

灰毡毛忍冬新品种组培高效增殖体系的建立

王晓明^{1,2} 李永欣¹ 易霏琴¹ 聂启英³ 宋庆安¹

(1 中南林业科技大学 2 湖南省林业科学院 3 长沙环境保护职业技术学院)

摘要:以灰毡毛忍冬新品种‘金翠蕾’为材料,研究了基本培养基、MS 培养基大量营养元素含量、植物生长调节剂浓度、生物素及蔗糖浓度对组培丛生芽增殖的影响。结果表明,在 MS、WPM、WH、B₅ 基本培养基中,MS 比较适合丛生芽的增殖和生长;MS 中的硝酸钾和磷酸二氢钾的含量对丛生芽增殖影响较大,以硝酸钾为零,磷酸二氢钾、硝酸铵、氯化钙和硫酸镁分别减半为宜;蔗糖浓度对丛生芽的增殖影响不显著,但以 30 g/L 为宜;添加生物素 D 以及低浓度 6-BA 和 NAA 有利于丛生芽增殖与生长;适宜的增殖培养基为改良 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 生物素 1.0 mg/L。

关键词:灰毡毛忍冬;组织培养;丛生芽;增殖系数

灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand. Mazz) 是忍冬科忍冬属多年生半常绿缠绕小灌木或直立小灌木植物,其花蕾绿原酸含量在全国各种金银花中最高^[1],是西南、中南地区商品金银花的主要品种之一^[2]。它含有挥发油、黄酮类、三萜皂甙、有机酸及无机元素等,具有抑菌、抗病毒、解热、抗炎、保肝、抗艾滋病等作用^[3]。湖南已从灰毡毛忍冬选育出高产、优质,有效成分含量高、抗性和适应性强的花蕾型新品种‘金翠蕾’、‘银翠蕾’和‘白云’,其花期花冠一直不开裂或半开裂,深受广大生产者和消费者青睐。但其常规的无性繁殖困难,扦插、嫁接成活率较低,组培苗增殖缓慢^[4-6],至今未见灰毡毛忍冬组培增殖的研究报道。为了加快新品种的推广应用,充分发挥其增产增效的作用,我们在建立灰毡毛忍冬新品种组培无菌体系的基础上,开展了丛生芽高效增殖体系的研究,旨实现灰毡毛忍冬新品种苗木规模化组培生产。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为湖南省林木无性系育种重点实验室前期诱导的丛生芽^[5],供试品种为金翠蕾 (*Lonicera macranthoides* cv. Jincuilei)。

1.2 培养基及培养条件

以 MS、WPM、WH、B₅ 为基本培养基,附加成分为 BA、NAA、IAA、IBA、活性炭和生物素 D 等,按不同的配

比加入基本培养基中。培养基 pH 值为 5.8,琼脂 7 g/L,蔗糖浓度 20~50 g/L。培养基用 300 mL 的广口瓶分装,每瓶 30 mL,封口膜包扎,在 121℃ 和 1.1 kg/cm² 条件下,用高压蒸汽灭菌锅灭菌 25 min。培养温度为 25 ± 2℃,光强 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.3 试验方法

将初代培养诱导的丛生芽切取单芽,剪切成 2.0~2.5 cm 长的茎段,接种于添加不同附加成分的增殖培养基上,25 d 后观察试管苗增殖的效果。增殖系数 = 调查时有效芽数/接种时的外植体数,有效芽是指长度 1 cm 以上的丛生芽。随机区组试验设计,4 次重复,每个重复中各处理接种 6 瓶,每瓶接种 6 个基本一致的外植体。具体试验设计如下。

1.3.1 基本培养基对丛生芽增殖的影响试验

设计 MS、WPM、WH、B₅ 计 4 种基本培养基,分别添加 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L。培养 25 d 再观察其生长情况,调查增殖系数。

1.3.2 MS 基本培养基大量营养元素含量对丛生芽增殖的影响试验

以 MS 培养基为研究对象,按 L₁₆(4⁵) 正交试验设计。试验因子 5 个:硝酸铵、硝酸钾、硫酸镁、氯化钙、磷酸二氢钾,每个因子 4 个水平,即①在培养基中不添加该因素(0);②含量减半(1/2);③含量保持不变(1);④含量加倍。培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖 30 g/L。

1.3.3 生物素浓度对丛生芽增殖的影响试验

设计生物素 D 浓度 0 (对照 CK), 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 4 种浓度。培养基为改良 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,改良 MS 是 MS 基本培养基中的硝酸钾的为零,磷酸二氢钾、硝酸铵、氯化钙和硫酸

收稿日期:2006-09-20

基金项目:湖南省林业“十五”科技攻关重点项目“灰毡毛忍冬新品种选育及快繁技术研究”(编号:2000-167),2006 年获湖南省科技进步二等奖。

第一作者简介:王晓明(1964-),男,研究员,博士生,主要从事经济林育种、栽培与生物技术研究。

镁的用量分别减半(下同)。

1.3.4 丛生芽高效增殖优化培养基的筛选

按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。参试因子为 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA (0.05、0.1、0.3 mg/L)、添加物 D (0.5、1.0、1.5 mg/L)。各因子均为 3 个水平。基本培养基为改良 MS。

1.3.5 蔗糖浓度试验

将丛生芽接种到含不同蔗糖浓度 (20、30、40、50 g/L) 的改良 MS +6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基中。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对丛生芽增殖的影响

灰毡毛忍冬丛生芽在不同的基本培养基中的增殖效果不一样(表 1)。方差分析结果表明:不同培养基对丛生芽增殖的影响差异极显著 ($F = 345.48^{**}$, $F_{0.01} = 5.95$)。用 WPM 处理的丛生芽,增殖系数最高,达到 5.37,但是生长不正常,长势差,苗细长,叶微黄,诱导生根率和苗木移栽成活率均低;用 MS 培养的丛生芽,增殖系数较高,达到 3.88,瓶苗生长健壮,茎节间长,粗壮,叶色浓绿,诱导生根率和苗木移栽成活率较高,这与王光金、李军在凤爪金银花和红河金银花组织培养的研究结果一致^[8,9]。WH 和 B_5 培养基的增殖系数很低,不足 1.3,不宜作为灰毡毛忍冬丛生芽增殖的培养基,这与杨培君在蒙花系列金银花的研究不一致^[7],可能与不同品种的遗传物质及生理特性不同有关。可见,MS 培养基是灰毡毛忍冬丛生芽增殖的最佳基本培养基。

表 1 不同基本培养基对丛生芽增殖的影响

指标	基本培养基			
	MS	WPM	WH	B_5
增殖系数	3.88 B	5.37 A	1.21 C	1.25 C

注: $LSD_{0.05} = 0.35$, $LSD_{0.01} = 0.49$ 。有相同字母的处理间差异不显著,无相同字母的差异显著。小写字母表示 0.05 的显著水平,大写字母表示 0.01 的显著水平。下同。

2.2 MS 基本培养基大量营养元素含量对丛生芽增殖的影响

从表 2 可见,MS 基本培养基大量营养元素含量对灰毡毛忍冬丛生芽的增殖系数的影响顺序是:硝酸钾 > 磷酸二氢钾 > 硝酸铵 > 氯化钙 > 硫酸镁,其中以硝酸钾和磷酸二氢钾的含量影响较大,说明钾离子和磷的含量对灰毡毛忍冬增殖影响较大;硫酸镁的影响最小。由此确定灰毡毛忍冬增殖培养适宜的 MS 基本培养基大量营养元素含量是:硝酸钾为零,磷酸二氢钾、硝酸铵、氯化钙和硫酸镁分别减半。该基本培

养基称为改良 MS 培养基。

表 2 MS 基本培养基矿质营养元素含量对丛生芽增殖的影响

处理	硝酸铵	硝酸钾	硫酸镁	氯化钙	磷酸二氢钾	增殖系数	生长量/cm
1	0	0	0	0	0	3.60	2.17
2	0	1/2	1/2	1/2	1/2	4.00	2.03
3	0	1	1	1	1	3.20	2.27
4	0	2	2	2	2	3.60	2.23
5	1/2	0	1/2	1	2	4.14	2.27
6	1/2	1/2	0	2	1	3.66	2.13
7	1/2	1	2	0	1/2	3.86	2.50
8	1/2	2	1	1/2	0	3.14	2.13
9	1	0	1	2	1/2	3.94	2.00
10	1	1/2	2	1	0	3.06	2.03
11	1	1	0	1/2	2	3.74	2.07
12	1	2	1/2	0	1	3.20	2.13
13	2	0	2	1/2	1	3.80	1.97
14	2	1/2	1	0	2	3.40	2.10
15	2	1	1/2	2	0	3.03	2.10
16	2	2	0	1	1/2	3.14	2.13
k1	3.600	3.870	3.535	3.515	3.208		
k2	3.700	3.530	3.593	3.670	3.735		
k3	3.485	3.458	3.420	3.385	3.465		
k4	3.343	3.270	3.580	3.558	3.720		
R	0.357	0.600	0.173	0.285	0.527		

注:k1、k2、k3 分别表示各因素水平的平均值,R 表示极差。下同。

2.3 生物素 D 浓度对丛生芽增殖的影响

方差分析结果(表 3)表明,生物素 D 浓度对丛生芽的增殖率和生长的影响极显著 ($F = 13.771^{**}$, $F_{0.01} = 5.95$),说明在灰毡毛忍冬增殖培养基中,适当添加生物素 D 有利于丛生芽的增殖和生长。多重比较结果表明,在培养基中加入生物素 D 比对照的增殖系数和生长量都极显著增加,但生物素 D 不同浓度的处理之间没有明显差异。从节约成本考虑,选择 1.0 mg/L 浓度的生物素 D 比较适合灰毡毛忍冬丛生芽的增殖培养。

表 3 添加物 D 浓度对金翠蕾丛生芽增殖的影响

指标	添加物 D 浓度/mg·L ⁻¹			
	0.0 (CK)	1.0	2.0	5.0
增殖系数	4.10 B	4.65 A	4.72 A	4.78 A
丛生芽长度/cm	2.25 B	2.82 A	2.74 A	2.69 A

注:增殖系数: $LSD_{0.05} = 0.26$, $LSD_{0.01} = 0.36$;丛生芽长度: $LSD_{0.05} = 0.23$, $LSD_{0.01} = 0.32$ 。

2.4 蔗糖浓度对丛生芽增殖的影响

蔗糖除了维持培养基的渗透压外,还向培养物提供碳源。蔗糖浓度为 20、30、40、50 g/L 的增殖系数分别为 3.65、3.71、3.74 和 3.76。方差分析结果表明,蔗糖浓度对丛生芽增殖影响差异不显著 ($F = 0.137$, $F_{0.05} = 3.49$)。蔗糖对丛生芽的增殖影响不大,但是对瓶苗的正常生长,叶色呈绿有一定的影响,这可能是灰毡毛

技术开发

忍冬增殖过程需要较高浓度的碳源来维持其生长旺盛的缘故。附加 20 g/L 的蔗糖,增殖的苗微黄;30 ~ 40 g/L 处理的瓶苗叶色浓绿,苗茎长,粗壮,挺拔。蔗糖浓度 50 g/L 处理的瓶苗玻璃化较重,不适合灰毡毛忍冬组培。从节约成本的角度考虑,选择蔗糖浓度 30g/L 较合适灰毡毛忍冬增殖培养。

2.5 丛生芽高效增殖的优化培养基筛选

丛生芽高效增殖优化培养基筛选的正交试验结果见表 4。由表 4 可以看出,影响丛生芽增殖培养的各因子的主次顺序是 6-BA、NAA、生物素 D,灰毡毛忍冬丛生芽增殖培养基的植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 的浓度不宜高,低浓度有利于丛生芽的增殖。增殖效果较好的培养基的附加成分组合为 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+生物素 D 1.0 mg/L。

表 4 丛生芽高效增殖优化培养基筛选的正交试验结果

处理	培养基附加成分/mg·L ⁻¹			增殖系数/个
	6-BA	NAA	添加物 D	
1	0.5	0.05	0.5	4.63
2	0.5	0.10	1.0	4.49
3	0.5	0.30	1.5	3.92
4	1.0	0.05	1.0	4.30
5	1.0	0.10	1.5	3.95
6	1.0	0.30	0.5	3.66
7	1.5	0.05	1.5	3.81
8	1.5	0.10	0.5	3.85
9	1.5	0.30	1.0	3.55
k1	4.35	4.25	4.05	
k2	3.97	4.10	4.11	
k3	3.74	3.71	3.89	
R	0.61	0.54	0.22	

3 结 语

(1) 实验比较了灰毡毛忍冬新品种丛生芽在 MS, WPM, WH, B₅ 培养基中的增殖效果,结果表明, WPM 培养基中的增殖系数虽然比 MS 大,但生长不正常,长势差,MS 培养基中的增殖系数略比 WPM 低,但瓶苗生长健壮。这与王光全^[8]、李军^[9]、杨晓^[10]的实验一致,但与杨培君等^[7]的又不一致,这可能与品种不同有关。如何改良 WPM,使其更有利于丛生芽增殖,有待进一步研究。

(2) MS 培养基大量元素含量对丛生芽增殖的影响试验结果说明,培养基中钾、磷的含量对丛生芽增殖系数影响最大,但其具体原因尚不清楚,尚待进一步研究。

(3) 在灰毡毛忍冬增殖培养基中添加生物素 D 有利于丛生芽增殖与生长。虽然蔗糖浓度对丛生芽的增殖影响不显著,但维持丛生芽正常生长仍需适当

的蔗糖浓度。

(4) 6-BA、IBA 与生长素 D 配比试验结果表明,影响灰毡毛忍冬丛生芽增殖的主要因子是 6-BA,其次是 NAA 和生物素 D,适宜的增殖培养基为改良 MS +6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+生物素 D 1.0 mg/L,组培苗增殖培养 25 d,增殖系数达 4.2 以上,丛生芽健壮。

参考文献

- [1] 郑师章. 若干金银花中绿原酸含量的比较研究[J]. 复旦大学学报, 1978, 6(1): 11.
- [2] 石钺, 石任兵, 陆蕴如. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(11): 724-727.
- [3] 茅青, 曹东, 贾宪生. 灰毡毛忍冬化学成分的研究[J]. 药学报, 1993, 28(4): 273-278.
- [4] 王小明, 罗金塔, 马社军, 等. 金银花(灰毡毛忍冬)新品种选育[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(6): 15-17.
- [5] 王小明, 易霭琴, 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.
- [6] 王小明, 李永欣, 袁启英. 金银花组织培养的研究进展[J]. 湖南林业科技, 2006, 33(4): 1-3.
- [7] 杨培君, 陈德经. 蒙花忍冬的组织培养与快速繁殖研究. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1304-1307.
- [8] 王光全. 凤爪金银花的组织培养技术[J]. 河北林业科技, 2002(5): 25.
- [9] 李军, 乔元伟. 红河金银花的组培快繁技术[J]. 山东林业科技, 2000(3): 41-42.
- [10] 杨晓. 红金色金银花的组织培养[J]. 植物杂志, 1989(5): 8.

(通讯地址: 410004, 长沙市韶山南路 498 号)

《林业科技开发》杂志 入选中国农业核心期刊

由中国农业科学院农业信息研究所组织,并依托中国农学会科技情报分会、中国农学会农业图书馆分会、中国农学会农业科技期刊分会等机构,历时两年时间,对我国公开出版的多种农业期刊进行了评选,日前结果揭晓。

根据文献计量学原理与方法,经多项指标定量评价,并邀请专家对定量结果进行定性评审,《林业科技开发》被评为中国农业核心期刊,并编入《中国农业核心期刊概览》中。核心期刊主要是指在某一学科领域发文质量高,载文量大,被摘率、被引率和借阅率都较高,被公认为能够反映该学科最新成果和前沿动态的期刊。核心期刊不仅具有科学性、集中性和代表性等特点,而且需要从多方面来综合测定,使其具有相对的权威性。

本次共有 152 种期刊入选中国农业核心期刊。另据悉,我国目前共有农业类期刊 1500 种左右。

(周贤军)