金银花愈伤组织的诱导及继代培养研究

单广福[1,2],张晓丽[1,3],李明军[1,3,4],陈明霞[1,3],刘文英[1],芦　婕[1]

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.河南教育学院,河南 郑州 450046;3.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;4.新乡市中药材保育及利用工程技术研究中心,河南 新乡 453007)

摘　要:以金银花优良品种"金丰一号"为试材,研究了不同外植体及不同浓度激素组合对金银花愈伤组织诱导和继代的影响。结果表明:愈伤组织诱导时,最佳外植体为花蕾下部,最佳培养基为 MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.01 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L,诱导率可达 100%,且愈伤组织生长较快,量多,质地疏松、湿润,颜色鲜亮;愈伤组织继代时,最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.75 mg/L+NAA 0.25 mg/L,在此继代培养基上,经过 3～5 次继代后可以得到 4 种不同类型的愈伤组织。

关键词:金银花;愈伤组织;诱导;继代

中图分类号:S 567.7+9　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2013)05－0106－04

金银花(*Lonicera japonica* Thunb)属忍冬科忍冬属多年生缠绕木质藤本植物,在全国大部分地区都有分布,是一种常用的名贵中药[1],其茎、叶、藤和花蕾均可入药,尤以花蕾最佳[2]。研究表明,金银花的主要化学成分含有绿原酸、异绿原酸、黄酮类以及挥发油等化合物,具有广谱抑菌消炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种功效[3-4]。因金银花通常以扦插方式繁殖,容易使金银花植株携带病毒细菌等,造成金银花植株生长不良,有效成分积累少,植株及产品品质降低。利用现代生物技术和现代农业生产技术细胞工程,可以解决金银花退化等问题。近年来,课题组对河南省道地中药材"金丰一号"金银花组织培养技术进行了系统的研究[5-6]。现分别以金银花优良品种的花蕾上半部分、花蕾下半部分、叶片、茎段和顶芽为外植体,对愈伤组织的诱导和继代进行了研究,为下一步进行细胞培养及有效成分的生产和细胞工程育种奠定技术基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试材为金银花优良品种"金丰一号",经常规灭菌后获得的金银花花蕾上半部分、花蕾下半部分、叶片、茎段和顶芽为外植体。

第一作者简介:单广福(1963-),男,河南柘城人,本科,副教授,研究方向为植物学。E-mail:sgf-718 @163.com.

责任作者: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:河南省教育厅科技攻关计划资助项目(2011B180034);新乡市科技创新平台建设计划资助项目;新乡市科技攻关计划资助项目(08N041)。

收稿日期:2012－11－08

1.2　试验方法

1.2.1　金银花愈伤组织的诱导　采用 4 因素 5 水平设计试验,研究外植体(花蕾上半部分、花蕾下半部分、叶片、茎段和顶芽)、NAA、6-BA 和 2,4-D 4 种因素对愈伤组织诱导的影响,选用 $L_{25}(5^6)$正交表(表 1)。将供试材料接种于正交设计的 25 种培养基上,观察愈伤组织的诱导情况,25 d 时对愈伤组织诱导率进行测定。

表 1　金银花愈伤组织诱导培养基的 $L_{25}(5^6)$正交实验设计

Table 1　Orthogonal array $L_{25}(5^6)$ of callus induction medium of *Lonicera japonica* Thunb.

培养基序号 No. of medium	因素 Factors 外植体 Explant (A)	NAA/mg·L^{-1} (B)	6-BA/mg·L^{-1} (C)	2,4-D/mg·L^{-1} (D)
1	1(花蕾上部)	1(0)	1(0)	1(0)
2	1	2(0.1)	2(0.01)	2(0.1)
3	1	3(0.5)	3(0.10)	3(0.5)
4	1	4(1.0)	4(0.50)	4(1.0)
5	1	5(2.0)	5(1.00)	5(2.0)
6	2(花蕾下部)	1	2	5
7	2	2	3	1
8	2	3	4	2
9	2	4	5	3
10	2	5	1	4
11	3(顶芽)	1	3	4
12	3	2	4	5
13	3	3	5	1
14	3	4	1	2
15	3	5	2	3
16	4(叶片)	1	4	3
17	4	2	5	4
18	4	3	1	5
19	4	4	2	1
20	4	5	3	2
21	5(茎段)	1	5	2
22	5	2	1	3
23	5	3	2	4
24	5	4	3	5
25	5	5	4	1

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

1.2.2 愈伤组织的继代培养 采用3因素3水平设计，研究6-BA、KT和NAA对愈伤组织继代的影响，选用$L_9(3^3)$正交表(表2)，将愈伤组织分别接种于继代培养基上，每种培养基接种5瓶，每瓶放4份大小均匀的愈伤组织块。25 d时观察并统计其增殖率及生长情况。将愈伤组织在筛选出的继代培养基上继代3～5次后，按照外部形态、质地等对愈伤组织进行分类。接种鲜重(mg/瓶)＝接种后瓶重(mg)－接种前瓶重(mg)；收获鲜重(mg/瓶)＝收获前瓶重(mg)－收获后瓶重(mg)；增殖率(%)＝(收获鲜重－接种鲜重)/接种鲜重×100%。

表2 金银花愈伤组织继代培养基的$L_9(3^3)$正交设计

Table 2 Orthogonal array $L_9(3^3)$ of callus subculture medium of *Lonicera japonica* Thunb. mg/L

培养基序号 No. of medium	因素 Factors 6-BA(A)	KT(B)	NAA(C)
1	1(1.50)	1(0.50)	1(0.10)
2	1	2(0.75)	2(0.25)
3	1	3(1.50)	3(0.50)
4	2(2.0)	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3(2.5)	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

1.2.3 培养条件 愈伤组织诱导及继代培养：温度(25±2)℃，光照强度2 000 lx，光照时间14 h/d。

1.3 数据分析

试验数据用Excel软件计算和作图，并用SPSS 11.5统计软件对所得数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

将金银花花蕾上半部分、花蕾下半部分、叶片、茎段和顶芽接种于正交设计的25种愈伤组织诱导培养基上，观察愈伤组织的诱导情况。从表3可以看出，3、6、8、9、10、14、15、18、19、20、22、23和25号培养基中出愈率均为100%，4、18、20号培养基愈伤组织量最大；至25 d时，1号培养基仍无愈伤组织产生，整体上来看，花蕾和叶片诱导出的愈伤组织较好，量多，质地疏松、湿润，颜色鲜亮，生长较快，而茎段和顶芽诱导的愈伤组织量少、生长缓慢。

对5种外植体的愈伤组织诱导率进行了方差分析、极差分析，由表4、5可以看出，4种因素对愈伤组织诱导率影响的效应大小分别依次为NAA＞6-BA＞2,4-D＞外植体，各因素F值均小于$F_{0.05}$，故对愈伤组织诱导率的影响差异并不显著；根据各试验因子的总和或平均数可看出，A取A_2，B取B_5，C取C_2，D取D_3为最好，即诱导愈伤组织的最佳外植体为花蕾下部、最佳培养基为MS＋NAA 2.0 mg/L＋6-BA 0.01 mg/L＋2,4-D 0.5 mg/L。

表3 正交设计培养基对金银花不同外植体愈伤组织诱导的影响(25 d)

Table 3 Effect of orthogonal array medium on the callus induction from different explants types of *Lonicera japonica* Thunb. (25 d)

培养基序号 No. of medium	开始出愈时间 Beginning time of induced callus/d	愈伤组织诱导率 Ratio of induced callus/%	愈伤组织量 Quantity of induced callus	愈伤组织生长状况 Callus growth
1	25	0	0	无愈伤组织，80%褐化
2	10	83	+++	黄绿色，疏松
3	8	100	+++	黄绿色，疏松
4	8	78	++++	黄绿色，疏松
5	8	75	+++	黄色，疏松
6	7	100	+++	黄(白)色，疏松
7	8	38	++	绿色，致密，褐化
8	8	100	+++	黄绿色，疏松稍褐化
9	8	100	++	黄绿色，疏松稍褐化
10	7	100	+++	黄白色疏松，点状褐化
11	8	20	++	黄白色疏松湿润较致密
12	8	22	+++	黄绿色，较疏松
13	11	50	+	绿色致密
14	8	100	++	黄白色疏松
15	8	100	+	黄白色湿润疏松
16	11	40	+	白色米粒状
17	11	50	+++	黄绿色湿润疏松
18	8	100	++++	黄白色较致密
19	8	100	+++	绿色致密
20	11	100	++++	绿色致密
21	8	56	+	黄白色
22	7	100	++	黄白色致密
23	7	100	+++	黄白色致密
24	7	70	++	黄白色致密
25	7	100	++	黄白色疏松

表4 金银花不同外植体愈伤组织诱导率的方差分析(25 d)

Table 4 Variance analysis of the ratio of induced callus from different explants types of *Lonicera japonica* Thunb. (25 d)

变异来源 Sources	df	SS	s^2	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A	4	3 022.55	755.64	0.67	3.84	7.01
B	4	10 565.86	2 641.47	2.34	3.84	7.01
C	4	3 549.14	887.29	0.78	3.84	7.01
D	4	3 368.66	842.16	0.75	3.84	7.01
试验误差 Experimental error	8	3 387.44	1 129.15			
总变异 Total variation	24	23 893.65				

表5 金银花不同外植体出愈率的极差分析(25 d)

Table 5 Range analysis of the ratio of induced callus from different explants types of *Lonicera japonica* Thunb. (25 d)

处理号 No. of treament	外植体 Explants	NAA /mg·L^{-1}	6-BA /mg·L^{-1}	2,4-D /mg·L^{-1}	愈伤组织诱导率 Ratio of induced callus/%
T1	3.36	2.16	4.00	2.88	T=1 882.08
T2	4.36	2.93	4.83	4.40	
T3	2.92	4.50	3.28	4.40	
T4	3.90	4.48	3.40	3.48	
T5	4.26	4.75	3.31	3.67	
$\bar{x}1$	0.27	0.17	0.32	0.23	
$\bar{x}2$	0.35	0.23	0.39	0.26	
$\bar{x}3$	0.23	0.36	0.26	0.35	
$\bar{x}4$	0.31	0.36	0.27	0.28	
$\bar{x}5$	0.34	0.38	0.27	0.29	
R	0.12	0.21	0.13	0.12	

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2.2　愈伤组织的继代培养

将所得的愈伤组织转入继代培养基中,观察其生长情况,25 d时统计试验结果,并对愈伤组织增重量进行方差分析和极差分析。由表6、7可以看出,3种因素对愈伤组织继代的影响效应大小依次为KT＞NAA＞6-BA;因各因素F值均小于$F_{0.05}$,故对愈伤组织诱导率的影响差异不显著;根据各试验因子的总和或平均数可知,A取A_2,B取B_2,C取C_2为最好,即愈伤组织继代的适宜培养基为MS＋6-BA 2.0 mg/L＋KT 0.75 mg/L＋NAA 0.25 mg/L。

表6　植物生长物质对愈伤组织继代培养影响的极差分析(25 d)

Table 6　Range analysis of plant growth regulator on the growth of callus (25 d)

处理号 No. of treament	6-BA /mg·L^{-1}	KT /mg·L^{-1}	NAA /mg·L^{-1}	增重量 Gainning weight/g
1	1(1.5)	1(0.50)	1(0.10)	16.89
2	1	2(0.75)	2(0.25)	45.36
3	1	3(1.50)	3(0.50)	17.49
4	2(2.0)	1	2	22.44
5	2	2	3	48.66
6	2	3	1	11.56
7	3(2.5)	1	3	17.28
8	3	2	1	17.1
9	3	3	2	16.62
$T1$	79.74	56.61	45.55	T=213.4
$T2$	82.66	112.12	84.42	
$T3$	51.00	45.67	83.43	
$\bar{x}1$	17.72	12.58	10.12	
$\bar{x}2$	18.37	24.69	18.76	
$\bar{x}3$	11.33	10.15	18.54	
R	7.04	14.54	8.64	

表7　植物生长物质对愈伤组织继代培养影响的方差分析(25 d)

Table 7　Variance analysis of plant growth regulator on the growth of callus (25 d)

变异来源 Sources	df	SS	s^2	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
A	2	204.05	102.05	1.85	19	99
B	2	819.41	409.71	7.45	19	99
C	2	327.42	163.71	2.98	19	99
试验误差 Experimental error	2	110.04	55.02			
总变异 Total variation	8	1 460.97				

3　讨论与结论

3.1　外植体对愈伤组织的诱导及继代的影响

已有的研究结果表明,不同基因型金银花相同外植体诱导愈伤组织的效果不尽相同[7-8]。该试验分别用“金丰一号”金银花的花蕾、顶芽、叶片和茎段作为外植体诱导愈伤,发现外植体对愈伤组织诱导的影响较大,其中花蕾最好,叶片次之,二者诱导的愈伤组织生长快,颜色鲜亮,茎段诱导愈伤组织效果最差,愈伤组织量少、生长慢且易褐化。这与刘连芬等[9]的研究结果一致。

3.2　植物生长调节剂对愈伤组织的诱导及继代的影响

生长素类物质是最早被发现的植物激素[10],它作为一类重要的生长调节物质,影响细胞的分裂、伸长、细胞形态建成、根的发育、顶端优势以及对光和重力的响应等多种生理过程[11];NAA在较低浓度下促进细胞生长,在高浓度下促进细胞成熟衰老。该试验结果表明,NAA 2.0 mg/L比较适宜金银花愈伤组织的诱导形成,而较适宜金银花愈伤组织继代培养的NAA浓度为0.25 mg/L,较高浓度的NAA对愈伤组织的诱导具有促进作用。2,4-D在低浓度下可以刺激植物生长,与适当浓度6-BA结合时,能更强烈的促进愈伤组织的形成和生长。二者浓度逐渐增大时,愈伤组织的生长越旺盛,但当高于一定浓度时生长反而变得缓慢[12],这可能与愈伤组织诱导过程中高浓度的细胞分裂素使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小、已形成的愈伤组织不能正常生长而逐渐变褐有关[13]。6-BA的作用主要是促进细胞分裂和细胞体积扩大[12],在愈伤组织的诱导及生长过程中,添加适量的细胞分裂素类物质可以促进愈伤组织的生长[13]。该试验结果表明,在愈伤组织的继代培养中,添加适宜浓度的6-BA(2.0 mg/L)有助于愈伤组织的生长,愈伤组织增殖系数较高;而过低或过高浓度的6-BA都不利于愈伤组织的生长。

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]　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):724-727.

[4]　Wang L M,Li M T,Yan Y Y,et al.Influence of flowering stage of *Lonicera japonica* Thunb.on variation in volatiles and chlorogenic acid[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2009,89(6):953-957.

[5]　陈明霞,张晓丽,龚玉佳,等.“金丰一号”金银花的组织培养技术研究[J].北方园艺,2010(23):126-128.

[6]　陈明霞,龚玉佳,刘文英,等.不同因子对“金丰一号”金银花生根的影响[J].河南师范大学学报,2011,39(4):130-132.

[7]　蒋娜,李群.灰毡毛忍冬愈伤组织诱导和增殖的研究[J].西南农业学报,2008,21(6):1690-1694.

[8]　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.

[9]　刘连芬,钱关泽.金银花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.

[10] Zhou S,Yu X L.Roles of heterotrimeric G protein in NAA induction and growth and development of *Arabidopsis thaliana* roots[J].Acta Bot Boreal-Occident Sin,2006,26(8):1617-1620.

[11] Berleth T,Sachs T.Plant morphogenesis:long distance coordination and local patterning[J].Curr Opin Plant Biol,2001(4):57-62.

[12] 张洋,陈志,王慧春,等.2,4-D和6-BA对唐古特大黄愈伤组织诱导的影响[J].河北省科学院学报,2006,23(3):23-25.

[13] 武维华.植物生理学[M].北京:科学出版社,2003:303-308.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性及其室内药剂筛选

杨　瑞[1]，赵宝龙[2]，张　莉[1]，谭小龙[1]，王晓东[1]

(1.新疆兵团绿洲生态农业重点实验室，新疆 石河子 832003；2.石河子大学 农学院，新疆 石河子 832003)

摘　要：为了进一步了解库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性，通过接种试验，研究了不同外界条件因子对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响。结果表明：病原菌菌丝最适生长温度为25～28℃，最适pH为6～7；孢子萌发最适温度为28～30℃，最适pH为7。分生孢子在梨果肉和表皮上萌发率差异不显著，且在梨表皮30℃培养12 h，萌发率可达95.8%。同时证明接种病菌发酵液粗体毒素可导致库尔勒香梨发病。对于7种杀菌剂室内抑制病原菌分生孢子萌发试验，得出甲基托布津对分生孢子萌发的抑制效果最好，其2 000倍液抑菌率为92%。

关键词：梨黑斑病；生物学特性；杀菌剂；孢子萌发

中图分类号：S 436.612.1+4　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2013)05－0109－05

库尔勒香梨是新疆传统的特色果品，具有极强的生长区域性，其皮薄肉细、酥脆多汁、香甜爽口、营养丰富，在国内外市场上享有盛名[1]。近年来，随着库尔勒香梨种植面积的不断扩大，梨树上各种病害相继发生，其中在运输、贮藏和销售的过程中香梨黑斑病尤为突出，严重影响了香梨的鲜果品质和商品价值，造成重大经济损失。梨黑斑病由 *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl 引起，是一种梨树上广泛发生的世界性病害[2-3]。最早在日本发现，随后在中国、韩国、法国等地相继发生[3-4]，危害严重。新疆以霍城、伊宁、哈密等地区发病较普遍[5-6]，给梨产业的发展和出口贸易造成了严重威胁[7]。目前，对梨黑斑病病原菌 *A. alternate* 的生物学特性研究报道较少，对于新疆库尔勒香梨黑斑病的研究鲜见报道。为详细了解库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性，现研究了不同外界因子对 *A. alternate* 菌丝生长和分生孢子萌发的影响，旨在为库尔勒香梨产业可持续发展，有效防治库尔勒梨黑斑病提供理论依据。

第一作者简介：杨瑞(1982-)，男，本科，现主要从事植物病害及其防治研究工作。E-mail：wxdong11@163.com.

责任作者：王晓东(1975-)，男，新疆石河子人，博士，副教授，现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail：wxd_agr@shzu.edu.cn.

基金项目：石河子大学高层次人才科研启动资助项目(RCZX200906)。

收稿日期：2012－11－09

Study on Callus Induction and Subculture of *Lonicera japonica* Thunb.

SHAN Guang-fu[1,2], ZHANG Xiao-li[1,3], LI Ming-jun[1,3,4], CHEN Ming-xia[1,3], LIU Wen-ying[1], LU Jie[1]

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007; 2. Henan Education Institute, Zhengzhou, Henan 450046; 3. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007; 4. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Chinese Crude Drugs, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract: Taking *Lonicera japonica* Thunb. 'Jinfeng No. 1' as material, the effect of different explants and different concentrations of plant growth regulators treatments on callus induction and subculture were studied. The results showed that the callus induction of the best explants was lower buds, and the best induction medium was MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.01 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L, the inducing ratio could reach 100%; the callus grew faster, plenty, moistly, loose, colors brightly. The best subculture medium for callus was MS+6-BA 2 mg/L+KT 0.75 mg/L+NAA 0.25 mg/L, 4 kinds of callus could be obtained after subcultured for 3～5 generations.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; callus; induction; subculture

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn