

## 北江茛花茎段离体快速繁殖与叶片再生体系构建

雷佩雯<sup>1,2</sup>, 干诗颖<sup>1,2</sup>, 孙家怡<sup>1,2</sup>, 彭思娴<sup>1,2</sup>, 栾牧<sup>1,2</sup>, 高培军<sup>1,2</sup>

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 开化纸产自浙江省的开化县, 纸张细腻、柔软、不易折毁、可久藏, 是现代古籍修复重要用纸。开化纸核心造纸原料是茛花属 *Wikstroemia* 植物, 目前国内外尚无人工林种植, 主要依靠采挖有限的野生资源和从菲律宾进口干料, 这已经严重影响开化纸的产业化发展。为了实现茛花种苗快速繁育, 本研究以北江茛花 *Wikstroemia monnula* 当年生幼嫩茎段和叶片为外植体进行组织培养, 探索北江茛花组织培养最佳外植体消毒方式, 外植体诱导和分化、增殖、壮苗培养的最佳培养基配方。结果表明, 用 0.25% NaClO 溶液浸泡消毒 10 min 为最佳消毒方式; 腋芽诱导培养基 WPM + 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 可直接诱导茎段获得不定芽, 腋芽诱导率达 45.3%; 愈伤组织诱导培养基 MS + 4 mg·L<sup>-1</sup> TDZ + 2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 的诱导效果最好, 叶片愈伤组织诱导率可达 65.1%, 且在分化培养基 MS + 2.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 中分化出不定芽, 诱导率为 64.9%; 增殖培养基 WPM + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 培养的组培苗增殖较好, 增殖系数可达 4.84; 壮苗培养基 WPM + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 1 000 mg·L<sup>-1</sup> PVP 可提高增殖系数, 达 5.42。上述研究结果为茛花种苗快速繁育提供了重要的技术支持。

**关键词:** 北江茛花; 愈伤组织; 组织培养; 快速繁殖; 开化纸; 茎段; 叶片

**中图分类号:** Q943.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1001-3776 (2022) 02-0008-07

## In vitro Propagation of *Wikstroemia monnula* from Stem and Leaf

LEI Pei-wen<sup>1,2</sup>, GAN Shi-yin<sup>1,2</sup>, SUN Jia-yi<sup>1,2</sup>, PENG Si-xian<sup>1,2</sup>, LUAN Mu<sup>1,2</sup>, GAO Pei-jun<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. College of Environment and Biotechnological, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract:** Tissue culture of current year leaf and stem of *Wikstroemia monnula* was conducted in Hangzhou, Zhejiang province. Experiments were carried out on different explant disinfections, medium for induction, differentiation, multiplication and cultivation. The results showed that the best disinfection method was to soak the explants in 0.25% sodium hypochlorite solution for 10 minutes. Induction medium of WPM+0.01 mg/L of 6-BA could introduce bud from 45.3% of the stem. MS+4 mg/L of TDZ+2 mg/L of 2,4-D had the highest callus induction ratio of 65.1%, and then MS+2.5 mg/L of TDZ+1.0 mg/L of NAA had bud induction of 64.9%. WPM+0.1 mg/L of 6-BA+0.1 mg/L of NAA had multiplication coefficient of 4.84, while WPM+0.1 mg/L of 6-BA+0.1 mg/L of NAA+1 000 mg/L of PVP could increase multiplication coefficient to 5.42.

**Key words:** *Wikstroemia monnulas*; callus; tissue culture; rapid propagation; Kaihua paper; stem; leaf

开化纸因产自浙江省开化县而得名, 有纸寿千年、中国手工纸皇冠上的明珠之美誉。开化纸始于唐宋, 盛于明清, 风靡朝野, 是明清时期古籍印刷的御用纸, 纸色洁白雅致、质地柔软坚韧, 其以茛花属 *Wikstroemia* 植物韧皮纤维为主要原料制作<sup>[1]</sup>。清末, 因战乱、造纸核心原料枯竭等原因, 造纸技艺中断百年。古籍修复是古

收稿日期: 2021-10-15; 修回日期: 2022-01-30

作者简介: 雷佩雯, 硕士研究生, 从事林木种苗快速繁育研究; E-mail:332729472@qq.com; 通信作者: 高培军, 副教授, 博士, 从事竹林培育、森林培育研究; E-mail:316919866@qq.com。

籍保护工作中的一项重要内容,我国古籍修复纸主要依赖日本进口,而随着开化纸造纸工艺的复原,这种依赖进口的境况将得到极大改善,对于发明造纸术的我国来讲,不仅有极高的经济价值,更有重大的政治意义。目前,国内外尚未开展莞花属植物的人工林培育,开化纸造纸原料主要依靠采挖野生资源及从菲律宾进口干料来完成,已严重影响开化纸的产业化发展,莞花属植物人工林培育迫在眉睫。因此,需要快速繁殖大量莞花属植物种苗来全面满足人工林营造的生产需求。

北江莞花 *W. monnula* 为瑞香科 Thymelaeaceae 莞花属多年生落叶灌木<sup>[2]</sup>,具有泻水逐饮,消坚破积之功效<sup>[3]</sup>;其枝条细长,韧皮纤维发达,可造纸。北江莞花主要生长在浙江衢州等地区,可作为开化纸的制作原料,取材方便。目前,关于北江莞花的组织培养和快速繁殖尚未见报道,仅有关于北江莞花同属植物南岭莞花 *W. indica* 的组织培养研究<sup>[4]</sup>。南岭莞花与北江莞花都是主要生长在南方的莞花属植物,生长习性相似,因此,可参考前人的研究内容设计北江莞花组织培养试验方案。

本研究以北江莞花幼嫩叶片和茎段为材料,开展不定芽诱导、增殖与壮苗的研究,以期构建最适宜北江莞花组培快繁的育苗体系,实现北江莞花的离体快速繁殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2018 年 11 月,从浙江省衢州市开化县引种 30 株 2 年生北江莞花裸根苗,苗高约为 1.56 m,地径约为 1.45 cm。采用塑料花盆(38 cm × 28 cm),盆内栽培基质为泥炭、珍珠岩和蛭石,按 1:1:1 的体积比混合,栽培于浙江农林大学智能温室,3 个月后供试验用。

MS 培养基、WPM 培养基、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)购自 PhytoTech,蔗糖、活性炭(AC)购自上海沪试实验室器材股份有限公司,植物凝胶(Gelrite)购自 Sigma 公司,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)购自上海源叶生物科技有限公司,试剂 NaClO、噻苯隆(TDZ)、二氯苯氧乙酸(2,4-D)购自浙江卡尔生物技术有限公司。

### 1.2 外植体的选择和消毒方法

取生长健壮的北江莞花盆栽苗当年生枝条,截取枝条前端 15 cm 左右,在流水下冲洗 2 h 后,先用 75% 酒精消毒 30 s,无菌水洗 3 ~ 5 遍后再用 0.50% NaClO 溶液浸泡消毒 10 min,无菌水洗 5 ~ 7 遍。在无菌条件下,剪取叶腋上 0.5 cm、叶腋下 0.5 cm 幼嫩茎段和靠近叶柄端的叶片,用无菌滤纸吸干试材表面水分后接种至未添加任何激素的培养基中。每隔 3 d 观察 1 次污染情况,30 d 后统计污染数量和未污染且能萌发的外植体数量。以污染数与总接种数的比值为污染率,以未污染但褐死的外植体与总接种数的比值为褐死率。结果表明,以幼嫩叶片为外植体,污染率为 37.82%,褐死率为 26.8%;以幼嫩茎段为外植体,污染率为 33.66%,褐死率为 29.85%。

### 1.3 直接器官发生途径诱导不定芽试验

取无菌幼嫩茎段外植体接种至附加了 3 种不同浓度 6-BA (0.01、0.10、1.00 mg·L<sup>-1</sup>) 的 MS 培养基和 WPM 培养基中<sup>[5]</sup>。试验共设置 6 个处理,每个处理的接种数为 50 个茎段,3 次重复,30 d 后观察萌发情况并计算芽诱导率。

### 1.4 间接器官发生途径诱导不定芽试验

取无菌幼嫩叶片外植体接种至附加不同浓度 2,4-D (0、0.2、2.0 mg·L<sup>-1</sup>) 和 TDZ (0.4、4.0、8.0 mg·L<sup>-1</sup>) 的 MS 培养基中<sup>[6]</sup>。试验共设置 9 个处理,每个处理接种 50 个外植体,3 次重复,培养 30 d 后观察愈伤组织诱导情况和芽生长情况并计算出愈伤组织诱导率和芽诱导率。

选择生长状况良好的愈伤组织块,将其切割成直径约为 5 mm 的愈伤组织小块,再将小块接种至不同的分化培养基中。分化培养基以 MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的 TDZ (0.4、1.0、2.5 mg·L<sup>-1</sup>) 和 NAA (0、1.0 mg·L<sup>-1</sup>)<sup>[7]</sup>。试验共设置 6 个处理,每个处理接种 50 个愈伤组织小块,3 次重复,30 d 后统计芽诱导结果。

### 1.5 增殖培养试验

挑选无污染、长势一致的无菌苗接种至培养基中进行增殖培养,增殖培养基以 WPM 培养基为基本培养基,

添加不同浓度的 6-BA (0.1、1.0、3.0 mg·L<sup>-1</sup>) 和 NAA (0、0.01、0.10 mg·L<sup>-1</sup>)<sup>[8]</sup>。试验共设置 9 个处理, 每个处理接种 50 株无菌苗, 3 次重复, 30 d 后观察并记录丛芽的生长状况和增殖情况。

1.6 壮苗培养试验

将增殖后长势良好的组培苗接种至增殖培养基上。壮苗培养分别采用附加聚乙烯吡咯烷酮 (PVP: 500、1 000 mg·L<sup>-1</sup>) 和活性炭 (AC: 1 000、2 000 mg·L<sup>-1</sup>) 的增殖培养基以及未附加上述物质的增殖培养基作为对照。试验共设置 5 个处理, 每个处理接种 50 株组培苗, 3 次重复, 30 d 后观察并记录丛芽的生长状况和增殖情况。

1.7 其它条件

本试验中若无特殊说明, 均在培养基中加入 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖, pH 调节至 5.7, 以 3.5 g·L<sup>-1</sup> Gelrite 为凝固剂, 灭菌条件为 121℃、215 KPa, 灭菌时间为 10 min。无菌外植体的培养条件为光照强度 2.5 × 10<sup>3</sup> lx, 每天的光照时间为 16 h, 环境温度为 (25 ± 2) °C, 空气相对湿度为 60% ~ 90%。

1.8 数据分析

所有数据均为 3 次重复的平均值 ± 标准误。使用 SPSS 22.0 软件进行数据处理及统计分析, 方差分析采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

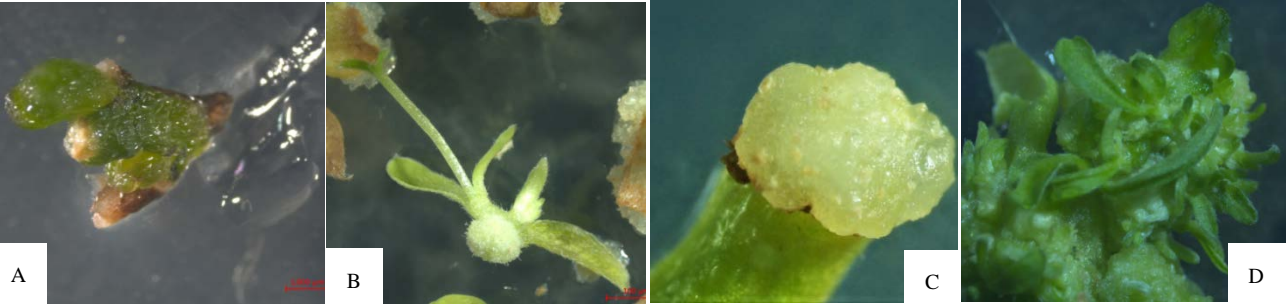
2.1 不同 6-BA 浓度和培养基对腋芽诱导的影响

由腋芽诱导试验结果表明 (表 1), 在 MS 培养基中的组培苗均出现玻璃化现象, 在添加 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的培养基中, 大部分组培苗出现玻璃化, 随着 6-BA 浓度的增加, 叶片的玻璃化程度加深; 在 WPM 培养基中, 添加 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 处理的组培苗未发生玻璃化, 生长状况最好, 腋芽诱导率达 45.3%, 随着 6-BA 浓度的增加, 叶片玻璃化程度逐渐加深, 芽诱导率呈先上升后下降趋势, 但各处理间的芽诱导率无显著差异, 这表明最佳的北江莞花腋芽诱导培养基是 WPM+ 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA (图 1A)。

表 1 不同 6-BA 浓度和培养基对北江莞花腋芽诱导的影响  
Table 1 Effect of different 6-BA concentration and medium on axillary bud induction

处理	基本培养基	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	诱导率/%	生长状况
1	MS	0.01	28.3±5.9b	叶片卷曲, 叶色较浅, 大部分玻璃化
2		0.10	44.4±6.8ab	叶片卷曲浓绿, 玻璃化严重
3		1.00	28.8±5.6b	叶片卷曲浓绿, 玻璃化严重
4	WPM	0.01	45.3±6.9ab	叶片舒展, 颜色较浅, 无玻璃化
5		0.10	49.2±6.6a	大部分叶片舒展, 颜色较浅, 少量叶片卷曲浓绿, 呈玻璃化
6		1.00	36.5±2.6ab	叶片卷曲浓绿, 玻璃化严重

注: 同列中不同小写字母表示同一器官不同处理间差异显著 (P < 0.05)。



A—腋芽膨大; B—茎段诱导不定芽; C—叶片诱导愈伤组织; D—愈伤组织分化成芽。

图 1 北江莞花组织培养过程的不同阶段

Figure 1 Different stages of tissue culture of *W. monnula*

2.2 不同浓度 2,4-D 和 TDZ 对愈伤组织诱导和芽诱导的影响

2.2.1 对愈伤组织诱导的影响 由愈伤组织诱导试验结果表明(表2),在MS培养基中未添加2,4-D处理,对愈伤组织诱导率较低;添加2,4-D后,随着2,4-D浓度的升高,愈伤组织诱导率呈上升趋势。在2,4-D浓度一定时,随着TDZ浓度的升高,愈伤组织诱导率呈先上升后下降趋势。处理8(2.0 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+4.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)的愈伤组织诱导率最高,达65.1%,与处理2(4.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)相比,愈伤组织诱导率增加了6.5倍。处理2的芽诱导率最高,与处理8相比,芽诱导率增加了2.8倍。

F检验结果表明(表3),TDZ和2,4-D对愈伤组织诱导均呈现出极显著性差异,TDZ和2,4-D的交互作用差异显著。因此,最适宜的愈伤组织诱导培养基是MS+2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+4 mg·L<sup>-1</sup> TDZ。

表 2 不同浓度 2,4-D 和 TDZ 对愈伤组织诱导和芽诱导的影响  
Table 2 Effect of different concentrations of 2,4-D and TDZ on callus and bud induction

处理	2,4-D/(mg·L <sup>-1</sup> )	TDZ/(mg·L <sup>-1</sup> )	愈伤诱导率/%	芽诱导率/%
1	0	0.4	0.0±0.0d	2.1±1.5bc
2		4.0	8.7±2.3d	7.3±2.1a
3		8.0	3.1±1.5d	1.5±1.1bc
4	0.2	0.4	30.7±4.9c	0.0±0.0c
5		4.0	64.7±3.8a	2.6±1.3abc
6		8.0	59.5±4.3a	1.5±1.1bc
7	2.0	0.4	43.6±4.5b	3.2±1.6abc
8		4.0	65.1±4.7a	1.9±1.3bc
9		8.0	47.2±4.9b	3.8±0.5abc

表 3 不同激素处理对愈伤组织诱导影响的方差分析  
Table 3 ANOVA on effect of different hormone treatments on callus induction

差异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
截距	34 675.917	1	34 675.917	530.462	0**
2,4-D	13 755.647	2	6 877.823	105.215	0**
TDZ	2 073.106	2	1 036.553	15.857	0**
2,4-D×TDZ	860.968	4	215.242	3.293	0.034*
误差	1 176.648	18	65.369		

注: \*表示差异显著(P<0.05), \*\*表示差异极显著(P<0.01)。下同。

2.2.2 对芽分化率的影响 由表4可知,未添加NAA时,随着TDZ浓度的升高,愈伤组织的芽分化率呈先上升后下降趋势;添加NAA后,随着TDZ浓度的升高,芽分化率呈上升趋势。处理6(1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA+2.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)的芽分化率与其他处理均存在显著差异(P<0.05),在该处理下芽分化率最大,达64.9%,较处理4(1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.4 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)增加了60%。

F检验结果表明(表5),TDZ、TDZ和NAA的交互作用对芽分化率的影响差异极显著(P<0.01)。因此,最佳的愈伤组织分化培养基为WPM+1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+2.5 mg·L<sup>-1</sup>TDZ(图1D)。

表 4 不同浓度 TDZ 和 NAA 对芽分化率的影响  
Table 4 Effect of different concentrations of TDZ and NAA on bud differentiation rate

处理	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	TDZ/(mg·L <sup>-1</sup> )	接种数/块	芽分化率/%
1	0	0.4	50	3.3±2.3d
2		1.0	50	40.1±6.4b
3		2.5	50	23.3±5.5c
4	1.0	0.4	50	4.9±2.8d
5		1.0	50	35.1±6.3bc
6		2.5	50	64.9±6.2a

表 5 不同处理对芽分化率影响的方差分析  
Table 5 ANOVA of effect of different treatments on bud differentiation rate

差异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
截距	14 723.852	1	14 723.852	120.814	0**
NAA	732.041	1	732.041	6.007	0.031
TDZ	5 524.029	2	2 762.014	22.663	0**
TDZ×NAA	1 904.734	2	952.367	7.815	0.007**
误差	1 462.461	12	121.872		

2.3 不同浓度 6-BA 和 NAA 对无菌苗不定芽增殖的影响

由增殖试验结果（表 6）表明，未添加 NAA 时，增殖系数偏低；添加 NAA 后，随着 6-BA 浓度的升高，增殖系数呈下降趋势，组培苗叶色逐渐变黄，褐化逐渐加重。在 6-BA 浓度一定时，随着 NAA 浓度的升高，增殖系数呈上升趋势。处理 3（0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA）的增殖系数最高，达 4.84，且无菌苗的生长状况良好（图 2A），较处理 9（3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.10 mg·L<sup>-1</sup> NAA）的增殖系数增加了近 1 倍。

表 6 不同浓度 6-BA 和 NAA 对增殖的影响  
Table 6 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on multiplication

处理	6-BA/（mg·L <sup>-1</sup> ）	NAA/（mg·L <sup>-1</sup> ）	增殖系数	生长状况
1	0.1	0	2.94 ± 0.23c	叶色较浅，无玻璃化，无褐化
2		0.01	4.06 ± 0.20b	叶色翠绿，无玻璃化，无褐化
3		0.10	4.84 ± 0.13a	叶色浓绿，无玻璃化，无褐化
4	1.0	0	2.39 ± 0.14c	叶色偏黄，无玻璃化，基本无褐化
5		0.01	3.55 ± 0.23b	叶色翠绿，无玻璃化，无褐化
6		0.10	3.58 ± 0.23b	叶色翠绿，无玻璃化，无褐化
7	3.0	0	1.88 ± 0.10c	叶色偏黄，无玻璃化，褐化较轻
8		0.01	2.58 ± 0.23c	叶色偏黄，无玻璃化，褐化较轻
9		0.10	2.44 ± 0.18c	叶色偏黄，无玻璃化，褐化较轻



A—无菌苗增殖；B—附加 1 000 mg·L<sup>-1</sup> PVP 的组培苗；C—附加 1 000 mg·L<sup>-1</sup> AC 的组培苗。

图 2 增殖培养

Figure 2 Multiplication culture

*F* 检验结果表明（表 7），6-BA 和 NAA 对无菌苗不定芽增殖均呈现出极显著性差异（*P* < 0.01），6-BA 和 NAA 的交互作用差异不显著。因此，最适宜北江莞花增殖的培养基为 WPM + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

表 7 不同处理对增殖影响的方差分析  
Table 7 ANOVA on effect of different treatments on multiplication

差异源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
截距	267.593	1	267.593	1 807.154	0**
6-BA	12.071	2	6.035	40.759	0**
NAA	7.698	2	3.849	25.994	0**
6-BA × NAA	1.474	4	0.368	2.488	0.08
误差	2.665	18	0.148		

2.4 不同浓度 PVP 和 AC 对组培苗生长的影响

在组培增殖过程中，许多植物会出现玻璃化现象，不利于后续的培养发育，所以需要组培苗进行壮苗培养<sup>[9]</sup>。由表 8 试验结果表明，与对照相比，添加 500 mg·L<sup>-1</sup> PVP 后增殖系数显著增加，为 4.94，当 PVP 浓度升高至 1 000 mg·L<sup>-1</sup> 时，增殖系数增加到 5.42，但 2 种 PVP 浓度处理的增殖系数无显著差异，植物叶片颜色变浅，叶形不变，茎变粗（图 2B）；与对照相比，添加 1 000 mg·L<sup>-1</sup> AC 后增殖系数增加，为 3.98，当 AC 浓度升高至 2 000 mg·L<sup>-1</sup> 时，增殖系数下降到 2.78，叶片颜色保持浓绿，叶形由卵圆形转变为披针形，部分植株叶片出现

黄化现象, 且低浓度 AC 处理, 植株高生长较快 (图 2C)。从后续生产角度考虑, 添加  $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PVP 处理增殖系数最高, 可获得更多生长健壮的幼苗。综合以上试验结果可知, 最适宜北江莞花壮苗的培养基为 WPM +  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PVP。

表 8 不同类型添加物 and 不同添加量对北江莞花生长状况的影响  
Table 8 Effect of different concentrations of PVP and AC on tissue cultured seedling growth

添加物种类	添加量/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	增殖系数	生长状况
对照	0	$3.73\pm 0.24\text{b}$	叶色浓绿, 卵圆形; 茎细, 部分玻璃化
PVP	500	$4.94\pm 0.33\text{a}$	叶色浅绿, 卵圆形; 基部块状, 无玻璃化
	1 000	$5.42\pm 0.25\text{a}$	叶色浅绿, 卵圆形; 基部块状, 茎粗, 无玻璃化
AC	1 000	$3.98\pm 0.23\text{b}$	叶色浓绿, 披针形; 部分高生长较快, 无玻璃化
	2 000	$2.78\pm 0.13\text{c}$	叶色浓绿, 披针形; 部分叶片黄化, 无玻璃化

3 讨论

组培快繁是实现种苗规模化生产的有效途径之一<sup>[10]</sup>。随着组培快繁技术的不断成熟, 该技术在珍稀濒危、资源紧缺的植物资源保护方面发挥着重要作用。Yadav<sup>[11]</sup>等使用三角叶杨 *Populus deltoids* 的叶片、根系、茎节等器官进行组培研究, 获得了完整植株。武梦瑶<sup>[12]</sup>以米槁 *Cinnamomum migao* 带芽茎段和叶片为外植体, 通过不定芽及愈伤组织的诱导、不定芽增殖培养、生根培养及炼苗移栽的过程, 成功获得再生植株。

3.1 直接器官发生途径诱导不定芽

瑞香科植物茎段常采用 6-BA 诱导不定芽<sup>[13]</sup>。本研究结果表明, 6-BA 浓度过高会抑制不定芽的形成, 并且芽苗质量差, 叶片玻璃化严重, 这与张虎等<sup>[14]</sup>对芫花 *Daphne genkwa* 茎段的诱导试验结果相似; 北江莞花对基本培养基类型较敏感, 高无机盐含量的 MS 培养基不利于不定芽诱导, 中等无机盐含量的 WPM 培养基更适宜茎段直接诱导不定芽<sup>[15]</sup>。

3.2 间接器官发生途径诱导不定芽

植物生长调节剂能促进愈伤组织的形成和不定芽的产生<sup>[16]</sup>, TDZ 对木本植物的再生非常有效, 而且需要较高浓度才能促进木本植物器官发生<sup>[17]</sup>。沈苗苗<sup>[18]</sup>研究发现 TDZ 对芍药 *Paeonia lactiflora* 愈伤组织诱导起到关键作用, 与 2,4-D 结合能更好地诱导外植体愈伤组织形成。本研究发现, 单独使用 TDZ 对愈伤组织诱导率较低, 加入 2,4-D 后对愈伤组织诱导率显著增加, TDZ 浓度过高时对愈伤组织诱导产生抑制作用<sup>[19]</sup>。这可能是由于 TDZ 对愈伤组织诱导的促进作用具有一定的浓度区间, 在适宜的含量区间内效果显著<sup>[20]</sup>。植物在不同阶段所需激素种类与浓度不尽相同, 2,4-D 是植物脱分化的重要激素, 因而在分化过程中不应添加, 而 NAA 有利于植株分化<sup>[21]</sup>。张娇等<sup>[22]</sup>在华北绣线菊 *Spiraea fritschiana* 试验中选择 TDZ 与 NAA 组合诱导不定芽, 植株分化后不定芽生长健壮。本试验结果表明, 以 TDZ 和 NAA 为外源激素, 通过浓度及配比的不同, 产生交互作用, 对植株的分化能力产生促进作用<sup>[23]</sup>。

本研究发现, 以茎段诱导腋芽培养、叶片愈伤组织诱导培养 2 种途径对北江莞花进行不定芽诱导, 2 种培养途径均有各自优势, 茎段诱导不定芽培养途径用时短, 但芽生长势较弱, 易玻璃化, 后续需壮苗培养; 愈伤组织诱导培养途径培养方式用时较长, 但芽诱导率高、生长势良好。因此, 对比发现, 茎段诱导培养可作为北江莞花不定芽诱导的最佳途径。

3.3 增殖培养

有研究表明, 单独使用细胞分裂素不利于丛生芽增殖和生长, 与生长素组合有利于丛生芽的诱导和增殖<sup>[24]</sup>。在瑞香科植物中, 徐强兴等<sup>[25]</sup>对土沉香 *Aquilaria sinensis*、江洪如等<sup>[26]</sup>对金边瑞香 *Daphne odora* 采用 6-BA 和 NAA 组合进行增殖试验, 增殖系数最高达 4.1。本研究结果表明, 6-BA 和 NAA 组合对北江莞花不定芽增殖效果较好, 增殖系数最高达到 4.84, 增殖系数高于二人所得实验结果; 6-BA 浓度要在较低水平才能获得理想的增殖率和生长势, 提高浓度会导致组培苗生长状况变差<sup>[27]</sup>。从研究结果初步推断, 高浓度 6-BA 处理可能会破坏



植物体内的激素平衡水平,从而抑制了芽的生长<sup>[28]</sup>。因此,在以 6-BA 诱导芽增殖时应选择合适的激素配比。

## 4 结论与展望

北江莞花幼嫩叶片和茎段分别采用两种方式进行不定芽诱导,以茎段为外植体诱导不定芽时,最佳诱导培养基为 WPM+0.01 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA,腋芽诱导率为 45.3%,诱导得到的芽生长状况良好,叶片舒展,颜色较浅,无玻璃化;以叶片为外植体诱导愈伤组织时,最佳诱导培养基为 MS+4 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D,愈伤组织诱导率为 65.1%;将诱导得到的愈伤组织转入分化培养基中培养,最佳分化培养基为 WPM+2.5 mg·L<sup>-1</sup> TDZ+1 mg·L<sup>-1</sup> NAA,芽分化率为 64.9%。以 6-BA 与 NAA 诱导北江莞花不定芽的增殖,不定芽的最佳增殖培养基为 WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA,增殖系数为 4.84。将长势较好的组培苗接入壮苗培养基中继续培养,在培养基 WPM+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1 000 mg·L<sup>-1</sup> PVP 中,增殖系数达到 5.42。

后续北江莞花组织培养的研究重点主要在以下两方面:一是对北江莞花无菌苗生根技术进行研究,二是对生根苗进行炼苗与移栽,从而建立一套北江莞花无菌苗再生体系,实现北江莞花产业化育苗。

## 参考文献:

- [1] 石永欣. 浅谈纳西族传统东巴造纸工艺[J]. 美术教育研究, 2015 (09): 54-55.
- [2] 中国科学院中国植物委员会. 中国植物志. 第五十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999, 52 (1): 312.
- [3] 张璐. 本经逢原[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2017: 112.
- [4] 李克烈, 王荣香, 陈伟, 等. 了哥王的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46 (07): 743-744.
- [5] 华佳文. 小美旱杨组织培养与苗木盐胁迫基因筛选研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [6] 邢小明. 波叶红果树愈伤组织诱导及抗逆性研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [7] 常苹. 水榆花楸组培快繁体系建立的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- [8] 曾文静. 几种国兰组织培养技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [9] GASPAR T, KEVERS C, DEBERGH P, et al. Vitrification: morphological, physiological, and ecological aspects[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Press Publ, 1987, 152-166.
- [10] ZHAO D, WANG X, LU W, et al. Plant regeneration via organogenesis from adventitious bud explants of a medicinal herb species, *Polygonatum cyrtoneura*[J]. In Vitro Cell Devel Biol Plant, 2003, 39 (1): 24-27.
- [11] YADAV R, ARORA P, KUMAR D, et al. High frequency direct plant regeneration from leaf, internode, and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoids*)[J]. Plant Biotechnol Rep, 2009, 3 (3): 175-182.
- [12] 武梦瑶. 米槁组织培养研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [13] 曹受金, 田英翠, 杨柳青. 金边瑞香的组织培养与快繁技术研究[J]. 江苏农业科学, 2007 (03): 115-116.
- [14] 张虎, 巫建新, 许建民, 等. 6-BA 与 ZT 对芫花茎段外植体组织培养的影响[J]. 江苏林业科技, 2018, 45 (04): 29-32, 53.
- [15] 杨瑞芹. 蔓越橘茎段离体快速繁殖与叶片再生体系建立[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012.
- [16] CENTENO M L, RODRÍGUEZ A, FEITO I, et al. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures[J]. Plant Cell Rep, 1996, 16 (1-2): 58-62.
- [17] HUETTEMAN C A, PREECE J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1993, 33 (2): 105-119.
- [18] 沈苗苗. 观赏芍药胚培养及茎段愈伤组织诱导研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [19] 王亚楠, 张湛仪, 赵李姗, 等. 紫果西番莲愈伤组织诱导分化及不定芽增殖研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2019, 39 (03): 155-160.
- [20] 王瑞敏, 沈瑒, 陈颖, 等. ‘高原之火’北美海棠叶片组培快繁再生体系[J]. 东北林业大学学报, 2020, 48 (07): 23-28, 39.
- [21] FINCHSAVAGE W, LEUBNER ETZGER G. Seed dormancy and the control of germination[J]. New Phytol, 2006, 171 (3): 501-523.
- [22] 张娇, 刘计璇, 李也, 等. 华北绣线菊 (*Spiraea fritschiana* Schneid.) 再生及遗传转化体系建立的研究[J]. 植物生理学报, 2016, 52 (12): 1851-1860.
- [23] 郭焯. 枣树优良品种叶片离体再生体系构建与多倍体诱导初探[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- [24] KUMAR R, NAJAR R A, GUPTA K B, et al. Micropropagation protocol for *Salvadora oleoides*[J]. J For Res, 2018, 30 (1): 87-93.
- [25] 徐强兴, 吴纪华, 周立赖. 土沉香的组织培养快繁技术研究[J]. 广东农业科学, 2006 (08): 44-46.
- [26] 江洪如, 余发新, 刘腾云, 等. 金边瑞香茎尖脱毒及快繁技术[J]. 南昌大学学报(理科版), 2008 (01): 59-61, 65.
- [27] MOREIRA-DIAS J M, MOLINA R V, BORDÓN Y, et al. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light[J]. Ann Bot, 2000 (1): 103-110.
- [28] 晏姝, 胡德活, 韦如萍, 等. 南洋楹组培快繁技术优化研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2017, 37 (06): 65-69.