

## 长绿期金银木的组织培养研究

石进朝, 陈兰芬

(北京农业职业学院, 北京 102442)

**摘要:**以长绿期金银木为外植体,探讨了不同生长调节物质对外植体分化、增殖和生根的影响。得出如下结论:(1)长绿期金银木组织培养最适宜的外植体是新稍茎段,以0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒5 min为最好。(2)适宜的继代培养基为MS+BA0.3+NAA0.1+CM80 ml·L<sup>-1</sup>,生根培养基为:MS+IBA1.0。(3)暗培养生根时间以4 d为最好。

**关键词:**组织培养;外植体;长绿期金银木

**中图分类号:**S722.37

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2009)04-0097-04

### Tissue Culture of the *Lonicera maackii* 'Changlvqi'

SHI Jin-chao, CHEN Lan-fen

(Beijing Agricultural Vocation College, Beijing 102442, China)

**Abstract:** Using *Lonicera maackii* 'Changlvqi' as explants, influences of different plant growth hormones on differentiation, multiplication and rooting were examined. The results showed that: (1) The optimal explant material was tender stem with single bud, sterilized 5 min in 0.1% HgCl<sub>2</sub>. (2) The optimal subculture and rooting media were MS+BA0.3+NAA0.1+CM80 mL·L<sup>-1</sup> and MS+IBA1.0 respectively; (3) the optimum rooting times was 4 day darkness culture.

**Key words:** tissue culture; explant; *Lonicera maackii* 'Changlvqi'

金银木(*Lonicera maackii*)为忍冬科(Caprifoliaceae)忍冬属一落叶灌木树种,具有喜光、抗旱、适应性强、管理粗放的特点,在中国北方园林造景中广泛应用。春季观花,秋季观果,全株入药。茎皮可制人造棉,种子油可制肥皂,叶浸汁可杀棉蚜虫,花可作金银花用,含有17种氨基酸,丰富的矿质元素、维生素和它多种营养成分,能祛风解毒、消肿止痛,主治头晕、跌打损伤,具有较高的观赏与药用价值<sup>[1-3]</sup>。长绿期金银木是金银木一自然变异类型,具有稳定的强耐寒性,比普通金银木落叶晚20~30 d,具有落叶期晚、生长期长等特征。笔者对长绿期金银木的繁殖主要采用扦插方法,由于母本少,成苗量少,繁殖系数低等特点,限制了这一优良类型的生产推广。对长绿期金银木的组织培养研究未见报道。于2006年11月~2008年9月在北京农业职业学院植物组织培养实验室对长绿期金银木进行了组织

培养快速繁育研究,找到了长绿期金银木快速繁育的技术参数,为快速推广生产利用这一乡土耐寒树种奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

为1~4 a生长绿期金银木(*Lonicera maackii* 'Changlvqi')植株。试验选取长绿期金银木带芽茎段、半木质化茎段、叶片、叶柄作为外植体材料。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的筛选及消毒处理 休眠期1 a生长绿期金银木外植体病菌污染试验。

在早春3月休眠期芽萌发前,从露地选取芽体饱满的当年生长绿期金银木枝段作为外植体材料。自来水冲洗干净后,采用70%酒精、0.1% HgCl<sub>2</sub>、3%~5%次氯酸钠、吐温20、无菌蒸馏水等进行消

毒。试验共设置 13 个处理(表 1),每个处理试验 30 个带芽茎段。培养温度(25±1)℃,光照度 1 200 lx,光照时间 12 h·d<sup>-1</sup>。

生长季外植体病菌污染试验 在早春 4 月份分别从温室及露地选取长绿期金银木新梢茎段、成熟叶片、叶柄作外植体材料,用 0.1%HgCl<sub>2</sub> 以 1~8 min 不同消毒时间进行消毒,试验分别各设置 8 个处理(表 2)。

1.2.2 增殖培养基的筛选 添加不同浓度生长调节剂对长绿期金银木进行增殖。以 MS 为基本培养基,添加不同类型及浓度的植物生长调节剂,30 d 调查接种处理后的苗木高度及生长势。

添加不同浓度椰汁对长绿期金银木进行增殖在增殖效果较好的 MS+BA0.3+NAA0.1 培养基的基础上,添加 50、100、150 mL·L<sup>-1</sup> 三种浓度椰汁(coconut milk,缩写:CM)进行增殖试验,30 d 调查接种处理后的苗木高度及生长势。

1.2.3 生根培养基的筛选 添加不同类型及浓度

生长素诱导长绿期金银木生根。

以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同类型及浓度的生长素,接种 30 d 后调查各处理的试管苗生根情况。

添加不同时间暗培养诱导试管苗生根 在已选取的生根培养基 MS+IBA1.0 上,对试管苗进行不同时间的暗培养,接种 30 d 后调查各处理的试管苗生根情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体的筛选及不同消毒方法的影响

2.1.1 露地外植体病菌污染试验 表 1 显示:对长绿期金银木休眠期 1 a 生枝进行的 13 个处理消毒试验,外植体污染率为 100%。重复试验 2 次,污染率仍为 100%。造成休眠期茎段污染率高的原因分析,主要有两种:一是北京地区早春干冷,空气杂菌较多;二是长绿期金银木小枝中空,枝芽密生绒毛,不易彻底杀菌。

表 1 长绿期金银木外植体病菌污染试验表

Table 1 Contaminant rates of different disinfected explants of *Lonicera maackii* 'Changliqi'

编号	消毒处理	外植体数/个	污染数/个	污染率/%
1	3%次氯酸钠 10 min	30	30	100
2	4%次氯酸钠 10 min	30	30	100
3	5%次氯酸钠 10 min	30	30	100
4	0.1%升汞 4 min	30	30	100
5	0.1%升汞 5 min	30	30	100
6	0.1%升汞 6 min	30	30	100
7	0.1%升汞 7 min	30	30	100
8	70%酒精 30 s+0.1%升汞 5 min	30	30	100
9	70%酒精 30 s+0.1%升汞 6 min	30	30	100
11	70%酒精 30 s+0.1%升汞 7 min	30	30	100
12	70%酒精 30 s+0.1%升汞 8 min	30	30	100
13	70%酒精 30 s+(0.1%升汞+2 滴吐温 20)7 min	30	30	100

在生长期的 6 月份,在露地采集长绿期金银木带芽茎段、半木质化带芽茎段、成熟叶片、叶柄作外植体材料,设置 13 个处理(同表 1),进行消毒试验,10 d 后外植体污染率为 100%。重复试验二次,污染率仍为 100%。

通过以上试验可看出,无论是生长期还是休眠期,从露地生长的长绿期金银木带芽茎段、新梢带芽茎段、成熟叶片、叶柄不适宜作为外植体的材料。

2.1.2 日光温室内生长季新梢茎段病菌污染试验 对采集于日光温室内生长的长绿期金银木新梢带芽茎段采用 0.1%HgCl 进行 1~8 min 不同时间的消毒试验。表 2 显示:污染率随着消毒时间的延长而降低,消毒时间越长污染率越低,然而对应的外植体死亡率越高。8 个处理的外植体污染率,以处理 8 污染

率最低为 5%,处理 6,7 为 10%,处理 1,2,3 为最高。外植体死亡率以处理 1,2,3 最低,处理 4 次之,处理 8 最高。综合污染率及死亡率两项判定指标,在对长绿期金银木新梢带芽茎段进行消毒试时,适宜的消毒处理是处理 5 及处理 4。在日光温室内采集的长绿期金银木带芽茎段、成熟叶片、叶柄进行消毒试验,全部污染。可见,长绿期金银木组培时,适宜的外植体材料为日光温室内生长的新梢带芽茎段。

### 2.2 增殖培养基的筛选

2.2.1 不同浓度生长调节剂对长绿期金银木生长的影响 在继代 30 d 时,在增殖培养基中添加不同浓度植物生长调节剂,依据增殖苗生长高度及生长势两项指标筛选长绿期金银木适宜的增殖培养基。结果见表 3。

表 2 不同消毒时间对新梢带芽茎段污染率的影响

Table 2 Effect of different disinfect times on contaminant rate of tender stem with single bud explant

处理	升汞 /min	段数 /支	污染段数 /支	污染率 /%	杀死数 /支	杀死率 /%
1	1	20	20	100	0	0
2	2	20	20	100	0	0
3	3	20	20	100	0	0
4	4	20	8	40	3	15
5	5	20	4	25	5	25
6	6	20	2	10	10	50
7	7	20	2	10	15	75
8	8	20	1	5	20	100

表 3 不同浓度生长调节物质对试管苗增殖生长的影响

Table 3 Effect of different hormones on proliferation of cuvette seedling

处理	培养基	样本数	30 d 苗高/cm	生长势
1	MS+BA0.5+NAA0.1	30	5.0	苗细弱,叶色黄
2	MS+BA0.5+NAA0.05	30	4.0	苗细弱,叶色较黄
3	MS+BA0.5+NAA0.03	30	3.5	苗细弱,叶色较绿
4	MS+BA0.5+NAA0.01	30	2.8	苗细弱,叶色较绿
5	MS+BA0.3+NAA0.1	30	4.0	苗健壮,叶色浓绿
6	MS+BA0.3+NAA0.03	30	3.0	苗较壮,叶色浓绿
7	MS+BA0.3+NAA0.01	30	2.5	长势一般,叶色较绿
8	MS+BA0.3+NAA0.05	30	3.0	长势一般,叶色较绿
9	MS+BA0.2+NAA0.01	30	3.0	苗较壮,叶色较绿
10	MS+BA0.2+NAA0.03	30	3.0	苗较壮,叶色偏黄
11	MS+BA0.2+NAA0.05	30	2.8	长势一般,叶色较绿
12	MS+BA0.2+NAA0.1	30	2.5	长势一般,叶色较绿

表 4 不同浓度椰汁对试管苗增殖的影响

Table 4 Effect of coconut milk(CM) with different concentrations on proliferation cuvette seedling

处理	培养基	样本数	30 d 苗高/cm	生长势
1	MS+BA0.3+NAA0.1+CM50 ml/L	30	6	生长旺盛,叶色浓绿
2	MS+BA0.3+NAA0.1+CM80 ml/L	30	7	生长旺盛,叶色浓绿
3	MS+BA0.3+NAA0.1+CM120 ml/L	30	5	生长旺盛,叶色浓绿
CK	MS+BA0.3+NAA0.1	30	4	生长中等,叶色浅绿

表 4 可看出,椰汁对苗木生长高度有明显促进作用。其中以处理 2 最明显,苗木高生长量为 7 cm,比对照增加了 3 cm,且生长势旺盛,叶绿。对照生长中等,叶色浅绿。可见,适宜的增殖培养基为:MS+BA0.3+NAA0.1+CM80 mL·L<sup>-1</sup>。

2.3 生根培养基的筛选

2.3.1 不同类型及浓度生长素对长绿期金银木生根的影响 在 MS 生根培养基中加入不同浓度的 IBA 及 NAA,生根培养 20 d 后,调查 5 种生根培养基试管苗的最初生根时间、平均生根数量、生根长度、根生长势,依此判断适宜的 IBA 及 NAA 添加浓度。结果见表 5。

通过对 5 种生根培养基在生根时间、生根数量、根生长量及生长势的调查结果的综合分析,处理 4 虽然开始生根时间较短,为 9 d,仅有少量愈伤出现,不利于移栽成活。处理 2 开始生根时间为 10 d,平

表 3 显示:处理 1 虽然苗木高生长量最大,但长势弱;处理 7,12 苗木高生长量最小,生长势缓慢。高浓度的生长素促进了苗木的高生长,但苗木变的细弱,这与李俊红<sup>[4]</sup>、王艳<sup>[5]</sup>等研究结果一致。从增殖苗生长高度及生长势综合分析,适宜的增殖培养基为处理 5。

2.2.2 不同浓度椰汁对长绿期金银木生长的影响

通过在增殖培养中添加不同浓度椰汁,观测对长绿期金银木生长的影响。依 30 d 苗木平均生长高度及生长势两项指标,选择适宜的椰汁浓度。

均根数 5 条,平均根长为 1.5 cm,为金银木试管苗生根最好。表 5 显示:适宜的生根培养基为:MS+IBA1.0。

表 5 不同浓度生长素对试管苗生根的影响

Table 5 Effect of different concentration IBA and NAA on cuvette seedling rooting

处理	生根 培养基	样本 数	开始生根 时间/d	平均 根数	根长 /cm	根生 长势
1	MS+IBA1.5	30	15	2~3	1.0	根少
2	MS+IBA1.0	30	10	5	1.5	根健壮,短粗
3	MS+IBA0.5	30	12	2	1.0	根少
4	MS+NAA1.0	30	9	2~3	0.5	有少量愈伤
5	MS+NAA0.5	30	11	4	2.0	根细长

2.3.2 不同时间暗培养对试管苗生根的影响 在已选取的生根培养基 MS+IBA1.0 的基础上,在试管苗接种初期进行暗培养。表 6 显示:一定时间的暗培养对试管苗生根有促进作用。处理 4,5 的生根时间比没处理前提前了 2 d,处理 2 提前了 1 d,处理

1 无变化。因此,试管苗接种初期暗培养时间以 4 d 为好。

表 6 不同时间暗培养对试管苗生根的影响  
Table 6 Effect of different dark culture durations  
on cuvette seedling rooting

处理	暗培养 时间/d	样本数	生根 时间/d	平均 根数	20 d 平均 根长/cm
1	2	30	10	4~5	1.5
2	3	30	9	5	1.5
3	4	30	8	6	1.8
4	5	30	8	5~6	2.0
5	6	30	9	5	2.0

### 3 结论与讨论

#### 3.1 结论

长绿期金银木组织培养时,适宜的外植体材料为日光温室内生长的新梢带芽茎段,诱导出不定芽的发生。消毒时以 HgCl 消毒 5 min 为最好,污染率为 25%,杀死率也为 25%。带芽茎段、成熟叶片、叶柄均不适宜作为外植体的材料。

长绿期金银木组织培养的不同培养阶段的适宜培养基分别为:继代苗培养基为:MS+BA0.3+NAA0.1+CM80 mL·L<sup>-1</sup>,生根培养基为:MS+IBA1.0。

在对试管苗进行暗培养时,有利于试管苗生根,能够显著提早生根。暗培养时间以 4 d 为最好。

#### 3.2 讨论

关于长绿期金银木外植体选择问题,试验中选取了带芽枝段、新梢茎段、叶片、叶柄作为长绿期金银木组织培养外植体,只有从日光温室采集长绿期金银木新梢带芽茎段进行外植体初带培养时,获得了腋芽萌发,污染率相对较低。而无论是从日光温

室内还是从露地选取带芽枝段、叶片、叶柄作为外植体初带培养时,全部污染死亡;露地新梢带芽茎段也全部污染死亡。北京地区春季干旱少雨,空气污染严重,枝条杂菌较多,彻底消毒受到了限制。长绿期金银木自身的芽枝多毛、容易积尘,增加了外植体消毒的难度,提高了污染率。忍冬科忍冬属的一些植物,如灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides*)选用茎尖及带腋芽茎段<sup>[6]</sup>,金银花“蒙花”品系的茎段<sup>[7]</sup>,金银花(*L. japonica*)的叶片<sup>[8]</sup>、顶芽和侧芽<sup>[9]</sup>作为外植体组培时取得了良好的效果。带芽枝段、新梢茎段、叶片、叶柄是否能够作为长绿期金银木组织培养快速繁殖的外植体材料,需要进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 贺士元,邢其华,尹祖棠.北京植物志(下)[M].北京:北京师范大学出版社,1992,943.
- [2] 李昉.野生植物金银忍冬营养成分的测定[J].化学与生物工程,2007,24(1):77-78.
- [3] 陈月开.金银木的黄酮类物质分析[J].山西大学学报:自然科学版,2006,29(3):305-307.
- [4] 李俊红,张焕玲,李周岐.杜仲组织培养再生体系的优化[J].西北林学院学报,2008,23(4):97-100.
- [5] 王艳,杜鸿云,梁海永,刘桂林.过路黄的组织培养及叶片植株再生[J].西北林学院学报,2008,23(4):104-108.
- [6] 唐效蓉,李午平,彭晓峰.灰毡毛忍冬的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,41(5):642.
- [7] 杨培君,陈德经,赵桦,李会宁.蒙花忍冬的组织培养与快速繁殖研究[J].西北植物学报,2003,23(7):1304-1307.
- [8] LI L G, GU L, QIN J SH. Tissue culture of *Lonicera japonica* [J]. Plant Physiology Communication. (植物生理学通讯), 1987(4):58-59(in Chinese).
- [9] 向增旭,高山林.忍冬组织培养体系的建立和优化[J].中国中药杂志,2007,32(24):2662-2663.

(上接第 96 页)

#### 参考文献:

- [1] 李毅,陈拓,安黎哲.超干贮藏对沙冬青和霸王种子的影响研究[J].种子,2006,25(10):1-5.
- [2] Ellis R H, Hong T D, Roberts E H. A comparison of the low-moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity in twelve species[J]. Annals of Botany, 1989, (63): 601-611.
- [3] 李毅.甘肃河西地区三种荒漠植物种质资源超干保存研究[D].兰州大学博士学位论文,2007.
- [4] 程红焱.种子超干贮藏技术研究的背景和现状[J].云南植物研究,2005,27(2):113-124.
- [5] 程红焱.种子超干保存种质研究[D].中国科学院植物研究所博士学位论文,1994.
- [6] 朱诚.种子种质超干保存及其耐干性的生理生化基础[D].浙江大学博士学位论文,2003.
- [7] 方莹.光皮桦种子超干贮藏及回湿处理的研究[D].南京林业大学硕士学位论文,2007.
- [8] 吴晓亮.种质超干干燥贮藏的生理生化特性及差异基因表达的研究[D].西南大学硕士学位论文,2006.
- [9] 程红焱,郑光华.超干处理提高榆树种子的耐藏性[J].植物生理学通讯,1992,28(5):340-342.
- [10] 邹冬梅.银合欢种子的超干保存[J].热带作物学报,2006,27(2):17-21.
- [11] Li Y, Feng H Y, Chen T, et al. Physiological responses of *Limonium aureum* seed to ultra-drying[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(5): 569-575.
- [12] GB2722-1999,林木种子检验规程[J].10-15.
- [13] 黄学林,陈润政.种子试验手册[M].北京:农业出版社,1990:110-112.