

“金丰一号”金银花组织培养技术研究

陈明霞^{1,2}, 张晓丽^{1,2}, 龚玉佳¹, 刘文英¹, 赵喜亭^{1,2}, 李明军^{1,2}

(1. 河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 对金银花中的优良品种“金丰一号”的离体培养进行了系统的研究。结果表明: 将金银花顶芽剥离成二叶一心后, 在 75% 酒精中灭菌 30 s, 再用 0.1% 升汞处理 15 min, 然后无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上进行培养, 无菌苗得率达 78.90%; 适于试管苗快繁的培养基是 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+生物素-D 2.0 mg/L, 繁殖周期为 28 d, 繁殖系数达到 7.37; 适于生根的培养基为 1/2 MS+IBA 3.0 mg/L, 生根率达 100%。

关键词: 金银花; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0126-04

金银花 (*Lonicera japonica* Thunb.) 为忍冬科忍冬属常绿或半常绿多年生缠绕木质藤本, 其叶、藤、花蕾均可入药, 尤以花蕾最佳, 具清热、解毒、抗菌等功效, 是传统的名贵中药材^[1]。金银花的有效成分绿原酸、异绿原酸, 具有抗病毒的特殊疗效^[2]。

利用组织培养建立金银花的无性繁殖体系, 进行种苗的工厂化育苗生产, 具有恢复和保持种性、固定优良性状, 保证苗木的整齐性, 快速大量繁殖优良品种的优势。忍冬属药用植物种类很多, 已有关于山东金银花^[3]、湖南金银花^[4] 组织培养方面的报道。现对豫产道地中药材“金丰一号”金银花的组织培养进行了系统研究, 对于有效解决金银花生产中存在的实际问题, 振兴河南经济具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

金银花优良品种“金丰一号”, 采自河南省新乡市封丘县陈桥镇轩寨村。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获得 将大田采摘的金银花嫩枝剥离成仅剩一心的顶芽, 用低浓度洗衣粉溶液浸泡 15 min, 用手轻轻搓洗, 再用流水冲洗 1.5 h, 用蒸馏水冲洗 2~3

次后带入无菌间, 用 75% 酒精浸泡 30 s 后, 转入 0.1% HgCl₂ 溶液中进行不同时间(11、13、15 和 18 min)的灭菌处理。用无菌水冲洗 6 次后, 接种在初代培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上进行培养。培养 25 d 时, 观察外植体生长情况, 并统计污染率、死亡率和无菌苗得率。污染率=(外植体污染总数/接种总数)×100%; 死亡率=(死亡的无菌苗/接种总数)×100%; 无菌苗得率=(成活的无菌苗/接种总数)×100%。培养基中蔗糖浓度均为 3%, 冷凝脂浓度为 6%, pH 5.8~6.0, 在 121℃, 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min(灭菌条件下同), 培养容器为三角瓶(容积为 100 mL); 培养条件: 温度(25±2)℃, 光照 14 h/d, 光强 2 000 lx(无特殊说明外, 下同)。

1.2.2 试管苗初代培养基的筛选 将无菌苗接种在以 MS 为基本培养基的初代培养基中, 设计 6-BA(0.1、0.5、1.0 和 2.0 mg/L)和 NAA(0.05、0.1、0.2 和 0.5 mg/L)二因素四水平随机区组试验, 共 16 种培养基, 每种 10 瓶, 每瓶 3 株, 3 次重复, 置于培养室培养。每 7 d 观察统计株高、叶片数、根长和生长情况等, 28 d 时计算株高增加值和叶片数增加值。株高增加值(cm)=(28 d 时株高-接种时的株高); 叶片数增加值(个)=(28 d 时的叶片数-接种时的叶片数)。

1.2.3 试管苗快繁培养基的筛选 以 MS 为基本培养基上, 添加不同浓度的 6-BA(0.5 和 1.0 mg/L)、NAA(0.05、0.1 mg/L)和生物素-D 2.0 mg/L, 将金银花试管苗切成 2~2.5 cm 带 2 叶的茎段, 随机接种于各培养基中, 培养 25 d 时, 观察并统计出株高、叶片数、腋芽诱导率及生长状况。

1.2.4 试管苗的生根 将试管苗顶芽切成 2~2.5 cm

第一作者简介: 陈明霞(1973-), 女, 河南南阳人, 博士, 讲师, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: chenmx1973@gmail.com.

通讯作者: 李明军(1962-), 男, 河南温县人, 博士, 教授, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: limingjun2002@263.net.

基金项目: 河南省重点科技攻关资助项目(0623030700); 新乡市科技攻关资助项目(08N041)。

收稿日期: 2010-09-19

长,接种在生根培养基中 1/2MS 基本培养基上,附加 0.2 g/L AC,比较不同 IBA 浓度(0、1.5、3.0、6.0 mg/L)对生根的影响,每处理接种 10 管,每管接种 1 株,每天观察记录其生根时间,28 d 时统计根数、根长、株高和叶片数等,并对记录结果进行统计分析。

1.3 数据处理和分析

所有试验数据均采用 Excel(Microsoft Office, 2003)和 SAS 9.0 程序进行数据整理、方差分析和数据比较^[3]。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对无菌苗得率的影响

将仅剩一心的顶芽放入 0.1%的升汞中,灭菌 11、13、15、18 min 后,分别接入 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基中,第 2 天,顶芽表面就显现出伤害迹象 5 d 时,一部分顶芽开始返青,有生长迹象。25 d 时,对各指标进行统计,结果见表 1。

表 1 灭菌时间对顶芽污染率、死亡率及 无菌苗得率的影响				
灭菌时间/min	11	13	15	18
接种数/个	60	60	60	60
污染率/%	32.87±1.23 Aa	9.96±2.08 Bb	3.13±0.42 Cc	1.56±0.31 Cc
死亡率/%	19.67±0.77 Cc	20.83±1.56 Cc	39.06±1.04 Bb	68.44±0.97 Aa
无菌苗得率/%	47.46±1.47 Cc	69.21±0.74 Aa	57.81±1.36 Bb	30±1.54 Dd

注:表中不同大写字母和小写分别表示各基因型水稻在水平 0.01 和 0.05 水平上差异显著 下同。

由表 1 可看出,随着灭菌时间的增加,污染率虽然逐渐降低,但死亡率却明显升高。灭菌 11 min 时,污染率高达 32.87%,与其它处理相比差异极显著,死亡率最低(19.67%)。灭菌 15 或 18 min 时的污染率分别为 3.13%和 1.56%,二者之间没有明显差异,但 18 min 时其死亡率达到最大,为 68.44%,与其它处理相比达极显著差异,无菌苗得率仅 30%。灭菌 13 min 时,污染率、死亡率、无菌苗得率与其它处理均达到极显著差异,其中无菌苗得率高达 69.21%。综上可知,升汞灭菌 13 min 为较好的处理时间。

2.2 试管苗初代培养基的筛选

将金银花带芽茎段接种在以 MS 为基本培养基、附加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 16 种初代培养基上,28 d 时,统计株高增加值和叶片数增加值,并进行方差分析,结果见表 2。由表 2 可看出,6-BA 对金银花株高增加值和叶片增加值均有极显著的影响。6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,金银花株高的增加值最大,6-BA 0.5 mg/L 时次之,二者之间有显著差异,与 6-BA 2.0 mg/L 相比,达到极显著差异;6-BA 1.0 mg/L 时,叶片增加值最大,与 6-BA 0.1 mg/L 相比有显著差异,与 6-BA 2.0 mg/L 相

表 2 6-BA、NAA 对金银花株高和叶片 增加值影响的方差分析			
变 量		株高增加值/cm	叶片增加值/个
6-BA /mg·L ⁻¹	0.1	3.300±0.533 Bc	3.583±1.417 ABb
	0.5	3.533±0.628 ABb	3.333±0.833 Bb
	1.0	3.775±0.603 Aa	4.000±0.833 Aa
	2.0	3.433±0.333 Bbc	3.250±0.750 Bb
NAA /mg·L ⁻¹	0.05	3.267±0.583 Bc	2.750±0.583 Cc
	0.1	2.875±0.583 Cd	2.583±0.583 Cc
	0.2	4.067±0.750 Aa	4.750±0.750 Aa
	0.5	3.833±0.458 Ab	4.083±0.458 Bb
6-BA		9.907 **	7.806 **
NAA		71.947 **	75.667 **
6-BA×NAA		9.148 **	9.080 **

比达到极显著差异。综合比较,6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,最有利于金银花无菌苗的初代培养。

NAA 对金银花的株高增加值、叶片增加值都有极显著性影响,当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,金银花株高的增加值最大,NAA 0.5 mg/L 次之,且二者之间无显著差异,但与其它处理相比均达到极显著差异;NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,叶片数的增加值最大,与其它处理均达到极显著差异。综合比较,NAA 浓度为 0.2 mg/L 时,较有利于金银花的初代培养。即 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为金银花初代培养较适合的培养基。

2.3 植物生长调节物质对试管苗生长及腋芽诱导的影响

将金银花带芽茎段接种在以 MS 为基本培养基、附加有不同浓度 6-BA 和 NAA 的 4 种培养基上,观察试管苗生长情况,培养 28 d 时,统计株高增加值、叶片数增加值、腋芽生长情况和繁殖系数等数据并进行方差分析,结果见表 3。

表 3 植物生长调节物质对金银花试管苗 生长状况的影响			
处理 /mg·L ⁻¹	株高增加值 /cm	叶片增加值 /个	繁殖系数
6-BA 0.5+NAA 0.05	0.63±0.12	4.67±1.59 ab	2.83±0.11 Dd
6-BA 0.5+NAA 0.1	0.53±0.12	7.11±1.46 a	7.37±0.11 Aa
6-BA 1.0+NAA 0.05	0.67±0.11	4.44±0.97 ab	3.61±0.12 Cc
6-BA 1.0+NAA 0.1	0.78±0.06	2.11±0.59 b	3.67±0.14 Cc

由表 3 可知,6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 处理中的叶片增加值最大,达 7.11 个,与 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 处理达显著性差异;6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 处理中繁殖系数最大,达到 7.37,与其它处理达到显著性差异。说明 NAA 0.1 mg/L 好于 NAA 0.05 mg/L,适合金银花的快速生长。即 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+生物素-D 2.0 mg/L 可作为金银花较适宜的快繁培养基。

2.4 IBA 对试管苗生根的影响

将试管苗带芽茎段接种在以 1/2MS 为基本培养基, 添加有活性炭同时附加不同浓度的 IBA 的培养基中, 28 d 时统计生根情况, 结果见表 4。

表 4 IBA 对试管苗生根的影响

IBA/ mg · L ⁻¹	根数/ 条	根长/ cm	生根率/ %
0	0.00±0.00 Bb	0.00±0.00 b	0
1.5	2.00±1.53 Bb	6.11±3.07 ab	30
3.0	9.67±0.88 Aa	8.93±0.59 a	100
6.0	2.67±1.33 Bb	3.47±2.08 ab	20

从表 4 可知, 过低(0.1.5 mg/L)或过高(6.0 mg/L)浓度的 IBA 处理时, 根数明显较少, 根长也较短, 生根率也较低; 适宜浓度的 IBA (3.0 mg/L)处理时, 根数及根长均达到最大, 其中根数与其它处理达到极显著性差异, 根长达到显著性差异, 且生根率达 100%。综上所述 适宜试管苗生根的 IBA 浓度为 3.0 mg/L。即 1/2MS+IBA 3.0 mg/L 为金银花生根较适合的培养基。

3 结论与讨论

3.1 无菌材料的获得

金银花的植物体表面被有绒毛, 且枝条中空, 所以消毒较困难。对金银花外植体的处理难以掌握, 时间太短, 消毒不彻底, 易污染; 时间太长, 会对组织产生毒害, 因此建立金银花无菌体系是一个很大的挑战。将金银花腋芽或带腋芽的茎段放入 75%酒精处理 25 s 和 30 s, 再用浓度 0.1%升汞处理 9 min 和 16 min, 能取得较好的效果^[9]。该试验中, 将金银花顶芽剥离成一心, 放入 75%酒精处理 30 s 后再用 0.1%升汞再灭菌 11 ~ 18 min, 污染率虽然较低, 但死亡率较高, 可能是叶片过嫩, 抵御伤害能力太弱所致; 而剥离成二叶一心的顶芽放入 75%酒精处理 30 s, 0.1%升汞灭菌 15 min, 效果较好, 虽然外部叶片有不同程度的褐化, 但内部顶芽能很快地生长, 无菌苗得率可达 78.9%。可看出, 同一种外植体, 在较低浓度的升汞(0.1%)中灭菌, 需要的时间较长; 在较高浓度的升汞(0.2%)中灭菌, 需要的时间相应较短。

3.2 6-BA 和 NAA 对试管苗快速繁殖的影响

要使植物组织分化出苗或快速增殖, 选择植物生长物质的种类和调节细胞分裂素与生长素的比例是关键。6-BA(6-苄基腺嘌呤)主要用作诱导芽的分化、促进侧芽萌发生长^[7]; NAA(1-萘乙酸)是一种人工合成的生长素类植物生长调节剂, 具有在较低浓度下促进细胞生长, 而在高浓度下促进细胞成熟衰老的作用。当 6-BA 为 2.0 mg/L 时, 红金银花的丛生芽的诱导率达 80%, 但随着 6-BA 浓度的增高, 其诱导率却逐步下降直至为 0^[8];

高浓度的 NAA 对蒙花金银花腋芽有抑制作用, 而加入少量的 NAA 对腋芽生长有一定的促进作用(低浓度 6-BA 条件下)^[9]。该试验结果表明, 低浓度的 6-BA (0.5 mg/L)与较高浓度的 6-BA (1.0 mg/L)相比, 前者的金银花腋芽诱导率和腋芽生长情况均好于后者; 而 NAA 的浓度太低(0.05 mg/L)时, 不适宜金银花腋芽的诱导和生长, 当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 其腋芽诱导率高且腋芽生长健壮, 明显好于 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时的腋芽生长状况。可以得出, 高浓度的 6-BA 不仅不能促进生长, 还可能会抑制腋芽的形成; 同时, 金银花需要一定浓度的 NAA 且浓度不能过低, 否则也不利于其快速繁殖。

3.3 IBA 对试管苗生根的影响

IBA 是试管苗生根中最为常用的生根剂之一^[10]。在单独使用 IBA 的生根培养基上, 北京忍冬试管苗 10 d 左右长出根原基, 20 d 左右形成粗壮根系, 其中浓度以 1.0 mg/L 为宜, 促根效果较好, 生根快, 根系发达^[11]。该试验发现, IBA≤1.5 mg/L 时对根生长的促进作用不明显; IBA 为 3.0 mg/L 时, 根从茎段基部发生, 根系发达、粗壮, 且组培苗生长良好, 叶片浓绿, 茎段健壮; IBA 为 6.0 mg/L 的培养基中形成大量愈伤组织, 根从愈伤组织上形成, 组培苗叶片萎蔫, 茎段细弱、弯曲。在组培苗生根培养基中, 要把握好 IBA 的浓度, IBA 浓度过低不能很好地促进组培苗生根, 浓度过高则往往会诱导大量的愈伤组织而降低生根率。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 1403-1405.
- [2] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 177.
- [3] 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): 5-6.
- [4] 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.
- [5] 余家荣, 肖枝洪. 概率统计及 SAS 应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2007: 116-159.
- [6] 李翔, 杨美纯, 全泉, 等. 华南忍冬组织培养的无菌体系建立[J]. 广西植物, 2008 28(6): 823-826.
- [7] 李明军. 怀山药组织培养及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 20.
- [8] 赵秀芳. 红金银花离体快繁技术[J]. 林业科技, 2005 30(4): 60-64.
- [9] 王晓明, 易霏琴, 宋庆安等. 灰毡毛忍冬新品种“银翠蕾”的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006 42(3): 474.
- [10] 李明军, 陈明霞, 洪森荣, 等. NAA、IBA 和 PP333 对怀山药试管苗生长发育的影响[J]. 广西植物, 2004, 24(4): 376-379.
- [11] 黄守印, 张福, 邢路军, 等. 北京忍冬的组织培养试验[J]. 河北林业科技, 2004(4): 3-4.

番茄植株再生体系的建立

赵 燕, 刘清波, 杜元正, 任春梅

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 选用杂交番茄早丰(07-13)为材料, 以下胚轴、子叶作为外植体, 根据控制单一变量与多重比较的原则, 设计添加不同种类和不同浓度的植物生长物质的培养基配方, 建立了一套简便有效地番茄再生体系。结果表明: 愈伤组织的诱导及增殖, 以配方 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L 为佳; 诱导不定芽的分化, 以培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 为佳; 生根培养基以 MS+NAA 0.1 mg/L+IAA 0.1 mg/L 为佳, 生根率高且根粗壮。

关键词: 番茄; 植株再生体系; 植物生长物质

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)23—0129—04

番茄是一种重要的世界性蔬菜, 具有很高的经济价值, 有关番茄组培的研究, 国内外已有较多的报道^[1-3]。在番茄杂种优势固定、优良品种快速繁殖、突变体保存利用及转基因等生物技术领域的研究中, 番茄的组织培养发挥了重要作用, 建立高效的组织培养体系是进行相关研究的基础^[3,4]。该试验选用杂交番茄早丰(07-13)为材料, 以子叶、下胚轴作为外植体, 在不同组织培养阶段添加不同种类和不同浓度的植物生长调节剂以优化培

养基配方, 建立简单有效的再生体系, 以期能用于番茄的遗传转化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试番茄材料为杂交番茄早丰(07-13), 由湖南农业大学生物科学技术学院任春梅教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基 以 MS 为基本培养基, 在愈伤诱导阶段, 设置 NAA、IAA、6-BA 等 3 种植物生长物质的不同浓度梯度组合, 进行愈伤的诱导和增殖。在分化阶段设置 6-BA、IAA、NAA、KT 和 2, 4-D 等 5 种植物生长调节物质的不同浓度梯度组合, 诱导分化。在生根阶段设置 IAA 或 NAA 的不同浓度梯度组合, 诱导生根。

1.2.2 无菌苗的获得和外植体的接种 将番茄种子用 70%酒精消毒 1 min, 无菌水清洗, 再用 10% NaClO 浸泡 20 min, 用无菌水冲洗 4~5 次。接种于 M1(MS+蔗

第一作者简介: 赵燕(1964), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为植物基因工程。E-mail: zhaoyan0585@163.com。
通讯作者: 任春梅(1962), 女, 博士, 教授, 研究方向为植物基因工程及信号传导。E-mail: rencm66@163.com。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770195)。
收稿日期: 2010-09-06

Study on Tissue Culture of *Lonicera japonica* Thunb. ‘Jinfeng-1’

CHEN Ming-xia^{1,2}, ZHANG Xiao-li^{1,2}, GONG Yu-jia¹, LIU Wen-ying¹, ZHAO Xi-ting^{1,2}, LI Ming-jun^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007; 2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, Henan University, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract: We studied the *in vitro* culture systematically on *Lonicera japonica* of this eximious varietal ‘Jinfeng-1’ for the first time. The results showed that dip the apical buds with two leaves from farmland in the ethanol of 75% for 30 s at first, then in the HgCl₂ of 0.1% for 15 minutes, and inoculated on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L after washed in the germfree water for 5~6. According to these steps, we could get plantlets and the yield of vaccine was up to 78.90%; The best medium for rapid propagation of *Lonicera japonica* Thunb. was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+biotin-D 2 mg/L with agar in can bottle of 500 mL, and the propagation coefficient could reach 7.37 by 28 days. The best rooting medium was 1/2MS+IBA 3 mg/L, and the rooting rate could reach to 100%.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; tissue culture; rapid propagation