

怀地黄分生组织培养脱病毒及快速繁殖技术的研究

邵春月, 高山林*, 陈峰, 张晓霞, 任斌

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要 采用茎尖分生组织培养技术, 获得了怀地黄的脱病毒试管苗。通过基本培养基和激素配比试验, 筛选出最佳的培养基组成, 用于脱病毒苗的快速繁殖。建立了怀地黄根尖染色体鉴定的最佳条件。结果表明: 诱导丛生芽的最适培养基为: MS+6-苊基腺嘌呤(6-BA) 0.5 mg/L+萘乙酸(NAA) 0.1 mg/L+6-糠氨基嘌呤(KT) 0.05 mg/L, 技术上达到了快速繁殖规模生产的要求。诱导试管苗生根的最适培养基为: 1/2MS+吲哚乙酸(IAA) 0.05 mg/L。用电子显微镜进行了反复的病毒检测, 证明脱病毒彻底, 脱毒试管苗将作为今后提供无病毒优质种苗的种源。染色体鉴定结果表明: 怀地黄的染色体为 $2n = 2X = 56$

关键词 怀地黄; 脱病毒; 组织培养; 染色体鉴定

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2008)04-0258-04

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科多年生药用草本植物, 其新鲜块根或块根加工品入药。现代医学研究表明它有显著的抗肿瘤、降血糖、抗衰老、抗胃溃疡和保护胃粘膜作用。地黄化学成分众多, 主要含梓醇、多种氨基酸、糖、甘露醇、 β -谷甾醇及菜油甾醇等多种成分^[1]。

长期以来地黄采用无性繁殖方法, 导致病毒病十分普遍, 是造成地黄退化的主要原因^[2]。目前针对植物病毒病尚无安全有效的药物进行治疗。利用植物茎尖组织的脱毒培养, 可以成功地获得脱毒苗, 有效地去除病毒, 再通过组织培养克隆繁殖就可以获得大量脱毒优良种, 为植物大规模田间种植提供依据, 供生产上应用^[3~6]。这不仅是中药现代化的要求, 也是实施中药材 GAP 的重要措施。

本实验以地黄道地产区河南温县的怀地黄为试材, 剥取茎尖培养, 优化培养条件, 筛选出最佳的培养基组成, 有效提高繁殖系数, 大量繁殖出无病毒试管苗, 为今后向生产上示范推广提供优质无病毒种源。对根尖染色体鉴定技术进行了优化, 得到了清晰的染色体照片, 为今后进行的优良品种选育打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

怀地黄购自地黄道地药材产区河南温县。栽

培于中国药科大学实验苗圃。原植物经中国药科大学遗传育种教研室主任高山林教授鉴定为玄参科植物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 取田间长势好的怀地黄的顶芽和侧芽剥去叶片, 用洗衣粉洗去表面尘土, 自来水冲洗 30 min, 进行表面灭菌。在超净台上用 70% 酒精消毒 30 s, 再用 0.05% 的 $HgCl_2$ 溶液消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 然后将经表面灭菌处理过的芽用无菌水冲洗 4 次, 接种于 MS+BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的培养基表面进行无菌萌发。

1.2.2 脱毒苗的获得及怀地黄的病毒检测 取怀地黄无菌试管苗, 剥去较大的叶片, 在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 10 s, 然后用 2% 次氯酸钠消毒 15 min, 再用无菌水冲洗 4~5 次, 在解剖镜下剥取生长点, 接种到 MS+BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 培养基上, 诱导出再生植株。培养条件: 培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ C$, 光照强度为 1 500~2 000 lux, 光照时间为 10~16 h。

茎尖分化成苗长至 5~6 cm 高时, 采集叶片 1 g, 加入 2 倍体积 0.2 mol/L PBS 缓冲液(含 1% 巯基乙醇, pH 7.2)捣碎, 研磨, 10 000 r/min 离心 30 min 取上清液进行病毒检测^[7], 用 2% 磷钨酸负

收稿日期: 2007-12-27

修回日期: 2008-02-24

作者简介: 邵春月, 女, 汉族, 1983 年 3 月生, 黑龙江七台河人, 硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

* 通讯作者: 高山林, 电话(传真): 025-85391288, E-mail: shlingao@163.com

染色 2 min, 在电镜 (H27000 型) 下观察, 每个样品做 3 个铜网, 每个铜网至少取 20 个以上不同视野检测病毒, 并以未脱毒作为对照, 确认所含病毒的形态和特征。

1.2.3 繁殖培养基筛选试验 怀地黄于添加 6-BA 2.0 mg/L、IAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基中继代 2 次后发现试管苗虽有较多丛生芽, 但苗瘦弱, 易玻璃化, 因此对繁殖培养基进行初步筛选^[8], 以 6-BA、NAA、KT 3 种激素作为 3 个因素, 采用 L₉(3⁴) 正交试验。试验因素水平见表 1。

Tab 1 The factors and levels of orthogonal test of propagation medium of *Rehmannia glutinosa* Libosch

Levels	Factors		
	A	B	C
	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	KT(mg/L)
1	0.30	0.02	0.00
2	0.50	0.05	0.05
3	1.00	0.10	0.10

以试管苗平均生长率 [平均生长率 = (20 d 后材料重 - 接种时材料重) / 接种时材料重] 为衡量指标, 筛选出最适繁殖培养基。

1.2.4 生根培养基筛选试验 取高约 1.5 cm 带有 2 个节的无菌苗接种于添加 IAA, IBA, NAA 3 种不同生长素浓度的 1/2MS 培养基上, 培养 14 d, 记录生根率、根长、平均根数及根粗细情况。

1.2.5 怀地黄根尖染色体鉴定 于早晨 8:00~9:00 切取长为 3~5 mm 的根, 将材料在蒸馏水中冲洗 3 次, 用 0.2% 浓度的秋水仙碱溶液浸泡不同的时间 (3, 4, 5, 6 h)。取出后用蒸馏水冲洗 3 次, 于卡诺氏液中固定 2~24 h。取出, 蒸馏水洗 3 次。于 60℃, 0.2 mol/L HCl 中分别处理 10, 12, 14, 16 min。蒸馏水洗 3 次, 并置蒸馏水中低渗 30 min。切取根尖于载玻片上, 改良苯酚品红试液分别染色 20, 30, 40 min, 压片。用 “Olympus BX40” 显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 茎尖大小、成活率与脱毒效果的关系

取怀地黄无菌试管苗, 用最佳消毒方案灭菌后, 剥取长为 0.3~1.2 mm 的茎尖, 接种到启动培养基表面, 25 d 左右茎尖明显变绿并开始膨大生

长, 说明已经成活。茎尖成活率的高低与其大小关系见表 2。

Tab 2 The relativity between the diameter of shoot tip and the survival rate

Diameter of shoot tip(mm)	No. of explant inoculated	No. of survival explant	Survival rate(%)
0.3	25	8	32.0
0.6	25	12	48.0
0.9	25	14	56.0
1.2	25	19	76.0

试验表明: 茎尖大小为 0.3 mm 时成活率很低, 茎尖越小, 所含病毒越少, 脱毒也就越彻底。但过小的顶端含有细胞数目少, 能导致进一步细胞分裂分化的可能性也小, 因而难以成活。当茎尖大小为 0.3 mm 时, 细胞生长分化等受到限制, 成活率仅为 32%。但是本研究以脱毒为主要目的, 一旦获得脱毒彻底的无菌材料, 就可以通过组织培养技术进行快速繁殖, 因此认为剥取 0.3 mm 的茎尖分生组织可以取得较好的效果。此外, 茎尖成活率也与培养基的硬度有关, 过硬的培养基不利于茎尖生长。据试验, pH5.8 较软的培养基有利于茎尖的成活。另外剥取的茎尖应迅速接于培养基表面, 防止干燥失水, 成活的茎尖约经 70 d 可直接分化形成植株。

2.2 病毒检测结果

在未脱毒样品中, 观察到大量杆状烟草花叶病毒 TMV, 长 300 nm 左右, 宽 15 nm 左右, 见图 1。而有 3 个脱毒样品在所有的视野中则均未观测到烟草花叶病毒 TMV, 说明脱病毒彻底, 其余样品视野中有少量病毒, 予以淘汰。



Fig 1 Tobacco mosaic virus from leaves of *Rehmannia glutinosa* Libosch virus-infected in vitro

2.3 繁殖培养基正交试验结果

正交试验结果与分析见表 3, 4。

Tab 3 The result of propagation medium of *Rehmannia glutinosa* Libosch designed by $L_9(3^4)$ orthogonal test

No.	Factors			Buds growing rate(Xi) %	X_i^2
	A	B	C		
1	1	1	1	23.45	0.0549
2	1	2	2	26.21	0.0687
3	1	3	3	27.92	0.0780
4	2	1	2	45.72	0.2090
5	2	2	3	52.92	0.2801
6	2	3	1	40.08	0.1606
7	3	1	3	32.06	0.1028
8	3	2	1	30.95	0.0960
9	3	3	2	30.22	0.0913
K1	77.58	101.23	94.48		
K2	138.72	110.08	102.15		
K3	93.23	98.22	112.90	K = 309.53	

Tab 4 Variance analysis of propagation medium of *Rehmannia glutinosa* Libosch

Source of variance	Sum of variance squares	Degree of freedom	Variance	F value	P value
A	672.48	2	336.24	19.38	$P < 0.01$
B	25.34	2	12.67	0.73	$P > 0.1$
C	57.08	2	28.54	1.65	$P > 0.1$
E(error)	12.32	2	6.16		
Sum	69.39	4	17.35		

Note: $F_{1-0.01}(2,4) = 18.0$ $F_{1-0.05}(2,4) = 6.94$ $F_{1-0.10}(2,4) = 4.32$

从正交分析结果可以看出:3个因素对生长率的影响次序为 $A(6-BA) > C(KT) > B(NAA)$ 。其中6-BA的浓度与试管苗生长率极显著相关,9种培养基中平均生长率最高达52.92%,结合试管苗的生长状况可以确定怀地黄的最佳繁殖培养基为A2B3C2,即MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.05 mg/L用筛选得到的最佳培养基进行怀地黄试管苗继代培养,繁殖效率高(图2)。

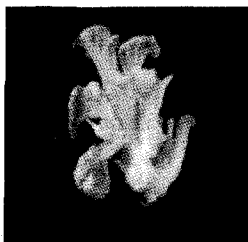


Fig 2 Crowd buds in the medium: MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.05 mg/L

2.4 生根培养基试验结果与分析

选取高约1.5 cm有2个节的健壮苗或切段,将

其接于添加不同生长素组合的1/2MS培养基上培养。14 d后,供试培养的试管苗的生根情况见表5。

Tab 5 The effects of different combinations and concentrations of phytohormone on root inducing

NO.	Factors			Average rooting No.	Average root length(cm)	Rooting rate(%)	Thickness level of roots
	IAA	NAA	IBA				
1	0.05	0.00	0.00	7.34±0.89	3.56±0.28	100.00	thicker
2	0.10	0.00	0.00	5.23±0.78	3.86±0.33	100.00	thick
3	0.30	0.00	0.00	4.57±0.69	2.82±0.32	100.00	thick
4	0.00	0.05	0.00	6.42±1.16	1.12±0.41	100.00	thick
5	0.00	0.10	0.00	5.67±0.88	1.30±0.27	100.00	thicker
6	0.00	0.00	0.10	5.13±0.85	0.98±0.40	98.00	thin
7	0.00	0.00	0.30	5.68±1.05	1.08±0.29	95.50	thin
8	0.00	0.00	0.00	3.52±0.75	0.71±0.38	93.25	thin

由表5可看出,在没有添加任何激素的1/2MS培养基上怀地黄也能生根,但试管苗的出根数少,根细且弱。添加不同浓度的IAA,NAA,IBA均能改善生根情况。其中添加IAA 0.05 mg/L与NAA 0.1 mg/L均能显著增强根的粗壮度,但添加NAA出根数少,根长较短,在实验过程中我们还发现添加了NAA的培养基中的试管苗都会长气生根,且NAA浓度越大气生根越多,影响移栽成活率。因此确定最佳的生根培养基为1/2MS+IAA 0.05 mg/L。试管苗生根情况见图3。



Fig 3 Effect of rooting in the medium:1/2 MS+IAA 0.05 mg/L

2.5 根尖染色体鉴定试验结果

从试验结果可发现在以0.2%的秋水仙碱溶液浸泡5 h的条件下中期细胞多,染色体分散较好,可以看到清晰的条状染色体。0.2 mol/L HCl 60℃下处理10 min,在敲压制片时根尖细胞不易散开,显微镜下可见细胞仍挤压在一起,而且除染色体外细胞的其他部分也不同程度的着色,影响了对染色体的观察,说明解离不够。0.2 mol/L HCl溶液60℃下处理12 min,大部分细胞分散开,染色体着色较好,分散效果较理想。0.2 mol/L HCl 60℃下处理14~16 min,大部分细胞分散开,染色体着色较好,同时染色体分散也较好,但部分细胞

破裂。根尖染色 20 min, 染色体着色较浅, 显微镜下很难分清染色体; 30 min 则染色体着色较好, 显微镜下较容易看到清晰的染色体; 40 min 会使细胞着色较深, 显微镜下分不清染色体。可见不同预处理和离析, 染色条件对地黄试管苗根尖细胞染色体的观察有着显著的影响。试验得到怀地黄冬根尖染色体鉴定的最佳条件是, 早上 8 点左右切取长约 0.5~1 cm 左右的根, 在 0.2% 的秋水仙碱溶液中浸泡 5h 后, 在无水乙醇-冰醋酸(3:1)中 4℃ 固定 2~24 h, 蒸馏水洗 3 次, 60℃ 水浴条件下 0.2 mol/L HCl 离析 12 min, 蒸馏水洗净并于其中低渗 30 min, 小心切取根尖, 置载玻片中央, 加改良苯酚品红染液一滴, 染色 30 min 后, 压片, 镜检。可清晰观察到怀地黄染色体数为 $2n = 2X = 56$ [9]。

3 讨 论

在繁殖培养基筛选过程中, 怀地黄生长旺盛且丛生芽较多, 可能该植物体内含较多的植物内源激素, 本研究用较低浓度的 6-BA 和 NAA 配比, 得到了非常好的培养效果。虽然高浓度的 6-BA 对丛生芽的诱导有利, 但若长期使用含高浓度的 6-BA 培养基, 芽生长过快, 易出现玻璃化现象。较高的激素配比使基部与培养基接触的叶片卷曲增厚并部分褐化, 随着激素浓度的降低此现象可得以改善。

怀地黄试管苗在不含生长素的 1/2MS 培养基中也能生根, 说明试管苗的内源激素也可以自发生根, 但根数少且细弱, 需要的启动天数长。加入适量的 IAA 可以增加发根数及根的粗壮度, 缩短启

动天数, 改善苗的性状提高移栽成活率。

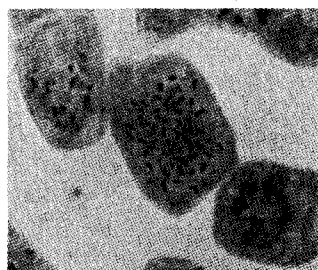


Fig 4 The rootlet chromosome ($2n = 2X = 56$) of *Rehmannia glutinosa* Libosch

根尖染色体鉴定是多倍体育种过程中的重要步骤之一, 对试管苗根尖的预处理及水解的控制对制片的效果有很大的影响。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 82.
- [2] 赵曦. 四大怀药的研究与应用 [M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 1992: 122.
- [3] 高山林. 药用植物育种的现状和展望 [J]. 世界科学技术. 中药现代化, 2001, 6: 58.
- [4] 王小刚, 高山林, 白雨, 等. 薄荷脱病毒的农艺性状和有关生理指标的测定 [J]. 药物生物技术, 2003, 10(2): 92.
- [5] 王蔚, 高山林, 刘葵, 等. 川麦冬脱病毒和组织培养技术的研究 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(4): 274.
- [6] 曾扬, 高山林, 王蔚, 等. 脱病毒生姜同源四倍体的诱导和鉴定 [J]. 药物生物技术, 2006, 13(5): 338.
- [7] 裘维蕃. 植物病毒学 [M]. 北京: 农业出版社, 159.
- [8] 于相丽. 怀地黄的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(9): 1720.
- [9] 温学森. 地黄常见种质的染色体观察 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 124.

Virus-Free Culture and Rapid-Propagation of *Rehmannia Glutinosa* Libosch

SHAO Chun-yue, GAO Shan-lin, CHEN Feng, ZHANG Xiao-xia, REN Bin

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract Virus-free materials of *Rehmannia glutinosa* Libosch were obtained from meristem culture in vitro. A series of optimization experiments for cultural medium composition and concentration of phytohormones were investigated with a view to accelerate the propagation of virus-free materials. The best condition of chromosome determination was established. The obtained results indicated that the most suitable rapid propagation media of *Rehmannia glutinosa* Libosch was MS+6-BA 0.5 mg/L+ NAA 0.1 mg/L+KT 0.05 mg/L. The optimized medium for rooting was 1/2 MS+ IAA 0.05 mg/L. These results could meet the technology requirements of rapid-propagation in large scale production. Virus-free materials were identified repeatedly under electron microscope, which could be used for rapid-propagation of large-scale production. The chromosome number of *Rehmannia glutinosa* Libosch was $2n = 2X = 56$.

Key words *Rehmannia glutinosa* Libosch, Virus-free, Tissue culture, Identification of chromosome