

山银花的组培快繁和种质离体保存研究

Study on Rapid-propagation and in Vitro Preservation of *Lonicera confusa* DC

付传明, 黄宁珍*, 唐凤鸾, 卢凤来

FU Chuan-ming, HUANG Ning-zhen*, TANG Feng-luan, LU Feng-lai

(中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006)

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

摘要:以山银花 (*Lonicera confusa* DC.)嫩茎段为外植体,研究不同培养基 (MS 1/2MS 1/3MS N68 White)和植物生长调节剂 (6-BA IBA NAA 2, 4-D BR)对其诱导、分化和增殖的影响,建立山银花的快速繁殖再生体系,并探讨在温度 15~ 20℃条件下,不同保存培养基 (MS 1/2MS 1/4MS)对种质离体保存的影响。结果表明:山银花嫩茎段分化能力较强,在培养基 MS+ 6-BA0.5 mg·L⁻¹+ IBA0.1 mg·L⁻¹上培养 7d腋芽开始萌发,15d时的诱导率达到 90%;以 N68为基本培养基,附加 6-BA0.4 mg·L⁻¹和 IBA0.4 mg·L⁻¹能较好地促进芽的伸长和增殖,避免叶片发黄脱落,每 30d的增殖倍数为 5.0倍;生根培养基以 1/2MS+ IBA0.2 mg·L⁻¹最好,培养 30d时生根率达 95%;以单株芽段为离体保存材料,在 1/2MS+ 蔗糖 20g·L⁻¹培养基上培养 30d后无菌条件下加入 0.5mg·L⁻¹ 硝普钠溶液,继代间隔期可以延长至 180d

关键词:组培快繁 离体保存 山银花 硝普钠

中图分类号: Q94-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2008)03-0304-05

Abstract Using tender stems as explants, experiments were conducted to study the effects of media and exogenous hormones on inducement, differentiation, proliferation of *Lonicera confusa* DC., and to establish its regeneration system. Meanwhile, the impacts of media on in vitro preservation when the temperature was 15~ 20℃ were investigated. According to the results, the axillary buds could be well induced on the medium MS+ 6-BA0.5 mg·L⁻¹+ IBA0.1 mg·L⁻¹, on which they began to bourgeon after 7 days, with 90% inducement rate after 15 days. On N68 medium with 6-BA0.4 mg·L⁻¹ and IBA0.4 mg·L⁻¹, the propagation coefficient was 5.0 times every 30 days, and elongation and proliferation of buds were promoted while preventing their leaves from etiolating and falling off. The ideal rooting medium was 1/2MS+ IBA0.2 mg·L⁻¹, on which rooting rates were 95% after 30 days. Being cultured on the preservation medium 1/2MS+ sucrose 20 g·L⁻¹, 0.5 mg·L⁻¹ sodium nitropruside was added after 30 days in asepsis condition, the single caudexs could be cultivated for 180 days without being transfered.

Key words tissue culture and rapid-proliferation, in vitro preservation, *Lonicera confusa* DC., sodium nitropruside

山银花 (*Lonicera confusa* DC.) 又称华南忍冬、山金银花、土忍冬,为多年生木质藤本,主要产于四川、广东、广西等省区,是华南地区金银花药材的主要来源,其药材应用范围非常广泛,具有清热解毒、凉散风热之功效,主治痈肿、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症,应用历史十分悠久^[1]。山银花药材除了传统疗效外,还是预防和治疗“非典”的良

药。同时,山银花也是重要的岩溶生态恢复物种^[2],为广生态幅植物,其根系发达,适应性强,具有抗旱、耐涝、耐寒、耐瘠薄等特点,在石漠化地区存活力强,对小气候具有良好的调节作用;其外形娇美,花形俊雅,香气清新宜人,枝叶经修剪后可以作为绿篱和庭院花卉植物。山银花是一种药用、生态和观赏兼备的植物。

目前,对山银花的化学成分、药理作用、提取工艺、临床应用、质量标准及检测方法等方面已有一些研究^[3,4]。但是山银花离体繁育方面的报道较少,仅见陈巧玲等^[5]对其愈伤和侧芽的诱导进行简短报道,

收稿日期: 2008-02-21

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

* 通讯作者。

而且她们的试验以研究愈伤为重点,未能解决愈伤组织难以继代诱导的问题。随着近几年来江西、广东、广西、贵州、四川、重庆等省市山银花栽培的迅速发展,快速的规模化种植与常规扦插、压条和种子繁殖周期长之间的矛盾显得日益突出。因此,我们进行山银花组培快繁技术和保存方法的研究,以期在短期内提供大量优质苗木,规模化生产种苗,以及优良种质资源的长期保存提供理论和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及其处理

山银花外植体于2005年采自广西植物园药材种质圃。于5~6月,选择晴好天气采集新萌发的山银花粗壮嫩枝,用自来水冲洗干净后,再在超净工作台内进行无菌操作,先放入75%酒精中浸泡30s后,转入1.0g·L⁻¹ HgCl₂溶液中消毒6min,无菌水冲洗5遍后,将材料切成长1.5~2.0cm带腋芽或顶芽的小段,接入初代诱导培养基中培养。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 组培快繁培养基

根据试验目的所选用的基本培养基分别为MS、1/2MS、1/3MS、N68、White无机盐培养基,植物生长调节剂为6-BA(6-Benzyl-aminopurine or kinetin)、IBA(Indolebutyric acid)、NAA(Naphthaleneacetic acid)、2,4-D(2,4-Dichlorophen-oxycetic acid)、BR(Brassinolide),并附加30g·L⁻¹或20g·L⁻¹的蔗糖和6.0g·L⁻¹的琼脂粉,pH值调至5.8,配制分装后于温度121℃,压力1.1kg·cm⁻²的条件下灭菌20min备用。

1.2.2 离体保存培养基

基本培养基使用MS、1/2MS、1/4MS三种无机盐水平,添加20g·L⁻¹的蔗糖和6.0g·L⁻¹的琼脂粉,pH值调至5.8,将配制好的培养基分装于容量200ml的玻璃瓶中,每瓶装培养基50ml,在121℃,压力1.1kg·cm⁻²下灭菌20min后备用。

1.2.3 培养条件

表1 激素对山银花诱导芽的影响

Table 1 Effect of hormone combinations on the buds inducement of *Lonicera confusa* DC

激素组合 Hormone combinations (mg·L ⁻¹)	接种外植体数(个) Number of explants (No.)	培养时间 Culture time (d)	新芽数(个) No. of shoots (No.)	芽诱导率 Induce-ment rate(%)	愈伤大小 Size of callus	生长状况 Growth status
I: 6-BA 0.2+ IBA 0.1	20	15	18	45	大 Big	一般 Moderate
II: 6-BA 0.5+ IBA 0.1	20	15	36	90	小 Small	良好 Good
III: 6-BA 1.0+ IBA 0.1	20	15	38	95	小 Small	一般 Moderate

培养室光照度保持在1800~2000Lx,光照时间为12~14h·d⁻¹,组培快繁时控制温度为(25±3)℃,种质离体保存时控制温度为15~20℃。

1.3 离体保存和恢复生长实验方法

选取生长基本一致的山银花继代试管苗(2cm左右)剪成单株接入保存培养基,每瓶接种4~5株,每个处理接种10瓶。培养30d时在培养基中加入不同浓度的无菌硝普钠(Sodium nitropruside, SNP)溶液,继续保存培养,定期进行存活率的统计和综合观测生长情况。

植株的所有叶片和茎尖全部变黄枯萎的作死亡计算,存活率=存活外植体数/(总接种外植体数-污染外植体数)×100%,试管苗存活率仅统计接种母株。

将保存180d后存活的芽苗或绿色的茎芽转接到继代增殖和生根培养基上进行正常培养,观察恢复生长的情况。

2 结果与分析

2.1 组培快繁研究

2.1.1 芽的分化诱导

在MS培养基中添加的细胞分裂素和生长素的浓度对山银花初代芽的萌发和芽苗的质量非常重要。经过多次试验发现,6-BA浓度范围为0.2~1.0mg·L⁻¹时均能诱导新芽生长,较低浓度的IBA(≤0.1mg·L⁻¹)利于初代芽的形成和生长。由表1结果可知,当6-BA浓度为0.2mg·L⁻¹的I号激素组合时,芽诱导率相对低,在诱导新芽生长的同时诱导出的愈伤也较大,但是诱导出来的愈伤组织难以继续增殖和分化出芽。当6-BA浓度为1.0mg·L⁻¹的III号激素组合时,出芽率较其他激素组合高,为95%,但是芽生长速度和健壮情况一般。综合观测在不同激素组合下诱导芽的频率和芽的生长情况后发现,激素组合II更利于形成健壮的芽苗,生长速度较快,出芽率也比较高。

2.1.2 芽的继代增殖

选取初代诱导出的粗壮无菌茎芽接种到增殖培养基上, 10d后可以看见不定芽萌发, 30d时的观测结果表明, 当以MS为基本培养基时, 激素组合为6-BA 1.0 mg L⁻¹ + IBA 0.1 mg L⁻¹和6-BA 0.4 mg L⁻¹ + IBA 0.4 mg L⁻¹培养基的芽苗最高, 分别为4~6cm和3~7cm。但是比较所诱导出的芽苗的粗壮度时, 6-BA 0.4 mg L⁻¹ + IBA 0.4 mg L⁻¹明显优于其他激素组合, 芽增殖倍数也较高(表2图1); 观察继代培养芽苗的生长情况时发现, 当激素组合中6-BA浓度高于0.4 mg L⁻¹时, 芽苗出现落叶现象, 并随着6-BA浓度的升高, 落叶更加明显, 芽苗质量差。同时, IBA浓度也不能高于0.4 mg L⁻¹, 高浓度IBA容易使芽死亡。另外, 不同基本培养基对芽苗的落叶和死亡情况和芽粗壮度等也有较大的影响, 在所试验的几种基本培养基中, 以N68最好, 所诱导出来的芽

表2 基本培养基及激素对山银花芽继代增殖影响

Table 2 Effect of media and hormones on the buds' proliferation of *Lonicera confusa* DC

基本培养基 Basic medium	激素组合 Hormone combinations (mg L ⁻¹)	培养时间 Culture time(d)	接种芽数(个) Number of inoculation (No.)	芽增殖倍数 Coefficient of proliferation	芽高 Height of buds (cm)	愈伤多少 Number of callus	落叶程度 Defoliation grade	芽粗壮度 Status of buds
MS	6-BA0.2+ IBA0.1	30	20	3.9	2~5	少 A few	+	中等 Intermedial
MS	6-BA0.4+ IBA0.1	30	20	3.5	1~6	少 A few	+	中等 Intermedial
MS	6-BA0.8+ IBA0.1	30	20	4.5	3~6	少 A few	++	中等 Intermedial
MS	6-BA1.0+ IBA0.1	30	20	5.0	4~6	少 A few	++	中等 Intermedial
MS	6-BA0.4+ IBA0.2	30	20	3.6	1~6	少 A few	+	中等 Intermedial
MS	6-BA0.4+ IBA0.4	30	20	4.2	3~7	少 A few	+	粗壮 Strong
1/2MS	6-BA0.4+ IBA0.4	30	20	4.4	2~6	少 A few	+	中等 Intermedial
1/3MS	6-BA0.4+ IBA0.4	30	20	3.8	2~6	少 A few	+	中等 Intermedial
N68	6-BA0.4+ IBA0.4	30	20	5.0	4~5	少 A few	-	粗壮 Strong
White	6-BA0.4+ IBA0.4	30	20	1.0	1~3	少 A few	+++	弱小 Weak

+++ : 严重, ++ : 中度, + : 轻微, - : 不落叶。+++ : Severity, ++ : Intermedial, + : Gently, - : No defoliation.

表3 不同培养基对试管苗生根的影响

Table 3 Effect of different media on roots formation of the tube plantlets

培养基 Medium (mg L ⁻¹)	生根率 Rooting rate(%)	单株主根数(条) Average amount of taproots(piece)	平均根长 Average length of roots(cm)	主根粗壮度 Taproot status	芽苗生长情况 Growth status
1/2MS+ NAA0.2	75	2.5	2.0	中 Intermedial	一般 Moderate
1/2MS+ IBA 0.2	95	2.0	2.5	粗 Strong	好 Good
1/2MS+ 2,4-D0.2	75	1.0	3.0	粗 Strong	一般 Moderate
1/2MS+ BR0.2	30	2.0	2.0	细 Weak	差 Bad

苗较粗壮, 叶片色泽翠绿, 无脱落。MS 1/2MS 1/3MS培养基上试管苗生长差别不明显。White培养基最差, 芽苗落叶明显, 大量死亡(图2)。综合基本培养基和激素浓度, 山银花芽的继代增殖最佳培养基配方应为 N68 6-BA 0.4 mg L⁻¹ + IBA 0.4 mg L⁻¹。

2.1.3 试管苗的生根

将生长健壮的芽苗转接到含不同生长素的1/2MS培养基上, 培养30d后观测试管苗的生根及芽苗的生长结果见表3。从表3可以看出, 在生长素为IBA 0.2 mg L⁻¹培养基上的苗生根率最高, 达95%, 每株苗基部长出主根2~3条, 初始为白色, 后转为浅绿色, 根系粗壮, 侧根较多(图3)。NAA和2,4-D生根效果一般。BR最差, 生根率最低, 根系和植株也最差, 不利于壮苗。综合根的发生率、粗壮度和苗的质量可知, 生长素 IBA 0.2 mg L⁻¹最适合于山银花根的发生及生长。



图1 继代增殖培养结果

Fig. 1 The result of subculture

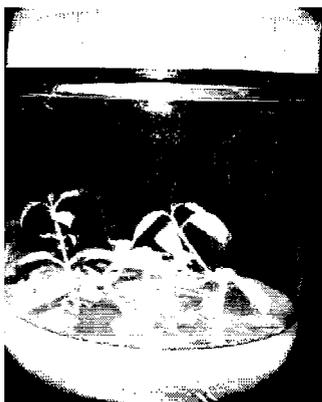


图2 培养过程中出现的死叶现象

Fig. 2 Etiolating and falling off of the leaves

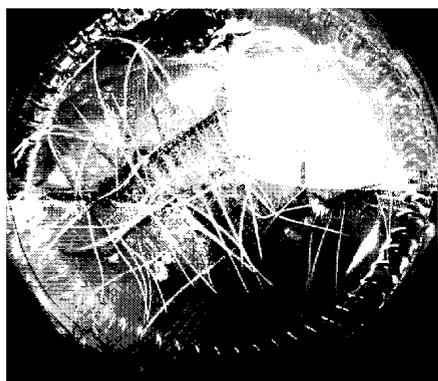


图3 生根培养结果

Fig. 3 The result of roots

2.1.4 试管苗的移栽

当根系和上部芽苗生长健壮后,于室内打开瓶盖炼苗3d,洗净根部的培养基后转入大棚中,移栽到已消毒的营养土中培养,移栽后浇透水,保持棚内温度为18~25℃和相对湿度80%以上,移栽成活率达90%。

2.2 离体保存研究

不加硝普钠时,山银花试管苗在3种无机盐水平培养基上培养30d时均能较好的生长,植株色泽绿,长势旺;90d时已出现一定程度的老化,表现为茎段略发黄,少部分叶片发黄脱落,120d之后芽苗逐渐失

绿死亡,存活率为1/2MS>1/4MS>MS,均小于50%,不适于继续保存(表4)。当向3种无机盐水平培养基中加入硝普钠后,苗茎明显较粗壮,叶片较大,颜色变深绿,但是不同培养基上山银花的存活率随硝普钠浓度变化出现较大的差异,当硝普钠浓度为0.2 mg·L⁻¹时,保存培养180d,以1/4MS无机盐水平培养基的存活率最高,为42%,单株苗老化程度也最轻,茎段略发黄,只有部分叶片发黄萎蔫;当硝普钠浓度为0.5 mg·L⁻¹时,以1/2MS无机盐水平培养基的保存效果最好,试管苗一直生长缓慢,能长时间保持健壮,180d时的存活率为50%(表4)。因此,综合存活率和生长情况,利于山银花试管苗保存的基本培养基为1/2MS,硝普钠浓度为0.5 mg·L⁻¹。

表4 不同培养基对山银花离体保存的影响

Table 4 Effects of media on the preservation of *Lonicera confusa* DC.

培养基 Medium	SNP (mg·L ⁻¹)	存活率 Survival rate(%)			生长情况 Growth situation
		90d	120d	180d	
	0	87	30	0	细弱,全部死亡 Plantlets were thin and all dead
1/4MS	0.2	90	70	42	粗壮,老化慢 Plantlets were strong and senesced slowly
	0.5	86	60	37	粗壮,老化慢 Plantlets were strong and senesced slowly
	0	83	40	0	细弱,全部死亡 Plantlets were thin and all dead
1/2MS	0.2	67	67	22	粗壮,老化较慢 Plantlets were strong and senesced slowly
	0.5	88	80	50	粗壮,老化慢 Plantlets were strong and senesced slowly
	0	82	19	0	细弱,全部死亡 Plantlets were thin and all dead
MS	0.2	86	53	25	粗壮,老化快 Plantlets were strong and senesced fastly
	0.5	90	33	25	粗壮,老化快 Plantlets were strong and senesced fastly

将在1/2MS附加0.5 mg·L⁻¹硝普钠培养基上保存180d后存活下来的植株,转接到继代增殖培养基上,能很快形成丛生芽,植株生长旺盛,形态正常。转接到生根培养基上,同样能很好的生根,形成完整植

株,增殖速率和生根率与未经保存的正常继代试管苗无明显差异

3 讨论

3.1 山银花离体快繁的影响因素

在离体条件下,植物组织良好生长的营养要求,随着植物种类不同而变化。在山银花组织培养中发现,以 MS 1/2MS 1/3MS无机盐水平为营养添加一定的植物激素,能诱导出芽,促进芽苗长高,但是在培养的过程中,芽苗生长还出现一定程度的落叶现象,以 White为无机营养添加同样的植物激素时,效果最差,不能诱导芽苗增殖生长,这些都是培养中无机营养不适应的结果,当转变基本培养基为 N6时,能较好的适应芽苗的继代生长,显著提高芽苗的健壮度,培养中未出现落叶的现象。

培养基中添加的细胞分裂素和生长素的浓度对芽苗的质量同样非常重要。经过一系列的修正试验后我们得出,在山银花芽的初代诱导时,6-BA的使用浓度为 0.5 mg L^{-1} ,浓度过高时芽苗质量下降。在对芽苗诱导分化和增殖时,6-BA与 IBA搭配使用时的浓度都为 0.4 mg L^{-1} ,高于这一浓度则容易导致落叶和芽苗死亡。可见,山银花继代增殖中出现的落叶现象不仅与培养基中无机盐含量有关,还与培养基中添加的细胞分裂素和生长素的浓度有关。这是因为不同的外源激素浓度能引起内源激素的变化,进而导致不同的形态发生^[6-8]。

3.2 山银花离体保存的适合条件

当营养充足,温湿条件适宜时,山银花试管苗生长快速,一般30d左右需要继代1次,单代培养时间不超过90d。本实验在培养过程中加入硝普钠作为植株老化缓解剂的效果十分明显,能够使单代培养时间增加到180d,转继代后活力未出现退化现象。这可能是因为在培养过程中硝普钠释放出信号物质NO,改变了离体条件下山银花正常的衰老进程^[9-11]。不仅如此,本实验加入硝普钠后,植株色泽更绿。这与樊怀福等^[12]发现的硝普钠能够提高胁迫条件下幼苗叶片叶绿素含量的结论相符合。但是,本实验在培养后期还出现部分添加硝普钠后的培养基易变成深绿色,具体机理有待进一步的研究。

本实验以 MS White为无机营养培养山银花试管苗时出现的叶片发黄脱落症状与保存后期出现的老化现象有些相似,今后的研究工作中可以尝试用 N6结合硝普钠对试管苗保存培养,进行进一步的优化研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志: 第七十二卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 238.
- [2] 何成新, 黄玉清, 李先琨, 等. 岩溶石漠化地区几种生态恢复植物的生理生态学特征 [J]. 广西植物, 2007, 27(1): 53-61.
- [3] 柴兴云, 李萍, 唐力英. 山银花化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 865-867.
- [4] 耿世磊, 徐鸿华, 赵晟, 等. 山银花茎、叶、花中绿原酸分布规律研究 [J]. 中草药, 35(3): 315-318.
- [5] 陈巧玲, 刘伟, 孔令明. 山银花的离体培养 [J]. 2005年全国植物生长物质研讨会论文摘要汇编, 2005: 100.
- [6] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 1999: 156.
- [7] 陶静, 詹亚光, 由香玲, 等. 白桦组培再生系统的研究III: 组培过程中内源激素的变化 [J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(6): 6-9.
- [8] 田长思, 叶蕙. 甜瓜子叶离体培养不定根发生过程多胺和可溶性蛋白含量以及过氧化物酶活性的变化 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 43(2): 105-107.
- [9] Ribeiro Jr E A, Cunha F Q, Tamashiro W M, et al. Growth phasedependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells [J]. FEBS Lett, 1999, 445: 283-286.
- [10] DelRio L A, Corpas F J, Arroso J B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 783-792.
- [11] He Y K, Zhang F X, Liu Y Z, et al. Nitric oxide: a new growth regulator in plants [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(5): 325-332.
- [12] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 等. 外源一氧化氮对 NaCl胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响 [J]. 生态学报, 2007, 27(2): 546-553.

(责任编辑: 邓大玉)