

亮叶忍冬组织培养快繁技术

柴慈江, 李童音, 史燕山, 骆建霞, 卢兴霞, 罗兰欣

(天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要:分别采用添加不同浓度 6-BA 的 MS 培养基和不含植物激素但改变大量元素浓度的 MS 培养基 2 种方法, 研究亮叶忍冬组培苗快繁体系。结果表明:以不含激素的 1/4MS 培养基中亮叶忍冬的茎芽增殖效果最好, 增殖系数达 3.8。将亮叶忍冬试管苗茎段培养于用土做支撑物的培养基中, 生根率为 98.3%, 根数也与琼脂支撑培养对照无明显差异, 且根毛长于对照。对土支撑培养基中生根的亮叶忍冬试管苗开瓶练苗 3 周后, 带坨移入营养钵中, 在移栽后不喷雾、不覆膜, 温室内午后空气相对湿度低至 55% 的条件下, 移栽成活率达到 93.3%, 显著高于常规方法移栽的成活率(53.3%)。

关键词:亮叶忍冬; 试管苗; 茎芽增殖; 生根; 带坨移栽

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)03-0125-04

亮叶忍冬(*Lonicera nitida* 'Maigrun')为忍冬科忍冬属灌木, 在北方落叶, 南方则表现为常绿。株型紧凑, 叶

色亮绿, 生长旺盛, 萌芽力强, 极耐修剪, 也较耐阴, 并具有较强的耐寒、耐旱和耐盐能力^[1-3], 是一种优良的木本观赏地被植物, 推广应用前景广阔。利用组织培养快繁技术育苗是尽快获得大量亮叶忍冬优质苗木的有效途径。目前已有北京忍冬、皱叶忍冬、蕊帽忍冬、蓝靛果忍冬和灰毡毛忍冬等多种忍冬属植物的组织培养快繁技术的研究^[4-8], 关于亮叶忍冬组织培养快繁技术的研究目前国内尚未见报道, 为此开展了该项工作。

第一作者简介:柴慈江(1960-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事园艺植物组织培养方面的教学与科研工作。

基金项目:国家科技星火计划资助项目(2008GA610015); 天津市科委资助项目(08ZXHXNC07000)。

收稿日期:2009-10-10

[4] 张丽梅, 陈善璞, 陈熹. 马蓝未成熟种子的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 521-522.

[5] 栾非时, 陈典, 崔喜波. 大蒜茎尖愈伤组织诱导、植株分化及变异的研究[J]. 北方园艺, 1993(4): 23-25.

[6] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理通讯, 1999, 35(6): 501-506.

[7] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].

北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78-84.

[8] 杨丽琴, 李瑞, 王俊, 等. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺, 2008(4): 104-106.

[9] 陈竭, 江山. 南板蓝根中大黄酚的分离鉴定[J]. 中药材, 1990, 13(5): 29-30.

[10] 吴群英, 徐庆, 李丽亚, 等. 青钱柳不同外植体组织培养及褐变防止的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1872-1874.

Measurement of Preventing Shoot Browning of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek During Rapid Propagation

YAO Yan¹, ZHANG Ying², WANG Zhen-chun¹, ZENG Cui-ying¹, FAN Guo-jian¹, SHI Hai-liang¹, LI Xiu-fang¹

(1. College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. School of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405)

Abstract: Shoot browning is a serious phenomenon during rapid propagation of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. This study attempts to control browning of shoot by three methods in order to increase the shoot ability of rapid propagation in vitro. The results showed that the browning degree of shoots which are broken off from plant and then flushed several times by water were lighter than the browning degree of shoots which were cut off by tool; The appropriate concentration of activated carbon 0.5 % in medium may reduce the shoot browning in some degree, but concentration of citric acid 300~500 mg · L⁻¹ had no effect significantly. In conclusion, the method that shoots were broken off from plant and flushed 2 hours by water, then explanted the medium adding 0.5% activated carbon, can decrease the browning effectively.

Key words: *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek; shoot; browning

1 材料与方

4月下旬,在天津农学院地被植物园中取亮叶忍冬植株当年萌发新梢茎段,先在70%酒精中浸蘸15 s,然后在2%次氯酸钠溶液中浸泡15 min,无菌水冲洗3遍后剪成单节茎段接种于含有蔗糖15 g/L、IBA 0.4 mg/L及大量元素减半的MS培养基中进行初代培养,初代培养获得的嫩茎经6~7次继代培养扩繁后所得的试管苗作为该试验的试材。

1.1 亮叶忍冬试管苗茎芽增殖培养的研究

不同6-BA浓度对亮叶忍冬试管苗茎芽增殖影响的研究:以50 mL三角瓶为培养容器,以0.7%琼脂做培养基支撑物,采用MS培养基为基本培养基,每瓶加入培养基25 mL。培养基中的6-BA浓度设置5个处理,分别为0、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/L。每个处理接种8瓶,每瓶4个单节茎段,每处理共接种32个茎段。

大量元素浓度对亮叶忍冬试管苗茎芽增殖影响的研究:以100 mL三角瓶为培养容器,采用含有蔗糖30 g/L并且改变大量元素浓度的MS培养基,以0.7%琼脂做培养基支撑物,培养基中不添加任何激素。培养基中的大量元素设置为3个不同的浓度处理,即:MS培养基原始配方浓度(简称MS)、1/2MS培养基原始配方浓度(简称1/2 MS)和1/4MS培养基原始配方浓度(简称1/4MS)。每个处理接种10瓶,每瓶接种3个单节的试管苗茎段,每处理共接种30个茎段。

上述试验中各处理接种后均放于培养室培养,培养条件为:温度23~28℃、光照强度2 000~3 000 lx、光照时间为14 h/d。培养40 d后,调查记录试管苗的茎段增殖数及生根等指标。

1.2 以土做培养基支撑物对亮叶忍冬试管苗生根培养

试验用土为取自天津农学院内的粘壤土,全盐含量0.405‰,pH值为8.12,水解氮含量74.27 mg/kg,速效磷含量38.27 mg/kg,速效钾含量228.00 mg/kg。以150 mL三角瓶为培养容器,先将土加入,再加入不含琼脂的液体培养基,培养基成分为不含大量元素的MS培养基并附加10 g/L的蔗糖,培养基中不添加植物激素。常规灭菌后每瓶接种6个双节的试管苗茎段,每个处理接种10瓶共60个茎段。

对照培养基同试验1.1中的1/4MS培养基处理,并以0.7%琼脂做培养基支撑物,以150 mL三角瓶为培养容器,每瓶接种6个双节的试管苗茎段,每个处理接种10瓶共60个茎段。

以上2个处理接种后均放于培养室中培养,培养条件同试验1.1。培养45 d后,调查记录试管苗的根茎生长状况并分析比较。

1.3 土支撑培养的亮叶忍冬试管苗带坨移栽试验

以大口瓶为培养容器,先在瓶内放入4片提苗

片^[9],然后按照试验1.2中土支撑生根培养方法培养试管苗,培养40 d后,将试管苗移至温室,先闭瓶练苗3 d,再去除封口膜并盖上具孔的玻璃罩,2周后去除玻璃罩,再完全开瓶练苗1周,然后用提苗片将试管苗带土坨移入营养钵中(图1-A所示)。用琼脂支撑生根培养、采用常规方法移栽的试管苗做对照。常规移栽方法即将试管苗洗去根上琼脂后裸根移入营养钵中。

移栽基质为园土与蛭石1:2的混合物。移栽后不覆膜、不喷雾,只在土见干时及时浇水。用周记型温、湿度自计仪测定环境温度和湿度。移栽30 d后调查移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 不同6-BA浓度对亮叶忍冬试管苗茎芽增殖影响

由表1可见,不同浓度6-BA对亮叶忍冬试管苗的茎芽增殖有明显影响。添加6-BA处理中试管苗的茎芽增殖系数均大于不添加的处理。6-BA浓度为0.75 mg/L和1.0 mg/L处理茎芽增殖系数均为3以上,二者之间无显著差异,但均显著高于不添加BA的处理。而6-BA浓度为0.25 mg/L和0.5 mg/L的处理茎芽增殖系数与未添加6-BA的处理无显著差异。从生根状况看,不加激素和添加低浓度(0.25 mg/L)6-BA试管苗生根率均超过96%,并显著高于其它处理。根长则以不加激素的处理最长,并显著高于所有添加6-BA的处理。

表1 不同6-BA浓度对亮叶忍冬试管苗的影响

6-BA 浓度 mg · L ⁻¹	接种茎芽数 /个	增殖茎芽数 /个	增殖 系数	生根率 /%	根长 /mm
0.75	32	109	3.4a	65.6	23.6c
1.0	32	102	3.2a	57.6	21.1c
0.5	32	96	3.0ab	58.1	29.2c
0.25	32	93	2.9ab	96.8	48.9b
0	32	80	2.5b	96.9	85.1a

注:表内每列数据后字母不同表示5%水平差异显著。下同。

2.2 不同大量元素浓度对亮叶忍冬试管苗茎芽增殖的影响

由表2可知,大量元素浓度为1/4MS处理试管苗的茎芽增殖系数最高,显著高于1/2MS和MS2处理,并且茎芽增殖系数为3.8。MS处理的茎芽增殖系数最低,但与1/2MS差异不显著。从发根情况看,在培养基中不添加任何激素的条件下,1/2MS和1/4MS的2个处理的生根率均为100%。1/4MS处理的试管苗单株根长最长,1/2MS处理的次之,但二者差异不显著,并且都显著高于MS处理。结合前述2.1结果分析,尽管采用MS培养基并附加6-BA 0.75 mg/L或1.0 mg/L的处理均可使亮叶忍冬的茎芽增殖系数达到3以上,但采用不含激素的1/4MS培养基对亮叶忍冬茎芽增殖培养更为有利,不仅增殖系数更高,而且可降低试管苗培养成本。图1-B为在不含激素的1/4MS培养基中的亮叶忍冬试

表 2 不同大量元素浓度对亮叶忍冬试管苗的影响

处理	接种茎芽数 /个	增殖茎芽数 /个	增殖系数	生根率 /%	根长 /mm
1/4MS	30	117	3.8a	100	55.6a
1/2MS	30	81	2.7b	100	43.5a
MS	30	69	2.3b	90	27.0b

管苗生长状况。

2.3 土做培养基支撑物对亮叶忍冬试管苗生根培养的影响

由表 3 可见,土支撑培养的亮叶忍冬试管苗尽管在茎长与根长方面显著低于琼脂支撑培养的试管苗,但其生根率可达到 98.3%,与琼脂支撑培养的无差异,其根数也与琼脂支撑培养的无明显差异。通过显微镜观察发现,2 个处理培养的试管苗均有根毛,但土支撑培养试管苗的根毛明显长于琼脂支撑培养。这表明以土取代琼脂做培养基支撑物进行亮叶忍冬试管苗的生根培养,可以获得正常的试管苗,这不仅可以降低试管苗的培养成本,而且为试管苗的进一步带坨移栽奠定了基础。图 1-C、图 1-D、图 1-E 为 2 处理试管苗生根和根毛发生状况。

表 3 土做培养基支撑物对亮叶忍冬试管苗生根培养的效果

处理	接种 茎段数/个	生根 茎段数/个	生根率 /%	根长 /mm	株平均根数 /个	茎长 /mm
琼脂支撑培养	60	59	98.3 a	111.0 a	3.6 a	27.5 a
土支撑培养	60	59	98.3 a	82.6 b	3.2 a	11.0 b

2.4 土支撑培养的亮叶忍冬试管苗带坨移栽效果

由表 4 可见,在移栽后不喷雾、不覆膜,温室内午后空气相对湿度低至 55%的条件下,带坨移栽的亮叶忍冬试管苗的成活率可达 93.3%,常规移栽的亮叶忍冬试管苗的成活率仅为 53.3%,二者差异显著。其原因可能是带坨移栽的试管苗根际环境变化较小,根系能保持较强的吸收能力的缘故。此外,带坨移栽的试管苗在移栽前经历了 3 周的开瓶练苗,对其移栽成活也极为有利。这与以前对葡萄、枣和枸杞子试管苗的带坨移栽试验结果是一致的^[10-13]。图 1-F 为带坨移栽成活的试管苗生长 3 个月后的状况。

表 4 不同移栽方法对亮叶忍冬试管苗移栽成活的影响

移栽方法	移栽数/株	成活数/株	成活率/%
带坨移栽	60	56	93.3 a
常规移栽	60	32	53.3 b

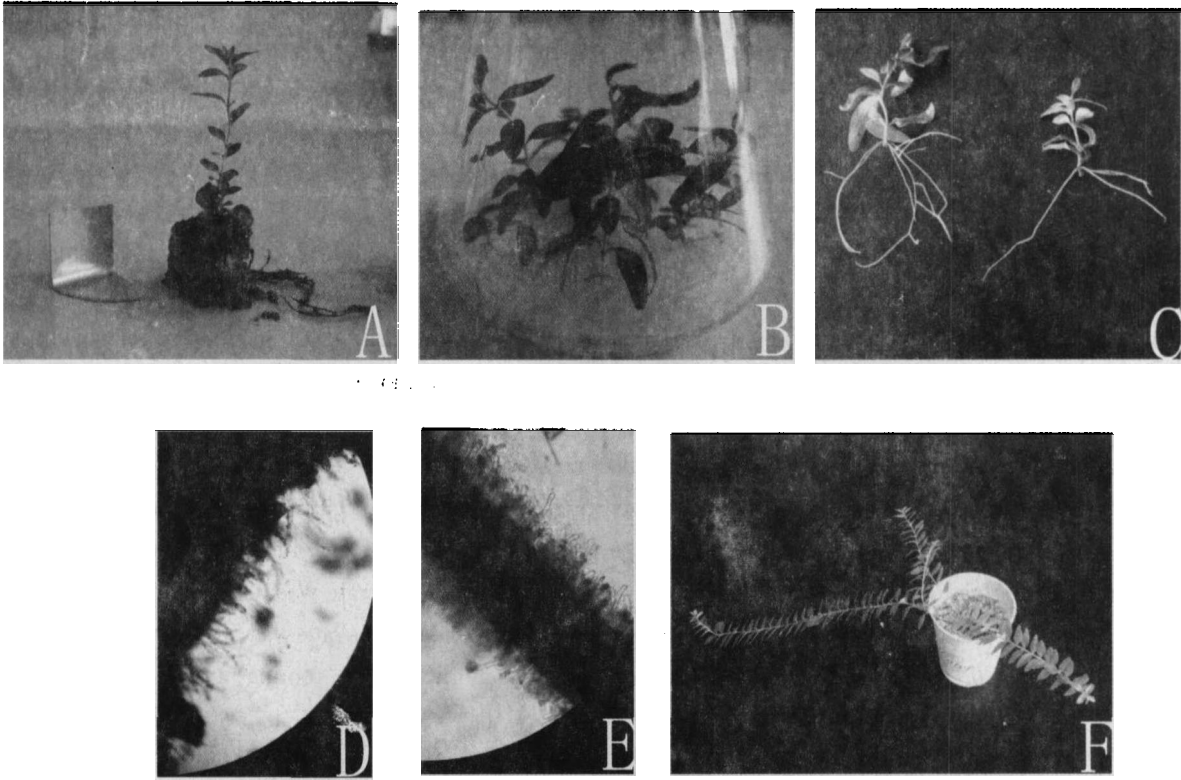


图 1 亮叶忍冬试管苗茎芽增殖、生根培养及带坨移栽效果

注:A:提苗片(左,专利号:200820075225.3)及带坨试管苗(右);B:在 1/4MS 培养基中的茎芽增殖培养效果;C:琼脂支撑培养基中(左)和土支撑培养基中(右)的试管苗生根状况;D:土支撑培养基中生根的试管苗根毛状况;E:琼脂支撑培养基中生根的试管苗根毛状况;F:带坨移栽成活的试管苗生长 3 个月后的状况。

3 小结

茎芽增殖培养是实现试管苗数量快速增长的关键环节,而培养基的组成对茎芽增殖系数影响很大。该项研究表明,采用不加激素的1/4MS培养基可使亮叶忍冬试管苗增殖系数达到3.8,基本能满足快速繁殖的需要,而且培养基成本较低。

在不含激素的培养基中亮叶忍冬试管苗的生根率可达96%~100%,表明亮叶忍冬试管苗很易生根。以粘壤土取代琼脂做培养基支撑物进行亮叶忍冬试管苗的生根培养,虽然所形成的试管苗茎长和根长明显小于琼脂支撑培养的试管苗,但生根率、根数与琼脂支撑培养无明显差异,其根毛也较长。土支撑培养的亮叶忍冬试管苗移栽前开瓶练苗可长达3周,地上部得到较充分锻炼,结合带坨移栽,试管苗移栽后对环境适应性强,可在空气相对湿度低至55%的条件下达到93.3%的成活率。这些结果为亮叶忍冬试管苗提供了低成本的生根培养与高效、简便的移栽技术,将为亮叶忍冬组织培养快繁技术的规模化应用奠定基础。

参考文献

- [1] 骆建霞,史燕山,张旭,等. 电导法对8种地被植物抗寒性的测定[J]. 天津农学院学报,2005,12(3):10-13.
- [2] 骆建霞,史燕山,曹鸿斌,等. 水分胁迫对蔓生紫薇和亮叶忍冬生长及生理特性的影响[J]. 园艺学报,2006,33(3):657-659.
- [3] 骆建霞,史燕山,吕松,等. 3种木本地被植物耐盐性的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(12):121-123,129.
- [4] 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.
- [5] 覃拥灵. 皱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.
- [6] 孙朝晖,尹会荣. 蕊帽忍冬的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2008,44(1):125-126.
- [7] 梁琦兰,张启昌,杨振国,等. 蓝靛果忍冬组织培养技术研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2006,7(6):549-551.
- [8] 王晓明,易露琴,宋庆安,等. 灰毡毛忍冬新品种‘银翠蕾’的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2006,42(3):474.
- [9] 柴慈江. 用于试管苗带坨移栽的提苗片[P]. 中国专利: ZL200820075225.3,2009-05-13.
- [10] 柴慈江,严仁玲,王震星,等. 葡萄试管苗土支撑培养带坨移栽研究[J]. 华北农学报,1995,10(1):116-119.
- [11] 柴慈江,宁保生,陈桂林. 枣试管苗带土坨移栽成活率高[J]. 中国果树,1998(4):56.
- [12] 柴慈江,魏志勇. 晚红葡萄试管苗快速繁殖技术研究[J]. 北方园艺,2005(1):61-62.
- [13] 柴慈江,史燕山,骆建霞,等. 枸杞试管苗蛭石支撑生根培养及炼苗移栽研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(17):7860-7861,7871.

Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lonicera nitida* ‘Maigrun’

CHAI Ci-tiang, LI Tong-yin, SHI Yan-shan, LUO Jian-xia, LU Xing-xia, LUO Lan-xin
(Department of horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

Abstract: This paper aims at setting up the system of tissue culture and rapid propagation technique of *Lonicera nitida* ‘Maigrun’. The MS media containing different concentration of 6-BA and the MS media with major element concentration changed without plant hormone were used respectively for the micro shut multiplication. The micro shuts multiplied best with the multiple coefficient of 3.8 on the 1/4 MS medium without plant hormones. The micro stem sections of *Lonicera nitida* ‘Maigrun’ were cultured in soil supporting medium and 98.3% of them rooted, the root number of which was no significant difference comparing with that of cultured in medium supported by agar, the root hairs of the plantlet from soil supporting medium were longer than that from agar supporting medium. After acclimatized in opened bottles for three weeks the rooted plantlets in soil supporting medium were transplanted into soil with lump and under the conditions of no-spraying, no-covering and low air humidity of 55% in afternoon their survival rate was 93.3% which was significantly higher than that of the plantlet transplanted by normal method, the latter survival rate was 53.3%.

Key words: *Lonicera nitida* ‘Maigrun’; plantlet *in vitro*; micro shut multiplication; rooting; transplanting with lump