

文章编号:1001—7380(2022)06—0015—05

## 互叶醉鱼草茎段组织培养技术研究

屈超,叶冬梅\*,郭欣,崔雁敏,朝勒蒙

(内蒙古农业大学林学院,内蒙古 呼和浩特 010019)

**摘要:**以互叶醉鱼草带腋芽的茎段为试验材料,采用正交试验设计和组织培养技术,对外植体的消毒时间和腋芽诱导、继代增殖、生根培养及炼苗移栽等技术进行了研究。结果表明:先用75%酒精处理30s,再使用1%NaClO溶液消毒12min,外植体存活率最高,达86.7%;初代诱导腋芽最佳培养基为MS+1.0mg/L 6-BA+0.4mg/L NAA,诱导率为93.3%;最佳增殖培养基为MS+1.0mg/L 6-BA+0.3mg/L NAA+0.3mg/L IBA,增殖系数为6.47;最佳生根培养基为1/2MS+0.3mg/L IBA,生根率为76.7%;将组织培养得到的幼苗栽植到由营养土、蛭石和珍珠岩(容积比为4:2:1)组成的混合基质中,成活率为88.3%。

**关键词:**互叶醉鱼草;腋芽;诱导;正交试验;组织培养

中图分类号:Q943.1;Q949.776.3

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2022.06.003

## Study on tissue culture of stem segments from *Buddleja alternifolia*

Qu Chao, Ye Dongmei\*, Guo Xin, Cui Yanmin, Chao Lemeng

(College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China)

**Abstract:** Taking the stem segments with the axillary buds of *Buddleja alternifolia* as explants, by orthogonal test design and tissue culture techniques, the disinfection time, axillary bud induction, proliferation, rooting culture and seedlings transplanting were studied. The results showed that: treated with 75% alcohol for 30 s, and then disinfected with 1% NaClO solution for 12 min, the explants could obtain the highest survival (up to 86.7%). The optimal medium for the axillary bud induction was claimed as MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L NAA, with the induction rate up to 93.3%. The optimal proliferation medium was determined as MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA + 0.3 mg/L IBA, with the proliferation coefficient up to 6.47. The optimal rooting medium as 1/2 MS + 0.3 mg/L IBA, with the rooting rate of 76.7%. The survival of the plantlets transplanted into the complex substrate composed of nutrient soil, vermiculite, perlite (volume ratio 4:2:1), could get up to 88.3%.

**Key words:** *Buddleja alternifolia*; Axillary bud; Induction; Orthogonal test; Tissue culture

互叶醉鱼草 (*Buddleja alternifolia*) 是马钱科 (Loganiaceae) 醉鱼草属中的一种多年生落叶灌木, 又名紫花醉鱼木。其适应性强, 极耐寒、耐旱、耐盐碱且萌蘖性强; 树形饱满, 盛花时节满树紫堇, 极富观赏性, 具有较好的生态习性和观赏价值<sup>[1]</sup>。此外, 互叶醉鱼草的花和叶有止血和抗感染作用, 有较高的药用价值, 具有良好的发展前景。

野生互叶醉鱼草对生长条件要求苛刻, 在自然条件下主要通过种子进行有性繁殖和自然分蘖进行营养繁殖, 但其种壳坚硬, 野外条件难以满足其种子萌发与幼苗生长的需求, 自然出苗率低, 长时间的高温、低温和较多的降水会增大幼苗死亡率, 致使互叶醉鱼草资源日趋减少, 在内蒙古被列入了《内蒙古珍稀濒危保护植物名录》。组织培养技术繁殖苗木较快, 不

收稿日期:2022-10-04;修回日期:2022-10-27

作者简介:屈超(1999-),男,陕西榆林人,硕士研究生。Tel:13237423706;E-mail:1052038371@qq.com

\*通信作者:叶冬梅(1970-),女,内蒙古包头人,副教授,博士。研究方向为森林培育理论与技术。Tel:18686026488;E-mail:yiedongmei19

@sina.com

受外部环境影响,幼苗能够保持母株的优良性状。因此,利用组织培养快繁技术是满足市场对互叶醉鱼草大量需求的重要途径<sup>[2-3]</sup>。我国目前关于互叶醉鱼草的研究集中在扦插繁殖育苗技术和生理生化特性研究,对互叶醉鱼草组织培养技术的研究甚少,仅有王慧瑜等的研究发现,6-BA和NAA对互叶醉鱼草的芽有诱导和增殖作用<sup>[4]</sup>。植物生长调节剂在组织培养中的作用与其具体质量浓度有关,但是王慧瑜等的研究中生长调节剂配比设置不合理,其质量浓度的选择单一,导致腋芽诱导率和增殖系数较低。为解决互叶醉鱼草腋芽诱导率低等问题,本研究基于不同植物生长调节剂和质量浓度配比的培养基配方体系,采用正交试验设计,探究适于互叶醉鱼草茎段腋芽诱导、增殖和生根的最佳培养基配方,完善互叶醉鱼草的离体快繁技术,为其种质资源保护和工厂化生产提供参考价值<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验材料为2022年5月采自内蒙古农业大学东校区的互叶醉鱼草当年生带腋芽茎段。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 选取健康的互叶醉鱼草茎段,先用洗洁精清洗,再用自来水冲洗1 h,在超净工作台中用75%的酒精处理30 s,先用无菌水冲洗4次,再用1% NaClO溶液处理(6, 8, 10, 12 min)进行消毒,无菌水冲洗6次,接种于培养基中,每个处理10瓶,每瓶接种茎段2个,重复3次。定期观察并统计污染率、褐化率和存活率。

1.2.2 初代诱导培养 在超净工作台上,将灭菌的茎段接种于添加蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L的MS和WPM培养基中培养,并添加不同质量浓度组合的6-BA(0.5, 1.0, 1.5 mg/L)和NAA(0.1, 0.4, 0.7 mg/L),每个处理10瓶,每瓶接2个茎段,重复3次,20 d后统计诱导率。

1.2.3 继代增殖培养的正交试验 将茎段诱导得

到的腋芽接种至以MS+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L的基本培养基中,并添加不同质量浓度的6-BA(0.5, 1.0, 1.5 mg/L)、NAA(0.3, 0.4, 0.5 mg/L)和IBA(0.1, 0.3, 0.5 mg/L),按照 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,每个处理20瓶,每瓶接1个腋芽,重复3次,30 d后统计幼苗的增殖系数。

1.2.4 生根培养 将增殖培养得到的幼苗进行生根培养,接种至加蔗糖30 g/L、琼脂6 g/L的1/2 MS培养基中,处理质量浓度为IBA 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mg/L, NAA为0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mg/L。每个处理20瓶,每瓶接1株幼苗,重复3次,30 d后统计生根率等。

1.2.5 炼苗及土壤基质的筛选 将生根完成的组织培养苗开瓶处理1 d以适应外界环境,取出幼苗种植于不同容积比的4类基质(营养土;营养土:蛭石=1:1;营养土:珍珠岩=1:1;营养土:蛭石:珍珠岩=3:2:1)中,定期浇水并观察土壤基质对幼苗生长情况的影响,30 d后统计成活率。

1.2.6 培养条件 培养基pH范围为5.75—5.85,培养基和试验工具置于高压灭菌锅(121 ℃, 1.1 MPa)内灭菌20 min,灭菌后放置在超净工作台上,待冷却后使用。试验均在温度为(23±2) ℃,光照强度为2 000 lx,光照时间为12 h/d的培养室中培养。

### 1.3 数据分析

试验数据均采用Excel软件统计处理,采用SPASS 23.0软件进行结果分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒方法对互叶醉鱼草茎段存活的影响

试验表明,随着消毒时间的延长,茎段的感染率逐渐降低,褐化率逐渐升高,存活率先增高后降低,消毒时间过长会导致外植体褐化甚至死亡。因此互叶醉鱼草茎段最佳消毒方式是使用1% NaClO溶液处理12 min,此时互叶醉鱼草的存活率最高,为86.7%。

表1 1% NaClO消毒处理时间对互叶醉鱼草茎段的影响

处理	消毒时间/min	接种数/个	感染率/%	褐化率/%	存活率/%
1	4	60	81.7±4.41 a	0.0±0.00 c	18.3±4.41 c
2	8	60	23.3±4.41 b	3.3±1.67 b c	73.4±5.77 ab
3	12	60	3.3±1.67 c	10.0±2.89 b	86.7±4.41 a
4	16	60	0.0±0.00 c	33.3±4.41 a	66.7±4.41 b

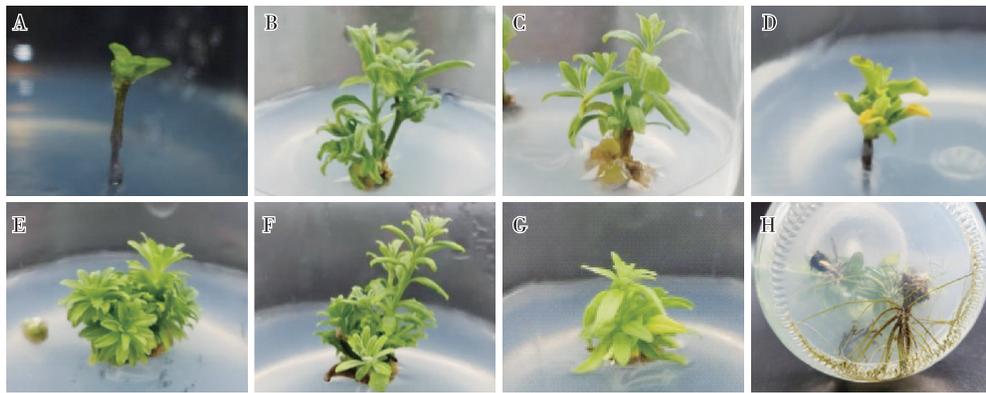
注:同列数据后不同字母表示不同处理结果间差异显著( $P<0.05$ )。感染率(%)=[污染数/接种数]×100;存活率(%)=[成活数/接种数]×100;褐化率(%)=[褐化数/接种数]×100。

2.2 不同激素质量浓度组合对腋芽诱导培养的影响

茎段接种 5 d 开始萌发,腋芽处冒出绿点,接种 20 d 后,不同质量浓度的激素组合得到的腋芽形态各异(见图 1),并产生丛生芽。由表 2 可知,在同一质量浓度的激素组合下使用 MS 培养基比 WPM 培养基诱导率高,并且萌发较早,生长状况好,故互叶醉鱼草茎段初代培养的最佳基本培养基为 MS 培养基。

试验表明,当 NAA 质量浓度不变,6-BA 质量浓度为 1.0 mg/L 时腋芽诱导效果最好,生长健壮(见

图 1B);6-BA 质量浓度为 1.5 mg/L 时诱导的芽叶片小,叶色黄(见图 1D)。试验中出现叶片卷曲、叶色发黄等现象,芽的整体生长受到了抑制,这可能是由于 6-BA 的质量浓度过高。当 NAA 质量浓度为 0.4 mg/L 时,腋芽茎节粗长(见图 1B);当 NAA 质量浓度为 0.7 mg/L 时,腋芽基部产生愈伤组织(见图 1C),说明高质量浓度的 NAA 可能会抑制腋芽茎节和叶片的生长发育。本试验结果表明互叶醉鱼草腋芽诱导培养的最适培养基为 MS+ 1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA。



注:A:5 d 茎段萌发腋芽;B:20 d 腋芽茎粗叶绿;C:20 d 腋芽基部有愈伤;D:20 d 腋芽不生长茎,叶色微黄;E:增殖 25 d 叶量多;F:增殖 25 d 植株高,茎粗;G:增殖 25 d 叶色微黄;H:生根 30 d 的根系

图 1 互叶醉鱼草组织培养过程

表 2 不同激素质量浓度组合对腋芽诱导培养的影响

处理	培养基	质量浓度/(mg/L)		诱导率/%	生长状况
		6-BA	NAA		
A1	MS	0.5	0.1	73.3±6.01 bc	萌发较好,叶子大
A2	MS	0.5	0.4	83.3±1.67 ab	萌发正常,茎粗
A3	MS	0.5	0.7	35.0±2.89 f	基部有愈伤
A4	MS	1.0	0.1	78.3±6.67 abc	基部有愈伤
A5	MS	1.0	0.4	93.3±4.41 a	萌发好,茎粗叶绿
A6	MS	1.0	0.7	48.3±7.26 ef	萌发缓慢,叶子较小
A7	MS	1.5	0.1	55.0±2.89 de	萌发缓慢,叶量较少
A8	MS	1.5	0.4	66.7±4.41 cd	不生长茎,叶子较小
A9	MS	1.5	0.7	33.3±4.15 f	不生长茎,叶量少
B1	WPM	0.5	0.1	63.3±7.26 abc	萌发正常,叶色浅绿
B2	WPM	0.5	0.4	80.0±2.89 a	萌发较好,茎粗叶子较大
B3	WPM	0.5	0.7	50.0±5.77 cde	萌发正常,基部有愈伤
B4	WPM	1.0	0.1	55.0±8.66 bed	萌发正常,基部有愈伤
B5	WPM	1.0	0.4	71.7±3.33 ab	萌发较好,叶量较多
B6	WPM	1.0	0.7	36.7±4.41 de	萌发缓慢,叶量一般
B7	WPM	1.5	0.1	48.3±6.01 cde	萌发缓慢,叶色微黄
B8	WPM	1.5	0.4	60.0±5.77 bc	萌发缓慢,茎短小
B9	WPM	1.5	0.7	35.0±3.17 e	不生长茎,叶子小

注:同列数据后不同字母表示不同处理结果间差异显著(P<0.05)。诱导率(%)=[增殖芽数/接种数]×100。

2.3 不同激素质量浓度组合对丛生芽继代增殖培养的影响

试验应用 3 因素 3 水平正交设计,设置不同质量浓度的 6-BA、NAA 和 IBA 对丛生芽增殖系数的影响进行试验。将互叶醉鱼草诱导的芽沿根部切下,在增殖培养基中培养 25 d 后增殖效果显著。由表 3 可知,增殖系数随着 6-BA 质量浓度升高而增大,而达到最佳的质量浓度后再增加 6-BA 质量浓度则抑制芽的增殖,如 6-BA 质量浓度为 1.5 mg/L 时叶片卷曲,叶色发黄。C4 处理的丛生芽增殖系数最高,生长健壮;而 C9 处理由于激素质量浓度过高,增殖情况差。故最适合丛生芽继代增殖的激素组合为 1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+0.3 mg/L IBA。

2.4 不同激素质量浓度对幼苗生根培养的影响

将增殖培养的芽苗接种至生根培养基中,培养 15 d 后,芽的基部呈白色状凸起,30 d 后,根系基本成型。由表 4 可知,D3 处理下的幼苗生根率较高,生根快,根多且粗,试验表明诱导生根最佳培养基为 1/2 MS +0.3 mg/L IBA。

表 3 互叶醉鱼草丛生芽继代增殖培养的正交试验

处理	质量浓度/(mg/L)			增殖系数	生长状态
	6-BA	NAA	IBA		
C1	0.5	0.3	0.1	3.05±0.23 f	植株有高能矮,叶子大
C2	0.5	0.4	0.3	4.89±0.11 bc	植株高,叶绿
C3	0.5	0.5	0.5	3.90±0.30 de	植株有高能矮,叶色浅绿
C4	1.0	0.3	0.3	6.47±0.26 a	植株高,茎粗叶绿
C5	1.0	0.4	0.5	4.39±0.07 cd	植株有高能矮,叶量多
C6	1.0	0.5	0.1	5.28±0.31 b	植株有高能矮,叶色微黄
C7	1.5	0.3	0.5	3.14±0.16 ef	植株矮小,叶色微黄
C8	1.5	0.4	0.1	3.01±0.12 f	植株较矮,茎少
C9	1.5	0.5	0.3	2.93±0.25 f	植株有高能矮,叶色发黄
K <sub>1</sub>	11.38	12.33	10.88		
K <sub>2</sub>	15.77	12.06	14.45		
K <sub>3</sub>	9.44	12.2	11.26		
R	2.11	0.09	1.19		

注:K<sub>i</sub>为各水平下的增殖系数平均值;R为最大与最小水平差距。同列数据后不同字母表示各处理间的差异显著性(P<0.05)。增殖系数=培养后的芽数/接入的芽数。

## 2.5 栽培基质对幼苗生长的影响

将开瓶处理的生根幼苗分别移栽到灭菌的4种基质中。由表5可知,移栽到营养土、蛭石、珍珠岩(容积比为4:2:1)的基质上的成活率为88.3%,幼苗生长效果好。

## 3 讨论与结论

组织培养试验中,外植体的消毒是试验成功的重要因素。本试验互叶醉鱼草茎段最佳消毒方式定为1% NaClO溶液消毒12 min。随着消毒时间逐渐增长,感染率随之降低、褐化率呈上升趋势、存活率先上升后降低。分析造成这种现象的原因可能是消毒时间过长,伤害了外植体本身,导致外植体褐化甚至死亡<sup>[6]</sup>。为降低外植体污染率,应选择当年生的嫩茎进行采集,而一些过于木质化的枝条生长时间久,带菌较多,不宜使用。

表 4 不同激素质量浓度组合对互叶醉鱼草生根的影响

处理	质量浓度/(mg/L)		平均生根数/个	平均根长/cm	生根率/%	生长状态
	IBA	NAA				
D1	0.05	-	3.30±0.36 de	1.48±0.15 cd	15.0±5.77 de	生长慢,根细
D2	0.1	-	5.07±0.37 b	2.26±0.11 b	38.3±3.33 bc	主根为短簇状
D3	0.3	-	6.27±0.32 a	2.91±0.10 a	76.7±4.41 a	生长快,根粗
D4	0.5	-	3.77±0.26 cd	1.16±0.14 cde	31.7±7.26 bcd	生长较慢
D5	-	0.05	3.20±0.44 de	1.07±0.11 de	13.3±3.33 de	生长慢,根细
D6	-	0.1	4.87±0.38 bc	2.05±0.10 b	45.0±8.66 b	主根为短簇状
D7	-	0.3	3.83±0.30 cd	1.50±0.14 c	21.7±4.41 cde	生长慢,根细
D8	-	0.5	2.27±0.26 e	1.01±0.12 e	8.3±1.67 e	根细,根数少

注:同列数据后不同字母表示不同处理结果间差异显著(P<0.05)。生根率(%)=[长根数/接种数]×100;平均根数=总根数/接种数;平均根长=总根长/总根数。

表 5 土壤基质对幼苗的影响

处理编号	基质容积比	移栽数	存活率/%
1	营养土	60	46.7±8.8 c
2	营养土、蛭石(2:1)	60	63.3±6.7 bc
3	营养土、珍珠岩(2:1)	60	71.7±6.0 ab
4	营养土、蛭石、珍珠岩(4:2:1)	60	88.3±1.7 a

注:同列数据后标不同字母表示不同处理结果间差异显著(P<0.05)。

植物组织培养中,外源生长调节剂是外植体诱导与增殖成功的关键,通常以细胞分裂素6-BA常与生长素类NAA组合诱导芽产生<sup>[7]</sup>。试验结果发现,芽的诱导率和增殖系数在一定质量浓度的6-BA中呈上升趋势,而达到最佳质量浓度后再加入6-BA则表现为芽生长发育的抑制,出现叶片卷曲、叶色

发黄等现象<sup>[8]</sup>。试验中发现,较低质量浓度的6-BA会使腋芽基部产生愈伤组织,说明6-BA具有促进芽生长和诱导愈伤组织的作用,应根据培育目标选择合适的质量浓度<sup>[9]</sup>。试验中发现,NAA对腋芽诱导的影响呈现先升高再降低的趋势,当NAA质量浓度较高时,腋芽基部产生愈伤组织,腋芽生长受到抑制,出现不长茎、叶片小等现象,说明高质量浓度的NAA会抑制腋芽茎节和叶片的生长与发育,可见使用适宜质量浓度的激素,诱导率会更好<sup>[10]</sup>。结果表明,互叶醉鱼草腋芽诱导培养基中的最佳激素组合为1.0 mg/L 6-BA和0.4 mg/L NAA,这与王慧瑜等<sup>[4]</sup>研究的结果相似,可在试验中继续缩小质量浓度梯度范围,获得更高效的培养基配方。

本试验在继代增殖培养中,采用了3因素3水平正交试验,降低了试验设计的复杂性,提高了试验的效率,改善了增殖苗的生长状况,与只加入6-BA和NAA相比,附加IBA之后,增殖苗生长发育更快更健康<sup>[11]</sup>,最适合丛生芽增殖的激素组合为1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+0.3 mg/L IBA,最佳增殖系数高达6.47,这与王慧瑜等研究有所不同,其研究发现最佳增殖激素组合为0.4 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,初步推测可能是不同地理位置导致激素所需有所不同。本研究发现,当6-BA质量浓度为1.5 mg/L时,叶片卷曲,叶色发黄,且不长茎,说明6-BA质量浓度较高会抑制增殖。在生根培养时,IBA及NAA在生根诱导试验中广泛使用,互叶醉鱼草一般适宜在生长素质量浓度较低的条件生根,IBA质量浓度超过0.3 mg/L或NAA质量浓度超过0.1 mg/L都会抑制生根;使用IBA诱导生根的效果比NAA更好,当IBA质量浓度为0.3 mg/L时,生根数多,根系粗长,生根率高<sup>[12-13]</sup>。故生根最适培养基定为1/2 MS+0.3 mg/L IBA。

本试验在王慧瑜等研究的基础上,完善了互叶醉鱼草组织培养快繁体系,相比于互叶醉鱼草种子萌发与扦插育苗技术,具有出苗快、成活率高的特点,能够保持母性优良性状的优点,成功保护了互叶醉鱼草种质资源,为互叶醉鱼草工厂化繁殖与生产具有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 柳金凤,吴建华,李永华.互叶醉鱼草的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2009,45(2):161.
- [2] ZHONG W M, ZHOU J L, TANG D M, et al. Establishment of tissue culture system of *Actinidia deliciosa* cultivar "Guichang" [J]. Journal of Chemistry, 2021, 6: 1-9.
- [3] 张赫岩,叶冬梅,林涛,等.金叶杨组织培养再生体系的建立[J].北方园艺,2020(9):97-103.
- [4] 王慧瑜,张晓申,李晓青,等.互叶醉鱼草组织培养快速繁殖技术研究[J].贵州农业科学,2010,26(11):105-112.
- [5] 肖祖飞,王玲玲,曹璐瑶,等.柠檬醛猴樟茎段组织培养技术研究[J].植物研究,2020,40(2):196-201.
- [6] 宋跃朋,陈盼飞,卜琛岷,等.高产优质白杨良种组培繁育体系构建[J].北京林业大学学报,2019,41(7):121-127.
- [7] 王林青.猕猴桃组织培养快繁技术研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [8] 苏亚娇,王秀峰,张悦,等.分蘖洋葱微鳞茎盘快繁技术体系建立[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2021,49(2):105-111.
- [9] 郑静楠,董文渊,尹泽南,等.笋竹组培快繁技术[J].东北林业大学学报,2021,49(1):50-54,59.
- [10] 章亮,谢祥琛,王奕然,等.侧柏茎段培养快速繁殖技术研究和黄帝手植柏克隆[J].西北林学院学报,2022,37(1):112-118.
- [11] 何志宇,付雪宁,尹鹏先,等.唐棣组织培养体系的建立与优化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(5):42-49.
- [12] 赵亚楠,张懿,谭旭,等.杜梨组培苗两步生根技术体系优化[J].中国农业大学学报,2021,26(11):105-112.
- [13] 张赫岩,叶冬梅,白玉娥,等.重瓣榆叶梅茎段组织培养体系的建立[J].中南林业科技大学报,2019,39(5):119-123,137.