

任 敏,吴羽晨,张家洋,等. 金银花愈伤组织的诱导[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):38-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.012

金银花愈伤组织的诱导

任 敏,吴羽晨,张家洋,赵志英

(新乡学院生命科学与技术系,河南新乡 453003)

摘要:以金银花的叶片为外植体,在 50 组不同浓度 IAA、NAA、6-BA 组合的 MS 培养基上进行愈伤组织诱导,以探讨金银花的快速繁殖体系的培养条件。结果表明,IAA 和 NAA 的最佳浓度均为 1.0 mg/L,6-BA 的最佳浓度为 1.5 mg/L。确定适宜的诱导培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA。

关键词:愈伤组织;金银花;组织培养;诱导培养基;配方;IAA;NAA;6-BA;最佳浓度

中图分类号:S567.7+90.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0038-03

金银花(*Lonicera japonica* Thunb) 别称银花、双花、忍冬、二宝花,是忍冬科忍冬属多年生半常绿木质藤本植物^[1-2]。金银花单叶对生,叶片卵形或长卵形,两面被柔毛;每叶腋内由二花组成一小聚伞花序,花两侧对称,花冠唇形,初开时为白色,2~3 d 后变成金黄色,故名金银花^[3],花期为 4—6 月。金银花喜温暖湿润气候,适应性比较强,对土壤要求不严,耐寒、耐旱、耐涝,除东北、西北等高寒、干旱地区和海南外,全国各地均有分布。金银花全草均可入药,其主要药用成分是绿原酸和异绿原酸,具有清热解毒、除火、消炎等多种功效,主治温病、风热感冒、咽喉肿痛、肿痛溃疡、痢疾、丹毒、肺炎等症^[4]。金银花的花蕾含有挥发性芳香油、皂苷、绿原酸、肌醇和黄酮类化合物等,还含有肉桂酸、茉莉醛、橙花醇等;其茎中含有生物碱;其叶中含有忍冬苷、忍冬素和木樨素等。根据药理研究,金银花对大肠杆菌、痢疾杆菌、葡萄球菌和肺炎双球菌等有抑制作用^[5-6],是我国著名的豫产道地中药材之一。尤其是在 2003 年的“非典”时期,以金银花为重要成分的中

草药对“非典”的预防作用十分显著。金银花除了作为用途广泛的中药材外,还具有良好的保健作用。此外,金银花茶香气宜人,对防治盛夏中暑、风热感冒、上呼吸道感染和肠胃疾病有良好的效果,可以制作饮料。尤其是对清除人体自由基、提高人体免疫机能和延缓衰老等具有良好的作用,因而也是高血压和心血管系统患者降低胆固醇的保健佳品。金银花花开清香宜人,黄白相间,繁华密布,也是优良园林绿化植物。目前,金银花仍采用传统的扦插和压条 2 种繁育方式^[7],但传统的繁殖方式繁殖速度慢、繁殖系数低,繁殖的苗木规格不一,商品化程度不高,不能满足金银花优良品种迅速推广种植的需要,因此,如何提高其繁殖速度,增加繁殖系数,并使其迅速推广种植已成为金银花生产中亟待解决的一个重要问题。而国内外对金银花的研究多集中在栽培、管理、加工、药理、制剂等方面,关于其组织培养、离体快繁的研究^[8-9]却报道得极少,仅见有凤爪金银花^[10]和蒙花 1、2 号金银花^[11]的组培报道,但封丘金银花组培还未见有报道。本试验以新乡学院校园内的封丘金银花品种的叶片为外植体,在不同浓度的 MS 培养基上进行愈伤组织诱导,通过对照不同的激素组合,以探索金银花的愈伤组织诱导的最佳条件,为金银花的快速繁殖和充分利用打下良好基础。

收稿日期:2014-04-16

基金项目:新乡学院创新基金(编号:12ZB16)。

作者简介:任 敏(1962—),女,河南新乡人,教授,主要从事植物生理学研究。E-mail:skxsyszr@163.com。

养的最适培养基配方为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 0.01 g/L 甲基紫,其诱导率最高为 11.4,但甲基紫的最适用量与原理还有待进一步研究。

继代次数对增殖系数与子球质量有明显的影响,继代培养第 1 代至第 13 代时,增殖系数基本保持在 9~11 的水平,但在第 14 代以后,其增殖系数明显降低。所以在组培苗生产中,应考虑继代至第 13 代时重新从母本上选取外植体进行初代培养,以利于组培苗工厂化生产的良性循环。

参考文献:

- [1] 张 林,成海钟,周玉珍,等. 朱顶红的研究进展[J]. 江苏农业科学,2011,39(5):225-228
- [2] 吕文涛,娄晓鸣,周玉珍. 杂种朱顶红鳞茎切割繁殖方法研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):138-140.

- [3] Lu L Z, Zhou Y Z, Zhang Y Q, et al. Anthocyanin extracts from purple sweet potato by means of microwave baking and ratified electrolysed water and their antioxidation *in vitro* [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45: 1378-1385.
- [4] 朱旭东,田松青. 朱顶红的组织培养[J]. 江苏农业科学,2002(6):1002-1302.
- [5] 刘群龙,段国锋,周 兰. 朱顶红鳞茎芽诱导及植株再生体系的建立[J]. 西北植物学报,2007,27(12):2551-2554.
- [6] 孙红梅,宋利娜. 大花朱顶红鳞茎不定芽的诱导[J]. 中国农学通报,2010,26(14):247-250.
- [7] 娄晓鸣,周玉珍,孔贤等. 杂交朱顶红鳞茎不定芽诱导研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(34):16769-16770.
- [8] 潘 娟,李先源,李名扬. 植物组织培养过程中常见问题及解决方法[J]. 安徽农业科学,2009,37(6):2392-2394.

1 材料与方法

1.1 材料选择

从新乡学院校园内采集健壮的封丘金银花幼茎,剪取叶片为外植体进行培养。取材时间为 3 月中旬至 4 月下旬。

1.2 试验方法

1.2.1 配制培养基 试验以 MS 培养基为基本培养基,以不同的生长调节物质浓度组合共设计采用了 50 组愈伤组织诱导培养基 M1~M50;MS+(0.1~1.5) mg/L IAA/NAA+(0.1~2.0) mg/L 6-BA(表 1),每组做 3 个对照。所有培养基均添加 3% 蔗糖、0.65% 琼脂,调至 pH 值至 5.8,分装于培养瓶内,每瓶 25 mL,封口后在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min,并且将重蒸水、镊子、打孔器、滤纸用聚丙烯薄膜包装后一并灭菌^[12]。待培养基冷凝后,放入超净工作台,紫外线表面灭菌 1 h,准备接种。

表 1 愈伤组织诱导培养基成分

编号	浓度组合 (mg/L)	编号	浓度组合 (mg/L)
M1	MS+0.1 IAA+0.1 6-BA	M26	MS+0.1 NAA+0.1 6-BA
M2	MS+0.1 IAA+0.5 6-BA	M27	MS+0.1 NAA+0.5 6-BA
M3	MS+0.1 IAA+1.0 6-BA	M28	MS+0.1 NAA+1.0 6-BA
M4	MS+0.1 IAA+1.5 6-BA	M29	MS+0.1 NAA+1.5 6-BA
M5	MS+0.1 IAA+2.0 6-BA	M30	MS+0.1 NAA+2.0 6-BA
M6	MS+0.5 IAA+0.1 6-BA	M31	MS+0.5 NAA+0.1 6-BA
M7	MS+0.5 IAA+0.5 6-BA	M32	MS+0.5 NAA+0.5 6-BA
M8	MS+0.5 IAA+1.0 6-BA	M33	MS+0.5 NAA+1.0 6-BA
M9	MS+0.5 IAA+1.5 6-BA	M34	MS+0.5 NAA+1.5 6-BA
M10	MS+0.5 IAA+2.0 6-BA	M35	MS+0.5 NAA+2.0 6-BA
M11	MS+0.8 IAA+0.1 6-BA	M36	MS+0.8 NAA+0.1 6-BA
M12	MS+0.8 IAA+0.5 6-BA	M37	MS+0.8 NAA+0.5 6-BA
M13	MS+0.8 IAA+1.0 6-BA	M38	MS+0.8 NAA+1.0 6-BA
M14	MS+0.8 IAA+1.5 6-BA	M39	MS+0.8 NAA+1.5 6-BA
M15	MS+0.8 IAA+2.0 6-BA	M40	MS+0.8 NAA+2.0 6-BA
M16	MS+1.0 IAA+0.1 6-BA	M41	MS+1.0 NAA+0.1 6-BA
M17	MS+1.0 IAA+0.5 6-BA	M42	MS+1.0 NAA+0.5 6-BA
M18	MS+1.0 IAA+1.0 6-BA	M43	MS+1.0 NAA+1.0 6-BA
M19	MS+1.0 IAA+1.5 6-BA	M44	MS+1.0 NAA+1.5 6-BA
M20	MS+1.0 IAA+2.0 6-BA	M45	MS+1.0 NAA+2.0 6-BA
M21	MS+1.5 IAA+0.1 6-BA	M46	MS+1.5 NAA+0.1 6-BA
M22	MS+1.5 IAA+0.5 6-BA	M47	MS+1.5 NAA+0.5 6-BA
M23	MS+1.5 IAA+1.0 6-BA	M48	MS+1.5 NAA+1.0 6-BA
M24	MS+1.5 IAA+1.5 6-BA	M49	MS+1.5 NAA+1.5 6-BA
M25	MS+1.5 IAA+2.0 6-BA	M50	MS+1.5 NAA+2.0 6-BA

1.2.2 获得无菌材料 取新鲜的叶片,先用流水冲洗 30 min,然后放到超净工作台上,用 75% 乙醇灭菌 30 s,无菌水冲洗 4 次,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 8 min,无菌水冲洗 4 次^[13-14],用无菌滤纸吸干材料表面的水分。

1.2.3 愈伤组织的诱导 用打孔器将材料切成大小均匀的若干小圆片,将材料接种在 M1~M50 培养基上,先经暗培养 24 h,然后置于 25 ℃ 培养箱中培养。

2 结果与分析

2.1 培养接种 30 d 后的观察结果

以叶片为外植体,叶片切口处有膨大现象最早是第 6 天,10 d 后大多数成活叶片切口处均有膨大的现象,14 d 后有白色颗粒状的愈伤组织出现。这与赵慧贤等的组培报道中以叶片为外植体的形成时间^[15]略有差异,这可能与金银花的品种不一样有关。

从愈伤组织组数观察结果(表 2)中可以计算出,在愈伤组织在形成过程中,150 瓶培养瓶中污染率为 6.00%,死亡率为 18.67%,诱导率为 76.99%(诱导率为诱导数除以除去污染数和死亡数的接种总数)。

表 2 金银花愈伤组织试验组数观察结果

组号	接种组数	污染组数	死亡组数	诱导组数
M1	3	0	0	0
M2	3	0	1	1
M3	3	0	1	2
M4	3	0	1	2
M5	3	0	1	1
M6	3	0	0	2
M7	3	1	0	2
M8	3	0	0	3
M9	3	1	0	1
M10	3	0	3	0
M11	3	0	0	3
M12	3	0	0	3
M13	3	0	0	1
M14	3	0	2	1
M15	3	2	0	1
M16	3	0	0	3
M17	3	0	1	1
M18	3	0	3	0
M19	3	0	1	2
M20	3	1	0	2
M21	3	0	0	3
M22	3	1	0	2
M23	3	0	0	1
M24	3	0	1	2
M25	3	0	0	2
M26	3	0	0	1
M27	3	0	0	2
M28	3	0	0	2
M29	3	0	1	2
M30	3	0	0	1
M31	3	0	1	1
M32	3	1	0	2
M33	3	0	0	2
M34	3	0	1	2
M35	3	0	1	2
M36	3	0	3	0
M37	3	1	0	2
M38	3	0	0	2
M39	3	0	1	2
M40	3	0	0	2
M41	3	0	1	1
M42	3	1	0	2
M43	3	0	1	2
M44	3	0	0	3
M45	3	0	0	3
M46	3	0	1	2
M47	3	0	0	3
M48	3	0	0	3
M49	3	0	2	1
M50	3	0	0	1

2.2 不同浓度的生长素对愈伤组织诱导的效果

试验结果(表 3、表 4)表明,IAA 和 NAA 都是在 0.5~1.0 mg/L 的浓度范围内诱导效果较好。其中又以 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时效果最好,诱导率最高,达 91.67%。随着 1.0 mg/L 浓度升高诱导率下降;当浓度低于 0.5 mg/L 时,诱导效果也欠佳。IAA 浓度为 1.0 mg/L 时诱导率也较高,达到 88.89%。这与刘连芬等的组培报道中金银花愈伤组织形成

表 3 IAA 浓度对愈伤组织诱导的影响(6-BA 浓度相同)

浓度 (mg/L)	接种总数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)
0.1	15	0	4	6	54.55
0.5	15	2	3	8	80.00
0.8	15	2	2	9	81.81
1.0	15	1	5	8	88.89
1.5	15	1	1	10	76.92

表 4 NAA 浓度对愈伤组织诱导的影响(6-BA 浓度相同)

浓度 (mg/L)	接种总数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)
0.1	15	0	1	8	57.14
0.5	15	1	3	9	81.81
0.8	15	1	4	8	80.00
1.0	15	1	2	11	91.67
1.5	15	0	3	9	75.00

的最佳生长素浓度结果^[16]基本一致。

2.3 不同浓度的细胞分裂素对愈伤组织诱导的效果

试验结果(表 5、表 6)表明,生长素为 IAA 或者 NAA 的情况下,6-BA 都是在 1.5 mg/L 的浓度诱导效果较好,诱导率高达 100%。

表 5 6-BA 浓度对愈伤组织诱导率的影响(生长素为 IAA)

浓度 (mg/L)	接种总数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)
0.1	15	0	0	11	73.33
0.5	15	2	2	9	81.81
1.0	15	0	4	7	63.64
1.5	15	1	5	8	88.89
2.0	15	3	4	6	75.00

表 6 6-BA 浓度对愈伤组织诱导率的影响(生长素为 NAA)

浓度 (mg/L)	接种总数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)
0.1	15	0	6	5	55.56
0.5	15	3	0	11	91.97
1.0	15	0	1	11	78.57
1.5	15	0	5	10	100.00
2.0	15	0	1	9	64.29

2.4 不同生长素/细胞分裂素组合对愈伤组织诱导的效果

接种 14 d 后,叶片外植体开始变绿且变厚,接触到培养基的外植体表面长出米粒状的白色愈伤组织。30 d 后,叶片愈伤组织以深褐色和淡黄色为主,深褐色的愈伤组织结构紧密,质地较硬,呈不透明状;淡黄色的愈伤组织结构松散,质地松软,呈透明状。对比发现 M3、M8、M15、M16、M17、M19、M22、M24、M29、M31、M34、M39、M42、M44、M47、M49 效果较好(表 7),生长速度快且愈伤组织多,其中又以 M44(MS + 1.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA)效果最好。因此较理想的金银花愈伤组织诱导培养基配方是 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA。

3 讨论

本试验中叶片的污染率(6.00%)较高,可能是因为叶片与空气接触的时间较长,被空气中的微生物侵染的几率较大,也可能是因为在灭菌过程中,灭菌剂浓度较低或者灭菌时间

表 7 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

组号	诱导率 (%)	组号	诱导率 (%)
M3	100	M29	100
M8	100	M31	50
M15	100	M34	100
M16	100	M39	100
M17	50	M42	100
M19	100	M44	100
M22	100	M47	100
M24	100	M49	100

较短;死亡率(18.67%)较高,这可能是因为叶片脱毒时操作时间过长对叶片组织破坏,也可能是因为接种时镊子在酒精灯上烤烧的时间过长,冷却较慢,容易烫伤叶片。试验观察到的 2 种不同状态的愈伤组织,哪一种更适合做传代培养^[17],这还需要进一步研究。此外,因试验条件和试验时间的限制,本试验接种组数较少,故其数据不具有普遍推广意义。

参考文献:

[1]王光全,孟庆杰,张志忠. 金银花生物学特性及其栽培利用[J]. 江苏林业科技,2000,27(6):36-37.

[2]王恒波,袁月芳. 金银花繁育栽培技术[J]. 河北林业科技,2003(3):38-39.

[3]马清温,丁作超,孙震晓,等. 山东药用植物[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998.

[4]陈志远,祁承经,汤庚国,等. 树木学:南方本[M]. 北京:中国林业出版社,2005.

[5]赵国玲,刘佳佳. 金银花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材,2002,25(10):762-763.

[6]王林青,崔保安,张红英. 金银花药理作用研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(11):91-95.

[7]杨小红. 金银花的培养[J]. 植物杂志,1989(5):8.

[8]王天志,李永梅. 金银花的研究进展[J]. 华西药学杂志,2000(4):292-294,298.

[9]于生兰,张 龙,孙 玲. 金银花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(8):498-500.

[10]王光全,孟庆杰,孟庆军. 凤爪金银花的组织培养技术[J]. 河北林业科技,2002(5):25.

[11]仇 键,谭晓风. 蒙花 1、2 号金银花的组织培养与快速繁殖[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):53-56.

[12]杨 峰,刘巧莲,代真真,等. 不同基本培养基和外植体对剑麻愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 热带作物学报,2012,33(3):475-478.

[13]李景刚,孙满芝. 良种金银花的组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技,2004(6):36-37.

[14]戴小英,洪林育,龚 斌,等. 金银花优良无性系离体快繁研究[J]. 江西林业科技,2010(6):10-11,15.

[15]赵贤慧,刘庆华,王奎玲,等. 诱导红金银花愈伤组织的影响因素研究[J]. 山东林业科技,2007(1):9-11.

[16]刘连芬,钱关泽. 金银花(Lonicera japonica Thunb.)愈伤组织的诱导和分化[J]. 聊城大学学报:自然科学版,2007,20(4):48-50,107.

[17]曹方莉,王晓明,赵思东,等. 花蕾型金银花同源四倍体的诱导和鉴定[J]. 安徽农业科学,2008,36(9):3619-3621.