

忍冬组织培养体系的建立和优化

向增旭^{1*}, 高山林²

(1. 南京农业大学园艺学院中药材研究所, 江苏南京 210095;

2. 中国药科大学中药学院, 江苏南京 210038)

金银花是我国常用中药材,具清热、解毒、抗菌等功效^[1]。忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 是中药材金银花的基原植物,以干燥花蕾入药。忍冬属药用植物种类很多^[2],已有关于北京忍冬^[3]、灰毡毛忍冬^[4,5]、金花忍冬^[6]组织培养方面的报道。但经作者重复文献试验,所报道的金银花组织培养方案繁殖系数不高或试管苗生长不旺盛。本研究对2005年版药典收录的金银花来源植物忍冬 *L. japonica* 进行组织培养的研究,旨在为进一步采用生物技术进行多倍体育种作好技术准备。

1 材料与方

研究材料取自中国药科大学药用植物园内2001年引种的山东蒙花品系金银花。经中国药科大学中药学院高山林教授鉴定为忍冬 *L. japonica*。

2 试验方法

2.1 外植体的灭菌

在田间取长势好的金银花的顶芽和侧芽,剥去叶片,用洗衣粉洗去表面尘土,自来水冲洗1h,然后进行表面灭菌。分别采用升汞、次氯酸钠及漂白精粉3种灭菌剂,进行不同灭菌剂的消毒效果试验。经过表面灭菌处理的芽用无菌水冲洗5次,剥去外层叶片,接种于 $B5 + BA 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IAA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基。培养基含蔗糖0.3%, pH 5.8。

2.2 不同外植体愈伤组织的诱导

外植体材料叶片、茎段、幼芽。消毒后分别接种于 $B5 + BA 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IAA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上。

2.3 组织培养技术的优化

2.3.1 金银花丛生芽诱导培养基的优化 实验设计见表1,三因素三水平正交实验。将金银花愈伤接种于含蔗糖3%, pH 5.8的B5培养基中。每个处理10

瓶,每瓶3块愈伤组织。30d后测出芽数和生长率。

表1 丛生芽诱导培养基优化因素水平 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

水平	A	B	C
	BA	KT	IAA
1	1.5	0.25	0.25
2	2.0	0.50	0.50
3	2.5	0.75	0.75

2.3.2 生根培养基的优化 实验设计见表2,三因素三水平正交实验。将在繁殖培养基中继代培养30d的试管苗,切成2cm左右的小段,接种于含3%, pH 5.8的附加激素的1/2MS培养基中。每个处理10瓶,每瓶10节。20d后测定生根率。

表2 生根培养基优化激素水平 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

水平	A	B	C
	IAA	ABT	PP ₃₃₃
1	0.1	0.05	0.2
2	0.3	0.10	0.4
3	0.5	0.15	0.6

2.3 培养条件

以上试验的培养条件均为每天光照16h,光强1000 Lx,培养温度(25 ± 1) °C。

3 结果与分析

3.1 外植体的灭菌消毒

对5种消毒程序进行了比较。消毒方法和灭菌效果见表3。在选择消毒方案时既要考虑能杀死附着在植物表面的微生物,降低污染,又要尽量降低对外植体的伤害。综合以上实验结果可以看出,外植体用洗衣粉洗去表面灰尘和部分细菌,流水冲洗1h,0.1%升汞浸泡7min,无菌水冲洗4~5次,是比较理想的消毒方案。

3.2 不同外植体愈伤组织的诱导

实验结果见表4。从表4中可以看出,茎、叶、芽诱导形成愈伤组织能力各不相同,顶芽的脱分化能力最强。实验结果表明金银花芽和叶片是比较理想的诱导愈伤组织外植体。

[收稿日期] 2007-02-01

[通讯作者] * 向增旭, Tel: (025) 84396591, E-mail: zxxiang@

njau.edu.cn

表3 不同药剂及灭菌方法效果比较(接种30 d)

编号	消毒药剂及方法	接种数	污染数	污染率/%	存活数	存活率/%
1	75%乙醇30 s + 0.1%升汞5 min	15	0	0	0	0
2	0.1%升汞7 min	15	5	30	8	53
3	0.1%升汞10 min	15	0	0	5	33
4	2%次氯酸钠4 min + 0.1%升汞7 min	15	12	80	3	20
5	漂白精粉饱和溶液10 min	15	15	0	0	0

表4 金银花不同部位愈伤组织的诱导

外植体	接种量	诱导数	诱导率/%
茎	20	12	63
叶	20	16	80
芽	20	20	100

3.3 丛生芽的诱导

试验结果及数据统计见表5。三因素极差分别为5.46, 2.46, 1.91, 因素A(BA浓度)的极差最大, 其水平改变时对试验指标的影响最大, 因此, 因素A是要考虑的主要因素, 它的3个水平所对应的出芽个数平均值分别为7.35, 12.81, 11.11, 以第二水平所对应的数值12.81为最大, 所以取它的第2水平为最好; 依此, 因素B取第3水平; 因素C第1水平。最好的方案应当是 $A_2B_3C_1$ 。筛选出丛生芽诱导培养基为 $B_5 + BA 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IAA 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表5 不同激素配比诱导丛生芽效果

No.	BA	KT	IAA	芽数
1	1	1	1	5.83
2	1	2	2	8.69
3	1	3	3	7.54
4	2	1	2	12.34
5	2	2	3	11.26
6	2	3	1	14.85
7	3	1	3	8.77
8	3	2	1	12.64
9	3	3	2	11.93

3.4 生根培养基的优化

表6可见, 三因素极差分别为30, 7.1, 6.6, 因素A(IAA浓度)的极差最大, 说明因素A的水平改变时对生根的影响最大, 它的3个水平所对应的生根个数平均值分别为23.4, 42.5, 53.4, 所以取它的第3水平为最好; 依此, 因素B取它的第一水平; 因素C取它的第1水平。单个因素对试验指标(出芽)的影响按大小次序来说应当是A(IAA浓度) > B(ABT浓度) > C(PP₃₃₃浓度)。最佳方案是 $A_3B_1C_1$ 。即筛选出生根诱导培养基为 $1/2MS + IAA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + ABT 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + PP_{333} 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表6 不同激素配比诱导生根效果

No.	IAA	ABT	PP ₃₃₃	根数
1	1	1	1	33.0
2	1	2	2	16.4
3	1	3	3	21.0
4	2	1	2	51.2
5	2	2	3	38.4
6	2	3	1	38.0
7	3	1	3	47.8
8	3	2	1	64.0
9	3	3	2	56.4

4 讨论

关于金银花组织培养的文献报道不多, 且均以MS培养基为基本培养基^[1,2]。作者重复文献的方法发现, 在MS培养上虽然也能不同程度的诱导出愈伤组织, 但是愈伤的生长状况较差。B₅培养基的主要特点是铵含量较低, 因铵可能对某些生长物有抑制生长的作用。作者以B₅培养基作为基本培养基, 以叶片、茎段及顶芽做为外植体, 结果诱导出愈伤组织生长旺盛, 愈伤经过2至3次继代培养, 不同程度的诱导出丛生芽, 尤其以顶芽做为外植体诱导丛生芽效果最为理想。但BA激素质量浓度大于 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱导出的丛生芽有较为严重的玻璃化现象, BA减低到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 玻璃化现象消失, 丛生芽生长良好。

[参考文献]

- [1] 王天志, 李永梅. 金银花研究进展[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(4): 292.
- [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]. 中国中药杂志, 1999, 34(11): 724.
- [3] 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] 唐效蓉, 李午平, 彭晓峰. 灰毡毛忍冬的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 462.
- [5] 王晓明, 易霁琴, 宋庆安, 等. 灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系建立[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 14.
- [6] 李景刚, 孙满枝. 良种金银花的组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技, 2004, 7: 36.

[责任编辑 张宁宁]