

花蕾型金银花同源四倍体的诱导和鉴定

曹方莉, 王晓明^{2*}, 赵思东, 李永欣 (1. 中南林业科技大学, 湖南长沙410004; 2. 湖南省林业科学研究院, 湖南长沙410004)

摘要 [目的] 为选育金银花优良品种提供材料。[方法] 以当年生银翠蕾嫩枝茎段为外植体, 进行愈伤组织和不定芽培养, 对获得的不定芽采用秋水仙素浸泡法和培养基中添加秋水仙素法诱导多倍体, 并进行染色体鉴定。[结果] 染色体观察结果表明, 7:30 a.m. 取材, 用0.2%的秋水仙素溶液浸泡3 h, 用1.0 ml/L 盐酸溶液在60℃下处理18 min 的材料中, 中期细胞多, 染色体分散和着色均较好, 而且可以看到清晰的点状染色体。染色体鉴定结果表明, 秋水仙素浓度对多倍体诱导率有显著影响, 用0.4%秋水仙素浸泡16 h 的诱导率为50.0%, 在秋水仙素浓度为1.0 g/L 的培养基中培养8 d 的诱导率为43.8%。[结论] 该研究为金银花同源四倍体的诱导与鉴定提供了一定的试验依据。

关键词 银翠蕾; 同源四倍体; 诱导; 鉴定

中图分类号 S687.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03619-03

Induction and Identification of Autotetraploid of Honeysuckle with Bud Type

CAO Fangli et al (Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract [Objective] The aim was to provide material for breeding good varieties of honeysuckle. [Method] With the stem segments of one-year *Lonicera macranthoides* "silver-green" tender branches as explants, the tissue cultures of callus and adventitious bud were conducted. The polyploids were induced from the obtained adventitious buds by the methods of soaking in colchicine solution and adding colchicine into medium and their chromosomes were identified. [Result] The observation on the chromosome showed that in the material sampled at 7:30 a.m., soaked in 0.2% colchicine solution for 3 h and treated with 1.0 mol/L chloride acid solution at 60℃ for 18 min, there were many metaphase cells, in which the chromosome separated and was colored better and the clear dot chromosome could be seen. The results from chromosome identification showed that the colchicine concn. had significant effects on the induction rate of polyploidy. The induction rate of soaking in 0.4% colchicine solution for 16 h was 50.0% and that of culture in medium with 1.0 g/L colchicine for 8 d was 43.8%. [Conclusion] The research provided some experimental basis for the induction and identification of honeysuckle autotetraploid.

Key words *Lonicera macranthoides* "silver-green"; Autotetraploid; Induction; Identification

金银花为忍冬科忍冬属植物, 忍冬(*Lonicera japonica* Thurb) 及同属多种植物的干燥花蕾^[1], 包括忍冬、灰毡毛忍冬、山银花、红腺忍冬等。灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand. Mazz) 又名拟大花忍冬、大银花、岩银花等, 是忍冬科忍冬属多年生半常绿缠绕小灌木或直立小灌木植物, 在我国主要分布于湖南、湖北、四川、贵州等地, 其花蕾绿原酸含量在全国各种金银花中最高, 主产于湖南和贵州, 其中湖南省金银花商品药材的主流就是灰毡毛忍冬^[2-3]。它含有挥发油、黄酮类、三萜皂甙、绿原酸及无机元素等多种成分, 具有清热解毒、消炎退肿、保肝抗病毒、延缓衰老的功效。最近研究还表明金银花具有良好的抗癌、抗艾滋病和预防“SARS”病毒的作用^[4-6], 是良好的药用植物资源, 被广泛应用于制药、香料、化妆品、保健食品、饮料等领域。

我国是金银花商品化人工栽培面积最大的国家。近年来, 我国金银花产业发展较快, 但原料短缺。中药材一般利用营养器官根、茎、叶为主要药用部位, 而植物多倍体一般具有巨型性, 因此多倍体对药用部位具有特殊的应用价值和较高的增产潜力。利用组织培养技术进行人工诱导选育多倍体, 不仅可以提高多倍体的人工诱导效果、加快育种速度, 还可以加速优良品种的繁殖速度^[7]。有关金银花倍性育种研究报道极少, 仅见山东省平邑县九间棚农业科技园有限公司与中科院植物研究所合作, 用滴液法培育出四倍体金银花新品种——“九丰1号”, 笔者在前人研究的基础上, 进行了金银花试管苗快速繁殖技术的优化, 和同源四倍体的诱导与鉴定, 为金银花优良品种的选育提供材料。

1 材料与方

1.1 材料 试验材料为湖南省林业科学院选育出的高产、优质、高抗性的灰毡毛忍冬新品种银翠蕾(*Lonicera macranthoides* cv. *yinculei*), 该品种于2005年通过国家林业局林木品种审定委员会审定, 获得国家级良种证书。

1.2 方法**1.2.1 试管苗组培快速繁殖体系的建立。**

1.2.1.1 无菌材料的获得。 选取当年抽生健壮的银翠蕾嫩枝茎段为外植体, 消毒处理后, 在培养基 MS + 6-BA 1.0 ng/L + NAA 0.1 ng/L 上培养, 得到金银花二倍体试管苗^[8-9], 用于愈伤组织和不定芽的诱导。培养基(下同)均附加3.0%蔗糖、0.7%琼脂, pH 值5.8, 培养温度(25±2)℃, 光强度30~40 μmol/(m²·s), 光照时间12 h/d。

1.2.1.2 愈伤组织的诱导。 将处理得到的无菌叶片和茎在无菌条件下分别切成1 cm的正方形和长约1 cm的切断, 接种于添加了BA、KT、IAA、NAA、2,4-D 5种不同激素和生长素配比的B5培养基上。诱导培养基为B5 + 2,4-D 0.5 ng/L + 6-BA 0.5 ng/L + NAA 3.0 ng/L, 接种10 d左右, 嫩茎段和叶片切口处出现浅黄色的颗粒状愈伤组织, 约22 d后, 愈伤组织生长达旺盛期, 呈黄绿色。

1.2.1.3 不定芽的诱导。 将诱导得到的愈伤组织接种于不定芽诱导培养基 B5 + 6-BA 3.0 ng/L + NAA 1.0 ng/L + KT 0.2 ng/L 上培养35 d后, 开始看到愈伤组织上有绿色芽点出现, 慢慢地看到叶, 随后就分化出不定芽。

1.2.1.4 适宜的继代培养基和生根培养基。 采用王晓明等筛选出的银翠蕾适宜的继代培养基和生根培养基进行试管苗培养^[8]。继代培养基为改良 MS + 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.1 ng/L + 生物素 D 1.0 ng/L, 改良 MS 是 MS 基本培养基中的硝酸钾为0, 磷酸二氢钾、硝酸铵、氯化钙和硫酸镁的用量

分别减1/2。生根培养基:1/2 MS+IBA 3.0 ng/L。

1.2.2 多倍体的诱导。

1.2.2.1 秋水仙素浸泡法诱导多倍体试验。以愈伤组织诱导的不定芽为材料,进行多倍体诱导试验。设计不同浓度的秋水仙素溶液和处理时间来处理材料,秋水仙素浓度分别为:0.1%、0.2%、0.4%、0.6%;浸泡时间分别为:4、8、16、24 h。每个处理浸泡8个芽,每瓶接种2个芽,在MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L+生物素D 1.0 ng/L培养基中培养1个月后,统计各处理芽的存活率,更换培养基使其分化成苗,继代培养,建立株系并编号。

1.2.2.2 培养基中添加秋水仙素法诱导多倍体试验。以愈伤组织诱导的不定芽为材料,进行多倍体诱导试验。添加到培养基中的秋水仙素分别为:0.5、1.0、3.0 g/L;材料在含秋水仙素的培养基中培养时间分别为:2、5、8 d。每个处理接种4瓶,每瓶4个芽,分别培养2、5、8 d后转入MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L+生物素D 1.0 ng/L培养基中培养,1个月后统计各处理芽的存活率,更换培养基使其分化成苗,继代培养,建立株系并编号。

1.2.3 多倍体的鉴定。将诱导得到的株系接种在生根培养基上生根,15~20 d后,待根长为0.5~1.0 cm时切取根尖作为试验材料,进行染色体鉴定。分别于7:00、8:00、9:00、10:00、11:00切取银翠蕾试管苗的根,用自来水洗净,用0.2%的秋水仙素溶液浸泡3 h后,卡诺氏固定液中固定2、3、4、6、8 h,用蒸馏水冲洗3次,然后取处理好的材料投入预热的58~60 1 mol/L热HCl中,恒温条件下水解15、16、17、18、20 min,倒去水解分离液,再加入固定液2 ml,软化5 min,再用蒸馏水反复冲洗材料,使之呈白色微透明。小心切取根尖,置载玻片中央,加改良苯酚品红染液1滴,染色40 min后,压片,镜检,观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 观察根尖染色体方法的优化 结果表明,银翠蕾试管苗根的不同取材时间、不同预处理和酸解条件对染色体的观察有显著的影响。不同的取材时间试验结果表明:7:30取的材料大部分细胞可观察到染色体,而且可以看到清晰的点状染色体。预处理试验结果表明:0.2%的秋水仙素溶液浸泡3 h,中期细胞多染色体分散较好,可以看到清晰的点状染色体。不同的盐酸处理时间结果表明:1 mol/L盐酸溶液60 min下处理18 min,大部分细胞分散开,染色体着色较好,分散也较好。

综合上述试验结果,银翠蕾根尖较好的制片方法如下:7:30左右切取长约1 cm左右的根尖,在0.2%的秋水仙素溶液中浸泡3 h后,在卡诺氏固定液中固定2~24 h,用蒸馏水冲洗3次,60 min下在1 mol/L热HCl中,恒温条件下水解15~18 min,然后倒去水解分离液,加入固定液2 ml,软化5 min,再用蒸馏水反复冲洗材料,使之呈白色微透明。小心切取根尖,置载玻片中央,加改良苯酚品红染液1滴,染色40 min后,压片,镜检,观察并摄影。

2.2 秋水仙素浸泡法对诱导多倍体的影响 将银翠蕾幼芽浸入不同浓度的无菌秋水仙素溶液中,分别处理不同时间,培养30 d后统计材料的存活率和诱导率,结果见表1。

表1 不同浸渍时间和秋水仙素浓度对诱导银翠蕾四倍体的影响

Table 1 Effects of different dipping time and colchicine concentration on inducing autotetraploid of *Lonicera macranthoides* cv. *yinculei*

浓度 % Concentration	诱导时间 h Time of inducement	接种数 Nb. of inoculated	存活数 Nb. of survival buds	存活率 % Survival rate	四倍体植株数 Nb. of tetraploid plants	诱导率 % Rate of inducement
0.1	4	8	8	100	0	0
	8	8	8	100	2	25.0
	16	8	9	100	3	37.5
	24	8	7	87.5	1	12.5
0.2	4	8	8	100	2	25.0
	8	8	8	100	3	37.5
	16	8	8	100	3	37.4
	24	8	8	100	2	25.0
0.4	4	8	8	100	2	25.0
	8	8	8	100	3	37.5
	16	8	8	100	4	50.0
	24	8	7	87.5	2	25.0
0.6	4	8	8	100	1	12.5
	8	8	8	100	1	12.5
	16	8	7	87.5	2	25.0
	24	8	7	87.5	1	12.5

由表1可知,秋水仙素对银翠蕾试管苗的毒害程度与其浓度密切相关,随着秋水仙素浓度的升高,试管苗存活率降低,诱导率也呈现先升高后降低的趋势,当秋水仙素浓度超过0.4%后,诱导率开始下降。所以秋水仙素浓度为0.4%是较为理想的条件,诱导率也达到了50.0%。由表1还可知,秋水仙素对银翠蕾试管苗的毒害程度与浸泡时间密切相关,随着处理时间的延长,试管苗存活率降低,但诱导率也随之提高,用0.4%秋水仙素浸泡16 h时诱导率较高,为50.0%;但秋水仙素浓度升高,存活率降低,诱导率也有所下降,所以确定秋水仙素浸泡诱导的最佳时间为16 h。

2.3 培养基中添加秋水仙素法对诱导多倍体的影响 将银翠蕾幼芽接种到含不同浓度的秋水仙素的培养基中培养,分别处理不同时间,转入MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.1 ng/L+生物素D 1.0 ng/L培养基中培养30 d后对材料的存活率和诱导率进行了统计,结果见表2。

表2 不同培养时间和秋水仙素浓度对诱导银翠蕾四倍体的影响

Table 2 Effects of different treatment time and colchicine concentration on inducing autotetraploid of *Lonicera macranthoides* cv. *yinculei*

浓度 g/L Concentration	诱导时间 h Time of inducement	接种数 Nb. of inoculated	存活数 Nb. of survival buds	存活率 % Survival rate	四倍体植株数 Nb. of tetraploid plants	诱导率 % Rate of inducement
0.5	2	16	16	100.0	0	0
	5	16	16	100.0	2.0	12.5
	8	16	14	87.5	3.0	18.8
1.0	2	16	15	93.8	6.3	
	5	16	13	81.3	3.0	18.8
	8	16	11	68.6	7.0	43.8
3.0	2	16	16	100.0	1.0	6.3
	5	16	14	87.45	5.0	31.3
	8	16	10	62.54	25.0	

由表2可知,秋水仙素对银翠蕾试管苗的毒害程度与其

浓度密切相关,随着秋水仙素浓度的升高,试管苗存活率降低;由表2 还可知,当秋水仙素浓度为0.5 和1.0 g/L 时,诱导率随着培养时间的延长而增高,当秋水仙素浓度为3.0 g/L 时,诱导率呈先升高后降低的趋势。在秋水仙素浓度为1.0 g/L 的培养基中培养8 d 得到的四倍体植株为7 株,诱导率为43.8%,达最高值,所以秋水仙素浓度为1.0 g/L 是较为理想的条件,诱导率和存活率都较高。

2.4 四倍体和二倍体试管苗根尖染色体鉴定和植株形态比较 经过3 次根尖染色体鉴定,确定共诱导成功59 个银翠蕾同源四倍体株系。四倍体和二倍体试管苗的根尖染色体鉴定比较见图1。结果表明,银翠蕾二倍体植株根尖染色体数目为 $2n=2x=18$ 条,与文献报道相符。四倍体植株根尖染色体数目为 $2n=4x=36$ 条,染色体数增加了1 倍。

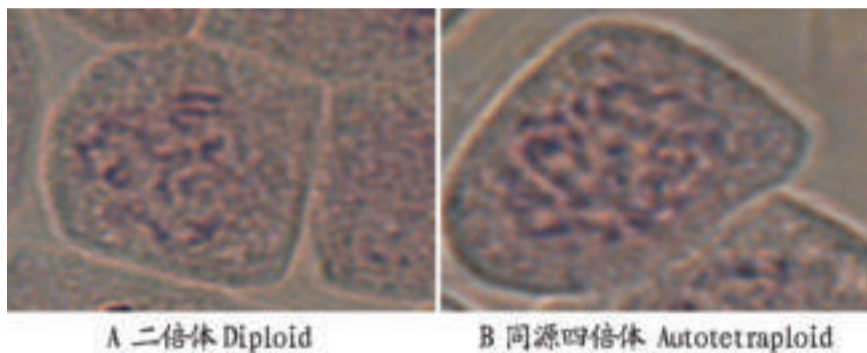


图1 银翠蕾四倍体和二倍体试管苗根尖染色体鉴定比较

Fig.1 Comparison of chromosome identification between autotetraploid and diploid plantlets of *Lonicera macranthoides* cv. *yinculei*

银翠蕾四倍体和二倍体试管苗的形态见图2。二倍体试管苗正常绿色,叶面平坦,较光滑,叶缘无锯齿,叶柄细长,叶脉正常大小,茎淡绿色;而多倍体试管苗表现出植株高大,叶深绿色、叶表面粗糙增厚、叶缘有锯齿、叶柄叶脉粗大,茎粗壮等外观特征,显示了多倍体所具有的巨大性特征。



A 二倍体 Diploid

B 同源四倍体 Autotetraploid

图2 银翠蕾四倍体和二倍体试管苗形态比较

Fig.2 Comparison of morphology between autotetraploid and diploid plantlets of *Lonicera macranthoides* cv. *yinculei*

参考文献

- [1] 王天志,李永梅.金银花的研究进展[J].华西药学杂志,2000,15(4):292-298.
- [2] 石钺,石任兵,陆蕴如.我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展[J].中国药学杂志,1999,34(11):6-9.
- [3] 中国药材公司.中国中药资源志要[M].北京:科学出版社,1994:1200.
- [4] 湖南省中药材普查办公室.湖南省中药资源普查报告[R].长沙:湖南科学技术出版社,1989:126-133.
- [5] 郭巧生.药用植物栽培学[M].北京:高等教育出版社,2004:353-361.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:人民卫生出版社,1990:190.
- [7] 郭启高,宋明,梁国鲁.植物多倍体诱导育种研究进展[J].生物学通报,2000,35(2):8-10.
- [8] 王晓明,易霏琴,宋庆安,等.灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系的建立[J].经济林研究,2005,23(4):14-16.
- [9] 王晓明,易霏琴,李永欣,等.灰毡毛忍冬新品种“银翠蕾”的组织培养及快速繁殖[J].植物生理通讯,2006,42(3):474.
- [10] 王晓明,李永欣,易霏琴,等.灰毡毛忍冬新品种组培苗生根的研究[J].河南林业科技,2006,26(4):1-3.
- [11] 王晓明,李永欣,易霏琴,等.灰毡毛忍冬新品种组培高效增殖体系的建立[J].林业科技开发,2006,20(6):62-64.

(上接第3615 页)

些稀有的球根花卉尤其是珍贵兰花品种遭到严重破坏,使得野生球根花卉资源的破坏相当严重。因此,必须高度重视野生观赏植物资源的保护工作。

首先应加强野生球根花卉种质资源的保护。注意保护稀有珍贵和濒危的野生球根花卉资源,调查其分布和蕴藏量,划定保护区,建立技术档案。在此基础上,积极开展引种驯化工作,充分利用植物园、自然保护区的优势,建立引种基地,将那些已严重受到人为干扰的濒危种类或一些自然衰落的稀有种优先加以保护。

有组织、有计划地进行引种驯化,对那些生态幅度大、抗逆性强的种类,如石蒜、射干、秋海棠、乌头、湖北百合、白头翁、桔梗、黄精、土麦冬等,可以将其直接用于城市园林绿化。对于那些花大色艳、确有特殊观赏价值的野生种类如龙胆、

忽地笑等可以采用逐渐引种,即逐代迁移驯化,使它们逐代积累适应性,从量的适应到质的适应,以期达到引种驯化的目的^[6]。同时应开展球根花卉的生物学特性、生态习性及其适应性方面的系统研究;加强选育种研究工作,广泛采用杂交、多倍体、辐射等多种育种手段,培育出观赏价值高、适应性强的新品种,更好地为城镇园林建设服务。

参考文献

- [1] 张金政,孙国峰.球根花卉[M].合肥:安徽科学技术出版社,2003.
- [2] 杨彦伶.浅谈湖北省野生花卉资源的保护及开发利用[J].湖北林业科技,2003(1):43-48.
- [3] 雷泽湘,费永俊,陈中义,等.荆州古城墙野生被子植物名录——草本和藤本植物[J].湖北农学院学报,1996,16(4):276-279.
- [4] 郑重.湖北植物大全[M].武汉:武汉大学出版社,1993.
- [5] 陈心启,吉占和.中国兰花全书[M].2版.北京:中国林业出版社,2003.
- [6] 杨好伟,翁海波,叶永忠,等.河南大别山区野生草本花卉资源与合理利用[J].河南农业大学学报,2000,34(2):130-133.