

# 早花忍冬离体快繁技术

王 欢<sup>1,2</sup>, 姜 哲<sup>1</sup>, 许士钊<sup>1</sup>, 刘 洋<sup>1</sup>, 苑 禹<sup>1</sup>

(1. 北华大学 林学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林省林业与生态环境重点实验室, 吉林 吉林 132013)

**摘 要:**以东北地区早春植物早花忍冬的幼嫩茎段为外植体, MS培养基为基本培养基, 添加不同的植物生长调节物质, 进行了离体快速繁殖技术研究。结果表明: 采用 2.0% NaClO 处理 20 min 的灭菌效果好; 诱导早花忍冬侧芽分化的适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% 蔗糖+0.7% 琼脂; 增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% 蔗糖+0.7% 琼脂, 30 d 的增殖系数为 8; 最佳的生根培养基为 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA+1.5% 蔗糖+0.7% 琼脂, 生根率达 100%。

**关键词:**早花忍冬; 组织培养; 早春植物

**中图分类号:**S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0095-04

早花忍冬 (*Lonicera praeflorens* Batalin) 属忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属落叶灌木, 主要分布于我国东北三省的东南部, 俄罗斯 (远东地区)、朝鲜、日本也有分布<sup>[1]</sup>。该树种枝叶茂盛, 开花早, 果实成熟早, 绿叶衬托着红果, 甚是美观。能弥补东北地区早春时节的萧条景象, 延长城市的绿化时间, 丰富早春时节绿化景观, 是一

种具有开发价值的优良绿化树种。

目前, 关于早花忍冬的研究尚少见报道。翟富<sup>[2]</sup>采用正交设计实验研究了 ABT 浓度、处理时间及扦插基质对早花忍冬嫩枝扦插的影响。贺勇等<sup>[3]</sup>的研究表明早花忍冬具有很强的滞尘和杀菌能力, 在所研究的 20 种乡土树种中早花忍冬的杀菌能力最强, 除菌率 83.07%。现已研究多数忍冬属植物具有清热解毒、保肝利胆、抗氧化、提高免疫力等功效。其花蕾和果实中还含有人体必需的微量元素、氨基酸和其它一些营养成分, 具有营养保健价值<sup>[4]</sup>。早花忍冬的化学成分及药理药效作用有待进一步分析, 可以考虑作为金银花的代用

**第一作者简介:**王欢(1978-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事珍稀植物保育生物学等研究工作。E-mail: magnolia2009@126.com.

**基金项目:**吉林省教育厅“十二五”科技资助项目(20140172)。

**收稿日期:**2014-11-06

## Molecular Cloning, Bioinformatics Analysis of *rbcL* Gene in *Bellis perennis*

XIONG Yong<sup>1</sup>, ZHAO Chun-yan<sup>2</sup>, YANG Qing-song<sup>1</sup>, ZHANG Wei-han<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500; 2. Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming, Yunnan 650221)

**Abstract:** Taking *Bellis perennis* as experimental materials. *Bellis perennis rbcL* gene was amplified using PCR method and sequenced. Biological softwares DNASTar, PAML was used to bioinformatic and adaptive evolutionary analysis for this gene. The results showed that the full length of cDNA of *Bellis perennis rbcL* gene was 1 458 bp, it encoded 485 amino acids. Compared to the sequences of this gene in other compositae plants, homology of their nucleotide and amino acid sequences were over 96%. The secondary structure of *RbcL* protein had 20  $\alpha$ -helices, 17  $\beta$ -sheets, 33 turns and some coils structures. The adaptive evolutionary analysis using variable  $\omega$  ratio sites method indicated that 3 amino acid residues (94 E, 149 Q and 309 M) were positively selected. The isolation of *rbcL* gene will facilitate the further research in *Bellis perennis* adapting to particular environment. The spatial locations of the positively selected sites in *rbcL* subunit played an important role to maintain function of Rubisco.

**Keywords:** *Bellis perennis*; *rbcL* gene; protein structure prediction; adaptive evolution

资源或开发为新的药用资源,满足医疗需求。

组织培养微繁技术是传统营养繁殖技术的扩展,具有繁殖速度快、繁殖系数大的优点,适合于优良树种的大量繁殖应用。目前尚鲜见关于早花忍冬组织培养的研究报道,因此该研究通过组织培养的方法来培育苗木,摸索适合其快速繁殖的培养基配方,建立其快繁体系,增加资源贮量,使这一乡土树种能够早日在东北地区的园林绿化上广泛应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2013年5月上旬,在吉林市龙潭山公园剪取早花忍冬当年萌发的嫩枝作为供试材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料的灭菌处理 修剪掉早花忍冬嫩枝的叶片,流水冲洗2 h,加入洗洁精浸泡10 min,再用流水冲洗干净。置超净工作台上分别采用以下3种处理筛选适宜的灭菌方法:第1种为0.1%升汞浸泡5 min,无菌水冲洗6次;第2种为0.1%升汞浸泡7 min,无菌水冲洗6次;第3种为2.0%次氯酸钠浸泡20 min,无菌水冲洗3次。接种30 d统计污染率和成活率。污染率(%)=污染的外植体数/接种的外植体总数×100%;成活率(%)=鲜绿的无菌外植体数/接种的外植体总数×100%。

1.2.2 启动培养 以MS培养基为基本培养基,剪取约1 cm带芽的茎段接种到以下5种不同培养基:MS+0.5 mg/L 6-BA;MS+1.0 mg/L 6-BA;MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA;MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。在启动培养过程中,定期观测外植体生长分化情况。

1.2.3 增殖培养 在启动培养的基础上,观察各组培养基外植体生长分化情况,改变细胞分裂素与生长素的浓度配比,筛选出适宜早花忍冬增殖的培养基。具体配比:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA;MS+2.0 mg/L

6-BA+0.10 mg/L NAA;MS+3.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA;MS+3.0 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA。接种后40 d统计芽萌发与生长情况。增殖系数=增殖后的芽数/接种芽数。

1.2.4 生根培养 将MS培养基中的大量元素浓度减半,蔗糖浓度减半为1.5%后,选择增殖培养中生长比较健壮的无菌苗,剪取2~3 cm无菌苗接种到以下培养基中:1/2MS+0.5 mg/L IBA;1/2MS+0.5 mg/L NAA;1/2MS+1.0 mg/L NAA;1/2MS+1.0 mg/L IBA;1/2MS+0.3 mg/L NAA+0.3 mg/L IBA;1/2MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA;1/2MS+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA。统计生根率、生根数量及长度等指标,筛选出适宜的生根培养基。

1.2.5 练苗与移栽 挑选生长健壮、根系发达的组培苗,打开封口膜,先在室内散射光条件下培养3 d,然后用镊子将试管苗从培养瓶中取出,洗净根部残留的培养基,移栽到含有等量珍珠岩和蛭石的基质中。移栽前将基质用0.3%高锰酸钾溶液淋透消毒,然后用清水冲淋3~5遍。

1.2.6 培养条件 以上培养基除生根培养基的蔗糖浓度为15 g/L外,其它培养基蔗糖浓度均为30 g/L,琼脂粉浓度均为0.7 g/L,pH 5.8。培养温度25℃,光照强度2 000 lx,光照时间14 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌剂对外植体的影响

该试验运用了2种灭菌剂,从表1可以看出,这2种灭菌剂的灭菌效果基本相同,但用升汞溶液处理的外植体颜色变褐甚至死亡,可能是升汞对幼嫩的植物材料造成了损伤。同时升汞会对环境造成污染,而次氯酸钠无毒且易清洗,因此用2.0%次氯酸钠溶液处理20 min是早花忍冬比较理想的灭菌方法。

表1 不同灭菌剂的灭菌效果

Table 1 The sterilization effect of different bactericides

灭菌剂 Bactericide	灭菌时间 Sterilization time/min	污染率 Contaminated rate/%	成活率 Survival rate/%	外植体生长情况 Growth performance of explant
0.1% HgCl <sub>2</sub>	5	16.7	60.0	生长差,少数变褐 Worse, few browning
0.1% HgCl <sub>2</sub>	7	10.0	43.3	生长差,多数变褐 Worse, more browning
2.0% NaClO	20	13.3	86.7	生长良好,绿色 Better, green

### 2.2 植物生长调节物质浓度对外植体启动培养的影响

由表2可以看出,早花忍冬启动培养对生长素浓度的要求比较低,只添加细胞分裂素6-BA就可以诱导腋芽萌发生长(图1),细胞分裂素和生长素配合使用诱导分化效果更好,但随着生长素浓度升高,腋芽萌发时间长,生长慢。NAA浓度在0.05 mg/L时生长迅速,分化率达93.3%;当NAA浓度达到0.10 mg/L时腋芽生长

缓慢且茎基部形成致密的黄绿色愈伤组织。这可能是较高浓度的生长素或较低细胞分裂素与生长素浓度之比对早花忍冬诱导分化不利,或与早花忍冬自身含有较高浓度的植物激素有关。因此,通过试验筛选出早花忍冬启动培养的适宜培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA。

表 2 不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 对芽诱导分化的影响

Table 2 The effect of 6-BA and NAA of different concentration on inducing bud differentiation

6-BA 浓度 6-BA concentration/(mg · L <sup>-1</sup> )	NAA 浓度 NAA concentration/(mg · L <sup>-1</sup> )	分化率 Differentiation percentage/%	40 d 分化情况 Differentiation status after 40 days
0.5	0	83.3	侧芽萌发,侧枝长约 2.5 cm Lateral branch elongation,2.5 cm
1.0	0	73.3	侧芽萌发,侧枝长约 2.0 cm Lateral branch elongation,2.0 cm
1.0	0.05	93.3	侧芽萌发,侧枝长约 4.0 cm Lateral branch elongation,4.0 cm
1.0	0.10	76.7	侧芽萌发,侧枝长约 3.0 cm Lateral branch elongation,3.0 cm



图 1 早花忍冬启动培养

Fig. 1 Primary culture of *L. prae-florens*

2.3 植物生长调节物质浓度对早花忍冬增殖的影响

从表 3 可以看出,当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,早花忍冬的腋芽分化增殖快(图 2),但随 NAA 浓度升高腋芽分化率降低。当 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,外植体基本不分化,甚至干枯而死。这可能是 6-BA 浓度过高,抑制了侧芽的萌发生长。同时在试验中发现,NAA 浓度达到 0.10 mg/L 时,外植体基部即形成致密的绿色的愈伤组织,但当 0.10 mg/L 的 NAA 与 2.0 或 3.0 mg/L 的 6-BA 配合使用时,愈伤组织均未分化。因此,得出适宜早花忍冬增殖培养的培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA,增殖系数可达 8,主要通过腋芽萌发伸长生长实现增殖。

表 3 植物生长调节物质浓度对早花忍冬增殖的影响

Table 3 Effect of concentration of plant growth regulator on multiplication of *L. prae-florens*

处理 Treatment	6-BA 浓度 6-BA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	NAA 浓度 NAA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	增殖系数 Proliferation coefficient
1	2.0	0.05	8
2	2.0	0.10	6
3	3.0	0.05	2
4	3.0	0.10	1

2.4 不同植物生长素对早花忍冬生根的影响

从表 4 可以看出,单独使用一种生长素时,NAA 的生根效果较 IBA 好,试管苗基部不形成愈伤组织,不定根由基部皮层下生出,随 NAA 浓度增大生根率降低。只添加 0.5 mg/L NAA,生根率达 83.3%(图 3),只加



图 2 早花忍冬增殖培养

Fig. 2 Multiplication culture of *L. prae-florens*

0.5 mg/L IBA 不分化出根,在无菌苗基部只形成愈伤组织。NAA 和 IBA 二者配合使用,主根数量多,根生长快且较粗壮,被黄褐色根毛。随二者浓度升高,主根数量减少,生长速度减慢,当 NAA 和 IBA 都达到 1.0 mg/L 时,生根数量显著减少,根生长显著减慢。因此早花忍冬适宜的生根培养基为 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA,在生根培养 12 d 左右不定根开始分化,随着培养时间延长,生根数量和根长增加,在培养约 40 d 时主根开始分化出侧根(图 4)。

表 4 植物生长素对早花忍冬生根的影响

Table 4 The effect of auxins on inducing rooting of *L. prae-florens*

NAA 浓度 NAA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	IBA 浓度 IBA concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )	平均生根率 Average rate of rooting/%	平均生根数 Average number of root/条	平均主根根长 Average length of root/cm
0	0.5	0	0	0
0.5	0	83.3	4	2.2
1.0	0	73.3	3	1.8
0	1.0	0	0	0
0.3	0.3	100.0	5	3.0
0.5	0.5	83.3	4	2.4
1.0	1.0	70.0	3	1.2

注:统计数据是生根培养 40 d 的结果。

Note:The statistical data is the result of rooting culture after 40 days.

2.5 练苗与移栽

移栽后 7~10 d 覆盖塑料薄膜保湿并用遮阳网适当遮荫,每天喷雾 2 次,随后逐渐降低湿度,增加光照。15 d 左右长出新根,移栽成活率达 90% 以上。

3 讨论

该试验中采用 2.0%NaClO 溶液处理 20 min 取得



图3 早花忍冬生根培养(35 d)

Fig. 3 Rooting culture for 35 days



图4 早花忍冬生根培养(60 d)

Fig. 4 Rooting culture for 60 days

了较好的灭菌效果。而以往研究均是用升汞结合 75% 乙醇灭菌效果好,而用次氯酸钠灭菌效果不好<sup>[5]</sup>,主要是用次氯酸钠处理时间过短没有取得好的灭菌效果。

植物组织培养中,生长物质的种类、水平以及相互组合配比对组织的产生与分化至关重要。早花忍冬茎段培养的诱导分化过程中,细胞分裂素 6-BA 的浓度在 0.5~2.0 mg/L,芽增殖与其浓度呈正相关,但当浓度大

于 2.0 mg/L 时,抑制芽分化。在试验中发现该植物对生长素 NAA 比较敏感,添加 0.10 mg/L 的 NAA,茎段基部即形成大量愈伤组织,同时腋芽萌发生长速度减慢。这与华南忍冬的组织培养结果一致<sup>[6]</sup>。

生根培养基中适量减少营养成分能有效促进生根,该研究采用 1/2MS 作为基本培养基取得了较好的生根效果。不同种类和浓度的植物生长素对植物的生根作用存在差异。较低浓度的生长素 NAA 和 IBA 配合使用或单独使用 NAA 对早花忍冬生根有促进作用,这与蕊帽忍冬<sup>[7]</sup>的生根培养中 NAA 的生根效果比 IBA 好一致,而与灰毡毛忍冬<sup>[8]</sup>和蓝靛果忍冬<sup>[9]</sup>生根需要较高浓度的生长素 IBA 不一致。可能由于不同物种自身合成内源激素能力不同,物种生根所需要的植物生长调节物质种类和质量浓度不同有关。关于早花忍冬愈伤组织的诱导分化及其它种类的细胞分裂素及生长素对其诱导分化效果还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 72 卷. 北京: 科学出版社, 1988: 208.
- [2] 翟富. 早花忍冬嫩枝扦插试验[J]. 中国园艺文摘, 2009(7): 43.
- [3] 贺勇, 李磊, 李俊毅, 等. 北方 30 种景观树种净化空气效益分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(5): 37-39.
- [4] 邢俊波, 李萍. 忍冬属化学成分研究概况及展望[J]. 中药材, 1999, 22(7): 366-370.
- [5] 向增旭, 高山林. 忍冬组织培养体系的建立与优化[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2662-2663.
- [6] 李翔, 杨美纯, 全泉, 等. 华南忍冬组织培养的无菌体系建立[J]. 广西植物, 2008, 28(6): 823-826.
- [7] 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.
- [8] 王晓明, 易露琴, 宋庆安, 等. 灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系建立[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 14-16.
- [9] 张启昌, 梁琦兰, 夏新莉, 等. 蓝靛果忍冬茎段离体培养与植株再生[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4): 126-130.

## Rapid Propagation *in vitro* of *Lonicera praeflorens*

WANG Huan<sup>1,2</sup>, JIANG Zhe<sup>1</sup>, XU Shi-zhao<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, YUAN Yu<sup>1</sup>

(1. Forestry College, Beihua University, Jilin, Jilin 132013; 2. Jilin Province Key Laboratory of Forestry and Ecological Environment, Jilin, Jilin 132013)

**Abstract:** Taking tender stem section of *Lonicera praeflorens* which flowers in early spring in the Northeast as material, MS medium was selected as the basic medium supplemented with different plant growth regulators, the efficient process for the regeneration was studied. The results showed that the surface sterilization in 2.0% sodium hypochlorite for 20 minutes was the best. The optimum medium for the differentiation of lateral buds was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% sucrose+0.7% agar; the medium MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% sucrose+0.7% agar was good for multiplication and the proliferation coefficient was 8. The optimum medium for inducing root was 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA+1.5% sucrose+0.7% agar, and the rooting rate was 100%.

**Keywords:** *Lonicera praeflorens* Batalin; tissue culture; early spring plant