

乌头植株再生体系的建立

关文灵¹, 王黎, 郑思乡*

(云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 目的 建立乌头高效再生系统, 短期内获得大量优质种苗。方法 以试管苗叶片为外植体, 在添加不同激素配比的培养基上培养。结果 培养基 MS+ BA 1.0 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 最适合于乌头叶片不定芽的分化; 培养基 MS+ BA 1.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 有利于芽的增殖; 培养基 MS+ BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 有利于芽的伸长; 不加激素的 1/2 MS 培养基有利于根的诱导。结论 采用组织培养方式可进行乌头的快速繁殖, 使乌头种苗的工厂化生产成为可能。

关键词: 乌头; 组织培养; 植株再生体系

中图分类号: R282.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0561-03

Establishment of plantlet regeneration system for *Aconitum carmichaeli*

GUAN Wen-ling, WANG Li, ZHENG Si-xiang

(College of Landscape Architecture & Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract Object To establish an effective plantlet regeneration system of *Aconitum carmichaeli* Debx. for the purpose to obtain a large number of high quality seedling in a short time. **Methods** Leaves *in vitro* were tried as the explants and cultivated in different media with the various portion of hormones. **Results** The medium of MS+ BA 1.0 mg/L+ KT 0.5 mg/L+ NAA 0.2 mg/L was the most suitable one for the induction of shoots; the medium of MS+ BA 1.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L was beneficial to the propagation of shoots; the medium of MS+ BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L was good for the elongation of shoots; and the medium of 1/2 MS without any hormone was suitable for the induction of roots. **Conclusion** Rapid propagation of *A. carmichaeli* could be achieved by tissue culture and this will lead to the possibility for its seedling in the industrial production.

Key words *Aconitum carmichaeli* Debx; tissue culture; plantlet regeneration system

乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 为毛茛科乌头属多年生草本植物, 其花色秀美, 花型独特, 具有较高的观赏价值^[1]; 其块根中含有较多的二萜类乌头碱, 对急性炎症和血管渗出及免疫性炎症有抑制作用, 因而具有较高的药用价值, 是我国传统的中药材之一。世界上 80% 的附子(乌头子根)产于我国^[2,3]。目前乌头的人工栽培主要靠子根繁殖, 耗种量大, 而且由于病毒感染等原因, 导致种性退化, 产量和品质降低, 犹如马铃薯一样, 需在高山留种换种, 不能适应规模化和标准化生产的需要。利用组织培养技术, 可为加速繁殖、提供栽培用无病毒优质种苗开辟一条新的途径, 为中药材的标准化生产提供依据。

乌头的组织培养较少报道。胡延玉等^[2]利用茎尖和带腋芽茎段培养获得再生植株, 但所用培养基成分复杂, 培养周期长。林静等^[3]利用叶片和幼茎进行培养, 叶片只诱导出愈伤组织而未分化出芽; 而茎

段的增殖倍率仅为 1 因此, 有必要对乌头组培快繁体系中基本培养基和外植体的选择、激素配比等方面进行进一步的研究。本实验以乌头无菌叶片为外植体, 建立了高效的离体再生体系, 可为乌头种苗的工厂化生产提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料: 植物材料采自云南农业大学花卉研究所温室。取早春刚萌动的块根作为起始培养材料。

1.2 方法:

1.2.1 无菌材料的获得: 取乌头块根, 洗净, 切除须根, 于 75% 乙醇中浸泡 1 min, 再于 0.1% 升汞中消毒 15 min, 用无菌水冲洗 4 次, 接种于 MS+ BA 1.0 mg/L 的起始培养基中培养。培养基中附加 0.65% 的琼脂, 蔗糖浓度为 30 g/L, pH5.8, 培养温度 23℃, 光照 12 h/d, 光强 2 000 lx。

1.2.2 不定芽的诱导: 以 MS 为基本培养基, 添加

* 收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 关文灵(1971-), 男, 云南新平县人, 讲师, 在职研究生, 主要从事园林植物及药用植物的研究和教学工作, 发表论文 6 篇。

E-mail: g55098w@public.km.yn.cn Tel: (0871) 5220399

不同浓度的 BA, NAA和 KT,具体配方见表 1 培养条件同上。将灭菌块根上萌发出的无菌幼叶切下,切成 1 cm× 1 cm左右的小块,接种在含不同激素配比的 MS培养基上培养,以诱导不定芽的发生。

1.2.3 芽的增殖培养:将在芽的诱导培养基和增殖培养基上生长了约一个月的健壮不定芽 3~ 4个为一簇切下转入到 MS+ BA 1.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L的培养基上继代培养,使芽增殖。培养条件同上。

表 1 不同激素配比对不定芽发生的影响

Table 1 Effect of various hormones combination on adventitious shoot induction

培养基编号	激素 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			接种外植体数 /块	产生芽的时间 /d	分化率 %	平均每个外植体出芽数 /个	芽苗的长势
	KT	BA	NAA					
1	0.5	1.0	0	20	26	30	5.3	芽苗叶色浅,生长缓慢
2	0.5	1.0	0.1	20	21	85	3.0	叶色绿,生长快
3	0.5	1.0	0.2	20	15	80	10.4	叶色绿,生长快
4	0.5	1.0	0.5	20	16	65	5.7	部分芽苗水渍状,生长不良;部分芽苗出现白色的根
5	0.5	0.5	0.1	20	30	35	0.7	大部分外植体枯黄,不定芽少,细弱,生长慢
6	0.5	1.5	0.1	20	17	55	1.7	苗细弱,生长慢

注: 1. 分化率 = (分化芽外植体数 / 接种外植体数) × 100%; 2. 平均每个外植体出芽数 = 不定芽总数 / 分化芽外植体数; 3. 统计的不定芽指长度超过 1 cm的芽

Notes 1. Multiplicated rate = (explants with shoots / total explants) × 100%; 2. NO. of shoots per explant = total shoots / explants with shoots; 3. The length of counted shoots achieves or exceeds 1 cm.

表 2 不同培养基对乌头试管苗生根的影响

Table 2 Effect of various media on test tube shoot induction of *A. carmichaeli* in vitro

培养基编号	培养基配方	接种苗数 /块	开始产生根的天数 /d	生根率 %	平均根数	根的长势
1	1/2MS	30	7	100	5.3	根向下及两侧生长,有分岔,多数向下
2	1/2MS+ NAA 0.2 mg/L	30	10	75	3.3	根表面有白色绒毛,多数向两侧生长,少数根尖呈黑色
3	1/2MS+ IBA 0.5 mg/L	30		0	0	绝大部分死亡,少量成活也不形成根

注: 1. 生根率 = (产生根的苗数 / 接种苗数) × 100%; 2. 平均根数 = 共产生根数 / 产生根的苗数; 3. 统计的根指长度超过 1 cm的根

Notes 1. Rooting rate = (shoots with roots / total roots) × 100%; 2. No. of roots per shoot = total roots / shoots with roots; 3. Length of counted roots achieves or exceeds 1 cm

封口膜,放于室内散射光条件下锻炼。2 d后将生根苗移出,洗净根部琼脂。移入盛有灭菌土的小花盆中,盖上塑料薄膜,浇少许 1/2MS营养液,放于散射光条件下培养,温度 18℃~ 23℃,相对空气湿度 80%~ 90%;保持基质湿润。1周后移去塑料薄膜,逐渐加大光照强度。

2 结果分析

2.1 不定芽的诱导:接种 5 d后外植体开始膨大隆起;10~ 15 d后外植体切口处出现淡黄色颗粒状突起,15~ 30 d后进一步长出绿色小芽。含不同激素配比的培养基上开始产生不定芽的时间,芽的诱导率,每个外植体产生的芽数以及芽苗的长势各不相同(表 1)。

1.2.4 芽的伸长与生根培养:将在增殖培养基中生长了一个月的丛生芽分成 3~ 4个为一小簇转入 MS+ BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L的培养基中进行芽的伸长培养;将在芽的伸长培养基中生长了约 20 d的芽再转入到生根培养基中进行生根培养。生根培养基以 1/2MS为基本培养基,分别添加 NAA和 BA,具体配方见表 2。培养条件同前。

1.2.5 试管苗的练苗移栽:将生根苗的培养瓶去掉

2.1.1 NAA浓度对不定芽的影响:在 1~ 4号培养基中 BA、KT浓度相同,NAA浓度不同。从培养结果看出:不含 NAA的 1号培养基的分化率最低,仅为 30%,平均出芽数也较少。当加入 0.1 mg/L的 NAA时,叶片不定芽的诱导率达最高,为 85%,但平均出芽数较少,仅为 3.0个;在 NAA浓度为 0.2 mg/L时,芽的诱导率为 80%,平均出芽数达最高,为 10.4个,不定芽的生长也最好,是诱导不定芽的最佳培养基。但当 NAA浓度达到 0.5 mg/L时反而抑制不定芽的形成。这表明添加适当浓度的 NAA对不定芽的诱导和生长有促进作用,过高的浓度会抑制不定芽的形成。

2.1.2 BA浓度对不定芽的影响:在 2,5,6号培养基中 KT NAA浓度相同,BA浓度不同。培养结果显示:BA为 1.0 mg/L时分化率和平均出芽数都是最高的,BA浓度高于或低于 1.0 mg/L都会抑制不定芽的产生和生长。

综合 BA和 NAA对不定芽诱导和生长的影响,3号培养基是最适宜的培养基 不仅不定芽诱导率高,而且平均出芽数最多、生长也最好。

2.2 继代培养:培养 2周后,芽苗基部膨大并长出许多绿色小芽,30 d后,芽丛增殖 4~6倍 增殖的芽丛可切成小簇继续增殖培养;也可将芽苗的较大叶片切下培养,再次诱导其产生不定芽,从而达到扩大增殖倍率的目的

2.3 芽的伸长和生根培养:经增殖培养后的丛生芽高生长缓慢,几乎没有茎段,需进行芽的伸长培养 在 MS+ BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L的培养基上培养 1周后,丛生芽快速伸长,20 d后可达 8 cm左右 将伸长后的芽苗接种生根培养基上,可诱导出根,形成完整植株 从表 2可看出,不同培养基上的生根时间、生根率、平均生根数有差异 其中不加激素的 1/2MS培养基上第 7天即开始长根,20 d后的生根率达 100%,平均生根数为 5.3,是最佳生根培养基;添加 0.2 mg/L NAA的 1/2MS培养基上的芽苗第 10天开始长根,20 d后的生根率为 75%,平均生根数为 3.3 添加 0.5% IBA的 1/2MS培养基上的芽苗始终没有长根。

2.4 炼苗移栽:据初步统计,乌头移栽后的成活率可达 80%。乌头试管苗的叶片很薄,极易失火而死亡,因此在练苗移栽过程中保持较高的空气湿度和适宜的温度是提高成活率的关键所在

3 讨论

胡延玉等在乌头的组织培养中采用的培养基,需加入维生素 B₆、维生素 B₁₂、烟酸、肌醇、生物素、腺嘌呤泛酸钙、胱氨酸、酪蛋白水解物等多种有机物,成本较高 而采用 MS培养基作为基本培养,并配以适当的激素进行乌头的组织培养,也可使植株再生,从而降低了成本。

林静等用带叶腋的茎段作为外植体进行培养,增殖率仅为 1,繁殖系数低,不能满足快速繁殖的需要;并且所用乌头的叶片作为外植体进行培养,诱导出了愈伤组织,但没有分化出芽 而本次实验以无菌叶片为外植体,配以适当的激素配比,直接诱导不定芽的产生并得到生根植株 这种方法不仅外植体来源丰富,且增殖倍率高,有利于乌头的工厂化育苗;同时也为乌头的多倍体育种、基因工程研究提供了依据。

References

- [1] The Flower Teaching Section of Landscape Architect Department, Beijing Forest University. *Flower Science* (花卉学) [M]. Beijing: China Forest Press, 1990.
- [2] Hu Y Y, Wu G Q. Tissue culture and regeneration of *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1985(5): 37-40.
- [3] Lin J, He Y. Investigation of tissue culture of *Aconitum carmichaeli* Debx. and its rapid propagation [J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 1998, 16(2): 120-123.

黄连的毛细管电泳特征指纹图谱研究

魏英勤,袁久荣,闫 滨*

(山东中医药大学中药学院,山东 济南 250014)

摘要:目的 建立黄连的高效毛细管电泳指纹图谱。方法 采用毛细管电泳考察了不同批药材季铵碱的保留时间和峰面积的相关性,并以小檗碱作为参照物计算了各色谱峰的相对保留时间和峰面积比值。结果 不同批号的黄连样品色谱组分的保留时间和峰面积的相关系数均大于 0.999 0 结论 建立的黄连高效毛细管电泳指纹图谱稳定、可靠,可作为黄连的特征指纹图谱。

关键词:黄连;毛细管电泳;指纹图谱

中图分类号:R282.710.3

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2003)06-0563-03

Study on fingerprint spectrum of *Coptis chinensis* by HPCE

WEI Ying-qin, YUAN Ju-rong, YAN Bin

* 收稿日期:2002-09-06

作者简介:魏英勤(1971-),男,山东郯城人,山东中医药大学 2000级博士,研究方向为中药及复方活性成分与质量控制。
Tel (0531) 2612433, 2612425 E-mail wyqsdu@sina.com