

长白忍冬的组织培养与快速繁殖

王 欢^{1,2}, 许士钊³, 李 旭¹

(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;

3. 吉林省林业勘察设计院, 吉林 长春 130022)

摘 要:以长白忍冬的幼嫩茎段为外植体, MS 为基本培养基, 添加不同的植物生长调节物质, 进行离体快速繁殖技术研究。结果表明: 在 0.1% HgCl_2 溶液中滴加 0.1% 吐温 80 处理 5 min 的灭菌效果最好; 诱导长白忍冬侧芽分化的适宜培养基为 $\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂或不加任何生长调节物质的 $\text{MS}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂; 增殖培养基为 $\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, 30 d 的增殖系数为 8; 最佳的生根培养基为 $1/2\text{MS}+15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖+7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, 生根率达 60.0%。

关键词:长白忍冬; 离体快繁; 茎段

中图分类号:S 688.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)13-0107-04

长白忍冬 (*Lonicera ruprechtiana* Regel) 属忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属落叶灌木, 又名扁担胡子、王八骨头。主要分布于我国东北地区的东部, 朝鲜半岛北部、西伯利亚东部及远东地区也有分布^[1]。单叶对生, 唇形花冠先白色后变黄色, 芳香; 浆果红色, 圆形, 挂果时间长, 耐旱抗寒性强, 是东北地区观花赏果的优良绿化树种。

忍冬属植物具有清热解毒、保肝利胆、提高免疫力等功效。果实中含有人体必需的微量元素、氨基酸和其它一些营养成分, 具有很高的营养保健价值^[2]。研究表明, 长白忍冬的化学成分等均与金银花相似, 其抗菌、抑菌作用均不亚于金银花, 有些方面还优于金银花^[3], 因此长白忍冬可以开发为新的药用植物资源, 从而满足医疗及市场需求。

目前, 关于长白忍冬的研究尚少, 主要是在长白忍冬的解剖学研究^[4-5]、花粉形态解剖结构^[6]、花蕾中化学成分的提取、分离及结构鉴定^[7-9]、抗旱性^[10]、绿原酸含量变化^[11]等方面开展相关研究工作。关于繁育方面, 李芬^[12]介绍了长白忍冬的种子繁殖、扦插繁殖及分株繁殖的常规方法及技术要点。董志国等^[13]以吉林省集安产地的长白忍冬为材料, 观测株间种子性状, 由于株间遗传差异, 种子千粒重存在显著差异。种子的大小和质量与年平均温度呈正相关, 而与纬度呈负相关。在园林应用方面, 长白忍冬的成活率、根长、株高、分根数等指标较好, 可作

为水土保持、植被恢复树种, 具有较好的生态效益^[14]。

长白忍冬多采用种子、嫩枝扦插和分株的方法进行繁殖, 但不能满足市场需求, 插穗繁殖系数较低, 且种子繁殖困难, 相对比较植物组织培养技术具有繁殖速度快、取材少, 保持母株优良遗传特性等优点, 更适用于优良树种的大量繁殖。目前尚鲜见长白忍冬组织培养的研究报道, 该研究采用组织培养技术培育长白忍冬苗木, 建立高效的快繁技术体系, 实现苗木快速繁殖, 以期为进一步开发利用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015 年 5 月初, 在吉林市松花湖南山剪取长白忍冬当年萌发的嫩枝。

1.2 试验方法

1.2.1 最佳灭菌方法的筛选 剪去幼枝上的叶片, 留 3~5 mm 叶柄, 修剪成长约 5 cm 的茎段, 放在洗洁精溶液中浸泡 20 min, 然后置流水下冲洗 30 min, 最后在超净工作台上分别采用以下 4 种处理灭菌: 第 1 种为 0.1% HgCl_2 浸泡 5 min, 无菌水漂洗 5 次; 第 2 种为 0.1% HgCl_2 浸泡 7 min, 无菌水漂洗 5 次; 第 3 种为先用 75% 乙醇消毒 20 s, 无菌水冲去残留乙醇, 再用 0.1% HgCl_2 浸泡 5 min, 无菌水漂洗 5 次; 第 4 种为在 0.1% HgCl_2 溶液中滴加 0.1% 吐温 80 浸泡 5 min, 无菌水漂洗 5 次。在启动培养过程中, 定期观测外植体污染情况、腋芽以及愈伤组织生长分化情况。接种 15 d 统计污染率, 污染率(%) = 污染的外植体数/接种的外植体总数 $\times 100$; 成活率(%) = 鲜绿的无菌外植体数/接种的外

第一作者简介:王欢(1978-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事植物组织培养教学及珍稀植物保育生物学等研究工作。E-mail: magnolia2009@126.com.

基金项目:中央财政林业科技推广示范资助项目(吉推[2014]13 号)。

收稿日期:2016-02-14

植体总数 $\times 100$ 。

1.2.2 启动培养基的筛选 以 MS 为基本培养基,剪取约 1 cm 带腋芽的茎段接种 MS、MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA、MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.10 mg \cdot L $^{-1}$ NAA 4 种培养基。

1.2.3 增殖培养基的筛选 在启动培养的基础上,观察外植体在各组培养基上的生长分化情况,改变细胞分裂素与生长素的浓度配比,根据组培苗的增殖系数筛选出适宜长白忍冬增殖的培养基。增殖系数=增殖后的芽数/接种芽数。将启动诱导的小枝修剪成 2 cm 左右茎段转接到以下培养基:MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、MS+2.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、MS+2.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.10 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、MS。

1.2.4 生根培养基的筛选 选择增殖培养中生长比较健壮的无菌苗,剪取 3 cm 左右接种到大量元素浓度减半和蔗糖浓度减半的 MS 培养基:1/2MS+0.1 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、1/2MS+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA、1/2MS+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ IBA、1/2MS。30 d 统计生根率、生根数量及主根长度等指标,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,移栽到含有已高温蒸汽灭菌的等量珍珠岩和蛭石的基质中,置于光照培养箱中,每天喷施 1/2MS 大量元素的水溶液,保持相对湿度 80%~90%,温度 25 $^{\circ}$ C,光照强度 2 500 lx。

1.2.6 培养条件 除生根培养基的蔗糖浓度为 15 g \cdot L $^{-1}$ 外,其它培养基蔗糖浓度均为 30 g \cdot L $^{-1}$,琼脂浓度均为 7 g \cdot L $^{-1}$,pH 5.8。培养温度(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,光照强度 2 000 lx,光照时间 12 h \cdot d $^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法的灭菌效果

从表 1 可以看出,单独使用升汞的灭菌效果不好,且随着灭菌时间延长,外植体的成活率降低。而在升汞溶液中添加表面活性剂的灭菌效果较好。由于忍冬属植物的表面具有绒状短柔毛和微腺毛,在消毒液中加入 0.1%吐温 80 或先用 75%乙醇(20 s)浸润外植体表

面可有利于增加消毒液与外植体表面的接触面积,从而达到更好杀菌效果。其中以在 0.1% HgCl $_2$ 溶液中滴加 0.1%吐温 80 处理 5 min 的灭菌效果最好。

表 1 不同灭菌处理的灭菌效果

Table 1 The sterilization effect of different treatments

灭菌处理 Sterilization treatment	接种瓶数 Inoculation quantity	染菌率 Contaminated rate/%	成活率 Survival rate/%
0.1% HgCl $_2$ (5 min)	50	44	46
0.1% HgCl $_2$ (7 min)	50	26	36
75%乙醇(20 s)+0.1% HgCl $_2$ (5 min)	50	35	58
0.1%吐温 80+0.1% HgCl $_2$ (5 min)	50	30	60

2.2 植物生长调节物质浓度配对外植体启动培养的影响

由表 2 可以看出,离体培养 40 d 后未加任何植物生长调节物质的培养基中 66.7%的外植体腋芽萌发并伸长生长(图 1);只添加细胞分裂素 6-BA 的培养基外植体的分化率为 50.0%,长势较 1 号慢,同时有个别腋芽分化形成丛生芽;3、4 号培养基上的外植体切口处 10 d 左右开始形成黄绿色的愈伤组织,40 d 愈伤组织继续形成,未见分化;同时腋芽萌发并有不同程度的伸长生长。其中 3 号分化率最高,达 83.3%,腋芽伸长生长最快。随着生长素 NAA 浓度升高,分化率降低,这可能是较高浓度的生长素或生长素与细胞分裂素浓度比对诱导腋芽分化不利,或是长白忍冬自身含有较高浓度的植物激素。由此可见,长白忍冬适宜的初代培养基为 MS+1.0 mg \cdot L $^{-1}$ 6-BA+0.05 mg \cdot L $^{-1}$ NAA 或不加任何植物生长调节物质的 MS 培养基。



图 1 长白忍冬启动培养

Fig. 1 Primary culture of *L. ruprechtiana* Regel

表 2 植物生长调节物质对比对芽诱导分化的影响

Table 2 Effect of plant growth regulator combination of different concentration on inducing lateral buds differentiation

培养基编号 Medium number	6-BA 浓度 6-BA concentration/(mg \cdot L $^{-1}$)	NAA 浓度 NAA concentration/(mg \cdot L $^{-1}$)	分化率 Differentiation percentage/%	20 d 诱导分化情况 Differentiation status after 20 days
1	0	0	66.7	侧芽分化长出 4 或 6 片小叶,枝长约 2.5 cm
2	1.0	0	50.0	侧芽分化长出 4 或 6 片小叶,枝长约 2.0 cm
3	1.0	0.05	83.3	侧芽分化长出 6 或 8 片小叶,枝长约 3.0 cm,基部形成少量愈伤组织
4	1.0	0.10	63.3	侧芽分化长出 4 或 6 片小叶,枝长约 2.5 cm,基部形成大量愈伤组织

2.3 植物生长调节物质浓度对长白忍冬增殖的影响

从表 3 可以看出,随 6-BA 浓度升高外植体的腋芽分化率降低,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,当 NAA 浓度达到 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外植体基部形成大量致密的绿色的愈伤组织,同时抑制腋芽萌发。因此,适宜长白忍冬增殖培养的培养基为:MS+ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,增殖系数可达 8,同时在不加任何植物生长调节物质的 MS 培养基中即可实现继代增殖,长白忍冬主要通过腋芽萌发伸长生长(无菌短枝发生型)实现增殖(图 2)。

表 3 植物生长调节物质浓度对长白忍冬增殖的影响

Table 3 Effect of concentration of plant growth regulator on multiplication of *L. ruprechtiana* Regel

6-BA 浓度 6-BA concentration /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA 浓度 NAA concentration /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖系数 Proliferation coefficient
1.0	0.05	8
2.0	0.05	4
2.0	0.10	2
0	0	6

表 4 植物生长素对长白忍冬生根的影响

Table 4 Effect of auxin on rooting of *L. ruprechtiana* Regel

IBA 浓度 IBA concentration/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA 浓度 NAA concentration/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均生根率 Average rate of rooting/%	平均生根数 Average number of root/条	平均主根长 Average length of root/cm
0	0.10	0	—	—
0	0.05	46.7	2	3.0
0.05	0.05	33.3	2	2.5
0	0	60.0	3	4.0



图 2 长白忍冬增殖培养

Fig. 2 Multiplication culture of *L. ruprechtiana* Regel

2.4 长白忍冬的生根诱导及移栽

从表 4 可以看出,长白忍冬对生长素极为敏感,添加 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 即在无菌苗基部形成愈伤组织,培养 30 d 左右愈伤组织分化出少量不定根。随着生长素浓度升高,愈伤组织形成越多但不分化出根。在不加任何生长素的条件下,经过 5 次以上继代培养,组培苗 20 d 即在茎基部的皮部分化出不定根(图 3),待主根生长 15 d 左右,又分化出一定量须根。因此长白忍冬适宜的生根培养基为 1/2MS。



图 3 长白忍冬生根培养

Fig. 3 Rooting culture of *L. ruprechtiana* Regel

将根系生长良好,长势健壮的再生植株移栽于等比例珍珠岩和蛭石的混合基质中,保证温湿度及光照条件。移栽后 15 d,小植株萌发出新叶,长出新根,移栽成活率达 85%以上(图 4)。



图 4 长白忍冬再生植株

Fig. 4 Regenerated plants of *L. ruprechtiana* Regel

3 讨论

在植物离体培养过程中获得无菌培养材料至关重要。因此需根据取材时间、植物材料的幼嫩程度、外植体类型等确定消毒的程序及时间。长白忍冬的幼枝和

叶柄被绒状短柔毛和微腺毛,灭菌较困难,加入少量的表面活性剂可以起到很好的润湿作用。选择春季新萌发的嫩枝为外植体相对较易灭菌,且外植体萌发力强,采用在 0.1% HgCl_2 中滴加 0.1% 吐温 80 处理 5 min 的灭菌效果较好。

在植物离体快繁中,植物生长调节物质是培养基中的关键物质,其种类、浓度及组合对培养物的诱导分化起重要作用。该试验选用不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合处理长白忍冬,结果表明不同质量浓度的 6-BA 与 NAA 的组合对于长白忍冬组培苗的增殖影响较大,随着 6-BA 浓度的升高,增殖系数降低,且当 NAA 浓度达到 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,增殖苗基部切口处产生大量愈伤组织,同时抑制腋芽分化。这与早花忍冬^[15]、华南忍冬^[16]的组织培养结果一致。同时在试验中发现,长白忍冬在不加任何植物生长调节物质的 MS 培养基中即可以通过腋芽萌发伸长生长的途径实现增殖,这与新疆忍冬^[17]在无激素的 B_5 培养基中实现增殖一致。

不同植物的生根诱导对生长素的种类及浓度需求存在差异,这与植物自身的遗传特性、继代增殖的次数及培养基组成等因素具有一定关系。长白忍冬的生根诱导对生长素的需求不大,不加生长素或加低浓度的生长素即可形成不定根。这可能与长白忍冬自身合成生长素能力较强或比较容易生根有关。关于诱导长白忍冬愈伤组织的再分化还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 徐炳声,胡嘉琪,王汉津. 中国植物志[M]. 72 卷. 北京:科学出版社,1988:143-259.
- [2] 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.
- [3] 朱大胜,赵蕊,戴丽梅. 长白忍冬药理实验研究[J]. 中国医学理论与实践,2003(1):111-112.
- [4] 杜佳朋,张友民. 长白忍冬的形态解剖学研究[D]. 长春:吉林农业大学,2006.
- [5] 倪福太,王占武,刘强,等. 金银忍冬和长白忍冬木质部比较研究[J]. 吉林师范大学学报,2014(2):131-133.
- [6] 朱丽,谢朋,王桂娟,等. 4 种忍冬属植物花粉形态结构的扫描电镜观察[J]. 吉林林业科技,2007,36(4):10-11,47.
- [7] 崔晶,王广树. 长白忍冬花蕾化学成分分离与结构鉴定[J]. 吉林大学学报(医学版),2009(6):1032-1035.
- [8] 樊庆林. 长白忍冬花蕾中挥发油及黄酮类成分的提取分离与结构鉴定[D]. 长春:吉林大学,2006.
- [9] 王广树,周小平,崔晶,等. 长白忍冬花蕾中环烯醚萜类成分的研究[J]. 中国药物化学杂志,2009(3):206-208.
- [10] 赵杰. PEG-6000 胁迫对忍冬科四种植物的生理影响[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [11] 赵权. 脱落酸对长白忍冬果实和叶绿原酸含量的影响[J]. 北方园艺,2011(22):22-24.
- [12] 李芬. 长白忍冬栽培丰产技术[J]. 中国林副特产,2014(4):66-67.
- [13] 董志国,张雪莹. 长白忍冬株间种子性状的观测与分析[J]. 吉林林业科技,2011,40(6):1-2,12.
- [14] 赵丽,刘平生,王佐良,等. 忍冬属部分树种综合评价[J]. 北方园艺,2012(23):102-104.
- [15] 王欢,姜哲,许士钊,等. 早花忍冬离体快繁技术[J]. 北方园艺,2015(4):95-98.
- [16] 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.
- [17] PALACIOS N,CHRISTOU P,LEECH M J. Regeneration of *Lonicera tatarica* plants via adventitious organogenesis from cultured stem explants[J]. Plant Cell Report,2002,20:808-813.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lonicera ruprechtiana* Regel

WANG Huan^{1,2}, XU Shizhao³, LI Xu¹

(1. College of Forestry, Beihua University, Jilin, Jilin 132013; 2. Jilin Province Key Laboratory of Forestry and Ecological Environment, Jilin, Jilin 132013; 3. Forest Survey and Design Institute of Jilin Province, Changchun, Jilin 130022)

Abstract: Taking tender stem segments of *Lonicera ruprechtiana* Regel as explants, MS was selected as the basic medium supplemented with different plant growth regulators, the rapid propagation was studied. The results showed that the surface sterilization in 0.1% HgCl_2 solution adding 0.1% Tween 80 for 5 min was the best. The optimal medium for inducing axillary buds was $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar or $\text{MS} + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar; the medium $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar was good for multiplication and the proliferation coefficient was 8. The optimum medium for root induction was $1/2\text{MS} + 15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, and the rooting rate was 60.0%.

Keywords: *Lonicera ruprechtiana* Regel; micropropagation *in vitro*; segments of tender stems