

丹参脱病毒及组培快繁技术研究

温春秀¹, 谢晓亮¹, 吴志明¹, 田伟¹, 方阵^{2*}

(1. 河北省农林科学院 药用植物研究中心, 河北 石家庄 050051; 2. 三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029)

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 为唇形科鼠尾草属多年生草本药用植物, 为常用大宗中药材, 主治心血管系统疾病, 具有活血祛瘀、消肿止痛、养血安神的功能^[1]。近年来研究表明, 丹参可有效地抑制体外肿瘤细胞的增殖, 能高效拮抗乙肝病毒核心抗原(HBeAg), 有较好的抗艾滋病病毒(HIV)作用^[2]。一系列对重大疾病有疗效的丹参新药的研制开发, 致使丹参用量不断增加, 种植面积不断扩大, 已成为国际市场重要的药材之一。前期研究发现大田种植丹参, 普遍感染黄瓜花叶病毒^[3], 该病田间发病率高, 有些田块高达 60% 以上, 引起植株退化, 表现为卷叶、皱缩、黄化、脉间失绿、矮化等典型症状, 感病植株根系变小, 严重影响了丹参的产量和品质, 为此开展了丹参脱病毒技术研究。

1 材料

YS—13000 超净工作台(上海苏净集团安泰空气技术有限公司), HWY200 恒温摇床(上海智诚分析仪器有限公司), ZRX—258D 光照培养箱(杭州钱江仪器设备有限公司), LDZX—40BI 自动消毒锅(上海申安医疗器械厂), 3KW18 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), XTB—1 体视显微镜和 MB—酶联免疫仪为北京新技术所产品。

MS 基本培养基中化学试剂和植物激素 6-BA、IBA、IAA、NAA 以及琼脂、蔗糖等购自华美生物工程公司, 均为分析纯。

丹参外植体采集于河北省农业科学院药用植物研究中心种质资源圃。狭叶丹参、大叶丹参、皱叶丹参、圆叶丹参为本中心进行丹参资源收集、评价研究中筛选出的性状相对稳定的栽培类型。这些类型主要是根据叶片形态初步划分确定的。

2 方法

2.1 接种诱导芽体再生: 用常规的方法接种丹参根段于不定芽诱导培养基上, 诱导不定芽产生, 获得不同种质类型的丹参组培无性系。

2.2 热处理、切取茎尖: 将丹参试管瓶苗放置于光

照培养箱中, 在温度为 37~38℃、湿度 80%、光强 3 000~4 000 lx, 光照时间 12 h/d 的条件下, 恒温培养 38 d, 然后取出瓶苗用双目体视显微镜在无菌条件下切取 0.2~0.4 mm 茎尖, 接种于不定芽培养基 1/3 MS+ BA 1.0 mg/L+ IBA 0.02 mg/L, 培养温度(25±1)℃, 光强 2 000~3 000 lx, 光照时间 12 h/d, 得到待检测的丹参小植株。

2.3 病毒检测: 采用双抗夹心-酶链免疫吸附测定法(DAS-ELISA), 利用 CMV 抗血清对脱毒处理的待检小植株进行检测, 检测结果在酶链免疫仪上读数确定。

2.4 培养条件: 以 MS 为培养基, 附加不同浓度的生长素和细胞分裂素, 琼脂 0.7%, pH5.8, 其中分化培养基(表 1)含 3% 蔗糖, 生根培养基(表 2)含 2% 的蔗糖。培养基分装后在 121℃ 下灭菌 15 min。培养温度(25±1)℃, 光强 2 000~3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

表 1 分化培养基

Table 1 Culture media for differentiation

培养基号	基本培养基	6-BA/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)
(1)	MS	0	0.2
(2)	MS	0.5	0.2
(3)	MS	1.0	0.2
(4)	MS	1.5	0.2
(5)	MS	2.0	0.2
(6)	MS	2.5	0.2

表 2 生根培养基

Table 2 Culture media for root-forming

培养基编号	基本培养基	IBA/(mg·L ⁻¹)	IAA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)
(7)	1/2 MS		0	
(8)	1/2 MS		0.2	
(9)	1/2 MS		0.5	
(10)	1/2 MS		1.0	
(11)	1/2 MS	0.2		
(12)	1/2 MS	0.5		
(13)	1/2 MS	1.0		
(14)	1/2 MS			0.2
(15)	1/2 MS			0.5
(16)	1/2 MS			1.0

* 收稿日期: 2003-12-19

基金项目: 河北省科技攻关项目(03220111)

作者简介: 温春秀(1965—), 女, 河北藁城人, 副研究员, 主要从事药用植物生物技术及栽培、育种研究。Tel: (0311) 7652129

3 结果与分析

3.1 热处理与茎尖培养脱病毒

3.1.1 热处理: 不同丹参种质类型对热处理温度的反应有较大差别, 处理的 4 个丹参类型中, 狭叶丹参耐热性最强, 大叶丹参较强, 皱叶丹参耐热性一般, 圆叶丹参最差(表 3)。

表 3 热处理对不同丹参品系的影响

Table 3 Effect of high temperature treatment on different Danshen varieties

丹参品系	处理一周后	处理两周后	处理 30 d 后
狭叶丹参	生长正常	叶缘干枯, 生长正常	少数顶尖死亡
大叶丹参	生长正常	基部叶片部分干枯, 生长正常	1/3 顶尖死亡
皱叶丹参	生长正常	基部叶缘干枯, 生长基本正常	2/3 部分顶尖死亡
圆叶丹参	基部叶片死亡,	茎叶全部干枯	20 d 后死亡
	顶尖叶开始干枯		

3.1.2 茎尖培养: 在超净工作台上, 通过双目实体显微镜对热处理后丹参切取 0.2~0.4 mm 茎尖, 置于不定芽诱导培养基上培养 1 个月, 然后检查成活率(表 4)。本试验通过茎尖培养获得了 3 种丹参待检株系 114 个。

表 4 切取 0.2 ~ 0.4 mm 的茎尖培养成活率

Table 4 Living stem-tip ratio in 0.2—0.4 mm meristem

丹参 品系	热处理			切取茎尖	
	株数	存活数 / 株	存活率 / %	成活数 / 株	成活率 / %
狭叶丹参	110	72	65.5	60	83.3
大叶丹参	110	55	50.0	34	61.8
皱叶丹参	100	43	43.0	20	46.5

3.1.3 CMV 病毒检测: 利用 CMV 抗血清, 对待检脱毒处理植株进行了 DAS-ELISA 检测(表 5)。可见, 采用茎尖培养与热处理相结合的方法, 3 个不同丹参类型均检测出了脱除 CMV 病毒的株系。但不同类型的丹参, 病毒脱除率有较大差异(表 6), 其中皱叶丹参脱毒率高达 80%, 大叶丹参脱毒率次之, 为 40%, 狭叶丹参最低, 为 20%。

3.2 丹参脱病毒苗组培快繁技术体系建立

3.2.1 最佳分化培养基筛选: 在(1)号培养基上丹参苗增殖系数为 0; 随着 BA 浓度的增大, 芽增殖系数也增高, 在(4)号培养基上芽的增殖效果最好, 芽增殖系数为 8.8; 随着 BA 浓度的再增大, 增殖率反而降低, 而且叶片增厚, 试管苗玻璃化严重。本试验筛选出丹参最适宜的增殖培养基为(4)号培养基。结果见表 7。

3.2.2 丹参生根培养基配方筛选结果: 丹参瓶苗在不同生根培养基上接种一周后开始有根产生, 2 周后部分根长达 1 cm 以上, (10)、(11)号培养基上的

表 5 脱病毒丹参样品检测结果

Table 5 Detection of CMV from virus-free Danshen

狭叶丹参	检测结果	大叶丹参	检测结果	皱叶丹参	检验结果
XY02	++	DY01	-	ZY101	++
XY03	-	DY11	-	ZY103	-
XY06	+-	DY16	+	ZY108	-
XY09	++	DY27	+	ZY111	-
XY12	+	DY35	+	ZY117	-

XY 代表狭叶品种, DY 代表大叶丹参, ZY 代表皱叶丹参, ++ 表示阳性, 有 CMV 病毒; + 表示弱阳性, CMV 不能明确判定; - 表示阴性, 无 CMV 病毒。以上为国家质检总局抗血清检测结果

XY are slim-leaf speies, DY are big-leaf species, ZY are wrinkle-leaf species; ++ indicates samples which have CMV; + indicates samples which have CMV or not and cannot defined; - indicates samples which have no CMV. Results of CMV detection were obtained by Institute of Animal and Plant Quarantine

表 6 不同丹参品系病毒脱除率

Table 6 Virus-free ratio of different Danshen varieties

丹参品系	检测株数/ 个	无病毒数/ 个	脱除病毒率/ %
皱叶丹参	20	16	80
大叶丹参	20	8	40
狭叶丹参	20	4	20

表 7 不同培养基上丛生芽诱导能力比较

Table 7 Comparison of inducing ability of cluster seedling on different culture media

培养基	接种数/ 个	增殖芽数/ 个	芽增殖系数
(1)	30	0	0
(2)	30	138	4.6
(3)	30	189	6.3
(4)	30	264	8.8
(5)	30	195	6.5
(6)	30	192	6.4

根粗壮, 根数多, 有毛根, 根系生长最好; (8)、(9)号培养基上二级根少, 根细弱, (12)号培养基上的根粗壮, 但根数少。(13)号培养基上的二级根少; (14)号培养基上的根数少, 毛根较多, (15)号培养基上的根粗短, 根少, (16)号培养基上的产生大量愈伤组织, 根粗短; (7)号对照上根特细弱, 移栽不容易成活。25 d 后生根情况统计见表 8。可以看出生根培养基上生根率都达到了 95% 以上, 只有(16)号培养基为 90%, 说明丹参组培苗生根较容易。综合平均根数和平均根长两项指标, 丹参生根培养基(11)号培养基最为适宜。

3.2.3 炼苗移栽: 当试管苗在生根培养基上生长 20 d, 苗高达 3 cm 有 3 条以上明显粗壮根时, 将试管苗在强光下闭瓶口炼苗 5~6 d, 再洗净根部培养基, 栽植于 0.1% 高锰酸钾消过毒的蛭石中, 浇足水扣上小拱棚地膜保温、保湿, 温度保持在 20~30℃, 湿度保持在 95% 以上。5d 后揭去地膜, 每 3~5d 喷

表 8 不同培养基激素浓度对根形成的影响

Table 8 Effect of culture media in different hormone concentration on root forming

培养基	接种数 / 株	生根数/ 株	株平均根 数/ 条	生根率 / %	平均根长 / cm
(7)	30	30	3.17	98	3.88
(8)	30	30	2.94	100	4.86
(9)	30	30	3.68	100	3.28
(10)	30	30	3.49	100	3.86
(11)	30	30	3.43	100	4.09
(12)	30	30	2.88	100	5.06
(13)	30	29	2.23	97	4.18
(14)	30	30	2.30	100	5.25
(15)	30	30	3.55	100	2.85
(16)	30	26	2.17	90	3.06

一次杀菌剂和营养液,一个月后小苗则长出白色新根,然后控制水分,每 10~15 天左右喷水一次,增加晒光时间,20~30 d 后可直接大田定植,成活率基本能达到 85%。

3.2.4 脱毒苗快繁技术体系:在温度 25~28℃,光照 2 000~3 000 lx 培养条件下,丹参根段或茎尖诱导不定芽培最佳培养基为 1/3 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.02 mg/L+蔗糖 30 g/L,pH 5.8;丛生芽分化最适宜培养基为 MS+BA 1.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L,pH 5.8;生根最适宜培养基为 1/2 MS+IAA 1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L,pH 5.8。

芽体在分化培养基上 25~30 d 继代一次,芽增殖系数基本保持在 8.0 以上,瓶苗接种到生根培养基上一般 20 d 即可全部生根,30 d 开始练苗。练苗温度 20~30℃,湿度 90% 以上,蛭石基质炼苗 30 d 左右,控制水分,使根老化。炼苗期间真菌感染,是造

成组培苗大量死亡的重要原因,必须做到基质经 0.1% 高锰酸钾彻底消毒,洗净苗根部的培养基,每 3~5 天喷施多菌灵、甲基托布津等杀菌剂一次。按上述优化的分化、生根培养基配方和培养条件,可进行丹参无毒苗工厂化规模繁育。

4 讨论

4.1 丹参不同种质类型在耐热性方面有较大差异,狭叶丹参>大叶丹参>皱叶丹参>圆叶丹参,脱病毒率与耐热性成反比,圆叶丹参在热处理后两周植株基本死亡,未获得脱病毒植株,需进行变温或其他方法脱除病毒研究。

4.2 丹参不定芽诱导同时,对丹参根茎进行了愈伤诱导,获得了大量愈伤组织,经愈伤调控和多次继代,获得了泥状、颗粒状、菜花状、棕红色等多种不同状态类型的丹参愈伤组织,部分类型愈伤容易再生出小植株,这一特性有利于愈伤法脱病毒或培育新品系等研究。

4.3 脱毒丹参苗大田栽植后,前期生长缓慢,栽植半年后观察,与根茎栽植苗比较脱毒苗根系均匀、分枝增多、商品根多,需进一步研究其生长势、产量、药用成分含量等。

References:

[1] Peng S H, Yuan L M, Han M L. Survey of pharmacological study of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2000, 24(9): 690.
[2] Teng Y F. Advance in study on medicine resource of *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Res Chin Wild Plant* (中国野生资源), 2001 (2): 1.
[3] Ding Y J, Wu Z M, Xie X L, et al. Identification of Danshen virus diseases from Danshen in Chin [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(12): 1136-1139.

HPLC 法测定山 中球松素的含量

潘永峰¹, 卢玉斌², 张继敏², 肖万宏², 郭芙蓉^{2*}

(1. 河南省信阳市药品检验所, 河南 信阳 464000; 2. 河南羚锐制药股份有限公司, 河南 新县 465550)

樟科(Lauraceae)山胡椒属(*Lindera* Thunb.)植物山 *L. reflexa* Hemsl. 为灌木或小乔木,已收载于《河南省中药材标准》(1993 年版第 2 册)。性温,行气止痛,止血消肿,主要用于胃疼。主要含黄酮类化合物和生物碱等,其中含量较高的是二氢黄酮

类化合物球松素(pinostrobin)。因此本实验采用 HPLC 法测定了其中球松素的含量。

1 仪器、试剂与药品

日本岛津 LC—10A 高效液相色谱仪,KA—500 型医用超声清洗器(昆山仪器有限公司),甲醇

* 收稿日期: 2003-12-02
作者简介: 潘永峰,男,河南省信阳市人,副主任中药师,主要从事药品检验工作。Tel: (0376) 6562739