

• 药材与资源 •

半夏的病毒危害及脱毒快繁技术研究

解红娥¹, 解晓红¹, 李江辉¹, 陈丽¹, 武宗信¹, 郝建平²

(1. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 2. 山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要:目的 确定病毒病对半夏植株生长的危害, 通过组织培养手段对病毒进行脱毒技术研究。方法 采取高温钝化结合茎尖培养的方法, 用多种激素诱导茎尖成苗、长根及增殖等。结果 用 6-BA 1.0~2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 诱导成苗可有效地脱去病毒; 6-BA 2.0 mg/L 附加适量的 NAA 和 GA₃ 可促进珠芽增殖及试管苗的生长速度; IAA 0.2~0.5 mg/L 可促进半夏根系的发育; 6-BA 2.0 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 配以适当质量浓度的 2, 4-D 和 NAA 可促进叶片愈伤组织形成丛生苗。结论 对半夏病毒病的脱毒率达到 80%, 脱毒植株叶片的内部结构排列有序、清晰可见。

关键词:半夏; 病毒; 脱毒; 快繁

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)11-1697-04

Virus damage to *Pinellia ternata* and its rapid-proliferation technique for virus-free seedlings

XIE Hong-e¹, XIE Xiao-hong¹, LI Jiang-hui¹, CHEN Li¹, WU Zong-xin¹, HAO Jian-ping²

(1. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Science, Yuncheng 044000, China;

2. School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: **Objective** To find out virus damage to plantlet growth of *Pinellia ternata* and study its rapid-proliferation technique for virus-free seedlings. **Methods** Combining stem tip culture with high temperature made virus blunt, the tips were induced to seedling, rooting, and multiplying by several hormones, then seedlings to virus-free by 6-BA 1.0—2.0 mg/L, NAA 0.2 mg/L. **Results** Adding 6-BA 2.0 mg/L with a proper quantity of NAA and GA₃, shoots and growth speed of tube seedlings could be accelerated. *P. ternata* root could be developed by IAA 0.2—0.5 mg/L. Leaf callus forming cluster of seedlings could be enhanced by 6-BA 2.0 mg/L and GA₃ 0.2 mg/L combined with a proper concentration of 2, 4-D and NAA. **Conclusion** The result shows virus-free seedling rate of *P. ternata* is up to 80% and the internal structure arrangement of virus-free leaves is in order and clear.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; virus; virus-free; rapid-proliferation

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 为天南星科半夏属多年生草本植物, 是传统的中药材, 其块茎中含有 β -谷甾醇-D-葡萄糖苷、蛋白、生物碱、氨基酸及 18 种微量元素^[1], 在临床上多用于抗肿瘤、抗早孕、调血脂、保肝和治疗冠心病^[2]等。但由于近年来大面积的人工种植, 病毒病的危害较为严重, 症状为叶片皱缩、花叶、植株矮化, 甚至死亡。目前在大田中已发现的病毒有芋花叶病毒(DMV)^[3]和大豆花叶病毒(SMV)^[4]等, 此外天南星科发现的病毒还

有番茄斑萎病毒(TSWV)、南芥菜花叶病毒(ArMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)等球状病毒和弹状病毒 Dasheen bobone virus。笔者 2003—2004 年对受到病毒浸染的半夏植株叶片内部结构进行了电镜观察, 并运用组织培养手段对其进行了脱毒技术研究, 以解决目前生产上因病毒病引起的品质退化和产量下降等问题。

1 材料

实验材料在山西省运城市新绛县中药材种植基

收稿日期: 2005-01-18

基金项目: 山西省攻关项目(041062)

作者简介: 解红娥(1965—), 女, 山西平陆人, 副研究员, 学士学位, 现主要从事植物脱毒及快繁技术研究, 目前主持研究科技部成果转化项目“优种地黄脱毒实用技术研究”、省攻关项目“半夏脱毒技术研究”等, 曾获得山西省科技进步奖数项, 发表论文 30 余篇。

Tel: (0359)2127091 E-mail: xiehcyb@eyou.com

地采集。

2 方法

2.1 半夏病株叶片内部结构观察:将叶片在50%乙醇中浸泡15 s,放入蒸馏水中清洗2~3次,用刀片切成1 mm×6 mm小块,放入用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.2)配制的2.5%戊二醛中,保持4℃固定20 h。用缓冲液漂洗3次后,再用2%锇酸固定4 h。然后将材料用缓冲液洗涤,用乙醇脱水后,包埋于环氧树脂628[#]中。包埋材料在45℃下浸透24 h,60℃下聚合72 h,修整后在LKB超薄切片机上切片,切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,在JEM-100 CX型电镜下观察并照相。

2.2 半夏的组培快繁及脱毒技术研究

2.2.1 半夏的珠芽培养:将采自田间的植株用自来水冲洗,取其珠芽,在75%乙醇中浸泡30 s,用0.1% HgCl₂消毒10 min,无菌水冲洗3次后,将珠芽切成小块,分别转入4种附加不同外源激素的MS培养基中。

2.2.2 半夏愈伤组织的诱导:将培养的半夏植株叶片切成1 cm²的小块,叶柄切成1 cm长的小段分别接种到培养基中,弱光下培养30 d,培养温度(25±1)℃。

2.2.3 半夏茎尖脱毒:将培养的植株放置38℃的人工气候箱中,高温处理28 d,然后置于解剖镜下,切取带有2个叶原基的0.3 mm左右的茎尖,置于附加不同外源激素的培养基中诱导成苗。

3 结果与分析

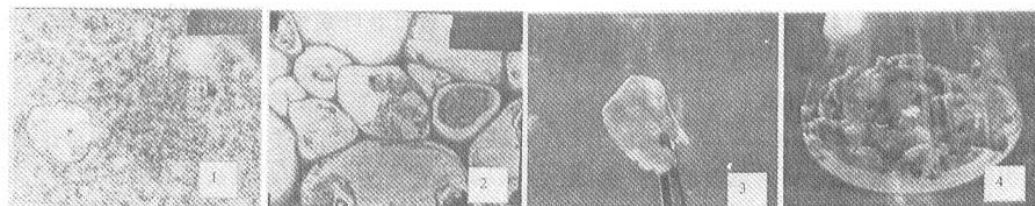
3.1 浸染病毒的叶片内部结构观察:在电子显微镜下,病毒随着浸染进程的加快,叶片的内部结构存在不同程度的变化。①图1-1中密集分布的圆形小颗粒为球状病毒粒子,颗粒小,数量多,分布均匀。在细胞质中出现许多病理性囊泡,而且周围存在病毒粒

子。②叶片的细胞结构发生变化。基粒类囊体与基质类囊体出现扭曲,结构变得松散,内有大小不等的嗜锇颗粒。进而基本看不到基粒类囊体的成垛叠层,细胞内叶绿体膜被破坏、解体,片层疏松无序地分散在细胞质中。③一些细胞内的叶绿体基本不复存在,细胞质中出现无序的状态;或者细胞中叶绿体严重退化,出现不同程度的畸形,叶绿体结构的破坏导致其功能下降或丧失,从而引起细胞病变,最终致使原生质体完全解体(图1-2)。内部的细胞学变化反映在叶片的外部症状上,表现为局部出现斑点(图1-3),进而不断扩大,最后导致整个植株枯萎死亡。

3.2 半夏的组培快繁及脱毒技术研究

3.2.1 外源激素对半夏珠芽增殖的影响:将切成小块的珠芽转入附加激素的培养基中30 d左右,珠芽即可萌发形成许多小植株。再经过30 d后,将小植株基部形成的珠芽再行切割后继代培养,又可形成新的植株。表1的统计结果表明,当培养基中的6-BA质量浓度为1.0 mg/L时,分别加入0.1 mg/L NAA或0.5 mg/L GA₃,有效芽数均较少,分别为5.1和5.8;当6-BA质量浓度增加到2.0 mg/L时,有效芽数较多,为6.3;当2.0 mg/L 6-BA与0.1 mg/L NAA和0.5 mg/L GA₃共同使用时,有效芽数最多,达7.6。说明高质量浓度的6-BA与适当质量浓度的NAA和GA₃相互配合,对半夏珠芽的增殖有很好的促进作用。

3.2.2 外源激素对半夏试管苗生长的影响:表2结果说明,在半夏试管苗的生长过程中,起主导作用的是6-BA。只要有适当质量浓度(2.0 mg/L)的6-BA存在,即可明显促进苗的增高。当6-BA为2.0 mg/L时,苗的生长速度与NAA或GA₃的使用与否关系不大;而当6-BA为1.0 mg/L时,加入0.1 mg/L的NAA的效果优于加入0.5 mg/L的GA₃。



1-感染病毒后半夏叶片细胞内的病毒粒子 2-染病半夏植株叶片细胞内的细胞质解体

3-感染病毒后半夏叶片上出现黄色枯斑 4-愈伤组织分化出小叶片

1-virus particles in cells of *P. ternata* leaf infected by virus 2-cytoplasm disintegration in cells of diseased leaf

3-withered and yellow spots in *P. ternata* leaf infected by virus 4-leafflets differentiated from calli

图1 感染病毒半夏叶片内部结构、外观特征及叶片分化

Fig. 1 Internal structure, exterior feature, and leaf differentiation of *P. ternata* infected by virus

表 1 外源激素对半夏珠芽增殖的影响

Table 1 Effect of exogenous hormone on proliferation of *P. ternata* shoots

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	芽数/个
1	1.0	0	0.5	5.8
2	2.0	0.1	0.5	7.6
3	1.0	0.1	0	5.1
4	2.0	0	0	6.3

表 2 外源激素对半夏试管苗生长的影响

Table 2 Effect of exogenous hormone on tube seedling growth of *P. ternata*

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	芽数/个
1	1.0	0	0.5	2~3
2	2.0	0.1	0.5	5~6
3	1.0	0.1	0	3~4
4	2.0	0	0	5~6

3.2.3 外源激素对半夏试管苗生根的影响:在 1/2MS 基本培养基中加入不同质量浓度的 NAA、IAA 或 2,4-D 诱导生根,10 d 后进行统计。如表 3 所示,培养基中 IAA 为 0.2~0.5 mg/L 时,根最长;当 IAA 为 0.5 mg/L 时,单株平均根数最多;IAA 为 1.0 mg/L 时,单株平均根数和根长指标居中,说明适量的 IAA 有助于半夏根诱导和生长。单独使用 2,4-D 和 NAA 时不同程度地抑制了根的形成。

表 3 外源激素对半夏无根苗生根的影响

Table 3 Effect of exogenous hormone on rooting of *P. ternata* seedlings without roots

编号	IAA/(mg·L ⁻¹)	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	平均根数/(条·株 ⁻¹)	平均根长/cm
1	0	0	0	1.4	0.4
2	0.2	0	0	3.2	0.9
3	0.5	0	0	3.8	0.9
4	1.0	0	0	2.0	0.5
5	0	0.2	0	0.3	0.4
6	0	0.5	0	0.6	0.3
7	0	1.0	0	0	0
8	0	0	0.2	0.8	0.3
9	0	0	0.5	0.8	0.3
10	0	0	1.0	0	0

3.2.4 外源激素对半夏叶片器官分化的作用:在附加不同外源激素的培养基中,叶片表现出不同的形态发生能力,实验结果见表 4。在附加 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 的培养基中,叶片愈伤组织化,然后在愈伤组织上分化形成小的绿色突起,继而形成小的叶片(图 1-4),其中在附加 GA₃ 0.2 mg/L 的培养基中愈伤组织化的程度较高,叶芽也较多。这一结果说明 NAA 是诱发半夏叶片愈伤组织

化的主要因素,GA₃ 起辅助、促进作用。在附加 6-BA 2.0 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 的培养基中,叶片保持绿色但未见明显的生长。在附加 NAA 1.0 mg/L、2,4-D 0.2 mg/L 培养基中,叶片形成的愈伤组织较少,但却直接分化出根,说明生长素在根的分化中起主要作用。根据不同的分化情况,在相应的培养基中诱导发芽或生根,最终形成再生完整植株。

3.2.5 外源激素对茎尖成活的影响:将半夏的无菌苗在 38 ℃ 的高温处理 28 d 后,切取茎尖培养于表 5 所示的培养基中,结果表明,当 MS 基本培养基中附加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 时,茎尖成活率最高,可达 50%,在附加 GA₃ 0.1 mg/L 的培养基中,半夏的茎尖成活表现出一定的抑制作用。培养 40 d 时,茎尖成苗的植株有 12 株叶片不带斑点,即表明去除病毒的苗数占茎尖成苗的 80%。

表 4 外源激素对半夏叶片器官形成的影响

Table 4 Effect of exogenous hormone on leaf organ formation of *P. ternata*

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	叶片发生情况
1	2.0	0.2	0	0	保持绿色,形态不变
2	2.0	0	0	0.2	愈伤组织化程度低,长叶
3	2.0	0.2	0	0.2	愈伤组织化程度高,长叶
4	0	0	0.2	1.0	基本无愈伤组织,长根

表 5 外源激素对半夏茎尖培养的影响

Table 5 Effect of exogenous hormone on stem tip culture of *P. ternata*

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	接种数	成活数	成活率/%
1	2.0	0.1	0.1	40	12	30.0
2	1.0	0.1	0.1	40	12	30.0
3	2.0	0.2	0	40	17	42.5
4	1.0	0.2	0	40	20	50.0

3.2.6 脱毒半夏叶片的电子显微镜观察:对茎尖成苗的植株进行移栽后,用电子显微镜观察叶片的内部结构,结果表明,脱毒半夏的叶片内部未发现病毒粒子以及结构异常和非细胞结构物质。可见典型的双层核膜和膜内近圆形的核仁和染色体,在细胞核与染色体之间为一圆形的线粒体和纺锤形的叶绿体,类囊体膜系统在基质中均匀分布,与叶绿体长轴平行排列,基粒体积大,结构清晰,基粒之间由基质类囊体相联系,类囊体膜系统发达,基粒片层垛叠层数多而紧密,基粒的体积也大,这无疑更有利于光能的吸收和转化,使植株正常发育和生长。

4 讨论

4.1 对半夏病毒的观察结果表明,半夏受到病毒浸

染后,叶片内部结构发生变化,基粒类囊体与基质类囊体出现扭曲,结构变得松散,叶绿体退化,甚至被破坏解体,直至不复存在,并最终导致整个植株死亡。

4.2 外源激素对半夏植株的增殖及生长发育有较大的影响,6-BA 2.0 mg/L 附加适量的 NAA、GA₃ 可促进珠芽增殖,并可促进试管苗的生长速度;IAA 0.2~0.5 mg/L 可促进半夏根系的发育。6-BA 2.0 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 并配以适当质量浓度的 2, 4-D 和 NAA 可促进半夏叶片形成愈伤组织,并直接长出叶片和根。

4.3 半夏的茎尖为叠套型生长,切取比较困难,本实验采取高温钝化病毒结合茎尖脱毒,利用 6-BA

1.0~2.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 诱导茎尖成苗去除病毒效果明显,脱毒率达到了 80%。

References:

- [1] Zhao L. Comparative analysis of *Pinellia ternata* alkaloid elements between *Pinellia ternata* cultures and artificial cultivated *Pinellia ternata* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1990, 15(3): 18-20.
- [2] Mao Z C, Peng Z S. Progress on research of *Pinellia ternata* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 2002, 20(1): 42-46.
- [3] Chen J S, Hong J. Dasheen mosaic virus causing mosaic disease of *Pinellia cordata* [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1996, 26(1): 87-91.
- [4] Chen J P. *Molecular Diagnosis Maps of Plant Viruses* (植物病毒分子诊断图谱) [M]. Beijing: Science Press, 2001.

11 种药用石斛根的形态组织学研究

郑艳^{1,2}, 徐璐珊¹, 王铮涛^{1*}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

摘要:目的 观察药用石斛根的内部结构,以期辅助鉴定生药石斛。方法 利用形态组织学方法,对茎多肉质的束花石斛 *Dendrobium chrysanthum* 及其易混的玫瑰石斛 *D. crepidatum*、报春石斛 *D. primulinum*、重唇石斛 *D. hercoglossum*、晶帽石斛 *D. crystallium*、茎粗硬的流苏石斛 *D. fimbriatum* 及其易混的叠鞘石斛 *D. aurantiacum* var. *denneanum*、茎节或节间肿胀的棒节石斛 *D. findlayanum*、杯鞘石斛 *D. gratiosissimum*、肿节石斛 *D. pendulum* 和大苞鞘石斛 *D. wardianum* 共 11 种药用石斛根进行显微结构研究;对根横切面结构相似的流苏石斛和叠鞘石斛,配合进行了根被表面制片观察。结果 根被细胞的形状及皮层厚度,中柱的木质部束数、导管的直径、髓的构成,晶体的类型与大小存在种间差异。流苏石斛和叠鞘石斛根被表面观结构不同。结论 根的组织构造特征可用于药用石斛的辅助鉴别。

关键词: 石斛属;根;横切面观;根被表面观;形态学;组织学

中图分类号:R282

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1700-04

Morphology and histology of eleven medicinal plant roots of *Dendrobium* Sw.

ZHENG Yan^{1,2}, XU Luo-shan¹, WANG Zheng-tao¹

(1. School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Objective To observe the histological structure of plant roots of *Dendrobium* Sw. for assisting identification of crude drug *Herba Dendrobii*. **Methods** Morphological and histological studies were carried out on 11 medicinal plant roots in *Dendrobium* Sw. by microstructural observation. The 11 species were divided into three groups according to their stem morphology: a) pair fleshy-stem group, including *D. chrysanthum*, *D. crepidatum*, *D. primulinum*, *D. hercoglossum*, and *D. crystallium*; b) thick and rigid-stem group, including *D. fimbriatum* and *D. aurantiacum* var. *denneanum*; c) node- or inter-node-bulgy-stem group, including *D. findlayanum*, *D. gratiosissimum*, *D. pendulum*, and *D. wardianum*. The surface descriptions of velamen were conducted for *D. fimbriatum* and *D. aurantiacum* var. *denneanum* which are similar in characters of cross section. **Results** There were differences in shape and

收稿日期:2005-02-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171144)

*通讯作者 王铮涛 Tel:(025)85391245 E-mail:wangzht@hotmail.com