

华南忍冬组织培养的无菌体系建立

李翔^{1,2}, 杨美纯¹, 全泉¹, 吴庆华³

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西甘蔗研究所, 南宁 530007; 3. 广西药用植物园, 南宁 530023)

摘要: 以广西山银花的种植品种华南忍冬带腋芽茎段为外植体建立无菌体系。结果表明, 较适宜的灭菌处理为外植体用 75% 酒精处理 25 s, 再用 0.1% 升汞溶液(加吐温 80)处理 9 min, 污染率最低为 6.7%; 初代培养腋芽萌发较适宜的培养基为 MS+6-BA2.0 mg/L, 萌发率 63.3%, 比 CK 组的高 33.3%; 继代周期为 30 d, 继代增殖较适宜培养基为 MS+6-BA1.7 mg/L, 芽比较粗壮, 平均每丛芽增加芽数为 10.7 个, 比 CK 组高 9.5 个。

关键词: 华南忍冬; 组织培养; 快速繁殖; 愈伤组织

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)06-0823-04

Tissue culture and rapid propagation of *Lonicera confusa*

LI Xiang^{1,2}, YANG Mei-Chun¹, QUAN Quan¹, WU Qing-Hua³

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Sugarcane Institute, Nanning 530007, China; 3. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

Abstract: The stems with axillary buds of Guangxi *Lonicera confusa* were taken as explants to build aseptic system. The results showed that the suitable disposal of sterilization was using 75% alcohol to dispose for 25 s firstly, and then using 0.1% HgCl₂ (with Polysorbate 80) to dispose for 9 min, the minimum rate of pollution was 6.7%; the suitable initial medium to germinate auxiliary buds was MS supplemented with 6-BA1.7 mg/L, germinative rate was 63.3% which was higher than CK 33.3%; the period of subculture was 30 d, the suitable subculture proliferous medium was MS supplemented with 6-BA1.7 mg/L, the buds were strong, and the average of the proliferous buds were 10.7 which was more than CK 9.5.

Key words: *Lonicera confusa*; tissue culture; rapid propagation; callus

华南忍冬(*Lonicera confusa*), 忍冬科多年生半常绿木质藤本植物(中国植物志编委会, 1988; 江苏新医学院, 1997), 是广西山银花中药材的主要品种。《中国药典》把山银花来源规定为忍冬科植物灰毡毛忍冬(*L. macranthoides*)、红腺忍冬(*L. hypoglauca*)、华南忍冬(国家药典委员会, 2005)。山银花叶、藤、花蕾均可入药, 尤以花蕾最佳, 具清热、解毒、抗菌等功效, 是传统的名贵中药材。山银花的有效成分绿原酸(chlorogenic acid)、异绿原酸(iso-chlorogenic acid)具有抗病毒的特殊疗效。据广西中医学院王柳萍(2005)测定, 广西山银花干燥花中绿原酸的含量为 4.72%, 高于《中国药典》2005 年版一部所规定的绿原酸含

量不少于 1.5% 的标准。

由于多年的开垦荒山导致我区山银花野生资源日益减少, 很多地方的山银花已濒临灭绝, 目前山银花药材的供需缺口很大, 仅靠野生资源已难以满足市场需求, 必须快速发展人工种植(袁航远, 2005)。山银花喜湿、耐寒、耐旱、耐涝, 适宜在山区丘陵地带栽培, 这几年我区山银花种植面积逐渐扩大, 2006 年忻城县种植面积 0.47 万公顷, 计划 3 年内扩大到 1.33 万公顷, 至少需要 400 万株种苗。山银花种子萌发率不高, 实生苗种植 3 年以上才开花(农训学, 2005); 枝条扦插成活率也较低, 扦插苗种植第二年有少量植株开花, 到第 4 年盛花期后植株容易出现

收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2008-01-17

基金项目: 广西创新能力建设项目(桂科能 0443001-16)[Supported by the Foundation of Innovative Ability Construction of Guangxi(0443001-16)]

作者简介: 李翔(1981-), 男, 广西梧州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物的有关研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: meichunyang@163.com)

早衰(柏雪云等,2004)。因此必须寻求更好的山银花种苗繁殖途径。植物组织培养是植物种苗快速繁殖的有效手段,本试验研究华南忍冬的组织培养快繁技术,可以解决山银花规模化种植的种苗短缺问题,为山银花的良种繁育及推广提供技术支持。

山银花中只有灰毡毛忍冬品种的组织培养已获得成功(王晓明等,2005),华南忍冬是广西山银花的一个种植品种。目前尚未见关于该品种的组织培养研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

广西药用植物园当年生华南忍冬枝条。

1.2 试验方法

(1)外植体灭菌:将华南忍冬嫩枝去除叶片后剪成1.0~1.5 cm长带一对腋芽的茎段,用洗衣粉溶液和高锰酸钾溶液分别浸泡15 min,自来水漂洗1 h,在超净工作台上分别用3%次氯酸钠溶液灭菌7~11 min;75%酒精浸泡15~35 s;0.1%升汞溶液(加吐温-80)灭菌7~10 min;先用75%酒精浸泡再用0.1%升汞溶液(加吐温-80)处理。无菌水冲洗5~6次。(2)培养基:培养基中均加入白糖30%,琼脂4.5 g/L,pH6~7。(3)接种方法:将华南忍冬1.0~1.5 cm长带一对腋芽的茎段接种于诱导培养基中,诱导腋芽萌发;待腋芽长出2~3节时,转到分化培养基上诱导丛生芽。(4)培养条件:光照强度 $35\sim 46 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间为12~14 h/d,温

表1 酒精与升汞配合使用的灭菌效果
Table 1 Results of sterilization with alcohol and HgCl₂

采样时间 Date	灭菌方法 Sterilized method		外植体数(段) No. of explants	污染外植数(段) No. of the pollutive explants	污染率(%) Rate of pollution	出芽外植体数(段) No. of the germinative explants	腋芽萌发率(%) Germinative rate of the axillary bud
	75%酒精(s) 75% alcohol	0.1%升汞(min) 0.1% HgCl ₂					
2006.05.18	25	9	30	7	23.3	18	60.0
2006.08.07	25	9	30	5	16.7	19	63.3
2006.09.06	25	9	30	3	10.0	21	70.0
2006.10.13	25	9	30	2	6.7	20	66.7
2006.11.10	25	0	30	11	36.7	19	63.3
2006.12.22	0	9	30	12	40.0	18	60.0

注:基本培养基为MS,下同。Note: MS as the basic medium, the same below.

度为26~28℃。

2 结果与分析

2.1 灭菌方法的确定

华南忍冬幼嫩枝芽表皮附着疏柔毛和疏腺毛(钱关泽,1998),灭菌比较困难,灭菌处理时间短,污染严重;时间稍长,则对外植体产生毒害导致腋芽萌发困难。因此本试验用四种灭菌方案对华南忍冬外植体茎段进行灭菌处理,灭菌后的材料接入MS+6-BA2.0 mg/L培养基中,每种灭菌方式接30瓶,每瓶一个茎段,20 d后观察。试验结果表明,使用3%次氯酸钠溶液进行灭菌处理,外植体污染严重,当灭菌时间低于9 min时,外植体污染率在80%以上,当灭菌时间在9 min或以上时,大部分外植体死亡,腋芽萌发率为0。单独使用酒精进行灭菌处理,灭菌时间在15~30 s之间污染率较高,灭菌时间为30 s或以上时,虽然污染率降低了,大部分外植体死亡,腋芽萌发率

几乎为0。各种处理中,浸泡时间25 s的灭菌效果稍好。单独使用升汞处理,效果好于酒精,但污染率仍较高。各种处理中,浸泡时间9 min的灭菌效果稍好。因此选用75%酒精25 s与0.1%升汞溶液(加吐温80)9 min配合进行灭菌处理,接入MS+6-BA2.0 mg/L培养基中,20 d后观察(表1)。由表1可知,将外植体先用75%酒精处理25s,再用0.1%升汞溶液(加吐温80)处理9 min,污染率最低,为6.7%;外植体的萌发率在60.0%以上。

2.2 基本培养基的筛选

将腋芽茎段接种于附加6-BA2.0 mg/L+NAA0.05 mg/L的MS、B5两种培养基上,每个处理接种30瓶,每瓶一个茎段。试验结果表明MS为较好的基本培养基(表2)。

2.3 6-BA对腋芽诱导的影响

将带腋芽茎段接种于附加不同浓度6-BA的MS培养基中,每个处理接种15瓶,每瓶接种2个茎段,接种后30 d内记录外植体出芽数总数、萌发

表 2 基本培养基的筛选
Table 2 The choose of basic medium

基本培养基 Basic medium	接种外植 体数(段) No. of explants	出芽外植体数(段) No. of the germinative explants	腋芽萌发率 Germinative rate of the axillary bud(%)	芽萌发情况 Status of the germination
B ₅	30	16	52.1	5 d 后, 芽体开始萌动; 10 d, 开始抽出丛芽; 30 d 后, 生长速度下降明显, 产生较多的愈伤组织, 叶色微黄
MS	30	14	48.3	7 d 后, 芽体开始萌动; 15 d 后, 开始抽出丛芽; 30 d 后, 芽体健壮, 分化丛芽能力强, 叶色翠绿

表 3 不同浓度的 6-BA 对腋芽萌发的影响
Table 3 Effects of 6-BA different concentrations on germination of axillary buds

编号 No.	6-BA 浓度 (mg/L)	外植体数 (段) No. of explants	出芽外植体数(段) No. of the germinative explants	腋芽萌发率(%) Germinative rate of the axillary bud	出芽总数(个) No. of the axillary buds	平均出芽数 (芽/外植体) The average of the germinative buds	出芽所需时间(d) The days of germinating buds
1	1.0	30	12	40.0	72	2.4	10
2	1.5	30	16	53.3	96	3.2	8
3	2.0	30	19	63.3	138	4.6	7
4	2.5	30	10	33.3	63	2.1	12
CK	0	30	6	20.0	60	2.0	20

表 4 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对比对腋芽萌发的影响
Table 4 Effects of 6-BA and NAA different concentrations on germination of axillary buds

编号 No.	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	外植体数(个) No. of explants	出芽外植 体数(段) No. of the germinative explants	腋芽萌发 率(%) Germinative rate of the axillary bud	出芽总数(个) No. of the axillary bud buds	平均出芽数 (芽/外植体) The average of the germinative buds	出芽所需 时间(d) The days of germinating buds	产生愈 伤组织 Callus
1	1.0	0.10	30	10	33.3	63	1.2	15	少量
2	1.5	0.10	30	12	40.0	69	1.5	12	少量
3	2.0	0.10	30	13	43.3	75	2.5	10	少量
4	2.5	0.10	30	8	26.7	66	1.1	15	少量
5	1.0	0.15	30	8	26.7	45	1.0	15	较多
6	1.5	0.15	30	9	30.0	51	2.4	12	较多
7	2.0	0.15	30	12	40.0	63	1.8	10	较多
8	2.5	0.15	30	6	20.0	42	1.0	15	较多
CK1	2.0	0	30	19	63.3	156	5.2	7	无
CK2	0	0	30	6	20.0	60	1.0	20	无

率、出芽所需时间(表 3)。

从表 3 可知, 在 6-BA 1.0~2.0 mg/L 处理的范围内, 芽的诱导率与 6-BA 浓度成正相关, 较适宜的 6-BA 浓度为 2.0 mg/L。当 6-BA 浓度超过 2.0 mg/L, 芽体开始出现扭曲、叶色变黄。接种 15 d 后, 6-BA 2.0~2.5 mg/L 处理的幼苗基部逐渐形成小块白色疏松的愈伤组织, 而且愈伤组织块的大小随着 6-BA 浓度的提高而增大。因此, 在初代诱导阶段, 6-BA 浓度不宜超过 2.0 mg/L。

2.4 不同浓度的激素对比对腋芽萌发的影响

将腋芽茎段接种于附加不同植物生长调节剂(6-BA、NAA)组合的 MS 培养基中, 每个处理组合接种 15 瓶, 每瓶接种 2 个茎段, 接种后 30 d 内记录出芽外植体数、出芽总数、出芽所需时间、愈伤组织

产生情况(表 4)。

接种 7 d 后, 茎节上中的腋芽膨大。15 d 后除 CK2 组外, 其余处理组的芽不断伸展, 25 d 后一般都能长出对生腋芽。从表 4 可以看出, NAA 对华南忍冬腋芽萌发没有作用, 在 6-BA 浓度相同的情况下, NAA 从 0.1 mg/L 增加到 0.15 mg/L 时, 腋芽的萌发率、平均每外植体出芽数都下降, 茎段基部产生愈伤组织增多。愈伤组织的产生明显抑制了丛芽的形成, 导致丛芽产生数量少, 芽体不壮。与单独加 6-BA 的 CK1 处理组相比, 腋芽抽出所需时间长, 形成的丛芽数少, 所以, 华南忍冬茎段培养不需加 NAA。

2.5 激素对丛芽增殖的效果

当腋芽产生的丛芽长到 0.5~1 cm 高时, 将其切割成带 3 个芽的小丛芽块, 接种于附加不同植物

生长调节剂(6-BA、NAA)组合的MS培养基中。每个处理接种15瓶,每瓶接种2丛丛芽,接种30d后记录芽增殖总数(表5)。

表5 激素对丛芽增殖的效果

Table 5 Effects of various phytohormones concentrations on proliferous buds

编号 No.	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种丛芽 数(丛) No. of inoculating cluster buds	芽增殖总 数(个) No. of the proliferous buds	平均每丛 芽增加芽 数(芽/丛) The average of the proliferous buds
1	0.5	0	30	129	4.3
2	0.8	0	30	183	6.1
3	1.1	0	30	192	6.4
4	1.4	0	30	225	7.5
5	1.7	0	30	321	10.7
6	2.0	0	30	339	11.3
7	2.3	0	30	165	5.5
8	2.6	0	30	69	2.3
9	1.0	0.05	30	63	2.1
10	1.5	0.05	30	96	3.2
11	2.0	0.05	30	123	4.1
CK	0	0	30	36	1.2

由表5可知,6-BA浓度在0.5~2.0 mg/L时,芽增殖数与6-BA的浓度基本成正相关,但当6-BA浓度超过2.0 mg/L后,芽数开始减少,芽体出现扭曲,6-BA 2.0 mg/L处理组的芽增殖数最多,但是芽比较短、细,不利于继代。6-BA 1.7 mg/L处理组的平均每丛丛芽增加芽数与6-BA 2.0 mg/L组的差不多,但芽稍长,比较粗壮。加入NAA后,6-BA 2.0 mg/L组的平均每丛丛芽增加芽数比6-BA 2.0 mg/L单因子诱导时少7.2个。说明即使低浓度的NAA的加入也抑制了丛芽的形成,因此,在丛芽诱导过程中不应加NAA。接种7d后,6-BA 2.0~2.6 mg/L以及加入NAA的各组的丛芽基部逐渐形成小块白色疏松的愈伤组织,而且愈伤组织块的大小随着6-BA浓度的提高而增大。因此,在继代增殖阶段,6-BA的浓度同样应该控制在2.0 mg/L以下,以1.7 mg/L较适宜。CK处理组的芽数很少,芽细长。

3 小结

(1)华南忍冬幼嫩茎部表皮附着疏柔毛和疏腺毛,灭菌比较困难。本试验摸索出了对华南忍冬茎段外植体较好的灭菌方法:经过预处理后,先用75%酒精浸泡25s,再用0.1%升汞溶液(加吐温-80)处理9

min,污染率可以控制在25%以下,初代诱导率可保持在60%以上。(2)华南忍冬茎段腋芽在B₅基本培养基中前期生长较好,但后期生长速度下降,出现较多的愈伤组织。在MS培养基中,茎段腋芽前期生长速度较慢,但后期分化的芽数多,小芽长势很好,因此,确定了MS为初代诱导、丛芽增殖的基本培养基。(3)试验中发现,6-BA浓度在2.0 mg/L以下时,丛芽的产生量与6-BA的浓度基本成正相关,当6-BA浓度超过2.0 mg/L后,分化芽数减少,芽体畸形,所以认为华南忍冬茎段培养初代诱导的6-BA浓度以2.0 mg/L为宜,较好的丛芽增殖的6-BA浓度为1.5~1.7 mg/L。本试验结果表明,华南忍冬茎段初代诱导和丛芽增殖均不应加生长素,否则就会产生较多的愈伤组织,抑制丛芽的产生,这与前人报道金银花的红河(李军等,2000)、凤爪(孟庆杰等,2002)等品种及山银花灰毡毛忍冬品种组织快繁需要6-BA与NAA配合使用的结果有所不同。

参考文献:

- 中国植物志编委会. 1988. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社:238
- 王光全,孟庆杰. 2004. 金银花繁育方法与技术[J]. 江苏农业科学,6:117-118
- 王柳萍. 2005. 广西山银花绿原酸的含量测定[J]. 中国药理通讯,3(3):67
- 农训学. 2005. 金银花种子繁殖方法[J]. 河北农业科技,3:11
- 江苏新医学院. 1997. 中药大词典[M]. 上海:上海科学技术出版社:1403-1405
- 李军,乔元伟. 2000. 红河金银花的组培快繁技术[J]. 山东林业科技,3:41-42
- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社
- 孟庆杰,王光全. 2002. 凤爪金银花的组织培养技术[J]. 河北林业科技,5:25
- 柏雪云,王常东,等. 2004. 金银花的扦插繁殖技术[J]. 时珍国医国药,6:27
- 袁航远. 2005. 金银花[J]. 农业知识,8:35
- 钱关泽. 1998. 金银花茎的比较解剖研究[J]. 聊城师院学报(自然科学版),3:65-67
- Chai XY(柴兴云),Li P(李萍). 2004. Studies on chemical constituents in dried buds of *Lonicera confusa* (山银花化学成分研究)[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志),9:865-867
- Di SL(耿世磊),Xu HH(徐鸿华). 2004. Distribution of chlorogenic acid in branch, blade, and flower of *Lonicera confusa* (山银花茎叶花中绿原酸分布规律研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药),3:315-318
- Wang XM(王晓明),Yi AQ(易霏琴). 2005. Germfree tissue culture system establishment of new varieties in *Lonicera macranthoides* (灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系建立)[J]. *Economic Fore Res* (经济林研究),23(4):14-16