

蓝靛果忍冬茎段离体培养与植株再生

张启昌^{1,2} 梁琦兰² 夏新莉¹ 尹伟伦¹

(1 北京林业大学林学院 2 北华大学林学院)

摘要:以蓝靛果忍冬的幼嫩茎段为外植体,采用正交设计及方差分析对影响蓝靛果忍冬植株离体培养与植株再生的因素进行了优化研究,培育出了蓝靛果忍冬的组培苗。结果表明:初代培养的适宜培养方案是 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,芽分化率达到 100%;继代增殖培养的适宜培养方案是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L + KT 1.5 mg/L,增殖系数达到 8.7;生根培养的适宜培养方案是 1/4MS + IBA 1.5 mg/L,生根率达到 96.7%。生根试管苗在驯化、移栽后成活率可达 97.8%。6-BA、IBA 和 KT 配合使用,可以增加蓝靛果忍冬继代培养的丛生芽数量。该试验培育的组培苗的各项指标已达到快速繁育苗木的要求,其技术措施可直接应用于规模化生产。

关键词: 蓝靛果忍冬; 幼茎; 离体培养; 激素组合; 植株再生

中图分类号: S722.3^{*7} 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)04-0126-05

ZHANG Qi-chang^{1,2}; LIANG Qi-lan²; XIA Xin-li¹; YIN Wei-lun¹. ***In vitro* culture and plant regeneration from sprouting buds of *Lonicera edulis* Turcz.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) **32**(4) 126-130 [Ch, 11 ref.]

1 College of Forestry, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 College of Forestry, Beihua University, Jilin City, Jilin Province, 132013, P. R. China.

The factors affecting *in vitro* culture and plant regeneration of *Lonicera edulis* were optimized by orthogonal design and analysis of variance using sprouting buds as explants. Tissue cultured seedlings were obtained on culture media with different concentrations of hormones. The results show that the optimum compositions for primary culture, subculture and rooting culture are MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L, MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L + KT 1.5 mg/L and 1/4MS + IBA 1.5 mg/L. The differentiation rate, proliferation coefficient and rooting rate on these media were up to 100%, 8.7 and 96.7%, respectively. The survival rate of the rooted plantlets could reach 97.8% after acclimatization and transplantation. The combination of 6-BA, IBA and KT is effective in shoot proliferation of *L. edulis* in the subculture. This micropropagation technology could be applied in mass propagation.

Key words *Lonicera edulis*; sprouting buds; micropropagation; hormone combination; plant regeneration

蓝靛果忍冬 (*Lonicera edulis* Turcz.) 又名蓝靛果 (东北)、羊奶子 (大兴安岭)、黑瞎子果 (黑龙江)、山茄子 (勃利县), 为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属蓝靛果亚组的落叶灌木, 是继越橘 (*Vaccinium uliginosum*)、黑穗醋栗 (*Ribes nigrum*)、树莓 (*Rubus* spp.) 等之后的又一新兴小浆果树种^[1]。蓝靛果忍冬具有清热解毒、稳定血压、改善肝脏的解毒功能和

抗肿瘤、抗疲劳、促进身体良好发育等功效。果实可鲜食, 可加工成饮料、果酱、果糕和果酒, 适于提取天然紫红色素^[2]。俄罗斯特别重视蓝靛果忍冬的研究, 20 世纪 50 年代就开始了品种选育的工作, 到 20 世纪 90 年代已经有 60 个品种应用到农户, 并进行商业化的栽培生产^[3]。日本自 20 世纪 80 年代开展蓝靛果新品种选育的工作, 已经有 ‘Yufutsu’ 等品种

收稿日期: 2009-09-10

基金项目: “948” 国家林业局引进项目 (2008-4-15)。

第一作者: 张启昌, 博士生, 教授。主要研究方向: 森林培育。电话: 15643218699 Email: zqc1212@sina.com 地址: 132013 吉林省吉林市华山路 3999 号北华大学林学院。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

推广应用^[4]。我国从20世纪80年代开展了野生蓝靛果的驯化栽培试验及开发利用工作^[5],但新品种选育及量化的培育试验工作才刚刚开始。对于蓝靛果亚组的组织培养研究仅有少量报道^[6-7],缺乏系统的特别是适合于生产应用的组织培养和离体快繁试验体系。本研究通过对蓝靛果忍冬不定芽的诱导及壮苗生根培养基的筛选,得出其适宜的初代、继代、壮苗和生根培养方案,为生产提供一套适应蓝靛果生产的快繁技术,并为今后进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 外植体的选择及灭菌

2005年3月从长白山地区采集蓝靛果冬眠枝条,带回实验室水培,取其萌发的芽为实验材料。水培萌芽首先用清水浸泡,并放入少量洗衣粉(按每100 mL水加1~2角勺的量配制),浸泡搅拌2~3 min,然后放入流水冲洗1~2 h,最后在超净工作台上,用0.1%的HgCl₂溶液消毒6 min,再用无菌水冲洗8次。

1.2 基本培养基的筛选

将消毒过的外植体,分别接种到MS、N₆、B₅、H和White培养基上,附加6-BA 1.0 mg/L、IBA 0.2 mg/L,观察生长状况,以筛选适合蓝靛果生长的基本培养基。

1.3 初代培养

在选定的基本培养基中分别添加不同浓度的6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)和IBA(0.1、0.2、0.3 mg/L),采用2因素3水平正交设计,每处理3次重复,每次重复接种30瓶,30 d后统计各处理芽的分化率(芽分化率 = 分化瓶数 / (接种瓶数 - 污染瓶数))。40 d后观察生长状况,接种芽数为80株。

1.4 继代增殖培养

在初代培养基基础上调节6-BA和IBA浓度,并增加KT,按照L₉(3⁴)前3列安排试验,每处理设3次重复,每次重复接种30瓶,观察嫩芽伸长生长及产生丛生芽数,筛选出最佳激素组合,计算增殖系数(增殖系数 = 产芽总和 / 产芽外植体数)。

1.5 生根培养

壮苗培养所得微枝用于生根,生根培养基采用MS、1/2MS、1/4MS,附加不同浓度的NAA或IBA。生根培养40 d芽苗根数趋于稳定后,统计各处理生根率(生根率 = 生根微枝数 / 培养微枝数)。

1.6 炼苗及移栽

将三角瓶除去瓶盖锻炼2~3 d。从瓶内取出经过锻炼的生根苗,洗净根部的培养基,栽入经过消毒的基质中。

1.7 组织培养条件

以上培养基中添加10 g/L琼脂、30 g/L蔗糖,高压蒸汽灭菌前pH值调至5.8。培养室内温度均为(25 ± 1)℃,光照13 h/d,光强2 000 lx。

1.8 统计分析

观测数据为百分数时,需经反正弦转换。数据分析与处理采用SAS8.2软件,用Duncan方法进行差异显著性检验。结果以平均数 ± 标准误差表示^[8]。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对外植体诱导分化的影响

从表1可以看出,MS培养基对蓝靛果的诱导分化效果最好,N₆和B₅培养基次之,H和White培养基最差。观察中发现:以MS培养基对蓝靛果嫩茎的分化效果明显,分化率达到98.5%,外植体在培养基上生长良好,并有丛生芽出现;N₆和B₅培养基对蓝靛果嫩茎的分化率为71.6%和68.5%,外植体生长一般,少数丛生;而在H和White培养基上外植体整体变白,分化率仅为63.6%和62.3%,叶片脆弱易落,濒临死亡,产生丛生芽的外植体很少。

表1 基本培养基对蓝靛果忍冬诱导分化的影响
Tab.1 Effects of basal media on shoot differentiation of *L. edulis*

培养基	染菌数	分化数	分化率/%
MS	12	67	98.5
N ₆	13	48	71.6
B ₅	7	50	68.5
H	14	42	63.6
White	11	43	62.3

2.2 激素对比对初代培养外植体诱导分化的影响

蓝靛果外植体接种于腋芽诱导培养基上,5~7 d后腋芽开始萌发,出现绿色的小突起并逐渐伸长,10 d后芽长到1.4~1.6 cm,30 d后芽的平均高达到3.9 cm,呈淡绿色(图1A)。各处理外植体分化率差异较大(见表2)。从表2可以看出,蓝靛果外植体在6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L方案中分化率最高,达100%,与其他处理间差异极显著($P < 0.01$)。

方差分析结果表明,激素6-BA、IBA及二者的交互作用均对蓝靛果芽分化率有极显著的影响($P < 0.01$)。F值从大到小依次是6-BA(45.72)、IBA(37.12)、二者的交互作用(22.49),说明6-BA对芽分化的作用最大,其次是IBA、二者的交互作用。为找出最佳培养方案,采用新复极差法(Duncan)进行多重比较。结果表明,6-BA的3个

水平中,1.0、2.0、3.0 mg/L 间差异极显著 ($P < 0.01$),分化率的平均值依次是 69.7%、60.7% 和 39.3%;根据平均值大小,选取 1.0 mg/L 水平。IBA 的 3 个水平中,0.1、0.2、0.3 mg/L 间差异极显著,分化率的平均值依次是 61.6%、67.2% 和 40.9%;

根据平均值大小,选取 0.2 mg/L 水平。因此,确定最优丛生芽诱导激素组合为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,为正交试验的 L2 方案。该处理的芽平均分化率达到 100%,且腋芽生长健壮,为最佳丛生芽诱导方案。



图1 蓝靛果忍冬组织培养和植株再生过程

Fig.1 Tissue culture and plant regeneration of *L. edulis*

表2 激素对比对蓝靛果忍冬初代培养外植体诱导分化影响

Tab.2 Effects of hormone combinations on shoot differentiation of *L. edulis* in primary culture

处理	激素配比/(mg·L ⁻¹)		分化率/%
	6-BA	IBA	
L1	1(1.0)	1(0.1)	64.6 ± 3.46 bBC
L2	1(1.0)	2(0.2)	100.0 ± 0.00 aA
L3	1(1.0)	3(0.3)	44.4 ± 5.56 cdCDE
L4	2(2.0)	1(0.1)	67.5 ± 10.32 bB
L5	2(2.0)	2(0.2)	60.4 ± 3.50 bcBCD
L6	2(2.0)	3(0.3)	54.2 ± 4.17 bcdBCD
L7	3(3.0)	1(0.1)	52.8 ± 2.78 bcdBCD
L8	3(3.0)	2(0.2)	41.1 ± 4.84 dDE
L9	3(3.0)	3(0.3)	24.1 ± 0.93 eE

注:数字后的不同字母表示差异显著,小写字母表示 $P < 0.05$,大写字母表示 $P < 0.01$,表3 同此。

2.3 激素对比对继代培养芽增殖的影响

将茎段上诱导出的腋芽切分后转入培养基中进行继代增殖培养,10 d 左右又形成新的腋芽,以后 30~40 d 继代一次,增殖系数可达 1.3~8.7(图 1B)。从表 3 可以看出,不同激素配比下芽增殖系数有较大的差异。6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L + KT 1.5 mg/L 方案的芽增殖系数最大,且与其他培养基的差异达到极显著的水平 ($P < 0.01$)。

方差分析结果表明,6-BA、KT、三者(6-BA、IBA、KT)的交互作用对继代增殖培养的影响达极显著 ($P < 0.01$),IBA 的影响达到显著水平 ($P = 0.0365 < 0.05$)。6-BA、KT、三者(6-BA、IBA、KT)的交互作用和 IBA 的 F 值从大到小依次为 89.15、28.00、9.77 和 4.00。说明 6-BA 对继代增殖产生丛生芽的影响最大,KT 次之,然后是三者的交互作用和 IBA。进一步进行新复极差测验表明 6-BA 的

3 个水平中,0.5 mg/L 的增殖系数平均值最大(6.0),且与其他 2 个水平的差异极显著 ($P < 0.01$);IBA 的 3 个水平中,0.3 mg/L 的增殖系数平均值最大(4.0),与其他 2 个水平的差异显著 ($P < 0.05$);KT 的 3 个水平中,1.5 mg/L 的增殖系数平均值最大(4.9),与其他 2 个水平的差异极显著 ($P < 0.01$)。因此得出继代增殖培养 3 种激素的最佳配比是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L + KT 1.5 mg/L,为正交试验的 M3 方案,增殖系数可达到 8.7。

表3 激素对比对蓝靛果忍冬不定芽继代增殖培养的影响

Tab.3 Effects of hormone combinations on shoot proliferation of *L. edulis* in subcultures

处理	激素/(mg·L ⁻¹)			芽增殖系数
	6-BA	IBA	KT	
M1	1(0.5)	1(0.1)	1(0.5)	5.0 ± 0.58 bB
M2	1(0.5)	2(0.2)	2(1.0)	4.3 ± 0.33 bcBC
M3	1(0.5)	3(0.3)	3(1.5)	8.7 ± 0.67 aA
M4	2(1.0)	1(0.1)	2(1.0)	2.3 ± 0.33 deFED
M5	2(1.0)	2(0.2)	3(1.5)	3.3 ± 0.33 cdBCD
M6	2(1.0)	3(0.3)	1(0.5)	1.3 ± 0.00 fE
M7	3(1.5)	1(0.1)	3(1.5)	2.7 ± 0.33 deCDE
M8	3(1.5)	2(0.2)	1(0.5)	1.7 ± 0.33 efED
M9	3(1.5)	3(0.3)	2(1.0)	2.0 ± 0.00 efED

2.4 生根培养方案的筛选

继代增殖培养获得的芽苗生长缓慢且弱小,无法诱导生根。将这些芽苗在不加任何激素的 MS 培养基上培养一段时间,多数芽苗生长到 1.5 cm 以上时,再将芽苗转入生根培养基中诱导生根。20 d 后小苗开始生根,30~40 d 小苗根数趋于稳定(图 1C),各处理生根率、平均根长度、平均根条数情况见表 4。

由表4可以看出,培养40 d后不同处理的生根率为11.7%~96.7%,平均根长度为0.6~1.5 cm,平均根数为1.3~5.0条。方差分析结果表明,各处理对生根率、生根数量和根长度的 F 值依次是24.37、17.71、78.03, P 值都小于0.000 1,表明各处

理对生根率、生根数量和根长度的影响都达到显著水平。在不同处理中1/4MS+IBA 1.5 mg/L+NAA 0.0 mg/L方案生根效果最好,生根率达到了96.7%,平均每个无菌苗可以生5条根,根的长度为1.5 cm。

表4 激素配比对蓝靛果忍冬微枝生根的影响

Tab.4 Effects of hormone combinations on rooting of *L. edulis* microcuttings

处理	实验方案	生根率/%	生根数量/条	根长度/cm
N1	1/4MS+IBA1.5 mg/L+NAA0.0 mg/L	96.7±1.67 a	5.0±0.00 a	1.5±0.00 a
N2	1/4MS+IBA1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L	60.0±10.41 b	5.0±0.00 a	1.4±0.03 a
N3	MS+IBA1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L	55.0±7.64 b	3.3±0.33 b	0.9±0.03 c
N4	1/2MS+IBA1.0 mg/L+NAA0.0 mg/L	36.7±4.41 c	3.0±0.58 cb	0.9±0.03 c
N5	MS+IBA1.5 mg/L+NAA0.5 mg/L	33.3±6.01 cd	3.0±0.00 cb	0.9±0.07 cd
N6	1/4MS+IBA0.5 mg/L+NAA1.0 mg/L	25.0±2.89 cde	2.3±0.33 cd	0.8±0.03 de
N7	1/2MS+IBA1.5 mg/L+NAA1.0 mg/L	16.7±4.41 de	3.3±0.33 b	1.2±0.03 b
N8	MS+IBA0.5 mg/L+NAA0.0 mg/L	15.0±2.89 e	1.3±0.33 e	0.6±0.03 f
N9	1/2MS+IBA0.5 mg/L+NAA0.5 mg/L	11.7±4.41 e	2.0±0.00 ed	0.7±0.00 fe

注:同列后字母不同表示差异显著($P<0.05$),表5同此。

2.5 炼苗及移栽

将生根试管苗分别栽入水苔藓、蛭石、河沙、森林土、珍珠岩以及草炭土6种基质中,40 d后观察成活率、最高苗高及平均苗高,结果见表5。从表5可以看出,河沙透水能力强,保水能力差,因为浇水比较勤,能保证水分供应和湿度要求,使移栽成活率达到97.8%,但是河沙中营养成分少,短期移栽的效果最好,不适合长期培养。用水苔藓、蛭石和森林土基质移栽后有些苗木出现烂根现象,苗木落叶死亡。由于蓝靛果喜酸性环境,移栽到草炭土中的苗木成活率也很高(94.4%),且苗的生长比较快,平均苗高可达到7.5 cm。因此,适合移栽试管苗的基质为河沙或草炭土。

表5 移栽基质对蓝靛果忍冬生根组织培养苗成活率及高生长的影响

Tab.5 Effects of transplant media on the survival rate and height increment of *L. edulis* plantlets

基质	成活率/%	最高苗高/cm	平均苗高/cm
水苔藓	71.1±7.2 c	8.9±0.4 a	6.4±0.6 b
蛭石	83.3±3.3 bc	5.1±0.6 b	3.0±0.1 d
河沙	97.8±1.0 a	8.8±0.4 a	5.2±0.1 c
森林土	51.1±3.0 d	4.5±0.5 b	3.4±0.2 d
珍珠岩	44.5±6.2 d	2.1±0.2 c	1.7±0.1 e
草炭土	94.4±1.3 ab	9.1±0.8 a	7.5±0.5 a

3 结论与讨论

由于用种子进行实生繁殖后代会发生变异,与其他绝大多数果树一样,蓝靛果忍冬也必须用无性繁殖方法培育苗木。目前生产上的主要繁殖方法是绿枝扦插,但由于受插穗来源的限制,繁殖系数较低。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

良新品种大量扩繁应用。但国内外关于蓝靛果离体培养与快速繁殖技术的报道还很少,仅有的研究比较初步,不能适应生产上的需要。赵越等^[6]通过愈伤组织诱导途径,对从俄罗斯引进的与该种同属蓝靛果亚组的勘察加蓝靛果(*Lonicera kamschatica*)进行了组织培养与植株再生的研究,芽增值率仅为2~3倍,生根率为85%,移栽成活率为90%,且时间相对较长,繁殖效率较低,不能完全适应生产上的需要。本课题组也曾对蓝靛果忍冬芽体组织培养技术进行了初步的研究,得出了最佳的消毒方案、筛选出了最佳基本培养基与最佳外植体^[7],但没有涉及继代增殖、生根、炼苗及移栽方案的研究内容,未形成系统的特别是适合于生产应用的组织培养和离体快繁试验体系。

本研究采用正交设计筛选出蓝靛果初代、继代、生根和炼苗的最佳培养方案,建立了蓝靛果离体培养系统,为其工厂化育苗与产业化栽培奠定了基础。在离体培养条件下,由于各种植物的遗传特性、生物学特性和生态学特性不一致,它们对营养的要求也不相同,因此选择适宜的培养基对植物组织培养至关重要。在嫩茎培养和芽诱导时主要用MS培养基,45种非木本植物嫩茎组织培养中36种采用MS及其修改的培养基,97种木本植物芽诱导有70种使用MS及其修改的培养基^[9]。在本试验过程中用MS、N₆、B₅、H和White 5种培养基进行了对比试验,发现MS是最佳的嫩茎培养和芽诱导培养基,分化率达到98.5%。

越来越多的试验已经证明Skoog等^[10]提出的“激素平衡”理论的正确性,细胞分裂素和生长素对芽的诱导和生长发育均起着重要作用。培养基中不

同激素的种类与浓度对比对蓝靛果的诱导和增殖影响极显著,是蓝靛果组培快繁技术的核心。适合蓝靛果最优丛生芽诱导的培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L,芽平均分化率达到 100%。实验表明,以 MS 为基本培养基,用 6-BA 和 IBA 两种激素很难实现快速繁殖。在蓝靛果继代培养时,6-BA、KT、三者(6-BA、KT、IBA)的交互作用对继代增殖培养的影响达极显著,IBA 的影响达到显著水平。说明将 6-BA、KT 与 IBA 搭配使用,可以增加蓝靛果继代培养的丛生芽数,同时有利于丛生芽嫩梢的伸长生长。继代增殖培养增殖效果最好的培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.3 mg/L + KT 1.5 mg/L,增殖系数可达到 8.7。基本培养基中大量元素含量降低能促进蓝靛果不定根的产生,以 1/4MS 为最佳。在蓝靛果生根培养过程中,IBA 具有较好的根诱导作用,产生的根多,适合移栽。适合蓝靛果生根的培养基为 1/4MS + IBA 1.5 mg/L + NAA 0.0 mg/L,生根率达到了 96.7%,平均每个苗可以生长 5 条根,根的长度达 1.5 cm。

培育壮苗、充分炼苗、方法得当、适时移栽是提高组培苗移栽成活率的重要保证^[11]。瓶内生根苗培养 40 d 左右,当苗高达 3~4 cm、叶色深绿、根粗壮时,将三角瓶除去瓶盖锻炼 2~3 d,洗净根部的培养基,栽入经过消毒的基质中。适合蓝靛果移栽试管苗的基质为河沙和草碳土,成活率分别达到 97.8% 和 94.4%。

参 考 文 献

- [1] 霍俊伟,杨国慧,唯薇,等. 蓝靛果忍冬 (*Lonicera caerulea*) 种质资源研究进展[J]. 园艺学报, 2005, 32(1): 159-164.
- [2] 向延菊,郑先哲,王大伟. 野生浆果资源——蓝靛果忍冬利用价值的研究现状及应用前景[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 669-671.
- [3] PLEKANNOVA M N. Blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)—a new commercial berry crop for temperate climate: Genetic resources and breeding [J]. *Acta Horticulturae*, 2000, 538: 159-163.
- [4] TANAKA S, KAKIZAKI M, WATANABE H, et al. New blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocalyx* Nakai) cultivar 'Yufutsu' [J]. *Bull Hokkaido Pref Agric Expt Sta*, 1994, 67: 1-9.
- [5] 许双庆. 蓝靛果忍冬栽培技术[J]. 北方园艺, 1989(7): 19.
- [6] 赵越,霍俊伟,王立娟. 蓝靛果的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 468.
- [7] 梁琦兰,张启昌,杨振国,等. 蓝靛果忍冬芽体组织培养技术研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2006, 7(6): 549-551.
- [8] 尚旭岗,徐锡增,方升佐. 青钱柳离体胚的培养及快速繁殖[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007, 31(1): 101-105.
- [9] 袁巧平. 生物技术与林木试管微型选育[J]. 世界林业研究, 1990(3): 51-55.
- [10] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro* in biological action of growth substances [J]. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118-131.
- [11] 景艳莉,周蕴薇,张金玉,等. 精粹百合的组织培养与快速繁殖技术[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(6): 46-47.

(责任编辑 赵 勃)