

文章编号:1009-4822(2006)06-0549-03

蓝靛果忍冬芽体组织培养技术研究

梁琦兰,张启昌,杨振国,寇国光
(北华大学 林学院,吉林 吉林 132013)

摘要:采用随机区组和正交试验设计,对蓝靛果芽体组织培养技术进行了系统研究.结果表明:外植体以冬眠枝条经水培后萌发的嫩枝茎段为最好;最佳消毒方法为0.1% HgCl₂ 消毒6 min;最佳培养基为MS + 6-BA (1.0 mg/L) + IBA(0.2 mg/L).

关键词:蓝靛果忍冬;芽体;组织培养

中图分类号:S722.37 **文献标识码:**A

蓝靛果忍冬(*Lonicera edulis*)是忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属(*Lonicera*)落叶灌木,高1.3~1.5 m,单叶对生,椭圆形;花生于叶腋短梗上,黄白色;浆果蓝黑色,椭圆形或圆形^[1].具有观赏价值,可作观赏树种^[2].其果实具有清热解毒,降血压的功效^[3].民间作为药用,可治疗小儿厌食.果实酸甜可口,营养丰富,含有大量的维生素C、氨基酸和多种微量元素,具有很高的营养价值,被誉为“果中之王”,是优良的酿酒、饮料的原料.果实中的红色素是食用天然色素^[4],具有很大的经济价值.目前对其快速繁殖研究较少.对蓝靛果忍冬芽体组织培养技术进行系统的研究,可为其快速繁殖提供一条有效途径.

1 材料与方 法

1.1 材 料

2004年3月从长白山地区采集蓝靛果冬眠枝条,插在水中,以其萌发的芽为实验材料;将采集的种子进行层积处理.

1.2 方 法

1) 无菌材料的获得.取下经水培萌发的芽,浸入清水中浸泡,放入少量洗衣粉(按每100 mL水加1~2角勺的量配制),浸泡搅拌2~3 min,然后用清水冲洗数次,在超静工作台上,用0.1%的HgCl₂溶液消毒6 min,然后用无菌水冲洗8~10次.

2) 培养条件.培养室温度(23±1)℃,光照时间为12~14 h/d,光照强度2 000 lx左右.

3) 试验设计.采用正交试验设计安排试验,利用多元统计方法进行数据处理,对蓝靛果最优外植体、最佳消毒方法、最佳初代培养基进行筛选,得出最优技术参数组合,建立蓝靛果最优再生系统.

2 结果与分析

2.1 不同外植体的筛选

外植体分别为水培后的带芽茎段、茎尖、叶片(5 mm×5 mm)、种子(层积处理),采用完全随机区组试验,每小区20瓶,重复3次.培养基为MS培养基,附加6-BA 1:0 mg/L,IBA 0.2 mg/L.由表1可以看出,茎尖、茎段的分化率都为100%,而叶片和种子的分化率都为0,茎尖和茎段为好;茎段比茎尖的增殖倍数要高,所以,茎段为最佳外植体.

收稿日期:2005-12-22

基金项目:吉林省林业厅科技发展项目(200102)

作者简介:梁琦兰(1979-),女,硕士,主要从事森林培育研究;

张启昌(1964-),男,教授,博士,主要从事森林培育及恢复生态研究.

表1 不同外植体分化率统计

Tab.1 The statistics of derive rate of different explants

外植体	接种瓶数量	污染率/%	分化率/%	增殖倍数	生长情况
叶片	60	6.67	0	0	褐变死亡
茎尖	60	6.67	100	4.43	产生丛生芽
种子	60	21.67	0	0	没萌发,无变化
茎段	60	11.67	100	6.23	产生丛生芽

2.2 不同消毒方法、消毒时间效果

植物各部分的表面携带着各种污染微生物,为了消灭这种污染源,在把植物组织接种到培养基上之前,必须进行彻底的表面消毒.表面消毒剂对于植物组织也是有毒的.因此,应当正确选择消毒剂的浓度和处理时间,以尽量减少组织的死亡率.分别采用75%酒精30 s后0.1% HgCl₂ 6 min,75%酒精30 s后0.1% HgCl₂ 10 min,0.1% HgCl₂ 6 min,0.1% HgCl₂ 10 min,75%酒精30 s后2% NaClO 10 min,2% NaClO 10 min,75%酒精30 s后10% H₂O₂ 10 min,10% H₂O₂ 10 min等8种消毒方法进行消毒试验,结果表明:0.1% HgCl₂ 消毒6 min效果最好;0.1% HgCl₂ 有较好的灭菌作用,NaClO分解出有杀菌作用的氯气,这些消毒剂虽具有在外植体表面容易除去,对植物无害^[5]等特点,但消毒效果不如HgCl₂,获得的无菌苗数量也以HgCl₂最多.但是,死亡率随消毒时间的延长而上升,其原因是在灭菌时HgCl₂游离出汞离子,外植体受到汞离子的毒害而死亡.因此,最佳消毒方法是0.1% HgCl₂ 消毒6 min.由于酒精有很强的穿透力,可以杀死外植体细胞、组织,会把材料损坏,导致死亡,所以不用酒精消毒.

2.3 基本培养基的筛选

在离体培养条件下,不同种植物的组织对营养有不同的要求,甚至同1种植物不同部分的组织对营养的要求也不相同,只有满足了它们各自的特殊要求,培养才能成功.因此,没有任何1种培养基能够适合多种植物组织.在建立蓝靛果组织培养体系时,首先要找到1种能满足蓝靛果要求的培养基.

2.3.1 最佳培养基的筛选

将蓝靛果茎段分别接种到5种培养基,即MS, N₆, B₅, H和White培养基上,附加6-BA 1.0 mg/L, IBA 0.2 mg/L,以筛选最适培养基.结果见表2.

表2 不同培养基对蓝靛果生长情况的影响

Tab.2 The influence of *L. edulis* growth on different medium

培养基	接种瓶数量	污染率/%	分化率/%	增殖倍数	产愈瓶数量
MS	80	15	98.51	4.21	21
N ₆	80	16.25	71.64	2.67	14
B ₅	80	8.75	68.49	2.05	20
H	80	17.5	63.64	2.12	15
White	80	13.75	62.32	1.57	1

从表2可以看出,MS培养基对蓝靛果的组织培养有良好的效果,而其他培养基的分化率和增殖倍数都不如MS培养基.蓝靛果生长需要较高浓度的无机物质以及多种有机物质,MS是含盐量较大的培养基,具高浓度的硝酸盐、K⁺和NH₄⁺,微量元素种类较全,无机营养的数量和比例比较合适,足以满足植物细胞营养和生理需要,有利于组织生长.

2.3.2 基本培养基最佳激素组合筛选

基本培养基提供了植物生长发育所需的营养元素,适宜的激素种类和最佳的浓度是决定组织培养成败的关键.筛选激素组合采用正交试验,具体组合及试验结果如表3(其中6-BA, IBA为mg/L):由表3进行方差分析^[6],结果见表4. F值检验表明:6-BA, IBA都达到极显著水平,说明各因素水平间存在着极显著差异,因素的不同水平对芽分化率有显著影响.为找出最佳组合方案,需进一步进行多重比较,见表5,表6.细胞分裂素的作用就是打破顶端优势,促进腋芽不断分化和生长,形成丛芽.细胞分裂素(6-BA)试验结果表明:3个水平中,A₁与A₂, A₃之间有极显著差异,根据平均值大小选取1.0 mg/L;生长素的作用是促进腋芽的生长,本试验安排了IBA(B因素)3水平试验,结果表明:B₂与B₁, B₃之间有极显著差异,根据平均值大小选取0.2 mg/L.因此,确定本试验最佳组合为2处理,各因子值为:6-BA 1.0 mg/L, IBA 0.2 mg/L.该处理的芽分化率为100%,为最佳培养方案.

表3 不同激素对蓝靛果生长的影响
Tab.3 The influence of *L. edulis*' growth on different hormones

处理	A 6-BA	B IBA	芽分化率/%			$\sin^{-1}\sqrt{P}$			合计
			1	2	3	1	2	3	
1	1.0	0.1	62.50	71.40	60.00	52.24	57.67	50.77	160.68
2	1.0	0.2	100.00	100.00	100.00	90.00	90.00	90.00	270.00
3	1.0	0.3	33.33	50.00	50.00	35.26	45.00	45.00	125.26
4	2.0	0.1	50.00	66.67	85.71	45.00	54.74	67.79	167.53
5	2.0	0.2	54.55	66.67	60.00	47.61	54.74	50.77	153.12
6	2.0	0.3	62.50	50.00	50.00	52.24	45.00	45.00	142.24
7	3.0	0.1	58.33	50.00	50.00	49.80	45.00	45.00	139.80
8	3.0	0.2	33.33	40.00	50.00	35.26	39.23	45.00	119.49
9	3.0	0.3	22.22	25.00	25.00	28.12	30.00	30.00	88.12

表4 方差分析
Tab.4 The square analysis

变异来源	df	SS	s^2	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
因素A	2	2 524.136 8	1 212.568 4	45.72**	3.55	6.01
因素B	2	1 968.960 5	984.480 2	37.12**	3.55	6.01
A×B	4	2 385.273 8	596.318 5	22.49**	2.93	4.58
误差	18	477.344 7	26.519 1			
总变量	26	7 256.715 7				

表5 6-BA3个水平新复极差测验
Tab.5 The different class tests of 6-BA3 three levels

水平	平均值	0.05水平	0.01水平
A ₁	61.77	a	A
A ₂	51.43	b	B
A ₃	38.60	c	C

表6 IBA3个水平新复极差测验
Tab.6 The new different class tests of IBA3 three levels

水平	平均值	0.05水平	0.01水平
B ₂	60.29	a	A
B ₁	52.00	b	B
B ₃	39.51	c	C

3 结 论

蓝靛果忍冬组织培养快速繁殖的外植体以冬眠枝条经水培后萌发的嫩枝茎段为最好;消毒时,用0.1% HgCl₂消毒6 min效果最好;在MS, N₆, B₅, H和White 5种不同培养基中,以MS最好;细胞分裂素(6-BA)和生长素(IBA)对芽分化率都有极显著的影响,芽分化培养基为:MS+6-BA(1.0)+IBA(0.2)。

参考文献:

- [1]王秀锁,孙秀殿,白艳春.蓝靛果的利用及栽培[J].特种经济动植物,2002,(6):34.
- [2]周以良.黑龙江植物志[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,1998.76.
- [3]朗杰.蓝靛果降压作用的实验研究[J].中医药信息,1996,13(1):45.
- [4]马自超.蓝靛果红素的分离与鉴定[J].南京林业大学学报,1987,(4):67.
- [5]王树芝,田砚亭,罗晓芳.刺槐宽叶和四倍体无性系的组织培养[J].植物生理通讯,1999,35(3):204~205.
- [6]李春喜,王志和,王文林.生物统计学[M].北京:科学出版社,2000.

On Tissue Culture of *Lonicera Edulis*

LIANG Qi-lan, ZHANG Qi-chang, YANG Zhen-guo, KOU Guo-guang

(Forestry College of Beihua University, Jilin 132013, China)

Abstract: Using the experiment design of random and orthogonal tests, technique of tissue culture of *Lonicera edulis*' shoot were studied. The results are shown: The best explant is the delicate shoot after Winter; The best disinfect method is 0.1% HgCl₂, disinfect time is 6 minutes; The best culture medium is MS + 6-BA (1.0 mg/L) + IBA(0.2 mg/L).

Key words: *Lonicera edulis*; Shoot; Tissue culture

【责任编辑:郭伟】