

地黄优良品种‘85-5’脱毒苗的快速繁殖研究

温学森¹, 霍德兰¹, 杨世林², 马小军², 李先恩², 郑俊华^{3*}

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;
3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 探索‘85-5’脱毒苗的快速繁殖技术。方法 将脱毒苗接种在不同培养基(单位:mg/L)(1. MS+ BA 0.5; 2. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02; 3. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02+ GA₃ 0.1; 4. 1/2 MS+ BA 0.1; 5. 1/2 MS+ BA 0.1+ GA₃ 0.1; 6. 1/2 MS+ GA₃ 0.1)上, 30 d后统计新生叶片数、根数以及苗高等。然后选用2号培养基, 在不同的培养条件下培养, 同上记录有关数据。结果 在1、2和3号培养基上, 具茎尖苗主茎发育良好, 基部具1~3个腋芽; 无茎尖苗腋芽发育, 主芽长0.5~1.5 cm。4、5和6号培养基上脱毒苗细弱, 叶少根多。在相同光照条件下, 28℃时, 各项测量值均显著高于23℃时的值; 在相同温度下, 低光照培养, 叶小苗高, 强光则相反。此外, 还发现BA和GA₃之间存在拮抗作用。结论 在28℃, 1 000~2 000 lx培养条件下, 采用2号培养基适于‘85-5’脱毒苗的快速繁殖。

关键词: 地黄; 脱毒苗; 快速繁殖; 拮抗作用

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)05-0452-04

Multiplication of virus-free seedlings of *Rehmannia glutinosa* CV. 85-5 *in vitro*WEN Xue-sen¹, HUO De-lan¹, YANG Shi-lin², MA Xiao-jun², LI Xian-en², ZHENG Jun-hua³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan Shandong 250012, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To develop a method of multiplying virus-free clonal seedlings of CV. 85-5 of *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey. **Methods** The leaf-cut segments with or without tips of plantlets were grown in different media (mg/L) (1. MS+ BA 0.5; 2. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02; 3. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02+ GA₃ 0.1; 4. 1/2 MS+ BA 0.1; 5. 1/2 MS+ BA 0.1+ GA₃ 0.1; 6. 1/2 MS+ GA₃ 0.1) to select a suitable medium, and the height and the numbers of newly formed leaves and roots were recorded 30 days later. To screen out a favorable condition, similar segments were transferred to No. 2 medium at different temperatures in different illuminations, and the height together with the leaf number and the fresh weight of the plantlets was recorded. **Results** In the former three media, the segments with tips were flourishing and one to three axillary buds were formed at its basal stem; while in those without tips almost every axillary bud developed with the main tip length 0.5~1.5 cm. In the later three media, the elongation of the segments was usually overstimulated, and the slim plantlets with fewer leaves and more roots formed. When the segments cultured in No. 2 medium, all records at 28℃ were higher than those at 23℃ in the same illuminations. But the leaf size and the height of the plantlets were inversely proportional to the intensity of illumination at the same temperature. In addition, antagonism between BA and GA₃ was found. **Conclusion** No. 2 medium is more suitable for the multiplication of the virus-free seedlings of 85-5 when cultured at 28℃ in the illumination of 1 000~2 000 lx.

Key words: *Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et Mey.; virus-free seedling; multiplication; antagonism

地黄为常用中药材, 具有悠久的栽培历史^[1]。产地药农筛选出了许多优良品种。我们在进行地黄

种质资源的收集和整理过程中, 发现每个品种都表现出不同程度的病毒病症状。

* 收稿日期: 2001-08-28

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39930220)

作者简介: 温学森(1965-), 男, 山东大学药学院副教授, 现在北京大学药学院在职攻读博士学位, 主要从事药用植物新品种培育和病害防治工作。E-mail: xswen@263.net

地黄病毒病由来已久,其对地黄的产量和质量有严重影响^[2]。目前针对植物病毒病尚无安全有效的药物进行防治,实现脱毒苗的工厂化生产是中药现代化的要求,也是实施中药材 GAP 的重要措施。前人曾就地黄的组织培养和植株再生进行了多方面的探索^[3~7],并进行了茎尖培养研究^[8~12]。“85-5”是目前生产上的主栽品种之一。我们在建立了“85-5”脱毒苗的基础上,对其快速繁殖技术进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料:本研究所用品种“85-5”为河南省温县农业科学研究所王乾璐高级农艺师培育并惠赠。通过茎尖培养和病毒检验,证明已经脱除病毒。所用材料均来自一个茎尖。所用试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 适宜培养基的筛选:本研究设置 6 种培养基:1. MS+ BA 0.5 (单位为 mg/L,下同); 2. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02; 3. MS+ BA 0.5+ NAA 0.02+ GA₃ 0.1; 4. 1/2MS+ BA 0.1; 5. 1/2MS+ BA 0.1+ GA₃ 0.1; 6. 1/2MS+ GA₃ 0.1。取在茎尖培养基上继代繁殖的脱毒苗(高 4~5 cm),去掉展开的叶片,分为具茎尖和不具茎尖两部分,接种时,两者相间排列,应用 100 mL 锥形瓶,每瓶分别接种 7 棵,3 个重复。培养条件为 23 °C, 1 500 lx, 12 h/d。

30 d 后观察记录新生叶片数,苗高和生根数;无茎尖切段记录苗重和主要腋芽长度。采用 SPSS 10.0 for windows 进行统计分析。

1.2.2 培养条件的筛选:选用 2 号培养基,按上述

方法处理和接种脱毒苗。培养条件设置两个温度(23 °C, 28 °C),分别由两台 LRH-250-G 型光照培养箱(广东省医疗器械厂)实现;3 种光照(1 000, 2 000 和 3 000 lx),由相同的外接光源(PHILIPS TLE 32W/54 型环型荧光灯)提供,12 h/d。30 d 后记录新生叶片数、苗高和苗重;无茎尖切段记录同上。

2 结果

2.1 适宜培养基的筛选:当脱毒苗生长 30 d 后,发现 1, 2, 3 号培养基中,具茎尖的脱毒苗粗壮,新生叶片开展,叶片排列均匀,基部具 1~3 个腋芽,无或有少数不定根,脱毒苗生长良好。1 号培养基中根较细长,2 号培养基中,苗较高,根粗短,发育成小地黄;3 号培养基中的脱毒苗生根少,较矮,叶较密。无茎尖者,腋芽发育良好,或形成丛生芽,主芽长 0.5~1.5 cm,基部无或有少数不定根。在 4, 5 及 6 号培养基中,具茎尖苗细弱,叶片较小,根较多;无茎尖者,腋芽发育良好,但未见丛生芽形成。

具茎尖脱毒苗的高度、新生叶片数和不定根数见表 1。经方差齐性 Levene 检验,苗高和新生叶片数方差齐,采用 LSD 法进行方差分析;不定根数方差不齐,选用 Tamhane's T2 法检验。培养基 1, 2, 3 之间各项差异不显著,其它结果如表 2。从表 2 可见,1 和 2 号培养基与 4, 5, 6 在叶数上差异显著,6 号培养基与其它培养基之间在苗高和根数上差异极显著或显著;4 号在苗高上与其它培养基差异极显著或显著。

表 1 不同培养基中具茎尖脱毒苗的高度、叶片数和根数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 21$)

序 号	培养基 (mg/L)	苗高 (cm)	叶片数	根数*
1	MS+ BA 0.5	3.1±0.4	10.9±0.7	1.4±0.7
2	MS+ BA 0.5+ NAA 0.02	3.3±0.3	11.1±0.7	1.1±0.3
3	MS+ BA 0.5+ NAA 0.02+ GA ₃ 0.1	2.6±0.4	10.1±0.8	0.3±0.2
4	1/2MS+ BA 0.1	5.1±0.4	8.9±0.3	11.6±2.0
5	1/2MS+ BA 0.1+ GA ₃ 0.1	3.6±0.4	8.4±0.7	3.8±1.2
6	1/2MS+ GA ₃ 0.1	8.0±0.5	8.7±0.5	19.0±0.7

* 根数超过 20 条者记为 20 条

表 2 不同培养基中具茎尖脱毒苗的高度、叶片数和根数的差异显著性比较

培养基 编号	1			2			3		4		5	
	L	H	R	L	H	R	H	R	H	R	H	R
4	*	*	*	*	*	*	*	*				
5	*			*					*			
6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

L: 代表叶数 H: 代表苗高 R: 代表根数 行与列中培养基比较: * $P < 0.05$; * * $P < 0.01$

2.2 温度和光照对脱毒苗生长的影响:脱毒苗在 MS+ BA 0.5+ NAA 0.02 中生长 30 d 后观察发现,不同的温度和光照对其影响很大,主要表现在苗

高、叶片大小等方面。在相同温度下,低光照培养,叶片较小,植株较高;强光照则相反。

具茎尖的脱毒苗保持较强的顶端优势,仅基部

1~3 个叶腋中形成腋芽。其苗重、苗高和叶片数 3 个测量值见表 3 及图 1。另外, 32 ℃ 时, 多数不定根呈小地黄状, 而 28 ℃ 多数细长, 膨大不明显。

经过差异显著性分析发现, 3 项测量值在不同温度间差异极显著。在相同温度下, 不同光照之间, 叶片数差异不显著; 而苗重除在 23 ℃ 时 2 000 和

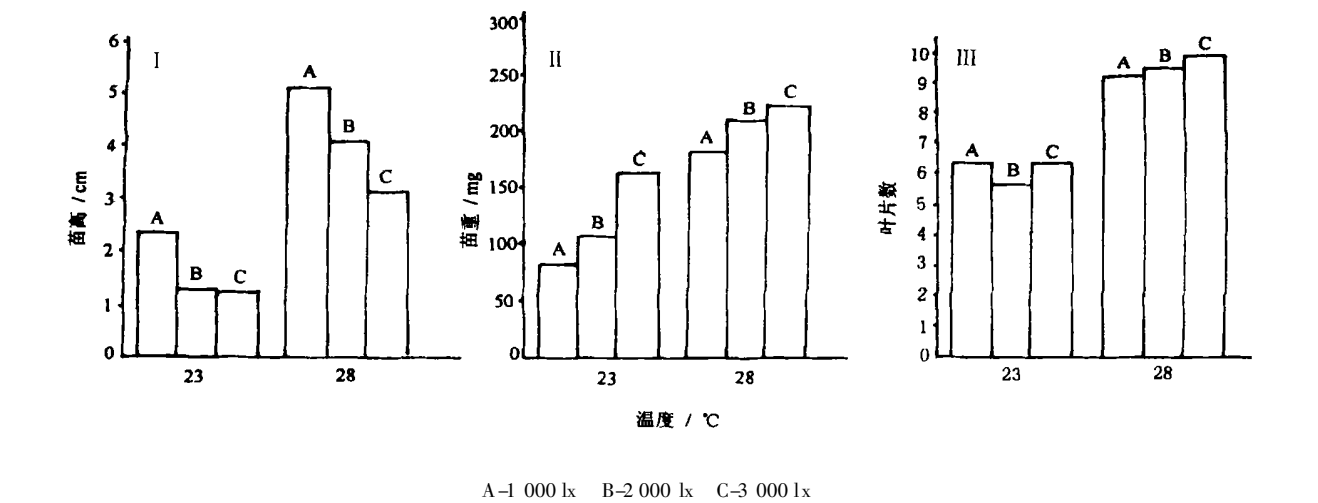


图 1 不同培养条件下具茎尖苗的苗高、苗重、叶片数统计图

3 000 lx 之间差异不显著外, 其余各处理之间的差异均达极显著或显著水平 (如表 4)。另外, 在 23 ℃ 条件下, 1 000 lx 光照处理与 2 000 和 3 000 lx 之间苗高差异达极显著水平; 在 28 ℃ 条件下, 1 000 与 3 000 lx 之间差异极显著。

LSD 检验, 1 000 与 2 000 lx 光照处理之间的差异均达显著水平, 说明 2 000 lx 光照对无茎尖苗的生长更为有利。

表 3 不同培养条件下具茎尖脱毒苗的高度、重量和叶片数($\bar{x} \pm s$, $n = 21$)

温度(℃)	光照(lx)	苗高(cm)	苗重 (cm)	叶数
23	1 000	2.4±0.1	81.6±4.0	6.3±0.2
	2 000	1.2±0.1	107.1±11.3	5.7±0.3
	3 000	1.1±0.1	162.1±15.5	6.4±0.3
28	1 000	5.1±0.2	181.4±20.4	9.2±0.2
	2 000	4.0±0.2	206.4±14.0	9.5±0.4
	3 000	3.1±0.1	223.9±20.8	10.0±0.4

表 5 不同培养条件下茎尖苗的主芽长度和苗重

温度(℃)	光照 (lx)	芽长 (cm)	苗重 (mg)
23	1 000	1.8±0.1	95.0±9.3
	2 000	1.3±0.1	84.4±13.3
	3 000	1.1±0.1	101.9±11.9
28	1 000	2.7±0.1	212.2±32.9
	2 000	3.7±0.2	449.9±84.8
	3 000	3.2±0.2	281.4±38.3

表 4 不同培养条件下地黄具茎尖脱毒苗的高度、重量和叶片数差异显著性比较

光照 (lx)	温度(℃)	苗重(mg)	苗高 (cm)	叶片数
1 000~2 000	23	△	**	△
	28	△	**	△
1 000~3 000	23	**	**	△
	28	△	**	△
2 000~3 000	23	**	△	△
	28	△	*	△

不同光照条件相比: △ $P > 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

无茎尖苗腋芽发育良好, 或形成丛生芽, 其苗重和主芽长度如表 5。从表 5 可见, 高温明显促进无茎尖苗的生长。23 ℃ 时, 苗重方差齐, 经 LSD 检验, 不同光照之间差异不显著, 主芽长度方差齐, 经 Tamhane's T_2 检验, 1 000 lx 光照处理分别与 2 000 和 3 000 lx 的差异达显著和极显著水平。28 ℃ 时, 丛生苗较多, 苗重和苗高分别经 Tamhane's T_2 和

3 讨论及小结

3.1 适宜 ‘85-5’ 快速繁殖的培养基: 针对试管苗的快速繁殖, 一般有两种策略。一是采用高浓度的细胞分裂素诱导丛生苗^[12]; 二是培养单茎苗, 然后切段扩大繁殖。前者繁殖系数较大, 但试管苗生长慢, 易于畸形, 有发生变异的可能; 后者采用激素浓度较低, 试管苗质量高, 生产成本低, 操作方便, 适于工厂生产, 因此目前生产上多采用这一方法。

本研究在初步确定 MS+ BA 0.5 为较好培养基的基础上, 经过严格的试验设计和操作, 并对观测数值进行了统计学处理。结果表明, MS+ BA 0.5 + NAA 0.02 更适于 ‘85-5’ 的快速繁殖。此外, 我们试图应用 1/2 MS 代替 MS 以降低生产成本, 但其脱毒苗细弱, 新生叶片数较少, 应用价值不大。

地黄正常的生长情况下, 呈莲座状, 故在进行地黄的快速繁殖研究时, 易于想到附加 GA₃ 使脱毒苗长高^[5~10], 但我们的试验结果正好相反。在相同的条件下, 附加 GA₃ 后, 脱毒苗更矮, 生根数减少。如 3

号培养基与 2 号, 5 号与 4 号相比。这种结果与 GA_3 本身无关, 如在 6 号培养基中, 脱毒苗高而根多。这说明 BA 与 GA_3 合用有拮抗作用。Shoyama 等也曾观察到相似的结果^[12]。其作用机制有待进一步研究。

3.2 适宜‘85-5’快速繁殖的培养条件: 温度和光照是影响试管苗生长和发育的两大关键因素, 同时也是生产成本的主要构成成分。本研究通过设置不同的温度和光照, 发现苗重随光照强度的增加而增加, 苗高则有相反的趋势, 如图 1-I, II。高强度光照在抑制脱毒苗长高的同时, 却使叶片增大, 这是苗重随光强增加的主要原因。叶片数在不同光照条件下虽有区别, 但差异不显著, 而不同温度处理, 叶片数差异显著, 如图 1-III。

脱毒苗高可使操作方便, 叶片多则提高繁殖效率, 而叶片增大无生产意义。因此, 在地黄脱毒苗快速繁殖时, 可采取温度 28 °C 左右, 光照以 1 000~2 000 lx 为好。生产中可根据具体情况适当调节。

另外, 本研究为了方便观察, 接种时将叶片去掉, 在日常培养中, 相同条件下, 具叶片的茎段生长速度明显快于去叶片者。对于无茎尖苗, 由于无顶芽的抑制作用, 常形成丛生芽, 接种时插入培养基的长度对其发育影响较大, 插入深者, 接触培养基的芽生长迅速, 插入浅者则相反。因此对本实验结果有一定影响。

3.3 小地黄形成的启示: 本研究结果表明, 在培养

基 MS+ BA 0.5 + NAA 0.02 上, 23 °C 时, 不定根膨大成小地黄状, 而 28 °C 时膨大不明显。这与我们在生产中观察到的结果相似, 即晚秋时节, 地黄的膨大速度最快。此外, 在 MS+ BA 0.5 中, 不定根多数不膨大, 这说明在块根形成的过程中, 可能有生长素类物质的参与。

参考文献:

- [1] 温学森, 李允尧, 陈沪宁. 地黄栽培研究进展[J]. 中药材, 2000, 23 (7): 427-429.
- [2] 温学森, 李先恩, 杨世林. 地黄病毒及其亟待解决的问题[J]. 中草药, 2001, 32 (7): 662-664.
- [3] 吴美芬, 陈伟东. 怀地黄块根、茎的组织培养及植株再生[J]. 植物学通讯, 1986, (2): 41.
- [4] 杨丽军, 许智宏. 不同来源的怀地黄叶外植体在培养中植株再生的差异[J]. 植物生理学通讯, 1985, (4): 38.
- [5] 李明军, 张嘉宝, 刘 萍. 怀地黄离体培养再生植株及其生长调控[J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 1996, 24 (4): 60-63.
- [6] Matsumoto M., Shoyama Y., Nishioka I., *et al.* Constituents of regenerated shoot and cultured root tissue of *Rehmannia glutinosa* [J]. Phytochemistry, 1989, 28 (9): 2331-2332.
- [7] 蒋立昶, 毛文岳, 余椿生, 等. 怀地黄愈伤组织的培养和植株再生[J]. 中草药, 1979, (10): 48-64.
- [8] 毛文岳, 蒋立昶, 李效刚, 等. 怀地黄组织培养及其在育种和栽培中的应用[A]. 中国药学会庆祝建国 80 周年学术讨论会论文集[C]. 中国药学会, 1987, 015-A-2.
- [9] 毛文岳, 余椿生, 刘清琪, 等. 怀地黄茎尖培养的研究[J]. 植物学通报, 1983, (1): 44-46.
- [10] 薛建平, 张爱民, 李明军, 等. 怀地黄茎尖培养和植株再生技术的研究[J]. 新乡医学院学报, 2000, 17 (1): 18-20.
- [11] Hatano M., Nakai R., Kawanishi F., *et al.* Genetic diagnosis of *Rehmannia* species micropropagated by tip tissue culture and an F1 hybrid by RAPD analysis [J]. Plant Breeding, 1997, 116: 589-591.
- [12] Shoyama Y., Nagano M., Nishioka I. Clonal multiplication of *Rehmannia glutinosa* [J]. Planta Med, 1983, 48: 124-128.

桔梗不同种质的比较研究 ——桔梗的杂交及花色、种色的新类型与分离

魏建和, 杨世林, 李先恩, 徐昭玺, 程惠珍*

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 目的 探索桔梗种质遗传基础, 培育桔梗新品种。方法 不同桔梗种质杂交后观察。结果 桔梗人工授粉的合适时期为花开放、柱头裂开, 去雄后 5~6 d。发现了桔梗新的花色类型—粉花型。在紫花 (♀) × 白花 (♂) 和白花 (♀) × 粉花 (♂) 两个杂交组合的当代种子 (F_0) 发现新颜色类型种子—黄绿色、灰绿色种子及杂色种子 (颜色嵌合), 而且在一杂交果实内有不同颜色种子。结论 桔梗花色和种色存在新的变异与分离, 花色和种色有一定的相关性。种子颜色分离没有规律性比例关系, 其分离与遗传不符合种皮由珠被形成的一般规律, 较复杂。其自身遗传机制及和花色遗传的相互关系, 以及不同花色类型之间的遗传关系尚需进一步的研究。

关键词: 桔梗; 杂交; 花色; 种色; 新类型

* 收稿日期: 2001-08-24

基金项目: 科技部基础性工作项目 (1999-2004); 国家中药材生产扶持资金 (1997-1999)

作者简介: 魏建和 (1970-), 男, 福建建阳人, 助研, 在读硕士, 主要从事药材野变家、种质资源、新品种选育、种子标准化和药材市场的研究, 目前主持北京市自然科学基金、中药材生产扶持资金项目 3 项, 参加国家自然科学基金重点项目和北京市科技项目等的研究。