

广西地不容种质离体保存技术研究^{*}

Study on Preservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in Vitro

付传明, 黄宁珍^{**}, 赵志国, 唐凤鸾, 李 锋

FU Chuan-ming, HUANG Ning-zhen^{**}, ZHAO Zhi-guo, TANG Feng-luan, LI Feng

(广西植物研究所, 广西桂林 541006)

(Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:以广西地不容 (*Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo) 试管苗为材料, 研究室温(25±2)℃光照2000lx(12h/d)条件下, 培养基中不同无机盐水平(MS、1/2MS、1/4MS)、蔗糖浓度(0、20、40、60g/L)和植物生长抑制剂 CCC(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.5mg/L)、PP₃₃₃(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L)、ABA(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L)、MH(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L)对广西地不容试管苗保存存活率的影响。结果表明, MS添加蔗糖20~40g/L适合作为广西地不容离体保存的基本培养基, 附加一定浓度的CCC、PP₃₃₃、ABA和MH能有效抑制试管苗的旺盛生长, 长时间保存后的存活率高; ABA易引起试管苗早衰, 保存效果不佳。对广西地不容试管苗保存效果较好的两个培养基配方为: MS+CCC 0.4~2.5mg/L+蔗糖 30g/L 和 MS+PP₃₃₃ 0.2~0.5mg/L+蔗糖 30g/L, 这两个配方可以不继代连续保存360~380d, 存活率60%~80%。

关键词:广西地不容 离体保存 生长抑制剂 矮壮素 多效唑 脱落酸 青鲜素

中图法分类号:Q949.746.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2007)02-0155-05

Abstract: The effects of media (MS, 1/2MS and 1/4MS), concentration of sucrose and plant retardants (CCC, PP₃₃₃, ABA, MH) on preservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro were studied. According to the results, MS medium with sucrose 20~40g/L could be used as basic medium for the preservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro. CCC, PP₃₃₃ and MH in certain concentration could retard the growth of tube plantlets which could be preserved for a long time with high survival rate. But tube plantlets tended to senesce prematurely in the mediums with ABA, in which effects on preservation were not very satisfied. The results showed that MS+CCC 0.4~2.5mg/L+sucrose30g/L and MS+PP₃₃₃ 0.2~0.6mg/L+sucrose 30g/L were better than other combinations in preservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro. These two formulas could store the tube plantlets up to the (without transfer) 360~380d at 60%~80% survival rate.

Key words: *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo, preservation in vitro, plant growth retardant, CCC, PP₃₃₃, ABA, MH

广西地不容 (*Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo) 属防己科千金藤属多年生草质落叶藤本植物, 主产于广西西北部至西南部, 是广西壮族等少数民族民间常用草药, 具清热解毒、散瘀消肿、健胃止痛之功效, 可用于治疗多种感染性疾病^[1]。其块根是生产中药“颠痛定”的重要原料, 在临幊上用于镇痛、镇静、解热^[2,3],

收稿日期: 2007-01-17

修回日期: 2007-03-20

作者简介: 付传明(1980-), 男, 研究实习员, 主要从事药用植物生物技术研究。

* 广西科技攻关(桂科攻 0322024-3B)项目资助。

** 通讯作者。

还可以减轻人体对毒品的依赖性, 是一种良好的戒毒辅助药品。广西地不容为雌雄异株植物, 种子较小, 存活时间短, 种壳坚硬, 在自然条件下萌发困难, 导致植株自然条件下繁殖能力较差, 加上近年来人为的破坏及各种环境因素的影响, 种质资源日趋减少。因此, 我们在成功完成广西地不容组培快繁技术研究的基础上, 采用室温离体保存材料的方法, 通过调整培养基中无机盐、蔗糖及植物生长抑制剂[矮壮素(CCC)、多效唑(PP₃₃₃)、脱落酸(ABA)、青鲜素(MH)]的浓度, 以期找出最适合广西地不容试管苗保存的培养基配方, 为广西地不容种质资源的中长期保存与可持续利用提供理论基础与技术方法。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理

供试材料原生长于广西靖西、凌云等县,采集其成龄植株的块根种植于广西植物园内,以新长出的嫩梢为外植体进行组织培养。选取继代增殖培养过程中形成的丛生小苗,剪成单株接种到保存培养基上,作本次离体保存实验。

1.2 离体保存实验

1.2.1 无机盐水平、蔗糖浓度的保存实验

广西地不容组培快繁所适用的基本培养基为MS^[4],因此,实验设计1×MS(以下简写为MS)、1/2MS、1/4MS三种无机盐浓度水平,分别附加0、20、40、60g/L蔗糖(附加琼脂粉6g/L,pH值5.8,以下各处理均同)。

1.2.2 不同植物生长抑制剂的保存实验

以MS+蔗糖30g/L为基本培养基,分别添加不同浓度的CCC(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.5mg/L)、PP₃₃₃(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L)、ABA(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L)和MH(0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L),各抑制剂均为化学纯。

1.3 观察记录及保存条件

保存后,每90d观察记录一次,观测指标包括:植株的高矮、叶片的大小、色泽、生根和存活情况。存活率=存活外植体数/(总接种外植体数-污染外植体数)×100%,其中各处理初始均接种10瓶,每瓶接种5个外植体,以外植体植株所有叶片和茎尖全部变黄枯萎的作死亡计算。

保存条件:培养室温度为15~20℃,光照强度为2000lx,照射时间12h/d。

1.4 恢复生长实验

选择添加生长抑制剂保存效果最好的无继代连续离体保存360d后存活下来的植株,去掉根系和老叶,剪切成带芽的短小茎段,转接到MS+1.0mg/LGA₃+0.02mg/LNAA的继代增殖培养基上,于温度(25±2)℃,光照度2000lx(12h/d)下进行正常培养,观察恢复生长的情况。

2 结果与分析

2.1 无机盐水平、蔗糖浓度对广西地不容离体保存的影响

如表1所示,培养基中不同的无机盐水平、蔗糖浓度对广西地不容离体材料的保存效果不同。培养360d后,在1/4MS和1/2MS无机盐培养基中,不加蔗糖或加低浓度蔗糖处理材料的存活率相对较高,如

培养基1/4MS+蔗糖0g/L上有50%的材料存活,1/2MS+蔗糖0g/L和1/2MS+蔗糖20g/L材料的存活率分别为70%和30%,其余处理材料全部死亡;而MS无机盐培养基上材料的表现则有所不同,不加蔗糖的材料存活率为0,而加20g/L和40g/L蔗糖的培养基上材料存活率分别为20%和30%。因此推测在广西地不容的离体保存中,无机盐和蔗糖浓度之间可能存在交互作用。

表1 无机盐和糖浓度对广西地不容离体保存的影响

Table 1 Effects of salt and sugar concentration on the conservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro

培养基 Mediums	存活率 Survival rate(%)				总体生长情况 General situation of growth
	90d	180d	270d	360d	
1/4MS+ sugar 0g/L	100	100	100	50	植株瘦弱,略玻璃化 Weak plantlets with slight vitrification
1/4MS+ sugar 20g/L	100	100	50	0	少部分芽存活,大部分黄化死亡 Some buds were alive and most were etiolated and dead
1/4MS+ sugar 40g/L	100	0	0	0	全部黄化死亡 All plantlets were etiolated and dead
1/4MS+ sugar 60g/L	100	0	0	0	全部黄化死亡 All plantlets were etiolated and dead
1/2MS+ sugar 0g/L	80	80	80	70	植株瘦弱,略玻璃化 Weak plantlets with slight vitrification
1/2MS+ sugar 20g/L	100	100	83	30	植株高大、弯曲,长满整瓶,部分老化 Plantlets were strong, tall and bent, overgrowing in the culture flask. Some of them senesced
1/2MS+ sugar 40g/L	50	50	50	0	部分芽存活,部分黄化死亡 Some buds were alive and others etiolated and dead
1/2MS+ sugar 60g/L	100	0	0	0	全部黄化死亡 All plantlets were etiolated and dead
MS+ sugar 0g/L	50	50	50	0	植株较矮,玻璃化明显 Short plantlets with obvious vitrification
MS+ sugar 20g/L	100	80	60	20	植株弯曲,长满整瓶,芽比较多,存活 Plantlets were bent and overgrown in culture flask with plentiful alive buds
MS+ sugar 40g/L	100	80	80	30	植株弯曲,长满整瓶,芽比较多,存活 Plantlets were bent and overgrown in culture flask with many alive buds
MS+ sugar 60g/L	100	100	60	0	多数老化,少数顶芽存活 Most buds senesced and a few apical buds survived

进一步观察不同处理中材料的品质和生长情况,在1/4MS和1/2MS培养基中,尽管苗的存活时间长,存活率也较高,但植株瘦弱并玻璃化,品质较差,不利于再次继代培养。而在MS+蔗糖20~40g/L培养基上,保存360d后虽然存活率仅为20%~30%,低于无蔗糖的1/4MS和1/2MS无机盐培养基,但试

管苗品质较好、芽多、健壮，利于进一步保存和继代。因此，我们认为在实际保存中，以 MS 无机盐水平添加 20~40g/L 蔗糖对广西地不容离体材料的保存效果最好。

2.2 植物生长抑制剂对广西地不容离体保存的影响

在不同植物生长调节剂的保存实验中，对照(MS + 蔗糖 30g/L)在培养 90d 后株高 3~5cm，叶片大，生根率为 40%；保存 270d 时，植株弯曲，长满整瓶，芽比较多，存活率为 60%；360d 时，存活率为 15%。

2.2.1 PP₃₃₃对保存的影响

从表 2 可看出，在保存 90d 时，株高均较对照小，且随着 PP₃₃₃浓度的增高株高逐渐变小，当浓度达到 8.0 mg/L 时，株高仅为 1~2cm，叶芽短缩明显；保存 270d 时，PP₃₃₃浓度 0.2~0.5 mg/L 培养基上植株高、壮，部分能长根，利于再次继代，而 PP₃₃₃浓度 > 0.5 mg/L 培养基上植株则表现为老叶黄化、脱落，新叶小或无，植株畸形。这些外观差异说明高浓度的 PP₃₃₃对试管苗的生理损伤较大，降低 PP₃₃₃的使用浓度，能减少对材料的伤害，并使材料保持健壮。另外，不同浓度的 PP₃₃₃也明显影响试管苗的存活率，保存 380d 时，PP₃₃₃浓度 0.2~0.5 mg/L 的存活率为 60%，高于对照，此时其他培养基上的材料均全部死亡。因

表 2 PP₃₃₃对广西地不容离体保存的影响

Table 2 Effects of PP₃₃₃ on the conservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro

PP ₃₃₃ 浓度 (mg/L)	株高 Height (cm)	叶大小 Size of leaves*	生根率 Rate of rooting** (%)	植株形态 Shape of plantlets**	存活率 Survival rate (%)	
					270d	380d
0.2	2~4	中大 Intermedial large	10	植株比较粗壮 Plantlets were strong	100	60
0.5	2~4	中 Intermedial	25	植株粗壮芽多、弯曲 Plantlets were strong and bent with many buds	78	60
1.0	2~4	中小 Intermedial small	25	部分黄化死亡 Some plantlets were etiolated and dead	67	0
2.0	1~3	小 Small	—	已经全部死亡 All plantlets were dead	0	0
4.0	1~3	小 Small	0	少数芽存活，叶片小或无 Small part of buds survived without or with small leaves	25	0
8.0	1~2	小 Small	0	整体老化，叶片小或无，部分顶芽绿存活 The whole plantlets senesced with small or no leaves, were green and survival	10	0

* : 90d; ** : 270d.

此，PP₃₃₃的使用浓度宜≤0.5 mg/L。

2.2.2 CCC 对保存的影响

从表 3 可以看出，CCC 对广西地不容试管苗保存的促进作用很明显。在浓度 0.4~2.5 mg/L 范围内，保存 360d 时，试管苗存活率相对较高，平均为 67%，明显高于对照的 15%，并且植株高、壮、色泽绿，侧芽较多，生根率 100%。而且在 CCC 所使用的浓度范围内(0.4~2.5 mg/L)，从外形上看对材料没有造成生理损伤，浓度的高低仅影响植株的生长速度。因此，CCC 是适合广西地不容种质离体保存的生长抑制剂，所使用的浓度范围较宽，试管苗存活时间表 3 CCC 对广西地不容离体保存的影响

Table 3 Effects of CCC on the conservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro

CCC 浓度 (mg/L)	株高 Height (cm)	叶大小 Size of leaves*	生根率 Rate of rooting** (%)	植株形态 Shape of plantlets*	存活率 Survival rate (%)	
					270d	360d
0.4	>5	大 Large	100	芽多，老叶凋落，植株壮、弯曲，利于继代 Plantlets with a lot of buds and old deciduous leaves, were strong, bent and benefited for subculture	90	70
0.8	>5	大 large	100	芽多，老叶凋落，植株壮、弯曲，利于继代 Plantlets with a lot of buds and old deciduous leaves, were strong, bent and benefited for subculture	90	80
1.2	>5	大 Large	100	芽多，老叶凋落，植株壮、弯曲，利于继代 Plantlets with a lot of buds and old deciduous leaves, were strong, bent and benefited for subculture	90	60
1.6	3~5	中 Intermedial	100	芽少，老叶凋落，不利于继代 Plantlets with few buds and old deciduous leaves, were not benefited for subculture	70	49
2.0	>5	中 Intermedial	100	芽多，老叶凋落，植株壮、弯曲，利于继代 Plantlets with a lot of buds and old deciduous leaves, were strong, bent and benefited for subculture	80	62
2.5	>5	大 Large	100	芽多，老叶凋落，植株中等壮，利于继代 Plantlets with a lot of buds and old deciduous leaves, were moderate strong, bent and benefited for subculture	86	80

* : 320d。

长,成活率高,形态正常,利于继代。

2.2.3 ABA 对保存的影响

从表 4 可看出,ABA 对保存中试管苗的生长和存活影响较大。保存 90d 时,植株均能正常成活,较矮壮,色泽绿,叶片小;180d 时,ABA 浓度 0.2~4.0 mg/L 培养基上植株均叶片发黄,色泽不绿,提前老化,早衰现象明显,ABA 浓度为 8.0 mg/L 时,尽管色泽绿,但植株矮小、茎芽畸形;保存 270d 时,存活率普遍较低,其中 ABA 浓度为 1.0 mg/L 的培养基上试管苗的存活率相对最高,为 50% (低于对照的 60%)。因此,综合生长和存活情况,ABA 浓度 0.2~8.0 mg/L 均不利于广西地不容的离体保存。

表 4 ABA 对广西地不容离体保存的影响

Table 4 Effects of ABA on the conservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro

ABA 浓度 (mg/L)	株高 Height (cm)	叶大小 Size of leaves*	生根率 Rate of rooting*	植株形态 Shape of plantlets**	存活率 Survival rate (%)	
					180d	270d
0.2	1~3	中小 Intermedial small	13	叶片发黄 Leaves were yellow	75	40
0.5	1~3	小 Small	79	叶片发黄 Leaves were yellow	93	20
1.0	2~3	小 Small	50	叶片略发黄 Leaves were slightly yellow	100	50
2.0	1~3	中小 Intermedial small	88	老叶发黄 Old leaves were yellow	100	20
4.0	2~3	中小 Intermedial small	89	叶片发黄 Leaves were yellow	100	40
8.0	1~2	小 Small	73	植株矮小,色泽较绿 Plantlets were little and green	100	40

* : 90d; ** : 180d。

2.2.4 MH 对保存的影响

从表 5 可以看出,当在 MH 浓度 0.2~2.0 mg/L 培养基上保存 90d 时,试管苗较对照略矮壮,株形相对紧凑,表现为株高略矮,叶柄略短,叶片略小,少部分材料长根;保存 180d 时,除少部分材料老叶发黄外,其他均生长正常;270d 时,存活率 73% 以上(高于对照的 60%);当 MH 浓度 > 2.0 mg/L 时,则明显改变植株的形态,表现为叶、芽收缩肥大,无根,整体畸形严重,存活时间短,存活率也明显降低(270d < 50%)。就目前的观测结果,综合生长和存活情况,以 MH 浓度 0.2~0.5 mg/L 对保存广西地不容的效果相对最好。

综合上述 4 种生长抑制剂对广西地不容离体保存的效果,以 CCC 对保存最好,其适用的浓度范围广(0.4~2.5 mg/L),未对材料造成生理损伤,试管苗存

活率高,保存 360d 平均存活率 67%;其次是 PP₃₃₃,在 0.2~0.5 mg/L 范围内,保存 380d 时,成活率 60%,两种抑制剂的保存效果均明显好于对照。因此,这两种抑制剂均可用于广西地不容种质的离体保存。

表 5 MH 对广西地不容离体保存的影响

Table 5 Effects of MH on the conservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo in vitro

MH 浓度 Concen- tration of MH (mg/L)	株高 Height (cm)*	叶大小 Size of leaves*	生根率 Rate of rooting (%)*	植株形态 Shape of plantlets**	存活率 Survival rate (%)
0.2	2~4	中大 Intermedial large	50	植株色泽绿,生长旺盛 Plantlets were green and grown vigorously	100 89
0.5	2~3	中大 Intermedial large	25	植株生长旺盛,部分老叶发黄 Plantlets grown vigorously with some etiolated old leaves	100 89
1.0	2~3	中 Intermedial	10	植株生长旺盛,少部分老叶发黄 Plantlets grown vigorously with a few etiolated old leaves	100 73
2.0	2~3	中 Intermedial	78	植株色泽绿,生长旺盛 Plantlets were green and grown vigorously	100 85
4.0	1~1.5	小 Small	0	芽叶明显收缩,无生长 Leaves and buds shrank obviously and could not grow	67 33
8.0	1.0	小 Small	0	芽叶明显收缩,无生长 Leaves and buds shrank obviously and could not grow	90 40

* : 90d; ** : 180d。

2.3 试管苗保存后恢复生长情况

在 CCC 和 PP₃₃₃ 培养基上无继代连续离体保存 360d 后存活下来的植株,经进行恢复生长实验,均能很快形成丛生芽,30d 可增殖 3~5 倍,植株生长旺盛,形态正常。转接到生根培养基上,同样能生根,形成完整植株,与未经保存的正常试管苗无明显差异。

3 讨论

综合试验结果,对广西地不容试管苗保存效果最好的培养基配方为:MS + CCC 0.4~2.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L 和 MS + PP₃₃₃ 0.2~0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L,可不继代连续保存 360~380d,存活率 60%~80%。

离体保存成功的试验表明,调整培养基中无机营养水平,能有效的延长保存时间和提高存活率^[5,6]。在菠萝^[7]和草莓^[8]的保存过程中,1/4MS 无机盐保存培养基上试管苗的长势和存活率都明显较 MS 标准培

养基上好,而咖啡分生组织培养的小植株则在1/2MS无机盐培养基上保存时间最长^[9]。在本实验中,广西地不容最适宜的无机盐保存培养基为MS,这一结果与上面报道的不同。这可能是因为不同植物本身的抗逆性和自养能力存在较大的差异,而且广西地不容试管苗在保存后期易极度生长,茎尖顶住瓶盖后在瓶内弯曲盘旋长满整瓶,因此消耗的无机营养也较多,这样就需要培养基中有相对更多的无机营养。

从广西地不容离体种质保存的结果来看,长期保存成功的关键因素之一是使用了合适的植物生长抑制剂。因为利用激素调控技术,不仅能延长培养物在试管中的保存时间而且能提高试管苗质量和再次继代成活率。在本实验中,添加一定浓度的CCC(0.4~2.5mg/L)和PP₃₃₃(0.2~0.5mg/L)后,保存过程中试管苗的生长和存活情况均明显较对照好,长时间保存后存活率更高,植株健壮。但同时,部分抑制剂(PP₃₃₃≥1.0 mg/L, MH>2.0 mg/L)也对广西地不容试管苗造成了一定的生理伤害,表现为叶、芽收缩退化,植株畸形。因此,为了避免保存中高浓度抑制剂对材料造成生理损伤,结合保存效果,正常情况下以获得最佳保存效果的较低浓度为宜。

在其它植物,如甘薯^[10]、马铃薯^[11]和猕猴桃^[12]的种质保存实验中,应用较低浓度的ABA能明显提高保存效果。但在本实验中,添加ABA后明显降低保存中试管苗的成活率,植株最先出现叶片黄化、早衰等症状。这是由于浓度选取不当,还是因为ABA本身作为一种胁迫激素^[13],对不同植物在保存后期试管内营养等环境条件不利的情况下产生的作用也不一样,这些还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第30

卷第1分册[M].北京:科学出版社,1996:40-70.

- [2] 王宪楷,赵同芳.千金藤属植物中生物碱成分的分布及其生物活性[J].中国药学杂志,1990,25(1):3-5.
- [3] 金国章.左旋四氢巴马汀和它的第二代新药——左旋千金藤啶碱的药理研究进展[J].药学学报,1987,22(6):472-480.
- [4] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:371-374.
- [5] ZEE F T, MUNEKA M. Invitrostorage of pineapple (*Ananas* ssp.) germplasm[J]. Hort Science, 1992, 27(1):57-58.
- [6] KO W H, CHWANG S, KU F M. A new technique for storage of meris-tem-tip cultures of Cavendish banana [J]. Plant Cell tissue and organ culture, 1991, 25(3):179-183.
- [7] FRANCIS T ZEE, 方德秋.菠萝种质的离体保存[J].世界热带农业信息,1992,16(6):38-42.
- [8] 赵密珍,王壮伟,钱亚明,等.不同培养基对草莓种质离体保存的影响[J].果树学报,2006,23(1):27-30.
- [9] KARTHA K K, MROGINSKI L A, PAHL K K, et al. Germplasm preservation of coffeea (*Coffea arabica* L) by in vitro culture of shoot apical meristems [J]. Plant Science Letters, 1981, 22: 301-307.
- [10] 辛淑英.甘薯组织培养和种质资源保存[C]//马缘生.作物种质资源保存研究论文集.北京:北京学术期刊出版社,1989:81-95.
- [11] 林长春,李其文.马铃薯块茎培养脱毒与种质资源试管苗保存的研究[J].马铃薯杂志,1989,3(2):73-78.
- [12] 郭延平,李嘉瑞,吉爱梅.ABA对猕猴桃种质离体保存的生理效应[J].西北农业学报,1994,3(4):84-87.
- [13] 潘瑞炽,董愚得.植物生理学[M].第3版.北京:高等教育出版社,1995:318-335.

(责任编辑:韦廷宗)

高盐饮食增加幽门螺杆菌毒性

幽门螺杆菌是一种螺旋形的细菌,存在于人体内胃和十二指肠的酸性环境中,80%的胃溃疡和90%的十二指肠溃疡都是由这种细菌引发的。不过,大多数人感染幽门螺杆菌后并不表现出症状,只有一小部分人会进一步患胃部或十二指肠疾病。美国科学家最新研究发现,饮食中过多摄入盐分会使胃肠内的幽门螺杆菌毒性增加,进而导致胃溃疡等疾病发生。高盐条件下,与幽门螺杆菌毒性有关的两种基因的转录活动增多,基因的表达模式发生了变化,这是幽门螺杆菌感染者发病风险增加的最主要原因。这使高盐饮食有害健康的观点又多了一项证据。

(据科学网)