

川麦冬脱病毒和组织培养技术的研究

王 蔚, 高山林*, 刘 蓁, 曾 杨, 谢 燕

(中国药科大学遗传育种教研室, 南京 210038)

摘 要 采用茎尖分生组织培养技术, 获得了川麦冬的脱病毒试管苗。通过川麦冬组织培养技术的正交试验及优化筛选, 筛选出最佳的培养基组成, 用于脱病毒苗的快速繁殖。建立了川麦冬根尖染色体鉴定的最佳条件。结果表明, 川麦冬最适繁殖培养基 MS+BA(6-苧基腺嘌呤)2.0 mg/L+NAA(萘乙酸)0.5 mg/L; 川麦冬最佳诱导愈伤培养基: MS+BA1.5 mg/L+IAA(吲哚乙酸)0.1 mg/L+2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)1.0 mg/L; 通过在培养基中添加不同浓度生长素, 得到适合川麦冬的生根培养基: 1/2MS+IAA 0.5 mg/L+ABT 0.5 mg/L。染色体鉴定结果表明: 川麦冬的染色体为 $2n=68$ 。

关键词 川麦冬; 脱病毒; 组织培养; 染色体鉴定

中图分类号: Q813.1⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2006)04-0274-05

麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* 的干燥块根。具有生津润肺、养阴清热的功能。用于热病伤津, 心烦口渴等症^[1]。现代药理研究表明, 皂甙是麦冬中的活性成分之一, 麦冬总皂甙能改善心肌收缩力, 对心肌细胞具有保护作用, 能抗实验性心律失常, 提高小鼠的耐缺氧能力; 麦冬中的多糖成分有降血糖和稳定血糖的作用; 另外, 麦冬还有提高免疫力, 改善胃肠运动机能, 抗肿瘤等方面的作用。麦冬在我国野生资源丰富, 已有悠久的栽培与研究历史, 具有很高的药用价值。^[2]

长期以来麦冬采用无性繁殖方法, 病毒病十分普遍, 品种严重退化, 直接影响了麦冬的产量和质量, 因此脱病毒和良种选育工作势在必行。由于病毒在植株体内分布并不均匀, 顶端分生组织一般无病毒或数量极少, 因此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苗供生产上应用^[3]。本实验以麦冬道地产区四川绵阳的川麦冬为试材, 剥取茎尖, 离体培养, 再通过培养技术的优化, 筛选出最佳的培养基组成, 大大提高繁殖系数。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 实验材料

实验于 2004.9~2005.6 月进行。供试材料川麦冬购自四川绵阳三台川麦冬道地药材产区。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川麦冬 (*Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.)。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌材料的获得 选取川麦冬新生嫩芽, 肥皂水清洗 15 min, 用流水冲洗 0.5 h 左右。在超净工作台上将材料置于 75% 酒精中浸泡 30 s, 再放入 0.1% 升汞溶液中 (加 3~5 滴吐温-20) 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种于 MS+BA(6-苧基腺嘌呤)2.0 mg/L+IAA(吲哚乙酸)0.2 mg/L 培养基中无菌萌发。

1.2.2 脱毒苗的获得以及川麦冬的病毒检测 取川麦冬无菌试管苗, 剥去较大的叶片, 用自来水冲洗 15~20 min, 晾干后在超净工作台上用 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+BA2.0 mg/L+IAA0.2 mg/L 培养基上, 诱导出生长点。培养条件: 培养温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照强度为 1500~2000 lx, 光照时间为 10~16 h。

茎尖分化成苗, 长至 5~6 cm 高, 采集叶片进

收稿日期: 2005-10-17 修回日期: 2006-02-28

作者简介: 王蔚, 女, 1979 年 6 月生, 河南洛阳人, 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

行病毒检测^[4],用2%磷钨酸负染色2 min,在电镜(H-7 000 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 扩大繁殖培养基优化实验 根据文献报道,川麦冬在培养基为MS+BA 1.5 mg/L+NAA(萘乙酸)0.5 mg/L上的丛生芽诱导率最高^[5]。以此培养基为基础,对激素水平进行小范围的调整,对培养基进一步优化。

1.2.4 诱导愈伤培养基筛选实验 以6-卞基腺嘌呤(6-BA)、吲哚乙酸(IAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)3种激素作为3个因素,分别设计3个水平做正交试验,以愈伤诱导率为衡量指标,综合考虑各培养基中愈伤的生长情况,筛选出适合川麦冬愈伤生长的培养基。试验设计见表1。

Tab 1 The factors and levels of orthogonal test of the medium for inducing callus of *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl

Levels	Factors		
	A	B	C
	6-BA(mg/L)	IAA(mg/L)	2,4-D(mg/L)
1	1.0	0	0
2	1.5	0.1	1.0
3	2.0	0.2	2.0

1.2.5 丛生芽生根试验 分别1/2MS培养基中添加吲哚乙酸(IAA)(浓度为0~0.5 mg/L)和生根粉(ABT)(浓度为0~0.5 mg/L)。记录生根率,根长等指标。

1.2.6 试管苗移栽试验 分别在不同的月份和天气进行川麦冬试管苗的移栽试验。试管苗出瓶后练苗3d,移栽至苗床培养,每天早晚覆膜,每隔两小时喷雾10 min,培育3~4 w后再移栽至大田,早晚各浇水一次,1 w后计算成活率。

1.2.7 川麦冬根尖染色体鉴定 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,用不同浓度的秋水仙碱溶液(0.1%,0.2%,0.3%)浸泡不同的时间(5 h,6 h,7 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5 min,10 min,15 min。蒸馏水洗3次,并置蒸馏水中后低渗30 min。切取根尖于载玻片上,改良苯酚品红试液染色30 min,压片。用“Olympus BX40”显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 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12 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 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl virus-infected in vitro

2.2 丛生芽快速繁殖培养基优化试验结果和分析
优化试验结果见表2。

Tab 2 The results of the test of optimizing multiplication medium of *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl

No.	Concentration of phytohormone(mg/L)	Fresh weight of cluster buds(g)	Fresh weight of cluster buds(30 days) later(g)	Growing rate cluster buds(times)
1	MS+BA1.5+NAA0.5	5.74	28.22	3.92
2	MS+BA2.0+NAA0.5	6.05	36.57	5.04
3	MS+BA2.5+NAA0.5	5.42	24.35	3.49
4	MS+BA3.0+NAA0.5	6.24	27.48	3.40

从表 2 优化试验结果可以看出,开始丛生芽生长率随着 6-BA 浓度的增加而逐步增高,在 6-BA 的浓度为 2.0 mg/L 时达到最高,6-BA 的浓度继续升高,则生长率有所下降。在四种培养基中丛生芽增殖系数差异不大,因此采用 2 号培养

基作为川麦冬快速繁殖培养基即可使繁殖材料的繁殖系数尽可能大,又能保证获得生长健壮的试管苗。

2.3 诱导愈伤培养基筛选实验结果和分析
培养基筛选实验结果见表 3。

Tab 3 The results of filtration of orthogonal test for inducing callus of callus medium of *Ophiopogon*

No.	Factor			inducing rate (Xi)	$X_{\bar{i}}$
	A	B	C		
1	1	1	1	0	0
2	1	2	2	0.46	0.2116
3	1	3	3	0.18	0.0324
4	2	1	2	0.44	0.1936
5	2	2	3	0.38	0.1444
6	2	3	1	0.24	0.0576
7	3	1	3	0.38	0.1444
8	3	2	1	0.08	0.0064
9	3	3	2	0.44	0.1764
K_1	$K_1^A=0.64$	$K_1^B=0.82$	$K_1^C=0.32$	$K=2.60$	$W=0.9668U$
K_2	$K_2^A=1.06$	$K_2^B=0.92$	$K_2^C=1.34$		
K_3	$K_3^A=0.90$	$K_3^B=0.86$	$K_3^C=0.94$		
U	$U_A=0.7811$	$U_B=0.7528$	$U_C=0.9272$	$P=0.7511$	
Q	$Q_A=0.0300$	$Q_B=0.0017$	$Q_C=0.1761$		

正交分析结果:2,4-D 的浓度与愈伤诱导率有显著相关性,而 IAA 对川麦冬愈伤组织诱导率影响不大。2,4-D 的浓度在 1.0 mg/L 时最有利于愈伤组织的生长。对诱导愈伤的主次因素排序为: C,A,B。最佳培养基为 $A_2B_2C_2$,即 MS+BA1.5 mg/L+IAA0.1 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L。

2.4 丛生芽生根实验结果和分析

丛生芽生根实验结果见表 4,5。

川麦冬试管苗在未添加生长激素的 MS, 1/2MS, B_5 三种不同的培养基中均能生根,但以 1/

2MS 培养基生根效果为最佳。为了考察 IAA 和 ABT 两种激素对川麦冬试管苗生根的效果,设计 6 种培养基进行生根试验,两种激素的配比见表 4。试验结果表明,在 1/2MS 培养基中适当添加低浓度的 IAA 能促进试管苗生根,并且有利于初生根的生长;在 1/2MS 培养基中单独添加 ABT,效果不佳;两种生长激素配合使用,生根效果优于两种激素单独使用。IAA(0.5 mg/L)和 ABT(0.5 mg/L)配合使用时,培养 10d 的试管苗生根率在 95%以上,初生根健壮,生长 1w 左右根长可达 3~5cm。

Tab 4 The proportion of IAA and ABT in the culture medium for growing root of *Ophiopogon japonicus*(L. f.)Ker-Gawl

Concentration of phytohormone(mg/ml)	1	2	3	4	5	6
IAA	0.2	0.2	0	0.5	0.5	0
ABT	0	0.2	0.2	0.5	0	0.5

Tab 5 The results of optimized culture medium for growing root of *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl

No.	No. of cultured buds	Root No. cultured 30 for day	Growing rate of root(%)	Average rooting No. ($\bar{x} \pm s$)	Average root length(cm) ($\bar{x} \pm s$)
1	20	77	100	3.85 $\pm$ 1.36	5.7 $\pm$ 0.67
2	20	103	100	5.15 $\pm$ 1.04	5.43 $\pm$ 0.61
3	20	62	100	3.10 $\pm$ 1.28	5.82 $\pm$ 1
4	20	146	100	7.30 $\pm$ 1.62	5.79 $\pm$ 1.04
5	20	128	100	6.40 $\pm$ 2.74	5.5 $\pm$ 0.85
6	20	80	100	4.00 $\pm$ 2.16	6.35 $\pm$ 0.53

2.5 试管苗移栽试验结果和分析

分别在3,6,9,12月进行试管苗移栽苗床试验,3,6,9月的移栽成活率均在85%以上,12月移栽成活率较低。移栽最佳时间是3,4月份左右,选择天气温暖的阴天移栽成活率最高(可达98%以上)。而在苗床培育一个月的试管苗生长旺盛,对移栽大田的条件要求不高,移栽大田极易成活,移栽成活率可达100%。

2.6 川麦冬根尖染色体鉴定结果和分析

用0.2%秋水仙碱浓缩5 h,6 h,7 h和用0.3%秋水仙碱浓缩5 h,6 h后的观察效果都很好,其中以0.2%秋水仙碱浸泡6 h的效果最好,观察得到的染色体缩短长度适宜,易于记数。用0.2 mol/L HCL处理10 min,大部分细胞分散开,染色体分散较好。试验得到川麦冬根尖染色体鉴定的最佳条件是:根尖用0.2%秋水仙碱溶液浸泡6 h,固定液固定2~24 h后,依次用100%,75%的乙醇和蒸馏水冲洗根尖,然后用0.2 mol/L HCL处理10 min,蒸馏水后低渗30 min,改良苯酚品红染色,压片。可清晰的观察到川麦冬染色体数为:2n=68(图2)。



Fig 2 The rootlet chromosome(2n=68) of *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.

3 讨 论

组织培养中,激素的种类、浓度和对比对实验结果有相当大的影响。本实验采用正交设计试验方式,能够在传统的单因子比较方法的基础上容纳更多的因素和水平,同时大大减少试验次数,提高准确率。试验结果表明,2,4-D的浓度与愈伤诱导率有显著相关性,而IAA对川麦冬愈伤组织诱导率影响不大。

在1/2MS培养基中适当添加低浓度的IAA能促进试管苗生根,并且有利于初生根的生长;在1/2MS培养基中单独添加ABT,效果不佳;两种生长激素配合使用,生根效果优于两种激素单独使用。

川麦冬较耐寒,一年四季移栽成活率都较高,但川麦冬的发根期只有两个,一个是7月份之前,一个是9-11月之间。所以最好不要在冬季移栽川麦冬。

麦冬细胞遗传学的研究及其有限,其细胞染色体数一直颇有争议^[6]。本实验通过对川麦冬染色体鉴定进行实验条件的优化,得出了川麦冬染色体数目为2n=68。

本研究为川麦冬生产中遇到的种质保存和病毒感染等问题提供了一条解决途径,建立了较为完整的川麦冬组织培养体系,同时也为川麦冬优良品种的选育工作打下了一定的基础。

参考文献

- [1] 余伯阳,徐国钧. 中药麦冬的资源利用研究[J]. 中草药, 1995,26(4):205.
- [2] 郭海林,刘建秀,杭悦宇. 麦冬研究进展[J]. 中国野生植物资源,2003,22(3):1.
- [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.

源与环境学报, 2000, 9(4): 27.

[4] 裘维蕃. 植物病毒学[M]. 北京: 农业出版社, 159.

[6] 梁国鲁, 杨美全, 阎勇. 川麦冬核型分析[J]. 西南农业大学学

[5] 莫肖蓉, 朱诚, 任晓米. 金边阔叶麦冬的组织培养[J]. 植物资

报, 1998, 20(4): 307.

Studies on Viru-free Culture and Chromosome Identification Technique of *Ophiopogon Japonicus* (L. f.) Ker-Gawl

WANG Wei, GAO Shan-lin*, LIU Zhen, ZENG Yang, XIE Yan

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038 China)

Abstract Virus-free materials of *Ophiopogon japonicus* were obtained from meristem culture in vitro. A series of optimization experiments for the composition of cultural medium and concentration of phyto-hormones were investigated with a view to accelerate the propagation of virus-free materials. The most suitable media of *Ophiopogon japonicus* for rapid-propagation was established and optimized by orthogonal test in tissue culture process. The obtained results indicated that the most suitable rapid-propagation media of *Ophiopogon japonicus* is MS+BA2.0 mg/L + NAA0.5 mg/L. The best inducing medium for callus is MS+BA1.5 mg/L+IAA0.1 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L. and its rooting media is 1/2MS+IAA 0.5 mg/L+ABT 0.5 mg/L. The best condition of chromosome determination was established. The chromosome number of *Ophiopogon japonicus* was $2n=68$. The above research laid the foundation for preserving the plant resource and breeding excellent lines of *Ophiopogon japonicus*.

Key words *Ophiopogon japonicus*, Virus-free, Tissue culture, Identification of chromosome

《中草药》杂志 2007 年征订启事

《中草药》杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级期刊, 月刊, 国内外公开发行。

本刊创刊于 1970 年 1 月, 1992 年荣获首届全国优秀科技期刊评比一等奖; 1997 年荣获第二届全国优秀科技期刊评比二等奖; 2001 年荣获中国期刊方阵“双奖期刊”; 2003 年 1 月荣获第二届国家期刊奖; 2005 年 1 月荣获第三届国家期刊奖提名奖; 2005 年 12 月荣获“第四届中国百种杰出学术期刊”。北京高校图书馆期刊工作研究会、北京大学图书馆 1992 年在我国首次调研编制的《中文核心期刊要目总览》中, 本刊被确认为全国中文核心期刊, 1996、2000、2004 年再次被确认。根据《中国科学引文数据库》连续 8 年来的统计数据表明, 在中国科技期刊总被引频次排行榜中, 本刊一直名列前 18 名, 中药学类第 1 名。多年来一直入选“CA 千刊表”, 并被俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《国际药学文摘》(IPA)、美国《医学索引》(IM/MEDLINE)、荷兰《医学文摘》(EMBASE)、波兰《哥白尼索引》(IC)等国际著名检索系统收录。

本刊主要报道中草药化学成分; 药剂工艺、生药炮制、产品质量、检验方法; 药理实验和临床观察; 药用动、植物的饲养、栽培、药材资源调查等方面的研究论文, 并辟有中药现代化论坛、综述、短文、新产品、企业介绍、学术动态和信息等栏目。科研论文附英文摘要刊登。承蒙广大作者、读者的厚爱和大力支持, 本刊稿源十分丰富。为了缩短出版周期, 增加信息量, 本刊由 A4 开本每期 120 页扩版为 160 页, 定价 19.80 元。国内邮发代号: 6—77, 国外代号: M221。请到当地邮局订阅。

欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者订阅, 欢迎与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编: 300193

电话: (022) 27474913 23006821 传真: (022) 23006821

电子信箱: zcyzjb@tjipr.com; zcyzjb@sina.com 网址: www. tjipr. com