

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.002

姚绍嫦, 谢月英, 黄雪彦, 等. 广西五种绞股蓝属植物离体快繁与种质保存研究[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 436-441

Yao SC, Xie YY, Huang XY, et al. Study on rapid propagation and germplasm conservation *in vitro* of five species of genus *Gynostemma* in Guangxi[J].*Guihaia*, 2014, 34(4): 436-441

# 广西五种绞股蓝属植物离体快繁与种质保存研究

姚绍嫦<sup>1</sup>, 谢月英<sup>1,2</sup>, 黄雪彦<sup>1,2</sup>, 余丽莹<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西药用植物园, 南宁 530023; 2. 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023)

**摘要:** 以绞股蓝属植物的带芽茎段为材料, 研究不同 6-BA 浓度与 NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 组合对其诱导、分化和增殖的影响, 并建立离体快繁体系。结果表明: MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 最适宜初代诱导, MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 最适合扁果绞股蓝的增殖培养, 而 MS+6-BA 1.5 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 是其它四种植物增殖的最佳培养基, 在 1/2MS+NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 上的生根率均达 100%。1/2MS 与蔗糖 40 g · L<sup>-1</sup> 对五种植物的保存效果均最好; 添加生长抑制剂能有效减缓生长速度, 最佳生长抑制剂为 ABA 和 CCC, 浓度均为 1.0 mg · L<sup>-1</sup>, 其中 CCC 能适合多个物种, 连续保存 360 d 的存活率均在 94.5% 以上; PP<sub>333</sub> 不适合五种植物的保存。活力检测表明, 各种质经保存后增殖、生根能力均未下降。

**关键词:** 绞股蓝; 扁果绞股蓝; 广西绞股蓝; 光叶绞股蓝; 长梗绞股蓝; 组织培养; 离体保存

**中图分类号:** Q943.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3142(2014)04-0436-06

## Study on rapid propagation and germplasm conservation *in vitro* of five species of genus *Gynostemma* in Guangxi

YAO Shao-Chang<sup>1</sup>, XIE Yue-Ying<sup>1,2</sup>, HUANG Xue-Yan<sup>1,2</sup>, YU Li-Ying<sup>1,2\*</sup>(1. *Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant*, Nanning 530023, China; 2. *Guangxi key Laboratory of medicinal Resources conservation and Genetic Improvement*, Nanning 530023, China)

**Abstract:** Using stem with buds as explants, experiments were conducted to observe the effects of different concentration 6-BA and NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> on induction, differentiation, proliferation of *Gynostemma* in Guangxi, in order to establish their rapid propagation systems. Meanwhile, different concentrations of the mineral nutrition, sucrose and plant grow inhibitors (CCC, ABA, PP<sub>333</sub>) were researched. The results showed that the best induction medium was MS medium supplemented with 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.02 mg · L<sup>-1</sup> NAA. The suitable proliferation medium for *G. compressum* was MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> and MS medium supplemented with 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA was best for others. The rooting medium was 1/2MS medium with 0.02 mg · L<sup>-1</sup> NAA, accounting for 100% of rooting rate. 1/2MS medium and sucrose 40 g · L<sup>-1</sup> were the most suitable for the conservation *in vitro* of all species. Plant grow inhibitors could slow down the grow speed effectively, and the best kind and concentration were ABA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> and CCC 1.0 mg · L<sup>-1</sup>. Several species were inhibited by CCC 1.0 mg · L<sup>-1</sup> and the survival rate was up to 94.5% after being conserved 360 d. PP<sub>333</sub> was not suitable for all species to conserve *in vitro*. Vigor testing showed that the ability of propagating and rooting of the plantlets didn't fall down.

**Key words:** *Gynostemma pentaphyllum*; *G. guangxiense*; *G. compressum*; *G. laxum*; *G. longipes*; tissues culture; conservation *in vitro*

收稿日期: 2013-10-14      修回日期: 2013-12-08

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 111107010-3-3)

作者简介: 姚绍嫦(1980-), 女, 广西容县人, 硕士, 高级工程师, 主要从事药用植物组织培养及离体保存技术研究, (E-mail) yaoshaochang@163.com.

\*通讯作者: 余丽莹, 研究员, 主要从事中药资源与物种保育研究, (E-mail) yuliyang@vip.sina.com.

全世界已知绞股蓝属(*Gynostemma*)植物有 17 种,我国产 14 种 2 变种,其中 9 种为中国特有种(Wu *et al.*, 2011),多数记载有药用功效,含有近 100 种皂甙、黄酮、氨基酸和多种微量元素,具有改善血脂代谢,降低血脂血糖水平,延长细胞寿命,抗疲劳、抗氧化、抗肿瘤等作用(Samer *et al.*, 2006; Shang *et al.*, 2006; 杨明辉等, 2006)。目前用于医药、饮料食品、化妆品、保健烟的开发和生产,具有成熟的市场和较好的开发前景。绞股蓝属植物在中国主要分布于云南、广西等西南地区,其中广西分布五种,仅次于云南省。在广西,除绞股蓝(*G. pentaphyllum*)和光叶绞股蓝(*G. laxum*)为广布种外,扁果绞股蓝(*G. compressum*)、广西绞股蓝(*G. guangxiense*)和长梗绞股蓝(*G. longipes*)均为广西特有或中国特有植物(陈秀香等, 2009)。

绞股蓝属植物在自然条件下以营养繁殖为主,易感染病虫害,易与同属物种杂交,导致种质退化(刘敏华等, 2001)。国内外学者先后对绞股蓝(刘松青等, 2000; Chen *et al.*, 2005)、广西绞股蓝(刘世彪等, 2012)、五柱绞股蓝(*G. pentagynum*) (刘世彪等, 2007)有一定研究,但迄今仍未见光叶绞股蓝、扁果绞股蓝和长梗绞股蓝等在组培快繁方面的研究报告。20 世纪 50~60 年代,植物组织培养技术开始出现,并得到不断完善和发展。而离体保存(*conservation in vitro*)通过植物组织培养技术实现了种质资源的异地保存。在药用植物种质离体保存中,为避免试管苗频繁继代造成污染和种质变异及流失,降低费用和劳动力的消耗,通常通过调整培养基养分水平、添加生长抑制物质等(周逊等, 2008)限制试管苗生长的方法来延长继代间隔的时间和减少继代的次数,如广西地不容(付传明等, 2007)、巴戟天(李锋等, 2008)、铁皮石斛(史永忠等, 1999)等。本研究在成功建立绞股蓝属五种植物组培快繁技术的基础上,采用限制生长法,通过调整培养基养分、渗透压和添加植物生长抑制剂,掌握最适合绞股蓝属五种植物试管苗保存的培养基配方,为实现种质资源的中长期保存与可持续利用提供相关技术,指导绞股蓝属其它物种离体种质保存。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

绞股蓝、光叶绞股蓝、扁果绞股蓝、广西绞股蓝

和长梗绞股蓝,外植体均于 2010—2011 年采自广西药用植物园绞股蓝种质保存圃。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 离体快繁研究

(1) 无菌材料的获得:在晴好的天气采集新萌发的粗壮嫩枝,自来水冲洗干净后,在超净工作台内进行灭菌,用 75% 酒精中浸泡 10 s 后,转入 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液中消毒 6 min,无菌水冲洗 5 遍后,将材料切成长 1.5~2.0 cm 带腋芽或顶芽的茎段,接入初代培养基中培养。

(2) 初代培养:将茎段接种到 MS+不同浓度 6-BA+NAA 0.02  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的初代培养基上,50 瓶/处理,1 芽/瓶,观察记录诱导情况,30 d 时统计芽诱导率,筛选适合各物种初代诱导的培养基。

(3) 继代增殖培养:将初代培养获得的不定芽切下单个芽,转接到 MS+不同浓度 6-BA+NAA 0.02  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的继代培养基中进行增殖培养,20 瓶/处理,3 芽/瓶,观察记录不定芽的生长情况,20 d 时统计观察增殖系数,并筛选各物种继代增殖的最佳培养基。

(4) 生根培养:继代芽苗高长至 2 cm 以上时,从基部切成单个芽,转接到生根培养基 1/2MS+NAA 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  中,20 瓶/物种,2 芽/瓶。观察记录不定芽的生根情况,20 d 时统计生根率。

(5) 培养条件:培养基附加蔗糖 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 值 5.8。培养室温度(26±2)°C、光照强度 3 000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 12 h/d。

#### 1.2.2 离体种质保存研究

(1) 不同无机盐浓度对保存的影响:分别以 MS、1/2 MS、1/4 MS、1/6 MS 为培养基,不添加任何生长调节剂。将从芽切成两叶一心高度一致的单芽进行接种,20 瓶/处理,3 芽/瓶,培养基附加蔗糖 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 值 5.8。培养 180、270、360 d,比较不同无机盐浓度对保存的影响。

(2) 不同蔗糖浓度对保存的影响:采用 1/2MS 为培养基,分别附加 0、20、40、60  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的蔗糖,不添加任何生长调节剂。将从芽切成两叶一心高度一致的单芽进行接种,20 瓶/处理,3 芽/瓶,培养基附加琼脂 5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 值 5.8。培养 180、270、360 d,比较不同蔗糖浓度对保存的影响。

(3) 不同植物生长延缓剂对保存的影响:以 1/2MS 为基本培养基,分别添加不同浓度的矮壮素(Chlormequat chloride, CCC)、多效唑(Pa-

clobutrazol, PP<sub>333</sub>) 和脱落酸 (abscisic acid, ABA), 将丛芽切成两叶一心高度一致的单芽进行接种, 20 瓶/处理, 3 芽/瓶, 培养基附加蔗糖 40 g · L<sup>-1</sup>, 琼脂 5 g · L<sup>-1</sup>, pH 值 5.8。培养 360 d 比较不同植物生长延缓剂对保存效果的影响。

(4) 保存条件及观察记录: 培养室温度 (20 ± 2) °C、光照强度 2 000 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>、光照时间 10 h/d。每隔 90 d 观察统计植株生长情况、生根情况及存活率。

(5) 保存种质的活力检测: 将保存 360 d 存活的材料转接到继代增殖和生根培养基上, 观察恢复生长的情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 高频再生体系研究

2.1.1 初代培养 由表 1 可知, 不同浓度的 6-BA 均能使带腋芽茎段诱导出丛生芽, 但芽诱导率各异。培养 7 d 左右, 接触培养基的部分开始出现少量愈伤组织, 且腋芽开始恢复生长。培养 10~15 d 时, 在叶腋处诱导出具有 4~5 个小芽的丛生芽。切口处出现的少量愈伤组织不分化形成芽。培养 20~25 d 时, 形成 3~5 cm 高的丛生芽丛。当 6-BA 为

2.0 mg · L<sup>-1</sup> 时, 丛生芽的诱导率最高, 除广西绞股蓝外, 其它物种的诱导率均达 100%, 且所需的时间最短, 芽生长速度快, 无玻璃化现象。但当 6-BA 浓度进一步增加到 2.5 mg · L<sup>-1</sup> 时, 诱导率呈下降趋势, 广西绞股蓝和长梗绞股蓝开始出现玻璃化现象。因此 MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 是对五种植物均适宜的初代诱导培养基。

2.1.2 继代增殖培养 将初代培养的丛芽切成带单芽、长约 1 cm 茎段, 接种于添加 0.5~2.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.02 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的 MS 培养基中, 培养 20 d 结果表明 (表 2): 各处理均能促进芽增殖, 同一物种各处理间的差异达到显著水平 ( $P < 5\%$ )。6-BA 浓度为 1.5~2.0 mg · L<sup>-1</sup> 增殖较快, 各物种的增殖系数均超过 6.67, 其中绞股蓝的最高 (14.24)。当 6-BA 浓度为 1.5 mg · L<sup>-1</sup>, 除扁果绞股蓝外, 其它的物种均获得最高的增殖系数 (图 1; A-E)。当 6-BA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, 扁果绞股蓝获得最高的增殖系数 (10.86), 其它物种的增殖系数反而降低。当 6-BA 浓度为 2.5 mg · L<sup>-1</sup>, 各物种的增殖系数均进一步降低。因此, MS+6-BA 1.5 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 是绞股蓝、光叶绞股蓝、广西绞股蓝和长梗绞股蓝增殖的最适培养基, 而 MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup> 最适于扁果绞股蓝。

表 1 不同质量浓度 6-BA 对绞股蓝属五种植物丛生芽诱导的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on cluster buds inducing on five species of *Gynostemma*

6-BA 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	芽诱导率 Rate of buds induced (%)				
Concentration of 6-BA	Concentration of NAA	绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	光叶绞股蓝 <i>G. laxum</i>	扁果绞股蓝 <i>G. compressum</i>	广西绞股蓝 <i>G. guangxiense</i>	长梗绞股蓝 <i>G. longipes</i>
0.5	0.02	83.33	66.67	50.00	40.00	31.54
1.0	0.02	100.00	80.00	63.33	66.67	53.67
1.5	0.02	100.00	86.67	83.33	76.67	86.67
2.0	0.02	100.00	100.00	100.00	86.67	100.00
2.5	0.02	100.00	93.33	96.67	80.00	71.33

2.1.3 生根培养 绞股蓝属植物试管苗均较易生根, 绞股蓝等五种植物在 1/2MS+NAA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 的培养基上均可长根, 且根数量较多, 粗壮, 生长快, 分叉多, 叶片平展浓绿, 有利于试管苗的移栽 (图 1; F)。不同物种之间生根情况无明显差别。

### 2.2 离体种质保存研究

2.2.1 不同无机盐浓度对保存的影响 在不添加植物生长调节剂的情况下, 观察发现各物种对于无机盐浓度的需求规律呈现一致的趋势 (表 3)。保存 180 d 时, 各物种在 MS 和 1/2MS 这两种无机盐营养水平下的保存效果差异不大, 植株生长都较高大,

叶色绿, 生长较好, 存活率均在 90% 以上, 而当无机盐浓度降至 1/4MS 和 1/6MS 时, 各物种均表现出植株纤细, 叶色发黄, 逐渐死亡的现象。继续保存至 270 d 与 360 d, MS 和 1/2MS 均有存活的植株, 但从存活率来看 1/2MS 对保存最好。

2.2.2 不同蔗糖浓度对保存的影响 从表 3 看出, 不同物种对蔗糖浓度的要求无明显差别, 随着蔗糖浓度的增加存活率均呈先上升后下降的趋势, 当蔗糖浓度为 40 g · L<sup>-1</sup> 时保存 180 d 均达到了最高的存活率 (100%), 继续保存至 270 d 与 360 d 时, 存活率一直保持最高。当蔗糖浓度增加到 60 g · L<sup>-1</sup> 时, 各物

表 2 不同质量浓度 6-BA 对绞股蓝属五种植物丛生芽增殖的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA on cluster buds inducing on five species of *Gynostemma*

6-BA 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of 6-BA	NAA 浓度 (mg · L <sup>-1</sup> ) Concentration of NAA	增殖系数 Proliferation coefficient				
		绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	光叶绞股蓝 <i>G. laxum</i>	扁果绞股蓝 <i>G. compressum</i>	广西绞股蓝 <i>G. guangxiense</i>	长梗绞股蓝 <i>G. longipes</i>
0.5	0.2	3.92e	1.67e	3.16d	1.67e	1.00e
1.0	0.2	6.50d	3.40d	2.53e	3.33d	6.33c
1.5	0.2	14.24a	10.54a	6.67b	12.16a	8.67a
2.0	0.2	13.18b	8.67b	10.86a	10.47b	7.67b
2.5	0.2	7.33c	6.98c	5.12c	8.00c	2.80d

注：同列数据后不同字母表示差异显著 ( $P < 5\%$ )。

Note: Data followed by different letters within same column are significantly different at 5% level.

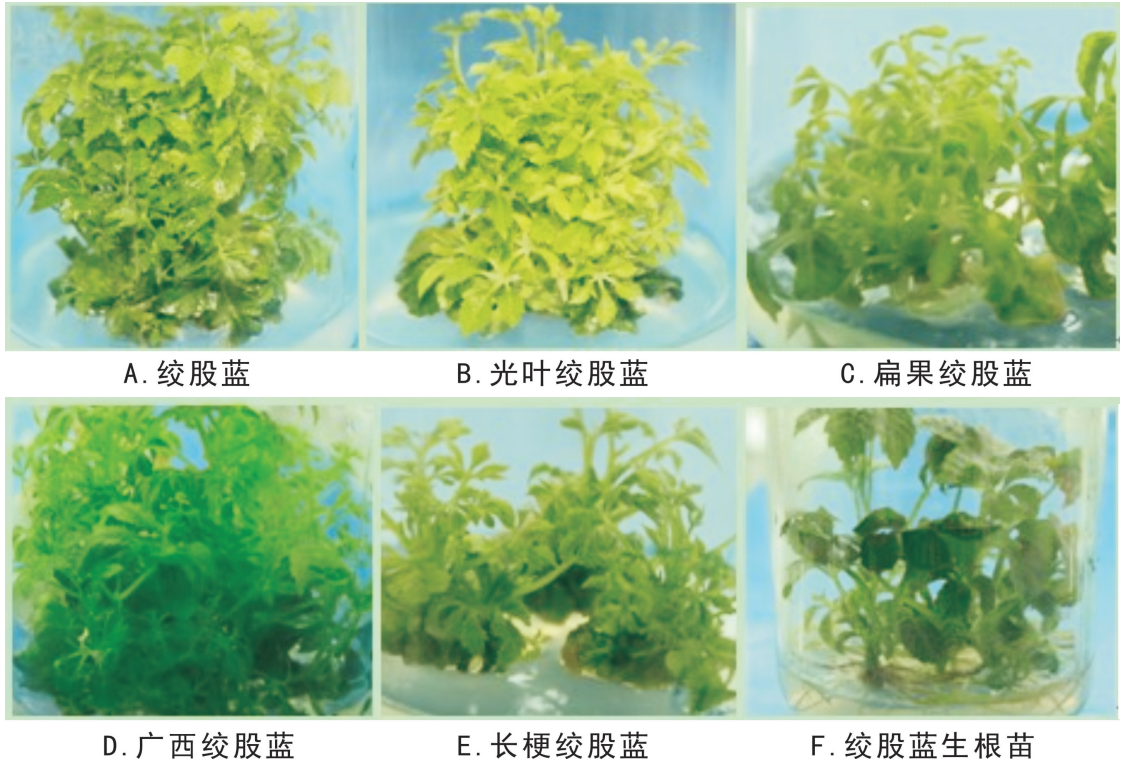


图 1 绞股蓝属五种植物丛生芽增殖与生根情况

Fig. 1 Cluster buds inducing on five species of *Gynostemma*

种的植株较矮小，叶色浓绿而且叶缘出现皱缩，存活率均反而下降。在无蔗糖的培养基上，植株矮小细弱，不生长，叶色黄，180 d 时植株已全部死亡。因此，绞股蓝等 5 个不同物种在保存培养基中最适合的蔗糖浓度为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 植物生长延缓剂对保存的影响 经植物生长延缓剂处理的材料比未处理的生长速度明显减慢，在未添加延缓剂的 MS 培养基上，材料生长快，节间长，植株高，叶片由下部开始逐步往上变黄死亡，270 d 统计全部死亡。从表 4 看出，不同物种的存活率随  $\text{PP}_{333}$  浓度的增加均不断提高，随 CCC 和

ABA 浓度的增加均先提高再下降。当 CCC 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，不同物种的植株均生长缓慢，节间较短，叶片绿，存活率高，其中绞股蓝、光叶绞股蓝和广西绞股蓝保存 360 d 的存活率达 100%。当 ABA 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，不同物种的植株生长缓慢，叶浓绿，不定根较多，存活率在 88.4% 以上。添加  $\text{PP}_{333}$  虽然也能延缓试管苗的生长，但是与 CCC、ABA 相比效果较差，植株节间较短，侧根和根多且根发生畸形膨大，叶片皱缩、下垂，植株衰老较快，存活率较低。因此， $1/2\text{MS} + \text{ABA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  最适合扁果绞股蓝的保存，其它的品种在  $1/2\text{MS} + \text{CCC}$

表 3 不同浓度无机盐与蔗糖对绞股蓝属五种植物保存效果的影响

Table 3 Effects of different concentrations of the mineral nutrition and sucrose on conservation *in vitro* of five *Gynostemma* species

处理 Treatment		存活率 Survival rate (%)														
		绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>			光叶绞股蓝 <i>G. laxum</i>			扁果绞股蓝 <i>G. compressum</i>			广西绞股蓝 <i>G. guangxiense</i>			长梗绞股蓝 <i>G. longipes</i>		
		180 d	270 d	360 d	180 d	270 d	360 d	180 d	270 d	360 d	180 d	270 d	360 d	180 d	270 d	360 d
无机盐 Mineral nutrition	MS	100	68.3	6.8	100	57.3	9.3	100	51.8	13.7	100	36.7	0	100	42.5	16.7
	1/2MS	95	75.6	13.6	95	60.5	26.7	90	53.6	33.6	90	47.3	11.6	95	53.5	23.5
	1/4MS	74.5	33.6	0	66.8	0	0	67.3	0	0	56.4	0	0	58.2	0	0
	1/6MS	56.3	15.7	0	33.2	0	0	27.5	0	0	34.6	0	0	35.7	0	0
蔗糖 Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	94.2	0	0	68.2	0	0	75.9	0	0	77.1	0	0	65.5	0	0
	40	100	46.8	25.6	100	56.7	31.6	100	57.3	35.2	100	65.3	37.5	100	54.2	33.6
	60	87.9	32.4	13.3	78.2	48.4	17.2	88.2	50.6	20.5	82.5	38.4	18.4	83.1	36.8	15.7

表 4 CCC、PP<sub>333</sub>、ABA 对绞股蓝属五种植物离体保存的影响Table 4 Effects of CCC、PP<sub>333</sub>、ABA on conservation *in vitro* five *Gynostemma* species

种类 Type	浓度 Concentration (mg · L <sup>-1</sup> )	存活率 (360 d) (%)				
		绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	光叶绞股蓝 <i>G. laxum</i>	扁果绞股蓝 <i>G. compressum</i>	广西绞股蓝 <i>G. guangxiense</i>	长梗绞股蓝 <i>G. longipes</i>
对照(CK)	0	0	0	0	0	0
CCC	0.5	37.3	33.4	38.5	40.2	36.2
	1.0	100.00	100.00	86.9	100.00	97.4
	2.0	95.4	90.7	74.2	93.5	88.6
PP <sub>333</sub>	0.5	31.7	36.6	42.3	43.5	35.3
	1.0	58.1	69.2	66.7	56.2	74.5
	2.0	69.4	87.3	71.2	68.3	83.6
ABA	0.5	72.5	77.0	80.0	75.3	88.1
	1.0	90.3	88.4	94.5	86.3	91.2
	2.0	85.6	91.7	80.3	78.5	83.1

1.0 mg · L<sup>-1</sup>均达到最佳保存效果。

2.2.1 保存种质的活力检测 不同物种经 360 d 离体保存后其增殖系数和生根能力均未受显著影响, 继代第二代均能恢复原来水平。不同物种经 8~10 d 继代培养均开始恢复生长, 培养 20~25 d, 各物种的平均芽高为 4~5 cm, 增殖系数为 3~4, 再将芽进行第二次继代培养, 培养 20~25 d 时, 平均芽高 5~6 cm, 增殖系数在 7.4 以上, 达到了离体保存前的增殖水平。将材料转接到生根培养基后, 生根率均达 100%。因此, ABA、CCC 能用于绞股蓝等 5 个不同物种离体种质的中长期保存。

### 3 讨论与结论

NAA 0.02 mg · L<sup>-1</sup>最利于绞股蓝的丛生芽诱导及增殖(刘世彪等, 2012; 吴峰等, 2005)。本研究结果表明, 6-BA 浓度较高(1.5~2.0 mg · L<sup>-1</sup>), 且丛生芽诱导的 6-BA 浓度略高于增殖的, 获得较好的

诱导和增殖效果。另外, 除长梗绞股蓝的增殖系数较低(8.67)外, 其它四种的均超过 10, 其中以绞股蓝的最高(14.24), 大大超过了前人在绞股蓝组织培养上的增殖系数(6~8)。说明该属植物对 6-BA 比较敏感, 在一定范围内适当提高 6-BA 浓度可大大提高绞股蓝属植物的增殖系数。

植物生长发育依赖外界养分的供给, 如果养分供应不足, 植物生长缓慢, 植株矮小。采用降低培养基中的养分水平可有效地抑制细胞生长, 达到保存的目的。在红根草离体保存培养过程中, 分生组织培养的小植株在 1/2 培养基上保存 360 d 存活率仍达 67%(付传明等, 2007)。在铁皮石斛的保存过程中也出现了类似的现象(史永忠等, 1999)。本研究也证明了 1/2MS 培养基是绞股蓝属 5 个不同物种离体保存的最好培养基。

在离体保存过程中, 糖类物质除了可提供培养物生存和生长所需的碳源, 还可调节培养基的渗透压。培养基的渗透压较高时, 可抑制培养材料的生

长(潘瑞焱等, 1995)。在一定范围内, 蔗糖浓度越高, 试管苗保存效果越好(周逊等, 2008)。在不外加蔗糖保存材料时, 咖啡(Kartha, 1981)、铁皮石斛(史永忠等, 1999)等能长时间成活, 但试管苗素质差; 添加一定浓度蔗糖后, 能明显改善试管苗素质, 大大提高成活率。本研究不加蔗糖时, 5 个物种的试管苗均不生长, 且逐渐死亡; 在蔗糖浓度为  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  下试管苗生长健壮, 360 d 时存活率仍达 25%; 蔗糖浓度为  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 叶片下垂且皱缩, 叶色浓绿, 原因可能是高浓度的蔗糖导致培养基的渗透强度过大, 试管苗吸水困难, 说明此浓度不利于试管苗保存。

在培养基中添加适当的生长抑制剂, 能达到抑制试管苗生长的效果, 延长培养物的保存时间, 提高试管苗素质和促进试管苗转接后恢复(潘瑞焱, 2006)。本研究不添加生长抑制剂, 培养 270 d 时试管苗全部死亡。添加  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 CCC 或 ABA 时, 5 个物种保存 360 d 后存活率均在 86.3%, 原因可能是 CCC 与 ABA 能有效抑制细胞伸长生长而使植株变矮、茎秆变粗, 从而延长保存时间。

本研究通过比较绞股蓝等 5 个不同物种在组织培养与离体保存上的培养基配方, 发现除扁果绞股蓝略有不同外, 其它四种均可使用相同的培养基配方进行组培快繁与离体保存, 说明同属的不同植物之间种质差异不大, 现有的研究报道也表明五柱绞股蓝等绞股蓝属植物在组织培养上的培养基配方与本研究结果类似。因此, 本研究结果还可以用于指导绞股蓝属其它物种的组织培养与离体保存。

## 参考文献:

Chang CK, Chang KS, Lin YC, *et al.* 2005. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins[J]. *Biotechnol Letters*, **27**:1 165–1 169

Chen XX(陈秀香), Liang DR(梁定仁). 1993. Ecological distribution and resources utilization of genus *Gynostemma* in Guangxi (广西绞股蓝属的生态分布及资源利用)[J]. *Bot J South Chin*(华南植物学报), 试刊:31–33

Fu CM(付传明), Huang NZ(黄宁珍), Zhao ZG(赵志国), *et al.* 2007. Study on preservation of *Stephanie kwangsiensis* H. S. Lo *in vitro* (广西地不容种质离体保存技术研究)[J]. *Guangxi Sci*(广西科学), **14**(2):155–159

Kartha KK, Mroginski LA, Pahl KK, *et al.* 1981. Germplasm pres-

ervation of coffee(*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems[J]. *Plant Sci Letters*, **22**:301–307

Li F(李锋), Fu CM(付传明), Huang NZ(黄宁珍). 2008. Study on preservation *in vitro* of *Morinda officinalis* (巴戟天种质离体保存研究)[J]. *Guihaia* (广西植物), **28**(1):95–99

Liu MH(刘敏华), Liu GZ(刘桂芝), Liu Y(刘影). 2001. *Gynostemma pentaphyllum* (绞股蓝)[M]. Beijing(北京):China Press of Traditional Chinese Medicine(中国中医药出版社):25

Liu SB(刘世彪), Li XY(李馨芸), Long H(龙华), *et al.* 2012. Tissue culture and rapid propagation of *Gynostemma guangxiense* (广西绞股蓝的组织培养和快速繁殖)[J]. *Amino Acids & Biotic Resour*(氨基酸和生物资源), **34**(1):29–32

Liu SB(刘世彪), Tao M(陶民), Jiang YF(姜业芳), *et al.* 2007. Tissue culture and rapid propagation of *Gynostemma pentagynum* Z. P. Wang(五柱绞股蓝的组织培养和快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **43**(2):308

Liu SQ(刘松青), Wu CR(武成荣). 2000. Shoot tips culture and plants regeneration in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino *in vitro* (绞股蓝茎尖组织培养和植株再生研究)[J]. *Chin Wild Plant Resour*(中国野生植物资源), **19**(6):60–62

Pan RZ(潘瑞焱), Dong YD(董愚得). 1995. *Phytophysiology* (植物生理学)[M]. 3rd edition (第3版). Beijing(北京):Higher Education Press(高等教育出版社):225–233

Pan RZ(潘瑞焱), Ye QS(叶庆生). 2006. *The Physiology of Cymbidium* (国兰生理)[M]. Beijing(北京):Science Press(科学出版社):103–104

Samer M, Neal MD, Basil DR. 2006. Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the zucker fatty rat[J]. *J Pharm Pharmac Sci*, **9**(3):281

Shang LS, Liu JC, Zhu QJ, *et al.* 2006. Gypenosides protect primary cultures of rat cortical cells against oxidative neurotoxicity [J]. *Brain Res*, **11**(2):163

Shi YZ(史永忠), Pan RC(潘瑞焱), Wang XJ(王小菁), *et al.* 1999. *In vitro* conservation of germplasm at room temperature in *Dendrobium officinale* (铁皮石斛种质室温离体保存)[J]. *J South Chin Norm Univ: Nat Sci Edit* (华南师范大学学报·自然科学版), (4):73–77

Yang MH(杨明辉), Guo XL(郭晓兰), Yuan GH(袁国华), *et al.* 2006. Gypenosides induce apoptosis in human hepatoma cells (绞股蓝总皂甙对肝细胞瘤细胞凋亡的诱导作用)[J]. *World Sci Technol Modern Trad Chin Med Mat Med* (世界科学技术:中医药现代化), **8**(4):53

Wu F(吴峰), Gao W(高文). 2005. The optimization of medium of the tissue culture and rapid propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (绞股蓝组培快繁培养基优化)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **21**(7):70–72

Wu ZY, Peter HR. 2011. *Flora of China* [M]. Missouri Botanical Garden Press, **19**:11–15

Zhou X(周逊), Xiang CP(向长萍). 2008. Advance in slow growth conservation *in vitro* of plant (植物种质资源缓慢生长离体保存研究进展)[J]. *Chin Veget* (中国蔬菜), (11):39–42