

金银花组织培养的研究进展

王晓明^{1,2}, 李永欣¹, 聂启英³

(1. 湖南省林业科学院, 湖南长沙 410004; 2. 中南林业科技大学, 湖南长沙 410004;

3. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南长沙 410004)

摘要: 综述了金银花组织培养的研究进展, 包括外植体、培养基、植物激素、细胞培养、培养条件及组培苗移栽等方面的研究成果, 提出了金银花组织培养存在的问题及建议。

关键词: 金银花; 组织培养; 研究进展

中图分类号: S 567.7*9 文献标识码: A 文章编号: 1003-5710(2006)04-0001-03

The research development of the tissue culture of *Lonicera japonica* Thunb

WANG Xiao-ming^{1,2}, LI Yong-xin¹, NIE Qi-ying³

(1. Hunan Forestry Academy, Changsha 410004, China; 2. Central South Forestry Academy, Changsha

410004, China; 3. Changsha Environmental Protection Polytechnic, Changsha 410004, China)

Abstract: The research development of the tissue culture of *Lonicera japonica* Thunb was summerized in the paper. The research development including the explant, culture medium, hormone of plant, cell culture, culture condition and transplant of tissue culture areas. The existing problems and countermeasures of the tissue culture of *Lonicera japonica* Thunb were also pointed in the paper.

Key Words: *Lonicera japonica* Thunb; tissue culture; research development

金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬(*Lonicera japonica* Thunb)及同属多种植物的干燥花蕾^[1], 为多年生半常绿藤本植物, 集保健、药用、观赏及生态功能于一体, 是国务院确定的名贵中药材之一。它具有清热解毒、消炎退肿、抑菌、抗病毒、增强免疫力等功效, 广泛应用于制药、香料、化妆品、食品等领域^[1-3]。

金银花一般采用扦插、嫁接、分株或压条繁殖, 繁殖系数小, 育苗周期长, 且易传染病菌, 品种退化快。植物组织培养能保持母株的优良性状, 具有繁殖系数高, 周年生产, 可实现金银花良种苗木规模化工厂生产。金银花组织培养研究始于 20 世纪 80 年代, 但直到近几年有关研究才逐渐增多。目前已在茎段和芽培养、离体叶培养、细胞培养等方面取得了一定进展。

1 茎尖、茎段、芽的培养

1.1 外植体

收稿日期: 2006-04-05

修订日期: 2006-06-01

作者简介: 王晓明(1964-), 男, 在读博士, 研究员, 主要从事经济林育种、栽培与生物技术研究。

不同的外植体及采取时期对金银花组织培养外植体存活和诱导丛芽影响较大。金银花组织培养的外植体, 通常采用生长季节的幼嫩茎段和顶芽, 但多数是选用带腋芽的茎段^[4-11]。接种时将其剪成 1.5~3.0 cm 长, 或直接取顶芽培养, 也有用萌发的冬芽芽尖^[14]。研究发现, 春季剪取的嫩茎作外植体, 比夏季和秋季嫩茎的存活率和诱导率高, 顶芽比带腋芽的茎段萌发快, 且不定芽的生长量也较高^[11]。

外植体消毒一般用 70%~75% 的乙醇和 0.1%~0.2% HgCl₂。多采用 70%~75% 的乙醇浸泡外植体 10~20 s, 凤爪金银花、良种 PM-1 和蓝靛果则浸泡 30~60 s^[6,14,17], 无菌水冲洗 2~3 次, 然后用 0.1%~0.2% HgCl₂ 消毒 5~8 min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次^[3-11]。李景刚等^[17]则在外植体消毒前用紫外线照射 20 min。有试验表明, 加 2~3 滴吐温 80 于 0.1% HgCl₂ 溶液中处理外植体的消毒效果更佳, 这与金银花茎段和芽体密被绒毛有关^[11]。

1.2 诱导培养

大多研究认为, 金银花诱导培养选用 MS 培养基或稍加改良 MS 培养基的诱导效果较好, 芽萌动较快。但

杨培君等^[6]在蒙花金银花组培中使用了 B₅ 培养基。不同种类激素及浓度配比对丛生芽的诱导影响较大。一般认为诱导培养基的细胞分裂素和生长素浓度比为 10 ~ 12.5:1 时较好^[5,6,9,11,14]。但杨培君等^[7]在研究中认为,蒙花金银花丛生芽诱导所用细胞分裂素和生长素浓度比例以 2.3 ~ 2.5 为宜。黄守印等^[8]认为北京忍冬诱导培养基两者比例为 6 时较好,而李景刚等^[17]则认为金银花良种 PM-1 诱导培养基的两者比例以 20 最好,分化率达 93%,平均丛生芽数 9 个。

1.3 增殖培养

增殖培养的基本培养基与诱导培养大致相同,多采用 MS 培养基。Karhu.S.T 研究发现,降低 MS 培养基矿物质浓度至 75%,可提高蓝靛果增殖系数,但进一步降低矿物质浓度至 50%时,顶芽的伤害增加^[12]。灰毡毛忍冬增殖培养基中硝酸钾为零,磷酸二氢钾、硝酸铵、氯化钙和硫酸镁分别减半,组培苗分化最好,增殖系数达 4.0^[11]。

通过调节细胞分裂素 BA 和生长素 IBA、NAA、IAA 的配比,实现组培苗增殖。一些试验中还使用了 KT、ZT,如蒙花金银花在 B₅ + BA 2.0 mg·L⁻¹ + KT 0.36 mg·L⁻¹ + IAA 1.0 mg·L⁻¹ + CH 1 000 mg·L⁻¹ 上产生愈伤组织较少,增殖系数较高^[7];北京忍冬增殖培养基也添加了 ZT 0.5 mg·L⁻¹^[8]。有些品种增殖时没有使用生长素^[14],如蓝靛果增殖培养基是 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹。另有研究报道,在增殖培养基中添加适量的有机物有利于组培苗增殖和生长。如在蒙花金银花组织培养中添加水解乳蛋白(LH)和水解酪蛋白(CH),在灰毡毛忍冬组培中添加生物素 D^[7,11]。

金银花增殖及生长还受培养基含糖量、琼脂含量、pH 值、光照、温度和培养周期等因素影响。蔗糖是常用碳源,增殖培养的蔗糖浓度一般为 20 ~ 30 g·L⁻¹。在增殖或生根培养中,使用蔗糖和白砂糖对组织培养苗增殖或生根无显著性差异^[11],因此,在组培苗规模化生产中,可以用白砂糖代替蔗糖,降低生产成本。一般来说,金银花增殖培养基琼脂为 7 g·L⁻¹,pH 值 5.6 ~ 5.8,光照时间 12 ~ 14 h·d⁻¹,光照强度 1 500 ~ 2 200 lx,培养温度 24 ~ 28 °C。Karhu.S.T 在蓝果忍冬和蓝靛果组培中发现,增加培养温度,可提高腋芽的增殖数量,白天与夜晚的温度为 26 °C/20 °C 时的增殖数量明显比 24 °C/20 °C 时高,28 °C/21 °C 时的增殖数量最高(蓝果忍冬和蓝靛果分别为 10.4 和 21.1),但是顶芽的伤害也较多(蓝果忍冬为 17%,蓝靛果为 49%)^[12]。金银花培养周期以 20 ~ 30 d 为宜。但红河金银花随着继代数的增加,形成幼苗天数越来越短,至 6 代后形成幼苗的天数缩短至 9 d^[5],蒙花金银花则要培养 35 ~ 40 d 才转接继代一次^[7]。Hiroyuki Imanishi 对蓝果忍冬组培苗冷处理过程中棉子糖的浓度变化进行了研究,结果表明,组培苗中的棉子糖

浓度与其抗冻性密切相关^[18]。

1.4 生根培养

金银花组培苗生根培养绝大多数采用 1/2MS 培养基^[3-13],也有用 1/4MS^[14]。所使用激素主要是生长素 IBA、NAA、IAA。不同品种诱导生根的生长素种类和浓度有较大的差别。蒙花金银花、北京忍冬、灰毡毛忍冬均采用 IBA 0.2 ~ 3.0 mg·L⁻¹ 诱导生根^[7,8,11],而红河金银花、凤爪金银花、皱叶忍冬则采用 NAA 0.02 ~ 0.05 mg·L⁻¹ 加 IAA 或 IBA 1.0 mg·L⁻¹ 生根培养^[5,6,9],也有采用高浓度 NAA 3.0 mg·L⁻¹ 诱导生根^[17]。一些试验认为,减少矿物质浓度可以使根增长,但不增加根的数量^[13]。另有研究认为,在金银花生根培养基中添加 200 mg·L⁻¹ 的活性炭能促进生根,生根率达 94.4%,且须根较多,苗木粗壮^[11]。

金银花生根培养多在温度 25 ± 2 °C 条件下培养。但灰毡毛忍冬生根培养适宜温度为 20 °C,生根率达 98.7%,比 25 °C 高 9.7%^[11]。

1.5 炼苗与移栽

组培苗根长 1.5 ~ 2.0 cm 时^[5,6],在自然条件下炼苗 5 d,开口炼苗 2 d^[8],即可移栽。但也有研究认为,金银花组培苗移栽不需要炼苗,采用“塑料杯单株一步移栽方法”,移栽成活率达 95%^[11]。移栽温度以 12 ~ 28 °C,相对湿度 80% ~ 85%^[5,6] 为宜。移栽基质对组培苗移栽成活率影响较大。适宜的移栽基质有河砂 + 蛭石或泥炭(1:1)^[6,14]、珍珠岩 + 腐殖土(1:1)或珍珠岩 + 蛭石 + 腐殖土(1:1:1)^[8]、黄心土 + 炭化糠壳灰 + 细砂(1:2:2)^[11]。也有试验表明,不同基质对成活率影响不显著,移栽在纯河砂、纯蛭石、河砂蛭石各半的 3 种基质上,成活率 90% 以上^[5]。

2 叶片离体培养及愈伤组织诱导

金银花叶片培养常用培养基为 B₅、MS^[15,20]。诱导愈伤组织所使用的激素一般是 BA、KT、IAA、NAA、2,4-D。宋广运等认为^[20],2,4-D 有利于愈伤组织的产生与生长,适宜的浓度范围是 0.5 ~ 1.0 mg·L⁻¹,NAA 诱导愈伤组织的效果不及 2,4-D。愈伤组织的诱导受胞分裂素与生长素比例大小的影响,两者比值以 2.2 ~ 2.5 为宜^[7,15],但赵越、宋广运等却认为两者比值以 0.1 为好^[14,20]。不同金银花品种诱导愈伤组织产生不定芽及生根的激素种类及浓度有较大差异,蓝靛果诱导不定芽的培养基是 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.01 mg·L⁻¹,诱导生根是 1/4MS + IBA 1.0 mg·L⁻¹^[14],金银花诱导不定芽则是 B₅ + 6-BA 2.2 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·L⁻¹ + IAA 2.0 mg·L⁻¹,生根培养基为 1/2B₅ + IAA 0.08 mg·L⁻¹^[15]。

3 细胞培养

有些学者对金银花细胞培养进行了一些探索性研

究^[21-24],主要研究了细胞悬浮培养过程中次生代谢物的变化。Horiike T等^[21]在金银花细胞悬浮培养中获得了6种姜黄二酮类物质,即(2S)-2-羟基姜黄二酮、(2R)-2-羟基姜黄二酮、(8S)-6-羟基姜黄二酮、(2R,8S)-8-羟基-2-羟基姜黄二酮、(1S,10S)-1,10-环氧姜黄二酮和(1R,10R)-1,10-环氧姜黄二酮。Yamamoto H等^[22]认为,金银花细胞悬浮培养不会产生环烯醚萜和裂环烯醚萜,但细胞能将马钱素转化成环烯醚萜或裂环马钱素,也能将7-脱氧马钱素转化成马钱素和环烯醚萜或裂环马钱素,而不能将香叶醇转化成环烯醚萜和环烯醚萜或裂环马钱素。Yamamoto H^[23]还证明了细胞色素P450是马钱素转化合成环烯醚萜或裂环马钱素的催化酶。

4 存在问题和建议

目前,金银花组织培养的研究不多,真正地大规模应用于生产的很少,仅有灰毡毛忍冬^[11]和南江金银花^[16]实现了组培苗规模化繁殖生产,其主要原因是金银花组培苗大面积移栽的成活率较低,育苗成本高,限制了组培苗的商品化生产。叶片培养中不定芽的诱导率还偏低。至今尚未见到金银花茎尖脱毒、原生质、胚乳、花药、花粉等培养的有关研究报告,应加大体细胞和胚培养的研究力度,为金银花转基因工程、倍性育种、体细胞杂交和种质保存奠定基础。金银花细胞培养及次生代谢物质培养的研究有零星的报道,但尚未产业化,一些关键技术没有解决,如最适培养工艺流程、高产细胞系的诱导与筛选等,应加强金银花细胞大规模反应器培养的研究,为工业化生产次生代谢物提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 王天志,李永梅.金银花的研究进展[J].华西药学杂志,2000,15(4):292-298.
- [2] 郭巧生.药用植物栽培学[M].北京:高等教育出版社,2004.353-361.
- [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] 杨 晓.红金色金银花的组织培养[J].植物杂志,1989,(5):8.
- [5] 李 军,乔元伟.红河金银花的组培快繁技术[J].山东林业科技,2000,(3):21.
- [6] 王光金.凤爪金银花的组织培养技术[J].河北林业科技,2002,(5):15.
- [7] 杨培君,陈德经,赵 桦,等.蒙花忍冬的组织培养与快速繁殖研究[J].西北植物学报,2003,23(7):1304-1307.
- [8] 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,2005,(4):3-4.
- [9] 覃拥灵.邹叶忍冬的组织培养与快速繁殖初步研究[J].河池学院学报,2004,24(4):32-34.
- [10] 易霭琴,王小明,宋庆安,等.灰毡毛忍冬(金银花)组培苗移栽技术研究[J].湖南林业科技,2005,32(3):34-35.
- [11] 王小明,罗金塔,易霭琴,等.灰毡毛忍冬(金银花)新品种选育及快繁技术研究[DB].科技成果库,登记号:943Y20050208.
- [12] Karhu. S. T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture[J]. Holand. 1997,48(3):153-159.
- [13] Karhu. S. T. . Axillary shoot proliferation of blue honeysuckle Plant Cell, Tissue & Organ Culture[J]. Holand. 1997,48(3):195-201.
- [14] 赵 越,霍俊伟,王立娟.蓝靛果的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,2004,39(5):468.
- [15] 李利改,郭 龙,秦金山.金银花组织培养[J].植物生理学通讯,1987,(4):58-59.
- [16] 四川省巴中实用技术研究所,成都中医药大学.南江金银花组织培养高效繁殖技术研究开发[DB].中国科技成果数据库,项目年度编号:0400051030.
- [17] 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.
- [18] Hiroyuki Imanishi, Takeyasu Kawaguchi, Takashi Suzuki. Accumulation of Raffinose During Cold Acclimation in *Lonicera Caerulea* L. Plantlets Cultured in Vitro[J]. Cryo Letters, 1997, 20(4):235-242.
- [19] Palacios, N. , P. Christou, M. J. Leech. Regeneration of *Lonicera tatarica* plants via adventitious organogenesis from cultured stem explants[J]. Plant Cell Rep, 2002, 20: 808-813.
- [20] 宋广运,梁 宏.忍冬组织培养及其次生代谢物质的研究[J].药学通报,1987,120(10):588-589.
- [21] Horiike T, Ohshiro M, Kuroyanagi M. . Biotransformation of the germacranolide type sesquiterpene curdione by suspension cultured cells of *Lonicera japonica* [J]. Phytochemistry, 1997, 44(4):627-632.
- [22] Yamamoto H; Katano N; Ooi A; Inoue K. . Transformation of loganin and 7-deoxyloganin into secologanin by *Lonicera japonica* cell suspension cultures [J]. Phytochemistry, 1999, 50(3):417-422.
- [23] Yamamoto H; Katano N; Ooi A; Inoue K. . Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450 [J]. Phytochemistry, 2000, 53(1):7-12.
- [24] Satish M. Nalawade, Abhay P. Sagare, Chen-Yue Lee. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization [J]. Bot. Bull. Acad. Sin. 2003, 44:78-98.