

· 中药及天然药物 ·

荆半夏组织培养及快速繁殖的研究

马维平¹, 黄连超², 顾红卫¹, 詹亚华³, 田维珍¹, 蒙晓鹏² (1. 湖北中医药高等专科学校, 湖北 荆州 434020; 2. 湖北荆楚种业股份有限公司, 湖北 荆州 434020; 3. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 建立荆半夏快速繁殖体系, 为抢救性开发荆半夏野生资源提供有力手段。方法 用 MS + 6BA 2.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹ 培养基诱导及分化培养; 用 MS + 6BA 0.2 mg · L⁻¹ + IBA 1.0 mg · L⁻¹ 培养基作生根培养。结果 诱导培养 2 周后形成大量愈伤组织, 继代培养 3 周后分化出大量丛生芽。生根培养 2 周后形成完整植株。结论 通过组培快繁荆半夏的繁殖系数由自然栽培时的每年 1~2 倍提高到每月 15 倍左右。

关键词:半夏; 荆半夏; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: R282 文献标识码: A 文章编号: 1004-2407(2006)02-0057-03

Research of tissue culture and rapid propagation of *Pinellia ternate* from Jingzhou

MA Wei-ping¹, HUANG Lian-chao², GU Hong-wei¹, ZHAN Ya-hua³, TIAN Wei-zhen¹, MENG Xiao-peng² (1. Hubei College of Chinese Medicine, Hubei Jingzhou 434020; 2. Hubei Jing Chu Seed Industry Corporation Limited, Hubei Jingzhou 434020; 3. Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430070)

Abstract: Objective In order to explore a effective method for protection the wild *Pinellia ternate* in Jingzhou. The rapid propagation system of *Pinellia ternate* was established. **Methods** A mixture of MS + 6BA 2.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹ was used as induce and polarized culture medium. And medium of MS + 6BA 0.2 mg · L⁻¹ + IBA 1.0 mg · L⁻¹ was used as the rootage culture. **Results** A mass of calli was formed in two weeks, and a mass of caespitose bud was induced after sequentially generational cultivation in three weeks. Plant was integrated after two weeks rootage cultivation. **Conclusion** The quotiety of propagation of *Pinellas ternate* Jingzhou increases from about 1~2 times a year by normal method to 15 times a month by our method.

Key words: *Pinellia ternate*; *Pinellia ternate* from Jingzhou; tissue culture; rapid propagation

半夏(*Pinellia ternata*)为天南星科多年生草本植物。块茎近球形,叶基生,高30 cm,叶柄长10~20 cm,下部有一株芽。主产地有湖北、四川、河南、贵州、安徽等省。地下块茎干燥炮制后入药,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效,为临床常用中药^[1]。荆州出产的野生半夏以色白、质坚实、粉性足而被誉为上品,蜚声海内外,称荆半夏,深受医药界青睐。目前野生荆半夏资源濒临枯竭。据湖北中药资源普查资料统计,1964年全省荆半夏收购量为49万kg,以后逐年下降,1991年仅为5万kg。现荆半夏已远远不能满足市场需求,为抢救性开发荆半夏这一重要中药资源,2004年湖北省教育厅对“荆半夏快速繁殖及规范化种植的研究”立项,本研究即为该项目的一部分。半夏栽培主要采用地下块茎及叶柄上的株芽繁殖,繁殖系数低,需种量大,成本高。利用组培技

术对半夏进行试管繁殖,不仅可提高繁殖系数,还可显著改良半夏品质^[2]。

文献^[1]曾报道用半夏茎尖作外植体诱导再生植株,本试验应用了不同的品种,外植体及培养途径也不同。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 荆州本地地产野生荆半夏地下块茎及叶柄上的株芽。

1.2 培养条件 以MS为基本培养基,添加6BA和IBA不同的比例。诱导及增殖培养,设5个处理:①6BA 1.0 mg · L⁻¹;②6BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.2 mg · L⁻¹;③6BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹;④6BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 1.0 mg · L⁻¹;⑤6BA 2.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹。生根培养设5个处理:①IBA 0.1 mg · L⁻¹;②IBA 0.5 mg · L⁻¹;③6BA 0.1

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ④ $6\text{BA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ⑤ $6\text{BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上培养基中均加入 0.8% 琼脂, 4% 蔗糖, $\text{pH} = 5.8 \sim 6.0$, 培养室温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度 $1\ 500 \sim 2\ 000 \text{ lx}$, 光照时间 12 h。

1.3 方法

1.3.1 外植体及消毒^[3] 取荆半夏地下块茎和叶柄上株茎, 清洗干净后, 用手剥去表皮, 用 3% 次氯酸钠溶液浸泡 30 min 待用。在无菌工作台上先用 75% 乙醇浸泡 10 s, 再用 0.1% 升汞浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 滤纸吸去表面水分。

1.3.2 诱导培养 将消毒好的外植体切割成 $0.3 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 大小, 接种于诱导培养基中。观察愈伤组织形成及芽苗分化情况。

1.3.3 增殖培养 经过诱导培养形成的愈伤组织连同小球茎切割成小块, 接种到同样配方的新的培养基中继代增殖培养。每 30 d 一个周期转移培养, 观察增殖效果及成苗情况。

1.3.4 生根培养 将增殖培养形成的试管苗或丛生小球茎进行分割, 单株接种到生根培养基中, 观察其生根情况。

2 结果与分析

2.1 不同激素比例对诱导愈伤组织及芽点的影响

接种 2 周后, 各个处理均开始形成愈伤组织, 带顶芽的外植体长出叶片, 但不影响愈伤组织形成。处理④诱导率最高, 处理②、⑤次之, 处理①、③诱导率较低。3 周后处理④诱导率高达 77.3%, 不易直接形成丛生芽; 处理②、⑤诱导率分别为 62.2% 和 67.4%, 愈伤组织呈青绿色, 愈伤组织膨大的同时分化产生大量丛生芽^[4]。



图1 诱导出愈伤组织并分化形成丛生芽

用完整的块茎或株茎直接接种, 1 周后开始长出叶片, 逐渐生长为单株, 但不能形成愈伤组织, 也不能形成丛生芽^[5]。

表1 不同激素比例对诱导愈伤组织及芽点的影响

激素比例/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数	2周形成 愈伤组织数	3周形成 愈伤组织数	诱导率 (%)	愈伤组织形态
① $6\text{BA}1.0$	32	2	12	37.5	黄白色 生长速度慢
② $6\text{BA}1.0 + \text{IBA}0.2$	45	6	28	62.2	青绿色 易形成丛生芽
③ $6\text{BA}1.0 + \text{IBA}0.5$	38	4	14	36.8	淡绿色 生长速度慢
④ $6\text{BA}1.0 + \text{IBA}1.0$	44	13	34	77.3	黄白色 不易形成丛生芽
⑤ $6\text{BA}2.0 + \text{IBA}0.5$	46	8	31	67.4	青绿色 易形成丛生芽

2.2 不同激素比例对增殖及幼苗生长的影响^[6]

转入新的培养基后, 处理②、⑤愈伤组织生长速度明显加快, 同时形成大量绿色的丛生芽, 逐渐生长成为小球茎, 3~4 周后小球茎长出小叶, 形成丛生苗, 增殖系数分别为 7.8 和 15.7。处理④愈伤组织快速膨大, 但难以形成丛生芽, 增殖系数仅为 2.9。处理①、③愈伤组织生长较慢, 形成丛生芽较瘦弱, 增殖系数也较低, 分别为 3.3 和 4.1。



图2 增殖形成丛生芽苗

表2 不同处理对增殖及幼苗生长的影响

处理	接入苗数	增殖数	系数	试管苗形态
①	26	86	3.3	芽苗瘦弱, 愈伤组织生长慢
②	38	296	7.8	愈伤组织膨大快, 丛生芽健壮, 3~4 周后从小球茎长出小叶
③	28	115	4.1	愈伤组织生长慢, 芽苗瘦弱
④	42	122	2.9	愈伤组织快速膨大, 难以形成丛生芽
⑤	47	738	15.7	愈伤组织快速膨大, 丛生芽健壮, 3 周后从小球茎长出小叶

2.3 不同培养基对试管苗生根的影响

5 个不同处理的培养基均可诱导植株根系形成, 随着 IBA 浓度的增加, 生根率逐渐增加。没有加入 6BA 的培养基植株瘦弱, 加入一定量的 6BA 有利于植株生长健壮。处理⑤中 6BA 和 IBA 浓度过高, 虽然植株根系生长健壮, 但基部愈伤组织化, 不利于试管苗的移植。

表3 不同培养基对试管苗生根的影响

激素比例/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接入苗数	生根株数	生根率%	2周后根系生长形态
① $\text{IBA}0.1$	27	15	56	白色, 根系少, 细长, 植株瘦弱
② $\text{IBA}0.5$	25	18	72	白色, 根量中, 细长, 植株瘦弱
③ $6\text{BA}0.1 + \text{IBA}0.5$	32	25	78	白色, 根量中, 细长, 植株较壮
④ $6\text{BA}0.2 + \text{IBA}1.0$	35	34	97	白色, 根量多, 放射状粗短根, 植株健壮
⑤ $6\text{BA}0.5 + \text{IBA}2.0$	28	27	96	黄白色, 根量多, 掌状, 基部愈伤组织化, 植株健壮



图3 试管苗根系健壮

2.4 试管苗的移栽定植 经过生根培养的试管苗,在室温条件下揭去封口膜,3~4 d后洗净根部培养基,移入基质中假植,移入小拱棚内,棚内温度25℃,湿度98%。3 d后逐渐通风炼苗,2周后小苗可移入大田定植,进行常规栽培管理。试验表明,组培苗在大田生长健壮,发育良好,总成活率92%以上。

3 小结与讨论

(1)本项研究通过组培方法快速繁殖荆半夏试管苗,其繁殖系数由自然栽培时的每年1~2倍提高到每月15倍左右,为抢救性开发荆半夏野生资源提供了有力手段。

(2)利用荆半夏地下块茎或株茎分割后,可有效地诱导愈伤组织并同时分化丛生芽,理想的培养基为MS+6BA2 mg·L⁻¹+IBA0.5 mg·L⁻¹。将丛生芽分割转入同样培养基中,可加快增殖速度,理想的增殖周期为4周。对试管苗进行生根培养时,理想的培养基为MS+6BA0.2 mg·L⁻¹+IBA1.0 mg·L⁻¹。

(3)试管苗炼苗移栽是最终实现规模化生产的关键环节。出瓶时残留根部的培养基必须清洗干净,假植基质要灭菌处理,防止烂苗。成活后注意水分和养分补给,以及温度、光线控制,确保形成壮苗。

(4)如果不经过生根培养阶段,将增殖培养形成的小球茎直接用作大田种植,将大大缩短繁殖周期,节约成本,这一设想正在研究中。

参考文献:

- [1] 李家实. 中药鉴定学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996. 216~218.
- [2] 何奕昆,刘刚,路铁刚,等. 半夏茎尖培养及块茎的品质改良[J]. 植物学报, 1994. 1:23.
- [3] 王玉英. 组织培养材料的消毒[J]. 植物杂志, 1980, 1:13.
- [4] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社, 1991. 91~95.

- [5] 张征兰,黄连超,金隶. 魔芋组织培养与植株再生的研究[J]. 华中农业大学学报, 1986, 5(3): 224~227.
- [6] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社, 1992. 332~337.

(收稿日期:2005-09-15)

RP-HPLC法测定黄连解毒汤中黄芩苷的含量

李清¹,王璐²,戴荣华¹,戴锦娜¹,毕开顺¹(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳110016; 2. 辽宁省药品检验所, 辽宁沈阳110023)

摘要:目的 采用高效液相色谱法测定黄连解毒汤中黄芩苷含量。方法 Hypersil C₁₈柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水-四氢呋喃(20: 78: 2.7), 磷酸调pH=4, 内标物为对硝基苯甲酸, 检测波长274 nm。结果 平均回收率96.6%, RSD为1.4% (n=9), 黄连解毒汤中黄芩苷含量为1.636 g·L⁻¹。结论 本法可以作为黄连解毒汤的质量控制方法。

关键词:黄连解毒汤;黄芩苷;高效液相色谱法

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

文章编号:1004-2407(2006)02-0059-03

黄连解毒汤出自《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成,具有较强的苦寒清热解毒功能^[1]。黄芩为臣药,主要成分是黄芩苷,具有抗菌、消炎、清热利尿、解毒及抗过敏作用^[2]。因此,黄芩苷质量标准确立对于黄连解毒汤质量控制具有重要意义。笔者以对硝基苯甲酸为内标,采用高效液相色谱法测定黄连解毒汤中黄芩苷的含量。实验结果表明该法可有效控制其质量。

1 仪器与药品

1.1 仪器 日本岛津LC-10AD高效液相色谱仪, SPD-10A检测器, C-R6A数据处理机

1.2 试剂和试药 黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度为98%以上)。药材均购自天益堂药店,由沈阳药科大学孙启时教授鉴定。黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎(产地四川);黄芩为唇形植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根(产地河北);黄柏为芸香科植物黄柏 *phellodendron amurense* Rupf. 的干燥树皮(产地辽宁);栀子为茜科植物栀子 *Gardenia jasminodes* Ellis 的干燥成熟果实(产地浙江)。乙腈为色谱纯,其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性 Hypersil C₁₈柱(4.6