

灰毡毛忍冬(金银花)的组织培养研究

王慧俐¹, 江小红² (1. 杭州万向职业技术学院, 浙江杭州 310023; 2. 浙江华友钴业股份有限公司, 浙江桐乡 314500)

摘要 [目的] 优选灰毡毛忍冬的组织培养的最佳培养基。[方法] 选用春季萌发的带腋芽的灰毡毛忍冬茎段为外植体, 探讨外植体的最佳灭菌时间, 并以 MS 为基本培养基, 附加不同激素浓度配比, 筛选丛生芽诱导、增殖及生根培养的最佳培养基。[结果] 材料的表面灭菌方法为浓度 75% 酒精浸泡 30 s, 然后放到 0.1% 的 HgCl₂ 溶液浸泡 8~10 min; 在此条件下, 污染率为 20%, 成活率可达 80%。最佳诱导培养基为: MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, 萌发率达 100%。诱导不定芽增殖的最佳培养基为: MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, 增殖率为 3.5。诱导生根的最佳培养基为: 1/2MS + 0.8 mg/L NAA, 生根率为 90%。[结论] 该方法筛选了灰毡毛忍冬的组织培养的最佳培养基, 为灰毡毛忍冬的快繁技术提供了理论依据。

关键词 金银花 (*Lonicera japonica* Thunb.); 组织培养; 外植体; 绿原酸

中图分类号 S793.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)30-11952-02

Tissue Culture of *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz

WANG Hui-li et al (Hangzhou Wanxiang Polytechnic, Hangzhou, Zhejiang 310023)

Abstract [Objective] The study was to optimize the optimum medium for tissue culture of *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz. [Method] The robust buds or stems with axillary buds of *L. macranthoides* in spring were used as explants to explore suitable disposal of sterilization and build rapid propagation. [Result] The results showed that the suitable disposal sterilization of explants was dipped in 70% alcohol for 30s, rinsed with water twice and then dipped in 0.1% HgCl₂ for 8-10min. The pollution rate was 20% and the survival percent of explants reached 80%. The best culture medium for induction of adventitious bud was combination of MS, 6-BA 1.5 mg/L and NAA 0.1 mg/L. The best successive culture medium for propagation was combination of MS, 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L. The suitable root induction culture was 1/2MS with 0.8 mg/L NAA. The rate of root induction reached 90%. [Conclusion] The study obtained the optimum medium for tissue culture of *L. japonica*, which provides a theoretical basis for its rapid propagation technique.

Key words *Lonicera japonica* Thunb.; Tissue culture; Explant; Chlorogenic acid

金银花 (*Lonicera japonica* Thunb.) 属忍冬科多年生半长绿木质藤本植物, 又名忍冬花、银花、金花、双花、二花等。金银花的适应性强, 我国南北各地均有生产。其茎、叶、藤、花蕾均可入药, 尤以花蕾为最佳, 具有清热、解毒、抗菌、止血和抗老化等功效^[1-2], 成为传统的名贵中药材。金银花同时具有抗病原微生物、抗炎及解热、护肝和降血脂等作用^[3]。

另外, 金银花根系特别发达, 适应性广, 枝条多, 叶面密度大, 除供药用外, 主要用于保持水土, 改良土壤, 调节气候, 作为沙丘栽植可以防风固沙, 防止土壤板结, 减少灾害。金银花通常以扦插、压条或分株方式繁殖^[4], 也可用种子繁殖, 但繁殖系数均较低^[5], 育苗周期长, 且易传染病菌, 品种退化快, 不能满足生产和市场需求。通过组织培养快速繁殖, 可在短时间内提供大量苗木, 供给生产, 加速品种的发展。

灰毡毛忍冬 (*L. macranthoides* Hand. - Mazz) 原生于中国, 主要成分绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 含量高于普通金银花^[6], 药用价值较高。因此, 笔者以灰毡毛忍冬为试验材料, 建立快速繁殖体系, 对灰毡毛忍冬金银花进行快繁技术研究, 以期灰毡毛忍冬的快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 研究对象。 灰毡毛忍冬茎段, 取自浙江大学华家池植物园, 经鉴定为 *L. macranthoides* Hand. - Mazz 的新鲜茎段。

1.1.2 主要试剂。 所用试剂均为国产分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 外植体表面灭菌时间的筛选。 剪取生长健壮无病虫害危害的 1 年生枝条上带侧芽的枝条, 用剪刀先把叶子剪掉, 再把茎段剪成带腋芽的长约 3 cm, 用加洗洁精的水浸洗 30 min, 而后放到超净工作台上, 用浓度 70% 酒精消毒 30 s, 再用无菌水冲洗 3 次, 然后放到 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中浸泡, 灭菌, 浸泡时间分别为 3~5、8~10、12~15 min 3 个处理, 加几滴吐温, 充分搅匀, 浸泡过程中要经常轻轻摇动, 再用无菌水冲洗 4~5 次, 将材料拿出放到已灭菌的牛皮纸上, 用刀切掉上下切口, 备用。比较各处理的污染率。污染率 (%) = 污染数/接种数 × 100。成活率 (%) = 成活的外植体数/接种的外植体数 × 100。

1.2.2 丛生芽诱导培养基的筛选。 以 MS 为基本培养基, 将外植体接种不同激素配比培养基上, 比较腋芽在不同培养基上的萌发率和增殖系数。培养基及编号如下: 1 号 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA; 2 号 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 3 号 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 4 号 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。萌发率和增值系数的计算方法如下: 萌发率 (%) = 成活数/接种数 × 100, 增殖系数 (%) = 产生的丛生芽数/接种的芽数 × 100。

1.2.3 丛生芽增殖培养基的筛选。 将初代培养产生的芽切割下来, 将长的茎段切成带一腋芽的小段, 接种到培养基上, 每瓶接 5 个。增殖培养基为 2 号和 3 号培养基。30 d 后记录萌发的芽数, 并计算增殖系数。

1.2.4 丛生芽生根培养。 将长到 3~4 cm 高的无根苗转接到以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 NAA 得生根培养基上, 比较无菌苗在培养基上的生根情况。

1.2.5 培养条件。培养条件温度为 25 ℃,相对湿度 60% ~ 70%;人工光照 12 h/d;光照 1 700 lx。

2 结果与分析

2.1 最佳灭菌时间的筛选 由表 1 可知,污染率从高到低依次是处理 1、处理 2 和处理 3。但成活率是处理 2 最高,除了污染的茎段其他的茎段都成活了;处理 3 虽然污染率低,但成活率却比较低,只有 33%,还有一部分茎段褐死,可能是因为这些茎段在升汞中浸泡的时间太长,影响了腋芽的活性。因此,金银花茎段在 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中处理的最佳时间为 8 ~ 10 min。结果表明,0.1% HgCl₂ 溶液能很好的杀灭由细菌产生的污染,但灭菌时间不能太短也不能过长,太短,污染严重;太长虽然灭菌效果好,但会对外植体产生毒害,使外植体萌发时间延长,甚至不能萌发。

2.2 不同激素配比对外植体诱导的影响 7 d 后观察发现

部分外植体上开始有丛生芽萌动,14 d 后观察发现 1、2 和 3 号培养基上的外植体生长比较快,4 号培养基上的略慢,少部分切口处开始有愈伤组织长出。由表 2 可知,3 号培养基(1.5 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA)的萌发率可达 100%,产生的芽多,增值系数最大,可达到 4.0。而 4 号培养基由于激素浓度太高,反而抑制了不定芽的萌发和生长,萌发率只有 60%,苗细且矮,叶色黄绿,增值系数只有 2.3。观察芽的生长情况发现,3 号培养基上生长的芽较长,且健壮,叶色绿。

表 1 不同表面灭菌处理方法对污染率和成活率的影响

处理	0.1% HgCl ₂ 处	接种数 个	污染数 个	污染率 %	成活率 %
	理时间//min				
1	5 ~ 6	32	18	56	44
2	8 ~ 10	50	10	20	80
3	12 ~ 15	30	2	7	33

表 2 6-BA 与 NAA 不同浓度对比对丛生芽诱导的影响

培养基编号	接种数	成活数	萌发率//%	丛生芽	增值系数	叶色
1	32	12	37.5	28	2.3	叶色浅绿
2	28	16	57.1	44	2.8	叶色绿
3	36	36	100.0	144	4.0	叶色绿
4	40	24	60.0	36	2.3	叶色黄绿

因此,3 号培养基最适合诱导金银花产生丛生芽。

2.3 不同激素水平对丛生芽增殖培养的影响 为了得到更多的丛生苗,将长到 3 ~ 4 cm 的丛生芽切割成小段,每小段至少都有一个腋芽,接种在 2、3 号培养基上。30 d 左右观察生长情况。由表 3 可知,在 3 号培养基上形成丛生芽的增殖

数大于 2 号培养基,但丛生芽在 2 号培养基比 3 号培养基上的长得高,粗壮且叶片呈绿色,3 号培养基上丛生芽较矮小,生长较弱,且叶色成翠绿色,不够健康。因此,最佳增殖培养基为 2 号培养基,增值系数为 3.5,将从丛生芽继续在 2 号培养基上进行继代培养,即可源源不断获得大量不定芽。

表 3 不同激素水平培养基对丛生芽增殖培养的影响

培养基编号	接种数	丛生芽数	增值系数	株高//cm	叶色
2	30	105	3.5	5.0	绿
3	30	120	4.0	3.8	翠绿,苗矮小,弱

2.4 生根培养基的筛选 以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 NAA 作为生根培养基。不同生根培养基对试管苗根诱导的影响见表 4。由表 4 可知,诱导生根率最高的培养基是 1/2 MS + 0.8 mg/L NAA。试验中观察到,10 d 左右不定根开始分化长出,15 ~ 20 d 后不定根可长出侧根,待根长 3 ~ 5 cm 时即可炼苗。

表 4 不同培养基对丛生芽诱导生根的影响

处理	NAA//mg/L	生根率//%	不定根数
1	0.4	78	2
2	0.6	82	4
3	0.8	90	6
4	1.0	85	3

2.5 试管苗的炼苗与移栽 将根长达 3 ~ 5 cm、苗高 4 ~ 5 cm 的试管苗先拿到准备室散射光下放 7 d,让其慢慢恢复光合作用能力和健壮度,而后打开瓶盖注入少量自来水使幼苗逐渐降低温度再转向有菌的自然环境,移栽在进口泥炭 - 珍珠岩(3:1, W/W)的基质中,一个月后移栽成活率可达 90%

左右。

3 结论

试验探讨了以灰毡毛金银花的茎段为外植体进行快速繁殖的技术方法。结果表明,外植体的表面灭菌方法为先在浓度 70% 的酒精中浸泡 30 s,用清水冲洗 2 次,再转移到 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中浸泡 8 ~ 10 min,然后用无菌水清洗 4 ~ 5 遍,此方法外植体的污染率较低,成活率最高。最佳的外植体诱导培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,外植体的萌发率可达 100%,增值系数可达 4.0。最佳的不定芽增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,增值系数可达 3.5,最佳的生根培养基为 MS + 0.8 mg/L NAA,生根率为 90%。研究为金银花的快速繁殖提供理论依据,对生产实际有一定的参考价值。

参考文献

- [1] PALACIOS N, CHRISTON P, LEECH M J. Regeneration of *Lonicera tatarica* plants via adventitious organogenesis from cultured stem explants [J]. *Plant Cell Rpt*, 2002, 20: 808 - 813.

是黑果枸杞和 0616, 分别为 43.61% 和 45.12%, 与蔓生枸杞和宁杞菜 1 号有极显著差异 ($P < 0.01$); 成活率低于 60% 的还有宁杞 2 号、宁杞 5 号、宁杞 6 号和 0901; 其他品种成活率都在 60% ~ 80%。

2.2 不同枸杞种嫩枝扦插苗根系数和根长对比情况 由表 1 可知, 成活扦插苗平均根数最多的是蔓生枸杞, 达到 19.67 条; 宁杞菜 1 号和宁杞 1 号的根数次之, 分别为 12 条和 10.67 条; 其余品种的根数都少于 10 条, 与蔓生枸杞根数存在极显著差异 ($P < 0.01$)。成活扦插苗平均根长最长的是黄果枸杞, 达到 8.53 cm, 最短的为黑果枸杞, 为 2.4 cm, 两者之间有

极显著差异 ($P < 0.01$); 其余品种间根长差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 不同枸杞种嫩枝扦插苗地径和高度对比情况 由表 1 可知, 成活扦插苗平均地径最大的是宁杞菜 1 号, 达到 67.79 mm; 宁杞 7 号次之, 为 53.13 mm; 最小的是黑果枸杞, 为 15.72 mm; 3 者之间有极显著差异 ($P < 0.01$); 其他品种的平均地径都在 30 ~ 50 mm。成活扦插苗平均高度最大的是宁杞菜 1 号和宁杞 7 号, 分别为 31.6 和 25.4 cm, 两者之间无显著差异; 平均高度最小的是黑果枸杞为 3.3 cm, 小于 10 cm 的品种有宁杞 2 号和 0616, 其余品种都介于 10 ~ 20 cm。

表 1 14 种枸杞嫩枝扦插苗成活生长对比情况

品种	成活率//%	平均地径//mm	平均根数//条	平均根长//cm	平均高度//cm
黑果枸杞	43.61 F	15.72 D	5.33 B	2.40 C	3.3 C
黄果枸杞	76.70 B	48.75 BC	9.00 B	8.53 A	11.6 B
蔓生枸杞	94.74 A	46.30 BC	19.67 A	5.07 BC	13.2 B
宁杞菜 1 号	88.73 A	67.79 A	12.00 AB	6.50 AB	31.6 A
宁杞 1 号	67.68 CD	35.71 C	10.67 AB	7.40 AB	13.2 B
宁杞 2 号	51.88 EF	53.33 B	8.67 B	5.93 AB	8.9 BC
宁杞 3 号	66.17 D	38.30 BC	9.67 B	6.80 AB	13.8 B
宁杞 5 号	54.89 E	42.10 BC	9.00 B	7.00 AB	14.0 B
宁杞 6 号	49.63 EF	43.23 BC	7.67 B	6.20 AB	12.0 B
宁杞 7 号	75.19 BC	53.13 AB	5.67 B	6.43 AB	25.4 A
0701	79.71 B	38.03 BC	9.97 B	7.30 AB	12.8 B
0901	48.13 EF	48.43 BC	9.67 B	5.83 AB	10.2 BC
0616	45.12 F	36.13 BC	8.67 B	6.13 AB	8.4 BC
0601	75.19 CD	54.70 AB	8.33 B	6.23 AB	15.2 B

注: 数据用 LSD 法进行多重比较; 不同大写字母表示在 0.01 水平上的差异显著性。

3 结论与讨论

试验结果表明, 在同一温室环境条件下, 不同枸杞品种及品系的嫩枝扦插苗成活生长情况都有差异。其中成活率最高的是蔓生枸杞和宁杞菜 1 号, 最低的是黑果枸杞, 平均生根数最多的蔓生枸杞, 宁杞菜 1 号次之, 最少的为黑果枸杞, 平均根长最长的是黄果枸杞, 最短的为黑果枸杞, 平均地径和平均高度最大的依次是宁杞菜 1 号和宁杞 7 号, 最小的依然是黑果枸杞。

环境温度、相对湿度是影响枸杞扦插成活的重要因子, 温度和湿度过高会使插穗腐烂, 过低则不利于生根和生长, 扦插成活率适宜温度为气温 30 ~ 35 °C, 地温 25 ~ 30 °C, 相对湿度控制在 85% 左右。插条的直径和木质化程度对插穗成活也有很大影响, 选择粗度 0.2 ~ 0.4 cm 的半木质化嫩枝作为插条最为适宜。同等温室环境下, 蔓生枸杞和宁杞菜 1 号生根快, 生长迅速, 对环境的精细化要求不高。黑果枸杞、宁

杞 2 号、宁杞 5 号、0901 和 0616 成活率较低, 在插穗选择、苗床温度和湿度控制方面需精细化。

参考文献

- [1] 董静洲, 杨俊军, 王瑛. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(48): 2020 - 2027.
- [2] 曲永霞. 枸杞无序发展 供需关系逆转[N]. 中国中医药报, 2013 - 08 - 23(007).
- [3] 李建国, 王孝, 马金平, 等. 枸杞嫩枝扦插育苗技术[J]. 育苗技术, 2010(6): 32 - 33.
- [4] 张晓放, 赵凌泉, 史少林. 宁夏枸杞嫩枝扦插育苗技术[J]. 防护林科技, 2005(5): 140 - 141.
- [5] 伊万梅, 辛菊平. 蒙杞 1 号嫩枝扦插繁殖育苗技术试验[J]. 青海农林科技, 2011(3): 57 - 59.
- [6] LIAO Q, MARHABA, SHA H, et al. A Study on the Establishment of Rapid Propagation System and Propagation Techniques of High-quality Seedling of Wolfberry (*Lycium barbarum* L.) [J]. Medicinal Plant, 2012, 3(11): 84 - 86.
- [7] 付任胜, 尹立荣, 陈磊, 等. 盐碱胁迫对枸杞生长及根际适应能力的影响[J]. 华北农学报, 2012(3): 177 - 180.

(上接第 11953 页)

- [2] PENG Y, LIU F, YE J. Determination of phenolic acids and flavones in *Lonicera japonica* Thumb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Electrophoresis, 2005, 17: 356 - 362.
- [3] 梁小敏. 金银花快繁的研究现状[J]. 河北林业科技, 2009(4): 57 - 58.
- [4] 文清岚, 黄修林. 金银花的组织培养与快速繁殖[J]. 吉林农业, 2012(4): 197 - 198.
- [5] 宋庆安, 王晓明, 易霁琴. 灰毡毛忍冬(金银花)新品种扦插繁殖技术研究[J]. 湖南林业科技, 2005, 32(4): 15 - 17.
- [6] 王晓明. 灰毡毛忍冬新品种 ISSR 分子标记及组织培养的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.

- [7] ZHANG J H, FENG B B, WANG X C, et al. RP - HPLC Determination on the Content of Chlorogenic Acid in FLOS LONICERAE JAPONICAE and FLOS LONICERAE from Different Producing Areas[J]. Medicinal Plant, 2012, 3(1): 52 - 53, 57.
- [8] 杜云, 杜登科, 邓正春, 等. 金银花富硒生产技术[J]. 湖南农业科学, 2012(24): 64 - 65.
- [9] 梅明清, 陈奕猛, 林鲍才, 等. 金银花高产高效栽培技术[J]. 内蒙古农业科技, 2013(2): 109 - 110.
- [10] 孙年喜, 李隆云, 崔广林. 灰毡毛忍冬开花特性及繁育系统的研究[J]. 西南农业学报, 2013(3): 1178 - 1183.