

生长调节剂和培养方式对匍枝筋骨草生根及 β -蜕皮激素量的影响

赵晓杰, 李晓灿, 宇佳, 迟德富*

东北林业大学生命学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 研究不同质量浓度吲哚丁酸(IBA)和萘乙酸(NAA)以及培养方式对匍枝筋骨草生长和 β -蜕皮甾酮量的影响。**方法** 以MS为基本培养基, 添加IBA(0.5、1.0、2.0 mg/L)或NAA(0.3、0.6、0.9 mg/L)进行组织培养, HPLC法测定匍枝筋骨草中 β -蜕皮甾酮量。并比较不同生长调节剂以及组织培养、水培不同培养方式下匍枝筋骨草生根情况与 β -蜕皮甾酮量的变化。**结果** 以MS为基本培养基, 添加生长调节剂IBA 0.5~1 mg/L时, 适宜匍枝筋骨草生根。IBA质量浓度为2 mg/L时, 匍枝筋骨草根中 β -蜕皮甾酮量最高。组织培养条件下, 匍枝筋骨草全株及根部的蜕皮激素量均达水培苗的2倍, 实生苗的3倍。**结论** 适宜适量浓度的IBA可以促进匍枝筋骨草根的生长, 组织培养条件下, 匍枝筋骨草根中 β -蜕皮甾酮量最高。

关键词: 匍枝筋骨草; IBA; NAA; β -蜕皮甾酮; MS培养基

中图分类号: R282.23 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1828-05

Effects of growth regulator and culture methods on rooting of *Ajuga lobata* and content of β -ecdysone

ZHAO Xiao-jie, LI Xiao-can, YU Jia, CHI De-fu

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To study the effects of indole butyric acid (IBA) and NAA at different concentrations and culture methods on the growth of *Ajuga lobata* root and content of β -ecdysone. **Methods** Taking MS as basic medium supplemented with IBA (0.5, 1.0, and 2.0 mg/L) or NAA (0.3, 0.6, and 0.9 mg/L), the tissue culture was carried out. HPLC was used to determinate the content of β -ecdysterone. **Results** The results showed that the roots could grew well on MS as basic medium supplemented with IBA 0.5—1 mg/L. The best culture condition for the highest β -ecdysone accumulation was MS medium supplemented with IBA 2 mg/L. The content of β -ecdysterone in the whole plant and the roots of *A. lobata* with tissue culture was twice times of hydroponics and about three times of cultivation. **Conclusion** MS medium supplemented with IBA at the proper concentration could promote the root growth of *A. lobata*. The content of β -ecdysterone in the root of *A. lobata* is the highest in tissue cultures.

Key words: *Ajuga lobata* D. Don; indole butyric acid (IBA); NAA; β -ecdysone; MS medium

匍枝筋骨草 *Ajuga lobata* D. Don 为唇形科筋骨草属植物, 具有清热解毒、止咳化痰、养筋活血的功效。研究表明, 筋骨草属植物内富含蜕皮激素类物质^[1-2]。药理研究表明, 蜕皮激素类似物可以促进核酸和蛋白质合成, 影响糖类和脂类代谢, 改善肝功能和促进创伤愈合^[3]。此外通过干扰或破坏昆虫体内原有的激素平衡, 导致昆虫生长发育阻断或异常, 影响昆虫蜕皮和成虫不育, 达到控制昆虫生长、发育和变态的作用。因此, 作为一种新型无公害杀

虫剂, 蜕皮激素类似物具有广泛的应用前景。

目前国内外学者对蜕皮激素类似物的提取和分离主要以野生植物资源为主^[4-5], 致使不少植物处于濒危状态, 数量急剧减少。与栽培植物相比, 利用细胞或组织培养生产植物次生代谢产物不仅不受地理、气候等条件的限制, 还能节省土地、降低成本、缩短生产周期, 此外还可以在了解次生代谢过程的基础上实施对培养条件、代谢前体的添加及诱导子的采用等手段来调控次生代谢过程, 进而获得高产

收稿日期: 2011-02-16

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201004003-7); 黑龙江省科技攻关项目(GB08B202-03)

作者简介: 赵晓杰(1983—), 女, 吉林人, 在读硕士研究生, 主要从事植物源杀虫剂的研究。E-mail: fairy.0101@163.com

*通讯作者 迟德富 E-mail: chidefu@126.com

量的次生代谢产物^[6-7]。因此,采用科学合理的植物培养技术,通过在植物培养物中添加激素等植物生长调节物质,是提高有效次生代谢产物量的有效途径之一。

本实验采用建立的匍枝筋骨草快繁体系,通过添加不同质量浓度的外源生长调节物质,研究其对蜕皮激素影响,达到提高匍枝筋骨草中蜕皮激素量的目的。在此基础上,采用 HPLC 法测定实生苗、水培苗体内的蜕皮激素量^[8]。以期建立一种高产蜕皮激素的匍枝筋骨草培养快繁体系,同时为大规模生产植物蜕皮激素类似物提供一定的理论依据和技术支持。

1 材料与仪器

药材购于2009年4月于浙江省杭州蓝天园林种苗公司余姚镇基地,经东北林业大学林学院黄普华教授鉴定为匍枝筋骨草 *Ajuga lobata* D. Don。

DL—360A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司),旋转蒸发仪 RE—52AA(上海亚荣生化仪器厂),FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),ALC—210.4 电子分析天平(上海垒固仪器有限公司),Waters 600 高效液相色谱仪,Waters 2487 紫外检测器,C₁₈ 色谱柱。β-蜕皮甾酮对照品(中国药品生物制品检定所),质量分数≥99%。

2 方法

2.1 组织培养法

选取同代和继代培养、生长一致的丛生芽分成单株,接种于生根培养基中。以 MS 为基本培养基,IBA 和 NAA 分别设置 3 个质量浓度梯度,即 0.5、1、2 mg/L,0.3、0.6、0.9 mg/L;以未加生长调节剂为对照。每个处理采用 30 个外植体,4 周后更换培养基,培养基中均加入蔗糖 20 g/L、琼脂 5.6 g/L,pH 值调至 6.5。

培养条件为温度(25±1)℃,光/暗周期 16/8 h,光照强度 2 000 lx,湿度 70%。接种 8 周后观察生长情况,用 DPS 软件中完全随机单因素试验统计分析,对生长性状和 β-蜕皮甾酮量进行方差分析和 Duncan 多重比较,并用该软件中的 Pearson 过程分析生根性状和 β-蜕皮甾酮的相关性^[9]。

2.2 水培法

挑选生长一致的匍枝筋骨草幼苗,先用蒸馏水进行漂洗,再用去离子水冲洗根系。移栽于盛有 1/4 HoagLand 营养液的蓝色周转箱中进行培养。每天用

增氧泵连续通气 1 h,并用 5 mol/L NaOH 将 pH 值调至 6.5±0.2,营养液每 3 天更换 1 次。待分生出 2~3 cm 的腋芽后分成单株培养,处理 8 周后取样测定。

2.3 β-蜕皮甾酮的测定

2.3.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 甲醇-水(50:50);柱温为室温;体积流量 0.8 mL/min;检测波长 242 nm。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 β-蜕皮甾酮对照品 3 mg,用甲醇定容于 25 mL 量瓶中,超声波混匀,得 0.12 mg/mL β-蜕皮甾酮溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 样品于 65℃ 烘干至恒定质量后研磨,称取 2.0 g 样品放入 50 mL 锥形瓶中加入 95%甲醇 20 mL,浸泡超声 30 min,10 000 r/min 离心取上清液,再加 95%甲醇 10 mL 于沉淀物中,超声 15 min,10 000 r/min 离心取上清液,合并上清液加入石油醚进行萃取,待叶绿素褪去后弃上清液,将萃取后的样品用旋转蒸发仪浓缩,甲醇定容至 4 mL。

2.3.4 标准曲线的绘制 精密吸取 β-蜕皮甾酮对照品溶液 20、25、50、100、1 000 μL,加甲醇定容至 1 mL,每次分别进样 20 μL,重复 3 次,以峰面积的平均值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得 β-蜕皮甾酮回归方程为 $Y=2 \times 10^7 X-11\ 681$, $r=0.999\ 9$,线性范围为 0.002 8~0.14 μg。

2.3.5 精密度试验 取 β-蜕皮甾酮对照品溶液连续进样 5 次,每次 20 μL,计算求得峰面积的 RSD 为 1.5%。

2.3.6 重现性试验 精密称取 5 份同一样品粉末,制备供试品溶液进行测定,β-蜕皮甾酮质量浓度 RSD 为 1.5%。

2.3.7 稳定性试验 供试品溶液分别在 0、2、4、6、8 h 测定 β-蜕皮甾酮峰面积,计算求得峰面积 RSD 为 1.5%。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取同一样品 5 份,每份 800 μL,分别加入 β-蜕皮甾酮对照品 200 μL,制备成供试品溶液,进行测定,计算样品回收率为 97%,RSD 为 1.03%。

3 结果与分析

3.1 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草组培苗不定芽增殖的影响

IBA 0.5、1 mg/L 处理后的匍枝筋骨草叶片嫩绿、长势良好、不定芽增殖较多(图 1-A),与对照组差异不显著(图 1-D)。2 mg/L IBA 处理后匍枝筋

骨草组育苗的部分叶片出现枯黄现象, 叶片呈狭长状生长, 且不定芽增殖较少 (图 1-B), 与未添加激素对照组差异显著。0.3 mg/L NAA 处理后的匍枝筋骨草组育苗不定芽增殖情况与 2 mg/L IBA 处理差异不显著 (表 1), 与未添加激素对照组差异显著。

0.6、0.9 mg/L NAA 处理后匍枝筋骨草组育苗的不定芽均没有增殖现象, 与未添加激素处理的对照组差异极显著。实验发现, 3 种不同质量浓度的 NAA 处理后匍枝筋骨草组育苗的叶片出现不同程度的卷曲生长 (图 1-C)。



图 1 1 mg/L IBA (A)、2 mg/L IBA (B)、0.3 mg/L NAA (C) 处理和对照组 (D) 的不定芽增殖情况图

Fig. 1 Effect of 1 mg/L IBA (A), 2 mg/L IBA (B), 0.3 mg/L NAA (C), and control group (D) on adventitious bud proliferation

3.2 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草根系生长的影响

IBA 和 NAA 均促进匍枝筋骨草根系的生长。经 IBA 和 NAA 处理后匍枝筋骨草不定芽的生根率、生根量和根长与对照相比呈极显著差异。匍枝筋骨草不定芽的生根率、生根量、根长和根粗均随着 IBA 质量浓度的升高而呈上升趋势, 随着 NAA 质量浓度的升高呈先上升后下降的趋势 (表 1)。

生根率次序为 IBA 2 mg/L>IBA 1 mg/L>NAA 0.6 mg/L>NAA 0.3 mg/L>IBA 0.5 mg/L>CK>NAA 0.9 mg/L; 生根量次序为 IBA 2 mg/L>NAA 0.6 mg/L>NAA 0.3 mg/L>NAA 0.9 mg/L>IBA 1 mg/L>IBA 0.5 mg/L>CK。IBA 2 mg/L 处理的不定芽生根量与 IBA 0.5 mg/L 处理的不定芽生根量呈极显著差异, 与其他各处理结果呈显著差异。

根长次序为 IBA 2 mg/L>IBA 1 mg/L>NAA 0.6 mg/L>IBA 0.5 mg/L>NAA 0.9 mg/L>NAA 0.3 mg/L>CK。IBA 1 mg/L、NAA 0.6 mg/L、IBA 0.5

mg/L 处理的生根平均根长差异不显著。IBA 2 mg/L 处理的生根平均根长与其他各处理差异显著。

根粗次序为 NAA 0.3 mg/L>NAA 0.9 mg/L>NAA 0.6 mg/L>IBA 2 mg/L>IBA 1 mg/L>IBA 0.5 mg/L>CK。IBA 0.5 mg/L 处理的根粗与对照根粗差异不显著, 1 mg/L IBA 处理的根粗与对照根粗差异显著。其他处理均与对照根粗差异极显著。NAA 处理的根粗总体上要高于 IBA 的各个处理。而 2 mg/L IBA 处理的根粗与 NAA 各处理差异不显著。

3.3 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草根中 β -蜕皮甾酮量的影响

经 IBA 和 NAA 处理后, 匍枝筋骨草根中蜕皮甾酮的量与对照呈极显著差异 (表 1)。蜕皮甾酮量由高到低的顺序依次为 IBA 2 mg/L>NAA 0.3 mg/L>NAA 0.6 mg/L>IBA 1 mg/L>NAA 0.9 mg/L>IBA 0.5 mg/L>CK。其中 IBA 2 mg/L 最高, 与其他

表 1 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草不定芽增殖、根系生长和 β -蜕皮甾酮量的影响

Table 1 Effect of IBA and NAA on proliferation of adventitious bud, growth of root system, and β -ecdysone content of *A. lobata*

处理	$\rho/(mg \cdot L^{-1})$	生根率/%	生根量/条	根长/cm	根粗/mm	不定芽增殖/个	β -蜕皮甾酮量/ $(\mu g \cdot g^{-1})$
CK		72.000 0 deCD	7.333 3 cC	2.166 7 cB	0.554 6 cC	3.333 3 aA	0.250 1 dE
IBA	0.5	75.000 0 cdCD	12.666 7 bB	6.200 0 abA	0.630 0 cBC	3.333 3 aA	0.395 6 cD
	1	83.666 7 bB	13.333 3 bAB	6.300 0 abA	0.983 0 bAB	2.000 0 abAB	0.475 4 bBC
	2	90.666 7 aA	17.000 0 aA	6.700 0 aA	1.111 0 abA	0.333 3 bAB	0.661 2 aA
NAA	0.3	76.333 3 cdC	14.000 0 bAB	6.033 3 bA	1.286 1 aA	0.333 3 bAB	0.529 2 bB
	0.6	78.000 0 cBC	14.666 7 abAB	6.233 3 abA	1.114 1 abA	0.000 0 bB	0.500 6 bB
	0.9	68.000 0 eD	13.666 7 bAB	6.133 3 bA	1.208 8 abA	0.000 0 bB	0.421 1 cCD

大写字母表示极显著性水平 ($P<0.01$), 小写字母表示显著性水平 ($P<0.05$)

Capital letters indicate significance at $P<0.01$ level, lower case letters mean significance at $P<0.05$ level

处理差异极显著, NAA 0.3 mg/L、NAA 0.6 mg/L、IBA 1 mg/L 之间差异不显著。

分析生根性状与 β -蜕皮甾酮量的相关性表明, β -蜕皮甾酮量与生根率和生根量高度相关, 与平均根长和根粗相关, 与不定芽增殖量负相关。相关系数分别为 0.801、0.886、0.734、0.626、-0.579。

3.4 不同培养方式对匍枝筋骨草生长和 β -蜕皮甾酮量的影响

采用 1/4 HoagLand 营养液水培条件下, 匍枝筋骨草腋芽 5 d 左右即可生根, 生根率达 90% 以上。培养 3 周时, 匍枝筋骨草水培苗出现节点及新生腋芽, 8 周后根系生长发达, 单株水培苗最高可诱导出 26 条根, 是组培苗诱导根数的 2 倍左右。组培苗无节点出现, 新生腋芽数与水培苗差异不显著。经 HPLC 测定, 实生苗全株中 β -蜕皮甾酮量为 362.579 $\mu\text{g/g}$, 根部为 196.921 $\mu\text{g/g}$; 水培苗全株为 678.125 $\mu\text{g/g}$, 根部为 251.132 $\mu\text{g/g}$; 添加 IBA 2 mg/L 的组培全株为 1 286.953 $\mu\text{g/g}$, 根部为 661.213 $\mu\text{g/g}$ (图 2)。

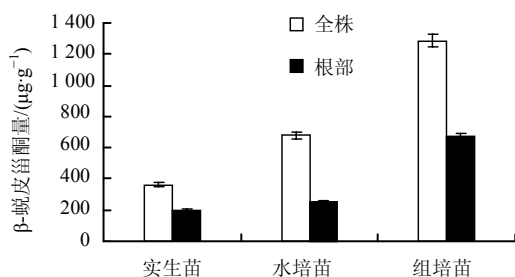


图 2 不同培养方式对匍枝筋骨草中 β -蜕皮甾酮量的影响

Fig. 2 Effect of different cultural ways on β -ecdysone content in *A. lobata*

4 讨论

4.1 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草根系生长状况的影响

在组织培养中, 不同质量浓度的 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草根系的生长均有很大的影响。NAA 处理后匍枝筋骨草叶片呈现深绿色, 并有不同程度的弯曲, 生长状况较差。高质量浓度的 IBA 处理后匍枝筋骨草叶片细长窄小, 抑制生长。低质量浓度的 IBA 处理后促进匍枝筋骨草生长。本研究发现, 不添加生长调节剂处理的组培苗也能少量生根, 说明匍枝筋骨草属于易生根植物。当 IBA 浓度在 0.5~2 mg/L 时, 对匍枝筋骨草根系的生根率、生根量、平均根长、根粗均有促进作用, 且不定芽增殖量逐渐减少, 愈伤组织较少或无, 适宜生根。当 IBA 为 2 mg/L

时, 出现大量愈伤组织, 影响生根^[10-11]。当 NAA 为 0.3~0.9 mg/L 时, 根系的生根率、平均根长、生根量均先上升后下降, 且均有大量愈伤组织出现, NAA 为 0.6 mg/L 时, 根系生长性状良好, 适宜生根, 但与 IBA 相比, 其愈伤组织明显, 不适宜生根。实验中经 NAA 处理的组培苗, 平均根粗均高于经 IBA 处理的组培苗, 这可能与其生根机制有关。NAA 化学性质稳定, 在促进植物生根方面效果最好, IBA 虽然化学性质稳定, 但其作用不是促进根的生长而是诱导根原基的发生^[12]。综合本实验结果, IBA 和 NAA 均能够促进匍枝筋骨草根的生长, 而适宜生根的生长调节剂为 IBA, 质量浓度为 0.5~1 mg/L。

4.2 IBA 和 NAA 对匍枝筋骨草根系中 β -蜕皮甾酮量的影响

本实验表明, 不同生长调节剂对匍枝筋骨草根中 β -蜕皮甾酮量的影响是不同的。经 0.5~1 mg/L IBA 和各质量浓度 NAA 处理后组培苗根均比对照组培苗根中 β -蜕皮甾酮量有所提高。当 IBA 质量浓度为 2 mg/L 时, 组培苗根中 β -蜕皮甾酮量最高, 但不利于根的生长。

实验表明, β -蜕皮甾酮的量与根系性状有着密切的关系, 其生根率越高, 生根量越大, 平均根长越长, 根粗越粗, 其量越高。可见根系生长状况越好, β -蜕皮甾酮量越高。

4.3 不同培养方式对匍枝筋骨草生长和 β -蜕皮甾酮量的影响

用 HoagLand 营养液进行水培, 匍枝筋骨草能正常生长, 且生长速度明显大于实生苗。这是由于营养液中养分和水分供给充足、均衡, 能及时满足植株的需要。水培条件下匍枝筋骨草根系分生能力较强, 定植后不久即可长出白色的新根, 随着根系不断生长, 根量增多、直径变小, 原有老根逐渐脱落, 新根代替老根进行养分和水分的吸收和运输, 从而使整株植物得以较快增长^[13-14]。

实生、水培和组培 3 种方式对匍枝筋骨草进行培养后发现, β -蜕皮甾酮量变化明显, 组培条件下, 匍枝筋骨草全株的蜕皮激素量达水培的 2 倍, 实生苗的 3 倍; 根部蜕皮激素量达水培的 2 倍以上, 是实生苗的 3 倍以上。水培方法调控不当, 容易造成大量烂根及虫害现象, 损失严重。组培方法达到了不受地理、气候等条件的限制, 并节省土地, 缩短生产周期, 提高有效成分的目的。

参考文献

- [1] 胡小倩, 吴玲, 陈洁. 常用杀菌剂和寡雄腐霉对多花筋骨草黑胫病的防效研究 [J]. 浙江农业科学, 2007(2): 210-212.
- [2] 邱明华, 聂瑞麟. 植物性蜕皮激素的结构相关性及其在生物体中的生物合成途径 [J]. 云南植物研究, 1987, 9(1): 119-128.
- [3] 邱志国, 迟德富. 两种筋骨草中蜕皮激素类物质的分析 [J]. 东北林业大学学报, 1997, 25(5): 67-68.
- [4] 惠玉虎, 张立, 李健. RP-HPLC 法测定珍珠露水草提取物中蜕皮激素的含量 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 426-426.
- [5] 姜晓峰, 李钺. 祁州漏芦地上部位的植物蜕皮激素化合物 [J]. 中草药, 1997, 28(5): 262-264.
- [6] 李金亭, 滕红梅, 胡正海. 牛膝营养器官中蜕皮甾酮的积累动态研究 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1570-1573.
- [7] Tamars S, Michaela B, Satyajit D S, *et al.* Phytoecdysteroids from *Lamium* spp: identification and distribution within plants [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 891-900.
- [8] 白会强, 蔡少华, 徐亮, 等. HPLC 法测定山蜡梅中东茛菪素、槲皮素、夏蜡梅碱 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 486-487.
- [9] 王博, 范桂枝, 詹亚光. 不同培养基类型和植物生长调节剂对比对白桦愈伤组织中三萜积累的影响 [J]. 林业科学, 2008, 44(10): 153-158.
- [10] 梁海英, 张雪平. 不同生长调节剂对扶桑插条生根的影响 [J]. 林业科学, 2009(18): 183-185.
- [11] Li J T, Hu Z H, Peng L, *et al.* Structural development of root and their relationship to accumulation of triterpenoid saponins in *Chyranthes bidentata* Bl. [J]. *J Mol Cell Biol*, 2007, 40(2): 121-129.
- [12] Nakagawa K, Konagai A, Fukui H, *et al.* Increasing secondary metabolite production in plant-cell culture by reducing transport [J]. *Plant Cell Rep*, 1984, 3: 254-257.
- [13] 刘晓娜, 张秀清, 孙君社. 贯叶连翘的水培及其代谢产物检测 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 101-103.
- [14] 柴慈江, 卢兴霞, 苏卫国, 等. 珠美海棠试管苗的土壤支撑生根培养和带坨移栽 [J]. 植物生理学通讯, 2010(1): 33-36.

天津中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》杂志、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821

传真: 23006821

联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

E-mail: zcy@tiprpress.com