

# 金银花疏松愈伤组织诱导及细胞悬浮培养研究

武丽娜

(邢台学院 生物化学系,河北 邢台 054001)

**摘要:**以“巨花一号”金银花为试材,研究了外植体、培养基对金银花疏松愈伤组织的诱导以及初始接种量和蔗糖浓度对金银花悬浮细胞生长的影响。结果表明:幼叶最易诱导愈伤组织,其诱导及增殖的最适培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;细胞悬浮培养中愈伤组织最适初始接种量为 60 g/L,培养基中蔗糖浓度为 35 g/L 时细胞生长最好。

**关键词:**金银花;疏松愈伤组织;细胞悬浮培养

**中图分类号:**S 567.7<sup>+</sup>9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)20-0107-03

金银花(*Lonicera japonica*)为忍冬科多年生半常绿缠绕木质藤本植物,由于花初开为白色,后转为黄色,因此得名金银花<sup>[1]</sup>。金银花是重要的药用植物,在中医临床上应用具有悠久的历史。金银花中富含绿原酸、异绿原酸和黄酮类化合物,其中绿原酸的含量最大,绿原酸有抗菌、抗病毒、保肝利胆、降血压、降血脂、清除自由基等功能<sup>[2]</sup>,还具有抗逆转录酶的活性,可能作为抗 HIV 的先导化合物<sup>[3]</sup>。但是由于金银花的栽培周期长,有效成分提取工艺复杂<sup>[1]</sup>,从人工栽培的金银花中提取的绿原酸等次生代谢产物已不能满足人类日益增长的需求。

因此,用细胞工程的方法利用金银花生产绿原酸势在必行。但国内有关金银花细胞悬浮培养的研究鲜有报道,现拟通过对金银花疏松愈伤组织诱导和细胞悬浮培养的研究,找到诱导疏松的、适合进行悬浮培养的金银花愈伤组织的最适培养基及金银花细胞悬浮培养的适宜条件,以期对金银花细胞大规模培养生产次级代谢产物的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用邢台学院组培实验室扦插的金银花植株,品种为邢台市巨鹿县出产的“巨花一号”。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体筛选 取金银花的茎、幼叶和芽作为外植体,用蒸馏水浸泡,用毛笔轻轻刷去表面的绒毛,用灭菌

**作者简介:**武丽娜(1977-),女,河北石家庄人,硕士,讲师,研究方向为分子生物学。E-mail:xtwulina1977@sina.com.

**收稿日期:**2012-05-16

[3] 田苗苗,周延清,牛敬媛,等.单粒干燥大豆种子基因组 DNA 提取的有效方法[J].生物学通报,2005,40(10):38-39.

[4] 刘艳玲,徐立铭,程中平.基于 ITS 序列探讨核果类果树桃、李、杏、梅、樱的系统发育关系[J].园艺学报,2007,34(1):23-28.

[5] 熊劲芳,向育君,张正奇.花生总 DNA 的快速提取与纯化研究[J].

生物学杂志,2003,20(2):32-34.

[6] 魏琦超,畅丽萍,周岩,等.一种简便实用的玉米干种子基因组 DNA 提取方法[J].广东农业科学,2009(6):165-167.

[7] 王晓丹,吕慧颖,张敬,等.以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J].分子植物育种,2004,2(6):891-894.

## The Improved Method of Apricot Genomic DNA Trace Extraction

JIANG Sheng-xiu, LAN Hai-yan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Gene Engineering, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** Based on the genomic extraction method reported in soybean seeds, the improved method was used for genomic DNA isolation of high fat almond, and the genome extracted as a template for the PCR amplification verification. The results showed that the DNA extraction in improved SDS method had these advantages: purity and concentration was high, the strip was clear, degradation was less, and in high dilution conditions could still obtain effective amplification.

**Key words:** almond; genome; SDS

双蒸水洗净,用70%的酒精浸泡15~30 s后,放入0.1%升汞液浸泡消毒8 min,再用无菌水冲洗3~4次。将消毒好的外植体切割成小块,切去外围组织后在中间划几道伤口,每瓶接种3~4块。固体培养基均为MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。7 d后,比较不同外植体诱导形成的愈伤组织性状及生长状况。

1.2.2 愈伤组织诱导 将金银花幼叶按上述方法进行处理,分别接种于加有不同植物激素(2,4-D、KT、6-BA)组合和浓度配比的MS培养基上。温度(26~28)℃下,首先进行7 d的暗培养,然后进行光照培养,光照周期12 h/d,光照强度1 000~2 000 lx。14 d后观察愈伤组织的生长情况。每隔15 d继代1次。

1.2.3 诱导率与褐化率的统计 诱导率=形成愈伤组织的外植体块数/接种外植体块数×100%,褐化率=褐化愈伤组织块数/愈伤组织总数×100%。

1.2.4 细胞悬浮培养 继代2次后,选择生长旺盛、结构疏松的愈伤组织块,用镊子夹碎或小刀分割得到愈伤组织碎块,转移到装有MS液体培养基的三角瓶中进行悬浮培养,置于摇床内100 r/min,26℃黑暗振荡培养,每7 d继代1次,继代时培养物用40目的灭菌不锈钢筛网过滤,除去大细胞团和残渣,得到一定体积的小细胞团或单细胞悬浮液。为了增强细胞的分散程度,培养基中加入适量的浓度为1%的果胶酶。每2 d观察生长情况,显微镜下观察计数并绘制生长曲线。悬浮细胞培养周期为18 d,经3~4次继代培养可得到稳定的细胞系。

## 2 结果与分析

### 2.1 金银花疏松愈伤组织诱导

2.1.1 外植体对愈伤组织诱导的影响 由表1可知,幼叶诱导形成的愈伤组织较为疏松,生长较快、褐化率较低;芽诱导形成的愈伤组织也较为疏松,褐化率低,但生长缓慢;而嫩茎诱导形成的愈伤组织较为坚硬,褐化率高。因此该试验选择金银花的幼叶作为外植体。

表1 不同外植体对金银花愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different explants on the callus induction of <i>L. japonica</i>				
外植体	诱导率/%	愈伤组织状态	生长状况	褐变率/%
嫩茎	83.3	紧实,绿色	++	72.0
幼叶	96.7	较疏松,浅黄色	+++	51.7
芽	93.3	较疏松,浅黄色	+	42.8

注:“+”表示生长;“++”表示生长较快;“+++”表示生长旺盛。

2.1.2 激素对愈伤组织诱导的影响 由表2可知,不同的激素种类和不同浓度配比对金银花愈伤组织的诱导有明显的影。6-BA含量越高诱导的愈伤组织越紧实,且愈伤组织内部发绿,不适合细胞悬浮培养。而2,4-D含量较高的组合中诱导的愈伤组织浅黄色,较为疏松。因此,2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L是诱导金银花疏松愈伤组织适合的激素组合。

表2 不同培养基对金银花愈伤组织生长的影响

Table 2 Effects of different culture media on the growth of callus of *L. japonica*

培养基 代号	生长调节剂/mg·L <sup>-1</sup>			愈伤组织形态		
	2,4-D	KT	6-BA	颜色	生长状态	表面特征
1	1.0	0	0.1	绿色	紧实	细颗粒
2	1.0	0.5	0.5	绿色	紧实	细颗粒
3	1.0	1.0	0	浅黄色	较紧实	颗粒状
4	1.5	0	0.5	浅绿色	较紧实	细颗粒
5	1.5	0.5	0	浅黄色	较紧实	颗粒状
6	1.5	1.0	0.1	浅黄色	较紧实	颗粒状
7	2.0	0	0.5	浅绿色	较紧实	细颗粒
8	2.0	0.5	0	浅黄、乳白	疏松	颗粒状
9	2.0	1.0	0.1	浅黄色	较疏松	颗粒状

### 2.2 金银花细胞悬浮培养

金银花细胞悬浮培养采用的液体培养基激素配比与诱导愈伤的固体培养基相同(MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L),pH为5.8。结果发现,细胞生长经历了4个阶段:迟滞期、快速生长期、平衡期和衰亡期(图1、2),表现为典型的S形生长曲线。液体悬浮培养条件下,细胞的生长周期为14 d。

2.2.1 初始接种量对金银花细胞悬浮培养的影响 初始接种量按每瓶(25 mL培养液)接种1.0 g(40 g/L)、1.5 g(60 g/L)、2.0 g(80 g/L)、2.5 g(100 g/L)鲜重的愈伤组织,接种于液体培养基中。由图1可知,接种量较低(40 g/L)时细胞的生长较为缓慢,接种量高(100 g/L)时细胞出现了褐化死亡,培养液变为褐色。而接种量为60 g/L的处理组的对数生长期最长,细胞生长量最大。初始接种量对细胞的增殖有明显的影响,初始接种量达到一定的值后细胞才能增殖,这是由于植物细胞的群集效应而引起的;另一方面,接种量过高则细胞密度大,导致培养液中的养分很快被耗尽,同时容易积累有害物质最终导致细胞衰老,细胞的生长量随即逐渐减少<sup>[4]</sup>。该研究结果表明,60 g/L为金银花细胞悬浮培养最适初始接种量。

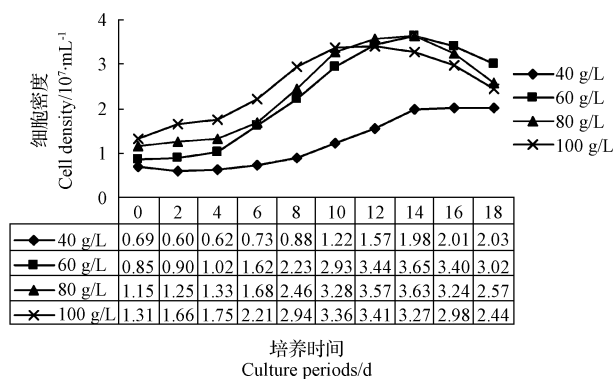


图1 初始接种量对金银花悬浮细胞生长的影响

Fig. 1 Effects of different inoculums sizes on cell growth in suspension cultures of *L. japonica*

2.2.2 蔗糖浓度对金银花细胞悬浮培养的影响 液体培养基中蔗糖的浓度设 30、35、40、45 g/L 4 个处理水平,初始接种量为 80 g/L。结果表明,培养基中蔗糖浓度为 35 g/L 时,细胞生长最快。蔗糖是细胞生长所必需的碳源,同时具有调节培养体系的渗透压的作用<sup>[5]</sup>。适量增加蔗糖浓度可促进细胞的生长,但蔗糖浓度过高可能造成渗透压过高而使细胞失水死亡,细胞增长量降低。该研究表明,35 g/L 的蔗糖浓度最适金银花的细胞培养。

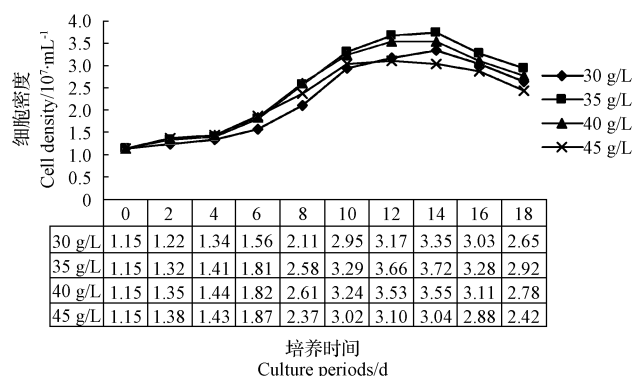


图2 蔗糖浓度对金银花悬浮细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of sucrose concentration on cell growth in suspension cultures of *L. japonica*

### 3 讨论

生长速度快、疏松易碎的愈伤组织是进行细胞悬浮培养的关键<sup>[4]</sup>。一般选用颗粒细小、疏松易碎、外观湿润、鲜艳的白色或淡黄色的愈伤组织作为细胞悬浮培养的材料<sup>[6]</sup>,已有研究发现,金银花愈伤组织的生长较慢、结构紧实不易分散,不利于细胞悬浮培养,这可能与金银花本身的特性有关。外植体对愈伤组织的生长状态有较大影响,该研究表明,金银花幼叶诱导的愈伤组织较疏松、生长较快,较适合作为疏松愈伤组织诱导

的外植体。不同的激素对愈伤组织诱导的效果不同,添加 6-BA 诱导出的愈伤组织坚硬、部分愈伤组织分化生根;而提高培养基中 2,4-D 浓度可诱导出较为疏松的愈伤组织,但须在液体培养基中加入果胶酶才能观察到分散的单细胞和小细胞团。

初始接种量和培养基蔗糖浓度是细胞悬浮培养的重要影响因素<sup>[5]</sup>,该研究结果表明,金银花细胞悬浮培养的最适初始接种量为 60 g/L,明显高于其它种植物的相关报道,如颜日明等<sup>[7]</sup>报道的杜仲的最佳初始接种量为 20 g/L,这些差异可能是由于愈伤组织的密度差异引起的;而该研究结果中蔗糖的最适浓度为 35 g/L,与其它文献报道的相同或接近<sup>[7-9]</sup>。由于植物体本身的特性不同,对其种植物适合的细胞培养条件不一定适合另一种植物。该试验对金银花愈伤组织诱导中的外植体、激素等影响因素和细胞悬浮培养中的初始接种量、蔗糖浓度等因素进行了研究,初步摸索出了金银花细胞培养的适宜条件,希望能对金银花大规模细胞培养和生产天然活性物质的研究提供理论上的参考。

### 参考文献

- [1] 姚银花. 药用植物金银花[J]. 凯里学院学报, 2007, 25(6): 53-55.
- [2] 夏宝伟. 金银花综述[J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 61(2): 88-89.
- [3] 孙燕荣, 董俊兴, 吴曙光. 中药杜仲抗 HIV 作用的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(2): 101-103.
- [4] 尹作鸿, 朱蔚华. 雷公藤愈伤组织悬浮培养的研究[J]. 生物工程学报, 1992, 8(1): 95-98.
- [5] 吴春霞. 植物细胞悬浮培养的影响因素[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(1): 36-38.
- [6] 章伟标, 王姿云, 张莹莹, 等. 半夏疏松愈伤组织诱导及高产半夏蛋白悬浮株系筛选[J]. 浙江理工大学学报, 2011, 28(5): 800-803.
- [7] 颜日明, 张志斌, 邱晓芳, 等. 高产绿原酸杜仲细胞悬浮培养体系优化研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 301-304.
- [8] 单国燕. 柱花草组织培养和细胞悬浮培养的研究[D]. 海口: 海南大学, 2010: 35-46.
- [9] 王亚琴, 叶青华, 朱媛. 杜仲细胞悬浮培养生产绿原酸的初步研究[J]. 广西植物, 2008, 28(5): 671-674.

## Study on the Loose Callus Induction and Cell Suspension Culture of *Lonicera japonica*

WU Li-na

(Department of Biology and Chemistry, Xingtai College, Xingtai, Hebei 054001)

**Abstract:** Taking 'Juhua No. 1' as the material, the effects of explant, medium on the loose callus induction of *L. japonica* were investigated, as well as the effects of primary inoculums size and sucrose concentration in the medium on the growth of suspension culture cell were studied. The results showed that the best explant which induced the callus was the young leave and its optimal medium was MS+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT. The best primary inoculums size of callus was 60 g/L and the cell of *L. japonica* grew best when sucrose concentration was 35 g/L in suspension culture.

**Key words:** *Lonicera japonica*; loose callus; cell suspension culture