0123-03

目前世界上普遍缺乏有效抗流感病毒的西药。板蓝根是中国治疗流感、发热的传统中药,尤其对抗病毒具有明显疗效。由于成分差异,南板蓝根—爵床科植物马蓝(*Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek)对流感病毒的杀灭、抑制方面明显优于北板蓝根—十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort)<sup>[1-2]</sup>。自从世界范围的“非典”、甲型流感爆发以来,国内的抗流感的中药材用量也在激增。由于南板蓝根种植面积逐年减少以及产量低等原因,市场上南板蓝根正品货源枯竭,供求矛盾严重<sup>[3]</sup>。如何促进南板蓝根的生产,并保证药材品质的优良,是目前急需解决的问题。

利用组织培养技术进行快速繁殖,工厂化生产紧缺药材,可以快速提供大量优质的种苗供应市场。目前南板蓝根也仅有利用种子建立无菌苗,通过诱导愈伤组织再分化途径再生植株<sup>[4]</sup>。但该途径植株建成所需时间较长,也易发生变异<sup>[5]</sup>。利用茎段等材料进行芽快速增殖,不仅可以有效缩短时间,也能够减少变异,保持品质优良。但研究中发现,南板蓝根芽体切离母体后,切口处极易褐变,严重影响离体培养的存活率及增殖能力。因此,现从取材方式、灭菌前预处理、培养基添加抗褐变剂 3 方面研究降低南板蓝根芽体褐变的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

南板蓝根(*Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek),广东南方中药材种苗基地提供。

**第一作者简介:**姚焱(1972-),女,河南开封人,博士,副教授,现主要从事植物遗传育种及生物技术研究工作。

**基金项目:**广州中医药大学中医药科研创新基金资助项目(09CX018);广州大学本科生创新性实验资助项目。

**收稿日期:**2009-10-20

### 1.2 外植体培养

从健康植株上取有节间的侧芽或顶芽为外植体,在 70% 酒精中消毒 30 s,0.1% 升汞溶液中消毒 6 min,无菌水漂洗 3~4 次,将外植体接种在 MS+BA 2 mg/L 培养基中培养。培养温度 25℃,光照强度为 2 000 lx,每天光照时间 12 h。

**1.2.1 直接掰取和剪取对外植体防褐变效果** 对侧芽或顶芽以直接掰取或剪取 2 种方式分别取材。

**1.2.2 灭菌前预处理对外植体防褐变效果** 直接掰取的材料在灭菌前,分别采取以下 2 种灭菌前预处理:流水冲洗 2 h;柠檬酸 500 mg/L 无菌水浸泡 2 h;以不冲洗或浸泡处理为 CK。

**1.2.3 抗褐变剂对外植体防褐变效果** 直接掰取的材料经灭菌处理后,接种在添加不同抗褐变剂的培养基 MS+BA 2 mg/L 中。添加抗褐变剂种类和浓度为:0.5% AC(活性炭);1% AC;柠檬酸 300 mg/L;柠檬酸 500 mg/L;0.5% AC+柠檬酸 300 mg/L,以不加抗褐变剂的培养基为对照。每浓度处理 5 瓶,每瓶 3 个外植体,培养 1 周后观察外植体褐变情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 直接掰取和剪取对外植体防褐变的效果

经观察,南板蓝根芽体褐变主要发生在接种初期,接种 1 周后褐变程度基本稳定。若能有效降低接种初期的褐变率,就可以有效减少褐变。因此,以接种后 1 d 和 1 周的情况进行统计。

表 1 中,直接掰取与剪取相比,可以明显降低接种第 1 天的褐变率 45%;若掰芽后立即流水冲洗,又可以降低接种第 1 天的褐变率 30%;各处理接种 1 周后褐变程度差异明显:直接掰取芽后冲洗处理与剪取处理相比,褐变率降低了 75%。根据观察,剪取易产生组织伤害和挤压,使组织、细胞液外渗,一旦切口处有渗液出现,便

极易引起芽体褐变;而直接掰取芽体,使伤口周围的组织伤害尽可能减小,取材后立即流水冲洗更有助于除去或稀释伤口外渗液,对减轻及延缓褐变有显著效果。

表 1 直接掰取和剪取对外植体防褐变的效果

取材方式	外植体数	1 d 褐变数	褐变率	1 周褐变数	褐变率
	/个	/个	/%	/个	/%
剪取	20	19	95	20	100
剪取后冲洗 2 h	20	15	75	20	100
掰芽	20	10	50	15	75
掰芽后冲洗 2 h	20	4	20	7	35

2.2 灭菌前预处理对外植体防褐变的效果

利用抗氧化剂柠檬酸 500 mg/L 溶液浸泡芽体,与流水直接冲洗方法比较,观察灭菌前芽体预处理对控制褐变的效果(见表 2)。利用 500 mg/L 柠檬酸液浸泡 2 h,与流水冲洗相比,不仅不能减少褐变的发生,反而增加了褐变率 60%;而且与直接接种相比,褐变率也提高了 30%左右。接种 1 周后外植体完全褐变。500 mg/L 柠檬酸液浸泡对南板蓝根褐变的抑制效果不佳。

表 2 灭菌前预处理对外植体防褐变效果

灭菌前 预处理	外植体数	1 d 褐变数	褐变率	1 周褐变数	褐变率
	/个	/个	/%	/个	/%
掰芽后接种(CK)	20	10	50	15	75
流水冲洗	20	4	20	7	35
柠檬酸液浸泡	20	16	80	20	100

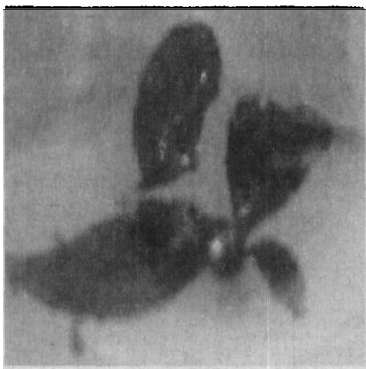


图 1 褐变芽

2.3 抗褐变剂对外植体防褐变的效果

直接掰取的材料经灭菌处理后,接种在添加了抗褐变剂的培养基中,比较各处理抗褐变的效果。

表 3 抗褐变剂对外植体防褐变效果

抗褐变剂	外植体数/个	1 周褐变数/个	褐变率/%
掰芽后接种(CK)	15	11	73
0.5% AC	15	7	47
1.0% AC	15	8	53
300 mg · L <sup>-1</sup> 柠檬酸	15	10	67
500 mg · L <sup>-1</sup> 柠檬酸	15	11	73
0.5% AC+柠檬酸 300 mg · L <sup>-1</sup>	15	10	67



图 2 正常芽

吸附剂活性炭(AC)与抗氧化剂柠檬酸相比,活性炭可在一定程度减轻南板蓝根外植体的褐变程度,其中 0.5% AC 浓度效果较好;柠檬酸 300~500 mg/L 浓度对褐变的抑制效果不如活性炭有效;0.5% AC 和柠檬酸 300 mg/L 在培养基中的共同抑制褐变效果不明显。

3 讨论

褐变现象主要是由 PPO(多酚氧化酶)作用于底物酚类物质而引起的。在导致褐变的诸多因素中,膜结构的破坏或细胞中物质区域化分布的破坏和酚类物质渗出是组织发生褐变的关键<sup>[6-8]</sup>。南板蓝根中含有多种化学成分<sup>[2,9]</sup>,取材时的切口以及离体培养过程可能会造成细胞中物质区域化分布的破坏,多酚氧化酶与酚类物质相互接触而褐变。

该研究通过取材方式及灭菌前处理的选择,发现掰芽取材和及时流水冲洗处理对减轻南板蓝根芽体褐变有显著的效果。这可能是由于掰芽可以显著降低因剪取而造成的物理伤害,减轻细胞物质区域化分布的破坏,减少组织渗出液,而流水冲洗又可有效地降低伤口部位易发生褐变物质的浓度,2 种处理共同作用,有效抑制了褐变的发生;据报道,在青钱柳茎段快繁过程,采用烧红的手术刀快速切割材料可以有效降低茎段的褐变率<sup>[10]</sup>,可能这是利用高温破坏了茎段切口的结构,阻碍了组织液渗出而达到减轻褐变的目的。诸多研究通过培养基中添加活性炭吸附剂或抗氧化剂来减轻褐变<sup>[6-8]</sup>。但该试验中,抗氧化剂柠檬酸对抑制褐变的效果不明显,吸附剂活性炭有一定作用。总之,从 3 种方式对褐变抑制的效果来看,接种前通过减轻外植体物理结构破坏,减少组织液渗出而减轻褐变的效果上要明显优于抗褐变剂的作用。

参考文献

[1] 吴煜秋,钱斌,张荣平,等.南板蓝根的化学成分研究[J].中草药,2005,36(7):982-983.  
[2] 孙小兵,盛家荣,王定培.南板蓝根化学成分及药理作用研究[J].广西师范学院学报(自然科学版),2008,25(4):66-69.  
[3] 棚雪梅.南板蓝根的现状与后市预测[J].中国现代中药,2008,10(8):42-43.

# 亮叶忍冬组织培养快繁技术

柴慈江, 李童音, 史燕山, 骆建霞, 卢兴霞, 罗兰欣

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

**摘要:**分别采用添加不同浓度 6-BA 的 MS 培养基和不含植物激素但改变大量元素浓度的 MS 培养基 2 种方法, 研究亮叶忍冬组培苗快繁体系。结果表明:以不含激素的 1/4MS 培养基中亮叶忍冬的茎芽增殖效果最好, 增殖系数达 3.8。将亮叶忍冬试管苗茎段培养于用土做支撑物的培养基中, 生根率为 98.3%, 根数也与琼脂支撑培养对照无明显差异, 且根毛长于对照。对土支撑培养基中生根的亮叶忍冬试管苗开瓶练苗 3 周后, 带坨移入营养钵中, 在移栽后不喷雾、不覆膜, 温室内午后空气相对湿度低至 55% 的条件下, 移栽成活率达到 93.3%, 显著高于常规方法移栽的成活率(53.3%)。

**关键词:**亮叶忍冬; 试管苗; 茎芽增殖; 生根; 带坨移栽

**中图分类号:**S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0125-04

亮叶忍冬(*Lonicera nitida* 'Maigrun')为忍冬科忍冬属灌木, 在北方落叶, 南方则表现为常绿。株型紧凑, 叶

色亮绿, 生长旺盛, 萌芽力强, 极耐修剪, 也较耐阴, 并具有较强的耐寒、耐旱和耐盐能力<sup>[1-3]</sup>, 是一种优良的木本观赏地被植物, 推广应用前景广阔。利用组织培养快繁技术育苗是尽快获得大量亮叶忍冬优质苗木的有效途径。目前已有北京忍冬、皱叶忍冬、蕊帽忍冬、蓝靛果忍冬和灰毡毛忍冬等多种忍冬属植物的组织培养快繁技术的研究<sup>[4-8]</sup>, 关于亮叶忍冬组织培养快繁技术的研究目前国内尚未见报道, 为此开展了该项工作。

**第一作者简介:**柴慈江(1960-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事园艺植物组织培养方面的教学与科研工作。

**基金项目:**国家科技星火计划资助项目(2008GA610015); 天津市科委资助项目(08ZXHXNC07000)。

**收稿日期:**2009-10-10

[4] 张丽梅, 陈善璞, 陈熹. 马蓝未成熟种子的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 521-522.

[5] 栾非时, 陈典, 崔喜波. 大蒜茎尖愈伤组织诱导、植株分化及变异的研究[J]. 北方园艺, 1993(4): 23-25.

[6] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理通讯, 1999, 35(6): 501-506.

[7] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].

北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78-84.

[8] 杨丽琴, 李瑞, 王俊, 等. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺, 2008(4): 104-106.

[9] 陈竭, 江山. 南板蓝根中大黄酚的分离鉴定[J]. 中药材, 1990, 13(5): 29-30.

[10] 吴群英, 徐庆, 李丽亚, 等. 青钱柳不同外植体组织培养及褐变防止的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1872-1874.

## Measurement of Preventing Shoot Browning of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek During Rapid Propagation

YAO Yan<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, WANG Zhen-chun<sup>1</sup>, ZENG Cui-ying<sup>1</sup>, FAN Guo-jian<sup>1</sup>, SHI Hai-liang<sup>1</sup>, LI Xiu-fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. School of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405)

**Abstract:** Shoot browning is a serious phenomenon during rapid propagation of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. This study attempts to control browning of shoot by three methods in order to increase the shoot ability of rapid propagation in vitro. The results showed that the browning degree of shoots which are broken off from plant and then flushed several times by water were lighter than the browning degree of shoots which were cut off by tool; The appropriate concentration of activated carbon 0.5 % in medium may reduce the shoot browning in some degree, but concentration of citric acid 300~500 mg · L<sup>-1</sup> had no effect significantly. In conclusion, the method that shoots were broken off from plant and flushed 2 hours by water, then explanted the medium adding 0.5% activated carbon, can decrease the browning effectively.

**Key words:** *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek; shoot; browning