

铁棒锤快速繁殖体系的建立

汪付田, 展 锐, 王建良, 郭 敏

甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 建立铁棒锤高效快速繁殖体系。方法 以铁棒锤越冬芽为外植体, 用不同的培养基、激素和附加物组合培养。结果 培养基 MS+2, 4-D 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+活性炭(AC) 1.5 g/L+聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 1 g/L 有利愈伤组织的形成; 培养基 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 1.5 g/L+PVP 1 g/L 有利于成芽; 培养基 MS+6-BA 3.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2, 4-D 0.1 mg/L+AC 1.5 g/L+PVP 1 g/L 有利芽增殖; 培养基 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+AC 1.5 g/L+PVP 1.0 g/L 有利于根的生成。结论 以种子发芽苗为外植体进行离体培养, 可以实现铁棒锤种苗的工业化快速繁殖。

关键词: 铁棒锤; 组织培养; 快速繁殖; 外植体; 聚乙烯吡咯烷酮

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1191-04

Establishment of rapid propagation system of *Aconitum pendulum*

WANG Fu-tian, ZHAN Rui, WANG Jian-liang, GUO Min

Gansu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Key words: *Aconitum pendulum* Busch; tissue culture; rapid propagation; explant; Polyvinyl pyrrolidone(PVP)

铁棒锤为毛茛科植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 的干燥根。其性热, 味辛、苦, 有大毒; 归心、肾、脾经; 具有活血祛瘀, 祛风除湿, 止痛消肿的功效^[1]。铁棒锤别名铁牛七、断肠草、两头尖、磨三转、乌药、一枝箭、三转半、一枝蒿, 生于海拔 1 450~3 050 m 的山顶、山坡、草地及灌木丛中, 为陕西、甘肃、宁夏、青海等省应用较广的民间草药^[2]。铁棒锤在甘肃主要分布于 2 391~2 495 m 的高寒地带, 由于对其需求量不断扩大, 一些地方已开始人工栽培。铁棒锤种子的发芽率极低, 所以主要以根进行分株繁殖, 但是这种繁殖方式繁殖率较低, 而通过组织培养可以建立铁棒锤高效、无毒的快速繁殖体系, 满足生产中的种苗需求。本课题组开展铁棒锤组织快繁研究, 试图以铁棒锤种子越冬芽为外植体, 建立铁棒锤的快速繁殖体系。

1 材料与方法

1.1 材料

样品于 2009 年采自甘肃省兰州市永登县武胜驿镇聂家湾村, 由甘肃中医学院李成义教授鉴定为铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 的种子。

1.2 方法

1.2.1 外植体获得 取铁棒锤种子, 去除种皮, 在蒸馏水中浸泡 4~5 h, 于 0.15% 升汞中消毒灭菌 10 min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 切去部分胚乳, 接种于 MS 培养基中, 培养基中附加 0.75% 琼脂、30 g/L 蔗糖、1.5 g/L 活性炭(AC)、1.0 g/L 聚乙烯吡咯烷酮(PVP); 培养温度 20 ℃, 光照 12 h/d, 光强 1 500~2 000 lx。培养 30 d 后, 待发芽苗长至 3~4 cm 长即可作为试验外植体。

1.2.2 愈伤组织诱导 以 MS 为基本培养基, 附加不同质量浓度的植物激素 NAA 和 2, 4-D, 蔗糖 3%, 琼脂粉 0.7%, pH 5.8, 培养基均加入 AC 1.5 g/L 和 PVP 1 g/L 作为抗褐化剂, 每组设 5~8 个重复。培养温度(20±1)℃, 光周期 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx, 具体配比见表 1。

1.2.3 成芽诱导 以 MS 为基本培养基, 附加不同质量浓度的植物激素 6-BA 和 NAA, 其他培养条件同上, 将在愈伤组织诱导培养基上生长约 1 个月的筛选最佳组愈伤组织转接到成芽诱导培养基上以诱导不定芽的生成, 具体配比见表 2。

1.2.4 芽的增殖培养 以 MS 为基本培养基, 附加

收稿日期: 2011-11-24

作者简介: 汪付田 (1966—), 男, 主任中医师, 研究方向为中药鉴定及中药新剂型与新技术应用。

Tel: 13893258146 E-mail: 0220wangfutian@sina.com

表1 愈伤组织诱导激素配比

Table 1 Hormone ratio of callus induction					
试验组	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	试验组	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)
1	2.5	0.4	6	2.0	0.2
2	2.5	0.3	7	1.5	0.4
3	2.5	0.2	8	1.5	0.3
4	2.0	0.4	9	1.5	0.2
5	2.0	0.3			

表2 成芽诱导激素配比

Table 2 Hormone ratio of budding induction					
试验组	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	试验组	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)
1	3.0	0.2	5	2.0	0.2
2	3.0	0.1	6	2.0	0.1
3	2.5	0.2	7	1.5	0.2
4	2.5	0.1	8	1.5	0.1

不同质量浓度的植物激素 NAA、6-BA 和 2, 4-D, 其他培养条件同上。将在芽的增殖培养基上生长了 1 个月的筛选最佳组健壮不定芽 3~5 个为一簇切下转入到芽增殖诱导培养基上, 以诱导芽的增殖。激素配比见表 3。

1.2.5 生根培养 以 1/2 MS 为基本培养基, 附加不同质量浓度的植物激素 NAA 和 IBA, 其他培养条件同上。筛选最佳芽增殖培养基, 将长至 3~5 cm 的不定芽转接到不同配比的生根培养基上, 以诱导根的生成。激素配比见表 4。

1.2.6 炼苗移栽 将生根培养基上根长 4 cm 左右, 植株 6 cm 左右的再生苗, 打开瓶盖, 室温炼苗 2~3 d 后, 自来水洗净苗上的培养基, 移栽至蛭石和腐殖土 (3:1) 的基质中, 置于 18~23 °C, 光照周

表3 芽增殖诱导激素配比

Table 3 Hormone ratio of shoot proliferation induction			
试验组	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)
1	1.5	0.1	0.1
2	1.5	0.2	0.1
3	2.5	0.1	0.1
4	2.5	0.2	0.1
5	3.5	0.1	0.1
6	3.5	0.2	0.1
7	4.5	0.1	0.1
8	4.5	0.2	0.1

表4 诱导生根培养基不同质量浓度激素配比

Table 4 Hormone ratio for rooting medium at different concentration					
试验组	IBA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	试验组	IBA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)
1	0.0	0.0	7	0.2	0.0
2	0.0	0.1	8	0.2	0.1
3	0.0	0.2	9	0.2	0.2
4	0.1	0.0	10	0.0	0.3
5	0.1	0.0	11	0.0	0.5
6	0.1	0.2			

期 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx 下培养, 薄膜覆盖保持基质湿润, 一周后转入栽培土。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

将种子发芽获得的无菌外植体接种于 9 组不同愈伤组织诱导培养基上, 每组设 8 个重复, 30 d 后统计愈伤诱导率, 结果见表 5。愈伤组织诱导速率随 2, 4-D 质量浓度升高而加快, 但质量浓度过高影响愈伤组织质量, 形成的愈伤组织蓬松如棉, 不利于进一步的成芽诱导。NAA 则在愈伤组织诱导中也

表5 愈伤组织诱导情况

Table 5 Induction of callus			
试验组	始成愈伤组织天数 / d	愈伤组织诱导率 / %	愈伤组织状态
1	10	100	愈伤生长太快, 组织蓬松如棉, 不利成芽
2	9	100	愈伤化快, 组织蓬松, 转接易褐化, 不利成芽
3	9	100	愈伤化最快, 组织最蓬松, 适于细胞培养
4	13	100	愈伤生长快, 紧实, 且量大, 有利成苗
5	12	100	愈伤生长快, 量大, 愈伤组织偏白, 愈伤组织较松
6	10	100	愈伤生长快, 组织蓬松, 不利成芽
7	16	75	愈伤生长慢, 过紧实, 量少
8	15	75	愈伤生长较慢, 量少
9	15	87.5	愈伤生长较慢, 组织状态好

起到一定调节作用,综合考虑愈伤组织诱导率、生长速率及愈伤组织质量,确定愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,其形成愈伤及增殖的速度快,且愈伤组织质量好,能较好地诱导成芽(图 1)。



图 1 发芽苗形成的愈伤组织

Fig. 1 Callus formed by germination seedlings

2.2 成芽诱导

将筛选组愈伤组织接种于 8 种成芽诱导培养基中,每组设 8 个重复,50 d 后统计成芽结果,结果见表 6。可以看出,较高质量浓度 6-BA 能促进芽诱导,但当质量浓度大于 3.0 mg/L 时其成芽效果降低。NAA 则以 0.2 mg/L 的诱导效果较好。综合考虑诱导率和诱导成芽的始成芽天数,确定成芽诱导最适培养基为 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,其成芽率较其他组高,且成芽速度快(图 2)。

2.3 芽增殖培养

将筛选组不定芽的外植体转到 8 种不同的增殖培养基,每组设 5 个重复。3 d 后不定芽适应培养基

表 6 成芽诱导情况

Table 6 Induction of budding

试验组	始成芽 天数/d	成芽诱 导率/%	试验组	始成芽 天数/d	成芽诱 导率/%
1	26	12.5	5	19	62.5
2	—	0	6	28	50
3	23	87.5	7	—	0
4	—	0	8	—	0



图 2 愈伤组织诱导成芽

Fig. 2 Budding induced by callus

并开始快速生长,10~25 d 芽增殖速度最快,到 30 d 以后增殖芽数基本不变,且生长渐缓。30 d 后统计增殖率及试管苗生长情况,见表 7。

表 7 芽增殖情况

Table 7 Proliferation of bud

试验组	褐化率/%	增殖率/%	生长势
1	100	158.6	—
2	75	141.3	+
3	25	251.5	+++
4	50	177.4	++
5	25	326.3	++
6	65	196.7	+
7	100	183.3	+
8	100	148.5	—

“+++”表示长势优;“++”表示长势良;“+”表示长势一般;“—”表示长势差,下表同

In “plantlets growing” section, “+++” indicates the excellent growing state, “++” indicates the good growing state, “+” indicates the general growing state, “—” indicates the poor growing state, same as below

可以看出,1、2 组中 6-BA 较低,其诱导增殖率较低,生长速度慢,褐化率高,生长势差;而 7、8 组中 6-BA 的量太高,高量的 6-BA 能显著促进褐变的发生,严重的褐化致使外植体生长受到很大影响,降低了芽的增殖率;综合增殖率、褐化率及培养过程中外植体生长情况,最终确定芽增殖诱导最适培养基为 MS+6-BA 3.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L,其增殖率平均可达 326.3%(图 3)。

2.4 生根培养

将筛选组的不定芽转到 11 种不同的生根培养基,每组 5 个重复。7 d 后开始出现白色幼根,7~15 d 生根速度最快,15~25 d 根伸长速度最快,30 d 后最长的达 4 cm,总体情况见表 8。不加任何激素的 1/2 MS 培养基不能诱导根的生成,且苗子长势渐弱;单独使用 NAA 诱导生根的效果明显优于单独使用 IBA 或 IBA 和 NAA 的混合激素,NAA 质量

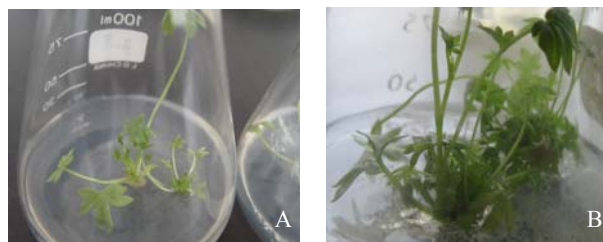


图 3 芽增殖诱导前 (A) 和诱导后 (B) 情况

Fig. 3 Bud proliferation before (A) and after (B) induction

表 8 不同培养基对铁棒锤生根的影响

Table 8 Effect of different media on rooting of *A. pendulum*

试验组	生根率 / %	平均根数	平均根长 / cm	试管苗长势
1	0	0	—	—
2	45.0	2	1.5	++
3	96.0	2	2.1	+++
4	38.0	1	0.1	—
5	75.0	2	1.3	+++
6	56.0	1	1.3	+
7	20.0	1	0.6	—
8	57.0	1	2.2	++
9	31.0	1	0.2	—
10	22.2	2	1.4	+++
11	11.1	1	0.9	++

浓度过高或过低都不利于铁棒锤根的生成, 其中以 NAA 质量浓度为 0.2 mg/L 的诱导生根效果最好, 其生根率、平均根长、试管苗长势都明显优于其他组。因此, 综合生根率、平均根数、平均长及试管苗长势等因素, 铁棒锤较优的生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L (图 4)。

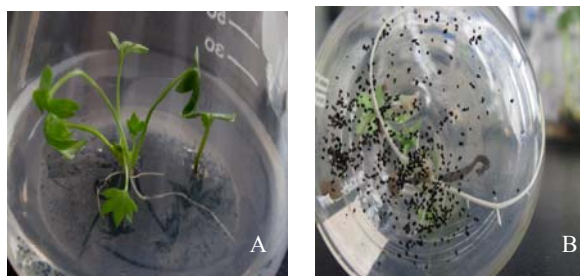


图 4 诱导成根 (A) 及防褐化处理 (B) 生根培养

Fig. 4 Rooting cultivation of induction (A) and treatment by browning prevention (B)

2.5 炼苗移栽

在本实验条件下, 铁棒锤移栽后的成活率可达 90%。但其试管苗叶片很薄, 极易失水而死亡, 因此在炼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 (图 5)。

3 讨论

铁棒锤种子的发芽率极低, 所以主要以根进行



图 5 炼苗移栽

Fig. 5 Hardening transplanting

分株繁殖, 但是这种繁殖方式繁殖率低, 而通过组织培养方式建立高效、无毒的快速体系, 能有效地解决生产中的种苗问题。本研究在参考相关文献^[3-7]的基础上, 设置 6-BA、NAA、2, 4-D 和 IBA 不同质量浓度的激素组合, 以 1/2 MS 和 MS 培养基作为基本培养基, 并在培养基中加入 AC 和 PVP 作为抗褐化剂, 以种子发芽苗作为实验材料, 进行研究, 确定了铁棒锤愈伤组织诱导、成芽诱导、芽增殖培养和生根培养的最适培养条件, 同时对试管苗的炼苗移栽条件进行摸索, 试管苗移栽成活率达 90%。本研究建立了铁棒锤高效、无毒的快速繁殖体系, 为解决铁棒锤种源问题提供理论依据。

参考文献

- [1] 王毓杰, 曾陈娟, 姚 喆, 等. 铁棒锤及其炮制品中二萜生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 347-351.
- [2] 陕西省卫生局. 陕西中草药 [M]. 北京: 科学出版社, 1971.
- [3] 唐晓义, 王晓军, 康喜亮, 等. 新疆一枝蒿的组织培养与快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(3): 523.
- [4] 李昌禹, 王英平, 臧 埔, 等. 黄花乌头叶片诱导植株再生研究 [J]. 特产研究, 2005(2): 34-36.
- [5] 田迎秋, 刘 帆, 黄玉碧, 等. 乌头离体培养和快速繁殖 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1243-1247.
- [6] 关文灵, 王 黎, 郑思乡. 乌头植株再生体系的建立 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 561-563.
- [7] 徐秀泉, 于荣敏, 赵 昱. 药用植物黄花乌头再生系统的建立 [J]. 中药材, 2004, 27(11): 797-798.