

黄草乌离体快繁技术研究

王卜琼¹, 韦建荣¹, 李红仙¹, 杨斌², 赵庭周¹

(¹ 云南白药集团中药材优质种源繁育有限责任公司, 武定 651608;

² 云南省农业科学院药用植物研究所, 昆明 650223)

摘要:应用植物组织培养技术,对黄草乌的诱导材料和培养配方进行筛选。结果表明:茎段为最适宜的诱导材料;以MS为基本培养基,附加6-BA 2.0mg/L, NAA 1.0mg/L 适宜茎段诱导培养;附加6-BA 2.0mg/L, NAA 0.2mg/L 适宜芽的增殖培养;附加NAA 0.5~1.5mg/L 适合根的诱导。

关键词:黄草乌;外植体;离体诱导

中图分类号:S567 **文献标识码:**A

Study in Vitro Culture and Rapid Propagation of *Aconitum Vilmorimianum*

Wang Buqiong¹, Wei Jianrong¹, Li Hongxian¹, Yang Bin², Zhao Tingzhou¹

(¹Traditional Chinese Medicine High Quality Source Breeding Production Base,

Yunnan Baiyao Group Co. Ltd, Wuding 651608;

²Medical Plant Institute Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650223)

Abstract: To screen out the induction materials and the culture medium combination by tissue culture. The results indicated that stem segment was optimum explanted. MS medium with 6-BA 2.0mg·L⁻¹+NAA 1.0mg·L⁻¹ was suitable for the induction of buds, MS medium with 6-BA 2.0mg·L⁻¹+NAA 0.2mg·L⁻¹ was best combination for the propagation of inductive buds, and MS medium with NAA 0.5~1.5mg·L⁻¹ was suitable for the induction of root.

Key words: aconitum vilmorimianum, explants, vitro culture and rapid propagation

黄草乌为毛茛科植物黄草乌 *Aconitum vilmorimianum* Kom.的块根。主要含有滇乌碱(yunaconitine)等生物碱成分^[1-3], 药理学研究表明, 滇乌碱的毒性极高, 具有较强的镇痛、抗炎和解热作用^[4]。其味辛、苦, 性热, 有大毒。归心、肝、肾、脾经。主治风寒湿痹, 关节疼痛, 心腹冷痛, 头痛头晕, 跌打损伤瘀痛, 半身不遂等(《云南中草药》和《贵州草药》)。是云南著名的百宝丹、虎力散、三乌胶等多种中成药的主要原料^[5]。集中分布于云南中部、西部和贵州西部及四川(会理)等海拔2100~3000m的山地灌丛中^[6]。云南大部分地区都有煮食鲜黄草乌的习俗, 用来增强机体免疫调节功能, 抵抗病毒侵害。

随着野生资源的减少, 人们开始对黄草乌进行人工驯化栽培^[7,8], 许多学者还对黄草乌的质量标准及影响因素等进行了研究^[9-12], 但对黄草乌的离体快繁技术

研究却未见报道。

目前黄草乌主要靠子根繁殖, 耗种量大, 且由于病毒感染等原因, 导致种性退化, 产量和品质降低, 不能适应规模化和标准化生产的需要。笔者通过组织培养技术获得无病毒植株, 再配合科学的栽培管理手段, 旨在对退化品种进行复壮, 为黄草乌的规范化标准化生产提供优质种源。

1 材料和方法

1.1 试验时间、地点

试验于2006年6月在云南白药集团中药材优质种源繁育有限责任公司开始进行。(注: 该公司为云南白药集团下属的中药材规范化种植基地)。

1.2 试验材料

以云南白药集团中药材优质种源繁育有限责任公司种植的黄草乌块根、茎尖、茎段及嫩叶为外植体进行

基金项目: 云南省科技计划项目(2006YX50)。

第一作者简介: 王卜琼, 女, 1981年出生, 硕士研究生, 研究方向为中药材良种繁育。通信地址: 650118 昆明市二环西路222号云南白药集团中药材优质种源繁育有限责任公司。E-mail: wpq1981@163.com。

收稿日期: 2008-04-08, 修回日期: 2008-05-04。

诱导。

1.3 中间繁殖体的诱导和继代

将诱导外植体用洗洁精清洗干净, 沥干水分, 在无菌条件下用 75%酒精消毒 30s, 无菌水冲洗 4 次, 块根用 0.2% HgCl₂ 消毒 10min, 其余材料用 0.1% Hg-Cl₂ 消毒 5min, 无菌水冲洗数次, 无菌滤纸吸干水分, 备用。将消毒好的块根、茎尖和茎段切成 1.5cm 长的小段, 嫩叶切成 0.5cm² 左右的小块, 接种在诱导培养

基上。待诱导出的幼苗长至 2~4cm 时, 转接到增殖培养基上继代培养。

1.4 培养基和培养条件

以 MS 培养基为基本培养基。不同诱导培养基中的植物生长调节剂浓度见表 1 (其中 1~4 号为诱导培养基, 5~8 号为继代培养基)。所有培养基中的蔗糖浓度为 30g/L, 琼脂含量为 7g/L, pH5.8。培养温度 25℃, 光照 2500~3000lx, 光照时间 12h/d。

表 1 不同诱导培养基中的植物生长调节剂浓度

培养基编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	6-BA/NAA	AC/(g/L)
1	2.0	0.5	4	0
2	2.0	0.8	2.5	0
3	2.0	1.0	2	0
4	2.0	1.5	1.3	0
5	1.0	0.2	5	0
6	1.5	0.2	7.5	1
7	2.0	0.2	10	0
8	2.5	0.2	12.5	1

1.5 生根培养

选择长 3cm 以上的小苗, 转移至含不同生长素、蔗糖浓度为 25g/L 的 1/2MS 培养基上培养, 30d 后记录生根情况。

1.6 炼苗移栽

待苗长出根后, 揭开封口膜在室内驯化培养 2~4d, 转移至含蛭石、腐殖质、菜园土的花盆中, 放置在温室内培养, 30d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对芽诱导的影响

为了确定黄草乌的最佳诱导部位, 分别将块根、茎尖、茎段和嫩叶接种于 2 号培养基上, 30d 后统计诱导结果(表 2)。试验发现, 黄草乌离体诱导褐化严重, 在这 4 种外植体中, 茎尖诱导芽启动较快, 诱导率最高为 67.50%, 但长势较弱。茎段的诱导启动时间比茎尖稍慢, 诱导率为 51.25%, 生长旺盛。以块茎和嫩

表 2 不同外植体对黄草乌芽诱导的影响

外植体	接种数量	诱导启动时间 /d	芽的诱导率	生长状况
块根	30	—	—	—
茎尖	30	16	67.50	芽纤细
茎段	30	18	51.25	芽粗壮
嫩叶	30	—	—	—

表 3 不同生长调节剂浓度对黄草乌芽的诱导和生长的影响

编号	接种数	诱导数	诱导率	叶色	芽的生长状态
1	80	52	65	淡绿	芽纤细、有 2~3 个丛生芽、生长参差不齐
2	80	41	51	翠绿~浓绿	芽粗壮、有 2~3 个丛生芽、生长参差不齐
3	80	40	50	翠绿~浓绿	芽粗壮、有 1~2 个丛生芽、生长旺盛
4	80	36	45	淡绿	芽粗壮、少有丛生芽分化、生长旺盛

叶为外植体, 则不能诱导愈伤组织及芽的产生, 块根接种后, 褐化严重, 没有诱导反应, 嫩叶接种 10d 后, 边缘卷曲干枯。

2.2 不同植物生长调节剂浓度对黄草乌芽的诱导和生长的影响

主要考察了 6-BA 和 NAA 对黄草乌芽的诱导和

幼苗生长的影响(表 3)。取茎段和茎尖接种在 1~4 号培养基上, 20d 后统计芽及幼苗的生长情况。从表 3 可以看出, 芽的诱导率与 6-BA/NAA 成正比关系, 在 6-BA 不变的情况下, 芽的诱导率随 NAA 浓度的升高而降低。NAA 浓度低至 0.2mg/L 时, 虽然诱导率比较高, 为 65%, 但诱导出的芽生长状态差, 商品价值低。

NAA 浓度升至 1.5mg/L 时,诱导率降低为 45%,几乎没有增殖率,芽的生长旺盛,叶色淡绿,其商品价值也不高。当 NAA 浓度为 1.0mg/L 时,虽然诱导率不是最高,为 50%,但能诱导丛生芽,芽生长旺盛,其综合指标最高,故为黄草乌芽诱导的最适培养基配方。

2.3 不同植物生长调节剂浓度对黄草乌幼苗继代增殖的影响

生长素 NAA 浓度 0.2mg/L 不变,主要考察细胞分裂素 6-BA 浓度对继代增殖的影响(表 4)。随着 6-BA 浓度的增加,幼苗增殖倍数相应增加。当细胞分裂素浓度达到 2.5mg/L 时,增殖倍数最高,为 3.5,但幼苗瘦弱,成苗率低。在这 4 个浓度梯度中,以 6-BA 浓度为

2.0mg/L 时,其综合指标最好。1g/L 的 AC 能有效解决褐化问题,但随培养时间的延长,幼苗逐渐弱化,降低成苗率。试验发现,培养基轻微褐化,并不影响幼苗的生长以及成苗。

2.4 不同植物生长调节剂浓度对分化小苗生根的影响

将从生苗转接到生根壮苗培养基上,20d 后就能观察到有根长出。试验表明(表 5),黄草乌小苗在没有激素的 1/2MS 培养基上能很好的生根,生根率达 90%,其平均根数、平均根长和植物长势都较好。添加低浓度的 NAA 有利于提高黄草乌的生根率及根的生长。高浓度的 NAA 则抑制生根,当浓度达到 2.0mg/L 时,生根率低于对照。

表 4 6-BA 浓度对幼苗增殖的影响

6-BA 浓度 / (mg/L)	增殖倍数	叶色	分化状况
1.0	2.0	淡绿	幼苗粗壮、生长参差不齐、轻微褐化、后期有根长出
1.5	2.4	淡绿~浓绿	幼苗粗壮、生长旺盛、无褐化、苗后期变弱
2.0	3.2	淡绿~浓绿	幼苗粗壮、生长旺盛、轻微褐化
2.5	3.5	淡绿~浓绿	幼苗纤细、密集、无褐化、苗后期枯黄、瘦弱

表 5 生长素浓度对黄草乌小苗生根的影响

NAA 浓度 / (mg/L)	生根率 / %	平均根数	平均根长	植株长势
0	90	7	2.0	叶色浓绿、生长旺盛
0.5	93	9	2.12	叶色浓绿、生长旺盛
1.0	94	10	2.08	叶色浓绿、生长旺盛
1.5	93	8	2.0	叶色浓绿、生长旺盛
2.0	82	8	2.03	叶色浓绿、生长缓慢
2.5	81	6	2.02	叶色浓绿、生长缓慢

2.5 炼苗移栽

将具有完整根系的苗移栽到装有灭菌的蛭石、腐殖质和菜园土的花盆中,维持较高的湿度和较弱的光照,培养 30d,试管苗可达到 80%~95%的成活率。

3 结论

黄草乌茎尖和茎段都能诱导芽的产生,茎尖诱导产生的芽生长纤细,茎段诱导产生的芽生长旺盛,符合商品化生产的要求。

黄草乌的适宜培养基为:诱导培养基是 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 1.0mg/L。增殖培养基是 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.2mg/L。生根培养基是 MS + NAA 0.5~1.5mg/L。

笔者初步筛选出了较适合的培养条件,建立了黄草乌的快繁体系,能为黄草乌的植物再生及种质资源的改善提供一条有效的途径。

参考文献

[1] 杨崇仁,郝小江,王德祖,等.黄草乌的生物碱研究.化学学报,1981,39

(2):147-152.

- [2] 陈泗英.滇乌碱的结构.化学学报.1979,39(1):15.
- [3] 符华林.我国乌头属药用植物的研究概况.中药材,2004,27(2):149-152.
- [4] 李晓玉.滇乌碱的免疫调节作用.中国药理学与毒理学杂志.1987,1(2):93.
- [5] 邓廷丰,李培清.云南野生滇南黄草乌人工驯化栽培技术.农村实用技术,2001,(1):15-19.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草 3.上海:上海科学技术出版社,1999:114-119.
- [7] 李明福.滇中黄草乌资源开发及种植技术.安徽农业科学,2006,34(1):11-14.
- [8] 王惠清.中药材产销[M].成都:四川科技出版社,2004:1.
- [9] 杨秀兰,文正洪.黄草乌质量标准研究.中国民族民间医药杂志,2005,(72):54-57.
- [10] 汪丽娅,孟繁蕴,张文生,等.黄草乌原药材与土壤无机元素相关性研究.北京中医药大学学报,2005,28(3):68-71.
- [11] 汪丽娅,张文生,杜树山,等.黄草乌 HPLC 指纹图谱分析方法研究.北京中医药大学学报,2006,29(8):548-551.
- [12] 赵英永,崔秀明,戴云,等.中药草乌重金属含量.中药材,2005,28(7):537-538.