

文章编号:1002-2724(2007)01-0009-03

诱导红金银花愈伤组织的影响因素研究

赵贤慧,刘庆华,王奎玲,张德锋

(莱阳农学院,青岛 266109)

摘要:以红金银花顶芽和叶片为实验材料,采用 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 混合水平的正交试验设计,对红金银花诱导愈伤组织进行了研究,结果表明红金银花外植体类型、培养基类型、6-BA 浓度、NAA 浓度以及蔗糖浓度和培养温度对愈伤组织的产生均有影响;顶芽诱导率高于叶片诱导率,MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L 为最佳培养基;最适蔗糖浓度为 30.0g/L,最适温度为 23℃~25℃。

关键词:红金银花;组织培养;愈伤组织;正交试验

中图分类号:S722.3*7

文献标识码:A

Studies on Effects of Inducing Callus of *Lonicera japonica* var. *chinensis*

Zhao Xianhui et al.

(School of Landscape Architecture and Art, LAC)

Abstract: Terminal buds and leaves of *Lonicera japonica* var. *chinensis* were studied for inducing callus, through the orthogonal design $L_{16}(4^4 \times 2^3)$. The five facts, the explant of *Lonicera japonica* var. *chinensis*, medium, temperature, concentration of 6-BA, NAA and sucrose were studied. The results showed that all of the five factors had significant effects on callus induction. The inducing rate of terminal bud was higher than the inducing rate of leaves. The best medium for callus induction was MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L. The best concentration of sucrose was 30.0g/L and the best temperature was 23-25℃.

Key words: *Lonicera japonica* var. *chinensis*; tissue culture; callus; orthogonal design

金银花为忍冬科忍冬属半常绿藤本花卉,干皮灰黄褐色,小枝中空而细长,多分枝,密生短柔毛。单叶对生卵形至椭圆形,基部圆形至心形,先端略尖,全缘。一朵花先开,初为白色,后变黄色,随后另一朵花开又现白色。红金银花为金银花的野生变种。其叶、茎、枝均为紫色,花期长,花蕾在开放前由紫红变大红,花开时先为粉红,花开后变成红、黄、白相间,香味浓郁。与其他忍冬属植物最大不同的是冬天不落,四季常青,可用于园林绿化,也可作盆景材料,观赏价值很高。

1 材料与方 法

试验所用材料为当年生红金银花的顶芽及叶片,采自青

岛市平度地区,时间为春季或秋季。

1.1 试验方法

1.1.1 外植体预处理

将取回的红金银花枝条置于水槽中,用软毛刷刷洗面,自来水冲洗,洗净表面尘土,剪取顶芽部位,保留嫩叶。放入清洗液或洗衣粉溶液中浸泡 15~20min,自来水冲洗一小时。再用 75% 的酒精浸泡 30s,0.2% 的升汞溶液消毒 3~5min,最后用无菌水冲洗 5~8 次。备用。

1.1.2 接种处理

顶芽部位保留 1.0cm 左右,叶片切成 0.5cm×0.5cm 大小,操作均在超净工作台上进行。

1.1.3 培养基、激素、外植体对愈伤组织的影响

收稿日期:2006-11-29

中双层纸袋的最高,单层纸袋的次之,套塑膜袋的较对照不明显。但套纸袋降低了单果重,而套塑膜则提高了单果重。

3.2 套袋对果实内在品质有不利的影响。其中套纸袋对内在品质的影响尤为明显。主要原因:一是套纸袋果叶绿素含量低,果实基本不具备光合作用;二是全果树都套纸袋,影响树冠透光度,导致树体叶片光合作用下降,果实内含物降低;三是套袋果处在弱光、高温的“小温室”效应下,而不套袋果处在光、风、雨、温度变化大的条件下,由于果实的自我保护机制,内容物比套袋果增多。

3.3 套袋增加了果实黑点病、痘斑病,日烧率的发生。在湿度大,透气差,温度高的条件下,易加重黑点病的发生,所以可以通过合理修剪,通风透光,防止树盘积水,控制 N 肥的使用,雨后及时排除袋内积水等措施来预防黑点病的发生。痘斑病主要是由于缺 Ca 而引起的病害,可以通过土壤施 Ca,叶面喷 Ca 等方面来减轻病害的发生。而通过树体喷水(降低温度),局部遮荫(降低光强)或合理的摘袋时间等措施可以使日烧的发生减少到最低程度。

表1 诱导红金银花愈伤组织的试验设计

处理号	6-BA(mg/L)	NAA(mg/L)	培养基	外植体
1	0.25	0	MS	叶片
2	0.25	0.2	MS	顶芽
3	0.25	0.4	B5	叶片
4	0.25	0.6	B5	顶芽
5	0.5	0	B5	顶芽
6	0.5	0.2	B5	叶片
7	0.5	0.4	MS	顶芽
8	0.5	0.6	MS	叶片
9	0.75	0	MS	顶芽
10	0.75	0.2	MS	叶片
11	0.75	0.4	B5	顶芽
12	0.75	0.6	B5	叶片
13	1.0	0	B5	叶片
14	1.0	0.2	B5	顶芽
15	1.0	0.4	MS	叶片
16	1.0	0.6	MS	顶芽

试验以6-BA、NAA、培养基类型、外植体类型为4因素,采用 $L_6(4^4 \times 2^3)$ 混合水平正交试验设计^[1],另外,蔗糖30.0g/L,琼脂6.0~7.0g/L,pH5.8~6.2。每处理10瓶,重复3次。

1.1.4 蔗糖、温度对愈伤组织的影响

以蔗糖为单因素,将红金银花顶芽接种于,以MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L为培养基,添加15.0g/L、20.0g/L、25.0g/L、30.0g/L、35.0g/L不同浓度的蔗糖,观察愈伤组织生长状况。琼脂7.0g/L,pH5.8~6.2,温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。每处理10瓶,重复3次。

以温度为单因素,以MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L为培养基,把已经接种的培养瓶放置于 21°C 、 23°C 、 25°C 、 27°C 、 29°C 不同温度下,观察愈伤组织生长情况。蔗糖30.0g/L,琼脂7.0g/L,pH5.8~6.2。每处理10瓶,重复3次。

培养期间光照强度保持1500~2000lx;光照时间为12~14h/d;除温度试验外,温度控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒

红金银花的植物体被有疏柔毛和疏腺毛,并且枝条中空,消毒较困难。对红金银花外植体的处理难以掌握,时间太短,消毒不彻底,易污染;时间太长,会对组织产生毒害。本研究结果表明,顶芽较易消毒且活性强,采用75%酒精30s与0.2%升汞5min的消毒组合,可达到理想的效果;叶片组织柔软易损伤,培养过程中产生褐化和枯死现象,采用75%酒精配合0.2%升汞3min消毒,则较为理想。

2.2 培养基、激素、外植体的影响

启动培养接种1个月后的观察结果见表2。

以顶芽和叶片为外植体,从表2中可以看出愈伤组织形成有较明显的差别,顶芽形成愈伤组织的时间和生长速度明显快于叶片。

表2 诱导红金银花愈伤组织的试验结果

处理号	接种数	污染数	污染率 (%)	死亡数	死亡率 (%)	诱导数	诱导率 (%)
1	30	4	13.33	1	3.33	10	38.46
2	30	3	10	0	0	25	92.59
3	30	2	6.67	0	0	15	53.57
4	30	2	6.67	0	0	23	82.14
5	30	0	0	1	3.33	26	86.67
6	30	4	13.33	2	6.67	20	76.92
7	30	2	6.67	0	0	28	100.0
8	30	6	20	2	6.67	18	75.0
9	30	4	13.33	0	0	24	92.31
10	30	5	16.67	1	3.33	20	80.0
11	30	2	6.67	0	0	24	85.71
12	30	3	10	3	10	17	62.96
13	30	4	13.33	0	0	14	53.85
14	30	3	10	1	3.33	23	85.19
15	30	3	10	2	6.67	20	74.07
16	30	3	10	0	0	23	85.19

顶芽在接种后第3天,即可发现茎端基部切口处有膨大的现象,6天后所有顶芽基部切口均产生膨大现象,并开始出现愈伤组织。而叶片切口处有膨大现象最早是第4天,8天后所有叶片切口处均有膨大的现象,10天后有颗粒状的愈伤组织出现。

从对顶芽和叶片愈伤组织产生的情况分析,发现顶芽比叶片出现愈伤组织的时间早3~4天,并且顶芽产生的愈伤组织其生长势明显优于叶片。从顶芽基部出现愈伤组织到形成直径1.0cm左右的组织块一般需要1周左右,愈伤组织呈淡绿色,结构紧密、质地青翠,半透明状。

从叶片切口出现愈伤组织到形成直径1.0cm左右的组织块,一般要耗时10天左右。叶片愈伤组织以深绿色和淡黄色为主,深绿色的愈伤组织结构紧密,质地较硬,呈不透明状;淡黄色的愈伤组织结构松散,质地松软,呈透明状。

从表3可以看出,红金银花的外植体类型对愈伤组织诱导率的影响明显。叶片的污染率和死亡率均高于顶芽,这可能是由于叶片与空气接触的时间较长,且组织分化程度较高,被空气中的微生物浸染机率明显大于顶芽的缘故。同时,由于叶片组织柔软,用消毒剂消毒时易破坏叶片组织,造成污染和死亡。

外植体类型对愈伤组织诱导率的影响(诱导率差值)远高于培养基类型对愈伤组织诱导率的影响。MS培养基对愈伤组织的诱导较B5明显。

培养基类型对愈伤组织诱导率的影响小于不同浓度6-BA对愈伤组织成活率的影响,不同浓度6-BA对愈伤组织诱导率的影响小于外植体类型对愈伤组织诱导率的影响。当NAA的浓度为0.2mg/L时,愈伤组织的诱导率最高为85.19%。

培养基类型对愈伤组织诱导率的影响小于不同浓度NAA对愈伤组织诱导率的影响,不同浓度NAA对愈伤组织诱导率的影响小于外植体类型对愈伤组织诱导率的影响。当6-BA的浓度为0.5mg/L时,愈伤组织的诱导率最高为83.81%。

表3 不同因素对红金银花愈伤组织形成的影响

不同因素	不同水平	污染数 (个)	死亡数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)	接种总数 (个)
6-BA	0.25	11	1	73	66.97	120
	0.5	12	5	92	85.19	120
	0.75	14	4	85	80.19	120
	1.0	13	3	80	74.77	120
	最小值	11	1	92	66.97	120
	最大值	14	5	73	85.19	120
	差	3	4	19	18.22	0
	NAA	0	12	2	74	68.52
NAA	0.2	15	4	88	83.81	120
	0.4	9	2	87	78.38	120
	0.6	14	5	81	76.42	120
	最小值	9	2	74	68.52	120
	最大值	15	5	88	83.81	120
差	6	3	14	15.29	0	
培养基	MS	30	6	168	80	240
	B ₅	20	7	162	73.64	240
	差	10	-1	6	6.36	0
外植体	叶片	31	11	134	64.11	240
	顶芽	19	2	196	88.69	240
	差	12	9	-62	-24.58	0

2.3 蔗糖浓度、培养温度的影响

试验2周后的观察结果,发现蔗糖浓度和培养温度对愈伤组织的影响效果相似。随着蔗糖浓度或温度的增加,愈伤组织的形成时间呈现缩减的趋势,而生长速度则出现增加的趋势。但是,随着温度的增高,外植体出现较严重的玻璃化和褐化现象。

结构致密和结构松散的愈伤组织生长势都很弱,增殖状况不如结构紧密的愈伤组织。由表4可知,蔗糖浓度为25g/L、30g/L或温度为23℃、25℃时,诱导的愈伤组织结构紧密,而蔗糖浓度为25g/L的诱导时间和生长速度均比浓度为30g/L差,温度为23℃、25℃的试验结果相似。因此,适宜的蔗糖浓度为30.0g/L,适宜的温度为23℃~25℃。

表4 蔗糖浓度和培养温度对愈伤组织的影响

因素	水平	诱导天数(d)	生长速度	玻璃化褐化	愈伤组织特征
蔗糖(g/L)	15	10	很慢		绿色结构致密
	20	7	慢		绿色结构致密
	25	5	慢		淡绿色结构紧密
	30	4	一般		淡绿色结构紧密
	35	2	很快		淡黄色结构松散
温度(℃)	21	7	慢	较轻	绿色结构致密
	23	5	一般	一般	淡绿色结构紧密
	25	4	一般	一般	淡绿色结构紧密
	27	2	快	严重	淡黄色结构松散
	29	2	很快	严重	白色结构松散

3 讨论

3.1 不同外植体类型对红金银花的愈伤组织启动影响明显,以顶芽启动愈伤组织成活率最高,为最佳外植体。这与宗树斌的研究结果一致^[2]。

3.2 不同因素对愈伤组织诱导率的影响不同,通过分析总结出不同因素对愈伤组织的影响大小表现为:外植体>NAA>6-BA>培养基,平均诱导率最高的培养基组合为MS+6-BA0.5mg/L+NAA0.2mg/L。

3.3 愈伤组织的启动与蔗糖浓度和温度有明显影响。蔗糖浓度以30.0g/L为佳,浓度太低,则启动缓慢;浓度太高,虽较易产生愈伤组织,但质量较差,与仇键的研究结果一致^[3]。温度以23℃~25℃为适,温度太低则生长缓慢;温度太高则易产生玻璃化和褐化,导致外植体死亡。

参考文献:

- [1] 辛淑亮,蔡秋芳.现代农业试验统计[J].中国计量出版社,1999,507
- [2] 宗树斌,周春玲,牛立军.美国红枫的组织培养研究[J].山东林业科技,2006,1:1~3
- [3] 仇键,谭晓风.蒙花1、2号金银花的组织培养与快速繁殖[J].中南林学院学报,2005,25(4):53~56
- [4] 邱学颖,等.大兴安岭森林地表可燃物生物量与林分因子关系研究[J].森林防火1994,(2):16~18.
- [5] 刘晓东,等.大兴安岭地区兴安落叶松可燃物生物量模型研究[J].森林防火1995,(3):8~9.
- [6] 赵宪文.西南林区火灾预报方法研究[J].森林火灾遥感监测评价.北京:中国林业出版社1995:76~86.
- [7] 袁春明.我国南方几种松杉可燃物类型火行为特点浅析[J].森林防火,1996,16(4):16~18.
- [8] 朱仁海,杨琪瑜,沈文瑛等.统计分析方法[M].北京:中国林业出版社,1990.
- [9] 胥辉,张会儒.林木生物量模型研究[M].昆明:云南科技出版社,2002

(接第3页)

载量。另外,在模型因子引入上是否应该考虑引入别的因子,如:土壤状况,气象等因子的影响,同时考虑对各因子之间的相互作用也应进行研究。

参考文献:

- [1] 文定元.森林防火基础知识[M].北京:中国林业出版社,1995
- [2] 袁春明.森林可燃物分类与模型研究的现状与展望[J].世界林业研究,2001,14(2):29~33.
- [3] 胡海清.利用林分特征因子预测森林地被可燃物载量的研究[J].林业科学2005,41(5):96~100.