

# 金银花(*Lonicera japonica* Thunb.) 愈伤组织的诱导和分化

刘连芬 钱关泽

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

**摘要** 以金银花的茎、叶片、芽为外植体,在70个不同浓度IAA、NAA、6-BA组合的MS培养基上进行愈伤组织诱导,分析了金银花的快速繁殖体系的培养条件,发现芽是金银花组织培养的最佳外植体,IAA和NAA的最佳浓度均为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,6-BA的最适浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,确定适宜的初代培养基为:MS+6-BA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,诱芽培养基为:MS+6-BA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA  $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**关键词** 愈伤组织,金银花,快速繁殖,组织培养

**中图分类号** Q949 **文献标识码** A **文章编号** 1672-6634(2007)04-0048-03

## 0 引言

金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)属忍冬科忍冬属植物,又名忍冬、银花、双花、二宝花.该种为多年生半常绿木质藤本<sup>[1]</sup>,节间中空,节部膨大,不定根发达;单叶对生,叶片卵形或长卵形,两面被柔毛;每叶腋内由二花组成一小聚伞花序,花两侧对称,花冠唇形,初开时为白色,2~3天后变成金黄色,故名金银花<sup>[2]</sup>;浆果球形,蓝黑色,成对生于叶腋中.花期4~6月,果期10~11月<sup>[3]</sup>.

除西北、东北等高寒、干旱地区和海南外,全国各地均有分布.金银花全草均可入药,花蕾入药称为金银花,茎藤为金银藤或忍冬藤.二者功效相近,但忍冬藤的药力较弱,其性味甘寒,有清热解毒之功能,有用于治疗水痘、毒菌中毒等症<sup>[4]</sup>的报道.金银花功能清热解毒、消炎、除火,主治温病、风热感冒、咽喉肿痛、肺炎、痢疾、痛肿溃疡、丹毒等症<sup>[5]</sup>.金银花花蕾含有挥发性芳香油、肌醇、皂甙、绿原酸和黄酮类化合物等,还含有肉桂酸、橙花醇、茉莉醛等;茎中含有生物碱;叶中含有忍冬素、忍冬甙和木犀素等.据药理研究,金银花对痢疾杆菌、大肠杆菌、葡萄球菌、肺炎双球菌等有抑制作用<sup>[4]</sup>.在2003年的“非典”时期,以金银花为重要成分的中草药对“非典”的预防作用显著.金银花除作为用途广泛的中药材外,还具有良好的保健作用.金银花茶香气宜人,可以制作饮料,对防治盛夏中暑、上呼吸道感染、风热感冒和肠胃疾病有良好的效果.对清除人体自由基、延缓衰老、提高人体免疫机能等具有良好的作用,因而也是高血压和心血管系统患者降低胆固醇的保健佳品.早期金银花药材均为取自野生材料,随着需要量的加大,逐渐开始有人栽植,并分化出密银花、东银花等地方类型.目前人们对金银花的需求无论在数量和质量上都急剧增长,实际生产能力还不能满足需要.尤其是金银花的品种较少,主要是引自野生的种源.运用现代生物技术进行新品种培育有望成为解决产量和质量问题的有效手段.组织培养技术是植物脱毒和快速繁殖的有效手段,探索金银花的组培技术有重要的经济意义.此前对凤爪金银花已有组培报道<sup>[5]</sup>,但经实验发现金银花与前者组培条件有所不同.我们分别采用茎、叶、芽作外植体,用不同的激素组合进行对照实验,以探索金银花的组培条件.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从聊城大学校园采集四叶期的健壮金银花幼茎,剪取茎、叶片、芽作外植体进行培养。

### 1.2 方法

(1) 培养基. 试验以MS培养基为基本培养基,以不同的生长调节物质浓度组合共设计采用了七十种愈伤组织诱导培养基M1~M70和九种不定芽增殖培养基M71~M79(见表1). 所有培养基均添加3%蔗糖,0.65%琼脂,调至pH 5.8,分装于100 mL锥形瓶内,每瓶25 mL,封口后在121℃条件下灭菌20 min,并且将重蒸水、镊子、解剖刀、解剖针、滤纸用聚丙烯薄膜包装后一并灭菌. 待培养基冷凝后,放入超净工作台,紫外线表面灭菌1 h,准备接种。

(2) 愈伤组织的诱导. 取新鲜的茎,叶,芽,先用流水冲洗30 min,然后放到超净工作台上,紫外灯光照30 min,用70%酒精灭菌15 s,再用0.1%升汞灭菌5 min,无菌水冲洗3~5次,用无菌滤纸吸干材料表面的水分. 用手术刀将材料切成若干小片,将材料接种在M1~M70培养基上,先经暗培养24 h,然后置于25℃和光照为1 000~1 500 lx(12h/d)培养。

(3) 不定芽的诱导 将初代培养的愈伤组织在无菌条件下切割,转接到诱芽培养基M71~M79上. 置于25℃下,先暗培养1 d,然后置于光照为1 000~1500 lx(12 h/d)条件下培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体对诱导愈伤组织的影响

不同类型的外植体对诱导愈伤组织的效果不同(见表2)

试验结果表明,用芽做外植体诱导愈伤组织效果最好,不仅愈伤组织数量多而且诱导速度快;用叶作外植体也诱导出了愈伤组织,但速度比较慢,数量相对较少;实验显示,用茎作外植体诱导率低于用芽和叶,而且褐化现象较严重. 王光全等报道以具芽的茎为外植体进行组织培养获得成功,实际上是先诱导出丛生芽,再用芽进行组织培养。

表3 NAA浓度对愈伤组织诱导的影响(6-BA浓度相同)

Material of explants	Concentration of NAA(mg · L <sup>-1</sup> )	Number of inoculation	Induction rate(%)		
			20d	25d	30d
Explants	0.1	20	0	0	0
	0.3	20	12.5	13.3	21.2
	0.5	20	40	45.4	78.5
	0.8	20	30.1	33.6	75.6
	1.0	20	63.2	67.9	97.5
	1.5	20	57.8	65.6	90.3
	2.0	20	31.2	35.7	60.3

### 2.2 愈伤组织的诱导

不同浓度的生长素和细胞分裂素的组合对愈伤组织诱导的效果不同。

表1 培养基的成分<sup>[3,4]</sup>

Medium	Composition of plant growth substances(mg · L <sup>-1</sup> )
M1~M7	MS+IAA 0.1-2 + 6-BA 0.1
M8~M14	MS+IAA 0.1-2 + 6-BA 0.5
M9~M21	MS+IAA 0.1-2 + 6-BA 1.0
M22~M28	MS+IAA 0.1-2 + 6-BA 1.5
M29~M35	MS+IAA 0.1-2 + 6-BA 2.0
M36~M42	MS+NAA 0.1-2 + 6-BA 0.1
M43~M49	MS+NAA 0.1-2 + 6-BA 0.5
M50~M56	MS+NAA 0.1-2 + 6-BA 1.0
M57~M63	MS+NAA 0.1-2 + 6-BA 1.5
M64~M70	MS+NAA 0.1-2 + 6-BA 2.0
M71	MS+NAA 0.02 + 6-BA 0.1
M72	MS+NAA 0.02 + 6-BA 0.5
M73	MS+NAA 0.02 + 6-BA 1.0
M74	MS+NAA 0.05 + 6-BA 0.1
M75	MS+NAA 0.05 + 6-BA 0.5
M76	MS+NAA 0.05 + 6-BA 1.0
M77	MS+NAA 0.08 + 6-BA 0.1
M78	MS+NAA 0.08 + 6-BA 0.5
M79	MS+NAA 0.08 + 6-BA 1.0

注:0.1~2代表0.1,0.3,0.5,0.8,1,1.5,2(mg · L<sup>-1</sup>)

表2 外植体对诱导愈伤组织的影响

Explants	Rate of mean callus (%)			
	7d	14d	21d	28d
Buds	30.1	70.2	90.5	99.6
Leaves	13.7	50.1	88.9	95.7
Stems	1.2	5.3	7.1	8.2

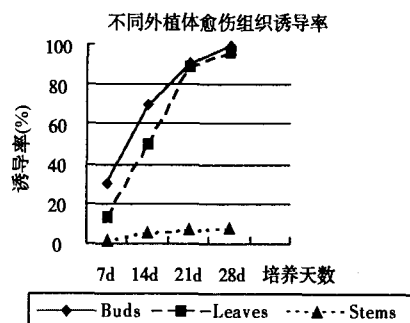


图1 不同外植体愈伤组织诱导率

表4 IAA浓度对愈伤组织诱导的影响(6-BA浓度相同)

Material of explants	Concentration of IAA(mg · L <sup>-1</sup> )	Number of inoculation	Induction rate(%)		
			20d	25d	30d
Explants	0.1	20	0	0	0
	0.3	20	10.2	11.5	18.9
	0.5	20	30	39.2	71
	0.8	20	27	28.5	73.2
	1.0	20	54	56.7	88.3
	1.5	20	46.3	52.1	75.6
	2.0	20	25.4	27.7	53.2

(1) IAA 和 NAA 浓度对愈伤组织诱导的影响. 试验结果表明(表3,表4,图2),NAA 和 IAA 都是在  $0.5 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围内诱导效果较好. 其中又以 NAA 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时效果最好,诱导率最高,达  $97.5\%$ . 随着浓度升高诱导率下降;当浓度低于  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,诱导效果也欠佳. IAA 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时诱导率也较高,达到  $88.3\%$ .

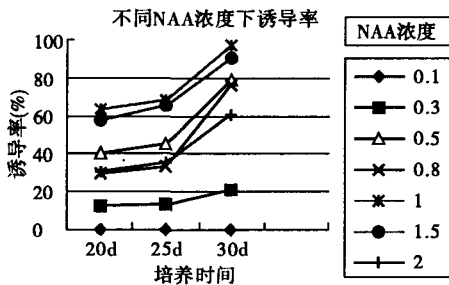


图2 不同NAA浓度下芽愈伤组织诱导率

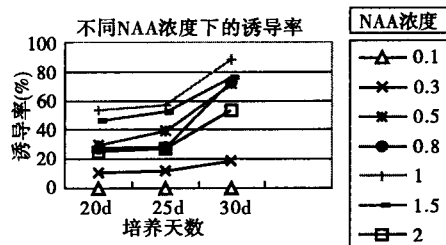


图3 不同IAA浓度下芽愈伤组织诱导率

(2) 6-BA 浓度对愈伤组织诱导的影响. 试验结果表明(见表5)6-BA 浓度在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

表5 6-BA 浓度对愈伤组织诱导率的影响(生长素浓度相同)

Material	Concentration of 6-BA( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Induction rate(%)					
		IAA( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			NAA( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		
		20d	25d	30d	20d	25d	30d
Explants	0.1	56.3	76.3	95.1	81.8	90.9	100
	0.5	35.4	41.2	85.2	42.1	57.9	100
	1.0	21.5	30.3	71.5	35	45.6	81.5
	1.5	0.8	1.1	1.1	1.5	2.5	2.5
	2.0	0	0	0	0	0	0

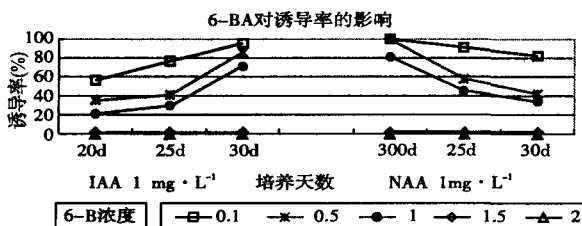


图4 不同6-BA浓度下芽愈伤组织诱导率 (IAA和NAA分别为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时)

和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时诱导效果较好. 其中  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导率达  $95.1\%$ .

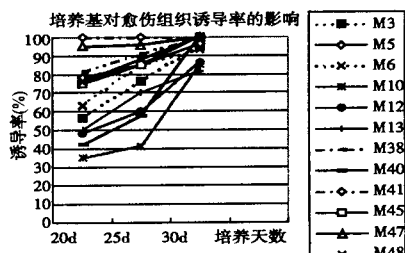


图5 不同培养基上愈伤组织诱导率的变化

接种 10 d 后,叶片及芽外植体变绿且变厚,接触到培养基的外植体表面长出米粒状的白色愈伤组织. 对比发现 M3、M5、M6、M10、M12、M13、M38、M40、M41、M45、M47、M48(分属于六种培养基)效果较好(见表6及图5),生长速度快且愈伤组织多,六者 6-BA 浓度在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,而生长素浓度范围较宽在  $0.1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其中又以 M40( $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )效果最好. 因此较理想的金银花愈伤组织诱导培养基配方是  $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 分析这些培养基上培养时间与诱导率的关系发现,随着培养时间的延长,实际诱导率百分值越来越接近. 这可能与生长激素浓度随时间延长发生变化有关,具体变化规律尚需进一步研究.

表6 不同培养基上时间对诱导愈伤组织的影响

Medium	Rate of mean calli(%)		
	20d	25d	30d
M3	56.3	76.3	95.1
M5	78.5	85.2	96.3
M6	63.2	85	93.6
M10	35.4	41.2	85.2
M12	48.2	60.3	86.3
M13	50.1	70.3	81.3
M38	81.8	90.9	100
M40	42.1	57.9	100
M41	100	100	100
M45	75	85	100
M47	95.5	96	100
M48	76.4	88.2	100

### 2.3 不定芽的诱导与分化

将诱导出的愈伤组织切成小块作为外植体,转接到成芽培养基上. 15 d 后,愈伤组织产生大量不定芽. 对比发现,在  $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上芽的分化最多、最快,而随着 6-BA 和 NAA 浓度的升高,产芽率明显减少.

### 参 考 文 献

[1] 王光全. 金银花生物学特性及其栽培利用[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(6): 32~37.

