维普资讯 http://www.cqvip.com

第36卷 第4期
2007年12月

西 部 林 业 科 学
Journal of West China Forestry Science

Vol. 36 No. 4
Dec. 2007

野生柱穗醉鱼草嫩芽的组培技术研究*

陈 贤，龚元圣，杨 德，关文灵
（云南农业大学，云南 昆明650201）

摘要：以野生柱穗醉鱼草的嫩芽为外植体，分诱导培养，茎芽增殖，继代培养，生根培养4个阶段进行其组培技术研究，结果表明：外植体消毒用0.1 %升汞液浸泡7 min效果较好；最佳的诱导培养基是MS+6-BA 0.5 mg/L + NAA0.02 mg/L；茎芽增殖培养基是MS+6-BA 0.5 mg/L +NAA0.02 mg/L；继代培养基是MS+6-BA 0.5 mg/L；生根培养基是MS+6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L+ AC 0.3 %。

关键词：柱穗醉鱼草；嫩芽；组陪技术
中图分类号：Q 949.776.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1672－8246（2007）04－0075－05

A Study on Tissue Culture of Tender Bud of *Buddleja cylindrostachya*

CHEN Xian, GONG Yuan-sheng, YANG De, GUAN Wen-ling
(Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201, P. R. China)

Abstract: Taking the tender bud as the explant, four stages of tissue culture of *B. cylindrostachya* namely induction, proliferation, subculture and rooting culture were studied. The experimental results showed that the best method for disinfection was soaking the explant in mercuric chloride of 0.1 % for 7 minutes. The best media for explant induction, bud proliferation, subculture and rooting induction were MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L, MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L, MS+6-BA 0.5 mg/L and MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L+AC 0.3 % respectively.

Key words: *Buddleja cylindrostachya*; tender bud; tissue culture

柱穗醉鱼草（*Buddleja cylindrostachya*）是马钱科醉鱼草属（*Buddleja*）的野生观赏植物。集中分布于滇中、滇南海拔高度1 300～2 700 m的山地，为常绿灌木，高可达5 m，紫红色或粉红色小花组成总状聚伞花序，密集成圆柱形，长15～40 cm。柱穗醉鱼草的花期11月至翌年元月，花期长，花序大而色泽幽雅，清香扑鼻；其叶和嫩枝密被白色星状毛和金黄色腺点，颇有观赏价值。目前国内外开发出的醉鱼草品种都在夏秋开花，而柱穗醉鱼草是该属植物中少有在冬季开花的物种，极具开发前景。国内对醉鱼草属植物栽培、繁殖技术的研究起步较晚，近年来只有该属少数植物如皱叶醉鱼草（*B. crispa*）引种栽培等的报道，而对柱穗醉鱼草繁殖、引种驯化方面的研究国内外均少见报道，本项研究对这一野生观赏植物的组培技术进行了探索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自生长于滇中哀牢山区的柱穗醉鱼草，所选的母株属灌木，长势良好，高约1.8 m，冠幅2 m，侧枝基部粗1.0 cm，分枝性强，其组培用的外植体选取该柱穗醉鱼草母株上秋季饱满的嫩芽。

* **收稿日期**：2007－05－12
第一作者简介：陈 贤（1972－），男，云南普洱人，硕士，讲师，主要从事园林园艺植物遗传育种、苗木生产和试验统计的教学与研究。
通讯作者简介：关文灵（1971－），男，云南新平人，博士研究生，副教授，主要从事园林植物及城市绿地规划方面的教学与研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 试验方法

以秋嫩芽为外植体的柱穗醉鱼草的组培试验分4阶段进行。第一阶段为诱导培养，第二阶段为茎芽增殖，第三阶段为继代培养，第四阶段为生根培养。

其组培用的培养基为MS培养基，含蔗糖30 g/L，琼脂6.5 g/L，pH值为5.8，培养温度23±2℃，每天12 h的日光灯辅助照明，强度约20 000 lx。参试因子为MS培养基中加入细胞分裂素6-BA的浓度（A因子），设3水平；加入生长素NAA的浓度（B因子），设4水平和外植体的升汞消毒时间（C因子），设3水平。柱穗醉鱼草嫩芽组培4阶段试验的参试因子及水平见表1。

其中：A_1为MS培养基中添加6-BA的浓度为0.1 mg/L，A_2为MS培养基中添加6-BA的浓度为0.5 mg/L，A_3为MS培养基中添加6-BA的浓度为1 mg/L；B_1为MS培养基中不添加NAA，B_2为MS培养基中添加NAA的浓度为0.02 mg/L，B_3为MS培养基中添加NAA的浓度为0.1 mg/L，B_4为MS培养基中添加NAA的浓度为0.5 mg/L；C_1为外植体，用0.1%升汞液浸泡4 min消毒，C_2为外植体，用0.1%升汞液浸泡7 min消毒，C_3为外植体，用0.1%升汞液浸泡10 min消毒。见表2。

表1 4个阶段的试验因子及水平汇总表

Tab. 1 Factors and levels of experiment

水平	因子		
	A	B	C
1	0.1	0	4
2	0.5	0.02	7
3	1	0.1	10
4		0.5	

（1）第一阶段（诱导培养）试验

本阶段试验含A因子、B因子和C因子各3水平。为了减少处理数，增加试验基数（重复数），把试验重点集中到重要的处理上，采用正交设计$L_9(3^4)$设置本阶段的试验内容。共9个处理，每处理15瓶，其试验的处理组合见表2。

培养基采用MS培养基，添加不同浓度的细胞分裂素6-BA（A因子）和不同浓度的生长素NAA（B因子）的组合。

试材取好后24 h内带回实验室，先剥掉嫩芽的最外叶，用毛笔刷掉嫩芽外叶上的绒毛，后用洗衣粉液浸泡一刻钟，用清水冲洗干净。

外植体洗净后转移至超净工作台上，在75%酒精中浸泡30 s，用无菌水冲洗3次，再用0.1%浓度的升汞液（C因子）浸泡不同时间，无菌水冲洗5次后接种于培养基上。

表2 第一阶段试验正交设计的处理组合

Tab. 2 Treatment combinations of orthogonal design of stage 1

处理	因子		
	A	B	C
1-1	A_1	B_1	C_3
1-2	A_2	B_1	C_1
1-3	A_3	B_1	C_2
1-4	A_1	B_2	C_1
1-5	A_2	B_2	C_2
1-6	A_3	B_2	C_3
1-7	A_1	B_3	C_2
1-8	A_2	B_3	C_3
1-9	A_3	B_3	C_1

注：试验采用正交设计$L_9(3^4)$法。

（2）第二阶段（茎芽增殖）试验

当外植体基部膨大形成愈伤组织，长出叶片，形成丛生芽时，把丛生芽转到增殖培养基上作第二阶段的茎芽增殖培养试验。第二阶段试验用的培养基仍为MS培养基，结合添加A因子2水平（A_1和A_2）和B因子3水平按交叉设计安排本项试验。本试验中的每处理各3瓶其试验处理组合见表3。

表3 第二阶段试验的处理组合

Tab. 3 Treatment combinations of orthogonal design of stage 2

处理	因子	
	A	B
2-1	$A_1=0.1$	$B_1=0$
2-2	$A_2=0.5$	$B_1=0$
2-3	$A_1=0.1$	$B_2=0.02$
2-4	$A_2=0.5$	$B_2=0.02$
2-5	$A_1=0.1$	$B_3=0.1$
2-6	$A_2=0.5$	$B_3=0.1$

（3）第三阶段（继代培养）试验

对茎芽增殖后的再生植株进行扩繁，转到继代培养基上进行继代培养试验。本阶段参试的培养基为无NAA情形下的MS+6-BA，其设A因子3水平的处理，每处理15瓶（处理组合见表4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4　第三阶段试验的处理组合

Tab. 4　Treatment combinations of orthogonal design of stage 3

A因子（培养基中6-BA的浓度）		
A_1	A_2	A_3
处理3-1	处理3-2	处理3-3

（4）第四阶段（生根培养）试验

经过多次继代培养后，得到大量无根试管苗。将无根苗转接到生根培养基上进行生根培养试验。在温度23±2℃，光照14~16 h的培养室中进行本阶段的培养试验。其培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+AC（活性炭）0.3 %+B因子3水平的处理，每处理40瓶，其处理组合见表5。

表5　第四阶段试验的处理组合

Tab. 5　Treatment combinations of orthogonal design of stage 4

B因子（培养基中NAA的浓度）		
B_2	B_3	B_4
处理4-1	处理4-2	处理4-3

2　试验结果与分析

2.1　第一阶段诱导培养的试验结果

柱穗醉鱼草秋嫩芽外植体接种1周后，其芽开始膨大，萌动，随后长出叶片，并在膨大的芽基部形成愈伤组织。培养20天后，对汞消毒时间（C因子）的效果统计表明（如表6），在行柱穗醉鱼草嫩芽外植体消毒时，用0.1 %升汞液浸泡7 min（C_2水平）的效果较好，既可基本杀死外植体的微生物，又不毒害芽体。

表6　不同升汞消毒时间对外植体的消毒效果

Tab. 6　Mercuric chloride disinfection effect of different soaking time

升汞消毒时间(C因子)	污染率/%	成活率/%
C_1	100	0
C_2	13	38
C_3	6.6	0

柱穗醉鱼草嫩芽外植体诱导培养即第一阶段试验的较好的处理有：处理1-5（A_2、B_2、C_2），处理1-3（A_3、B_1、C_2），处理1-7（A_1、B_3、C_2），其结果见表7。处理1-5的诱导产物为丛生芽；处理1-3的诱导产物为愈伤组织，有少量丛生芽；处理1-7的诱导产物为愈伤组织。其中以处理1-5（培养基中添加6-BA的浓度为0.5 mg/L，NAA浓度为0.02 mg/L）的效果最好，其芽萌动最快，芽粗壮，颜色浓绿，分化的节数最多，培养5周后，可诱导出4~5个节，所以在用柱穗醉鱼草嫩芽作组培外植体时，其诱导培养阶段的诱导培养基以MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L为宜。

表7　3个较好处理的芽分化情况

Tab. 7　Bud differentiation of three good treatments

处理	1-5	1-3	1-7
芽平均分化率/%	50	33	22

2.2　第二阶段茎芽增殖的试验结果

将柱穗醉鱼草的无菌芽转接到含不同激素配比的增殖培养基上作第二阶段的茎芽增殖培养。约5天后从芽基部出现愈伤组织，10天后从愈伤组织上分化出丛生芽，在不同激素配比的培养基上丛生芽的数量及长势存在差异，较好处理的效果如下（见表8）。

处理2-1　芽细弱，颜色较浅，叶对数少；处理2-4　芽粗壮，颜色深绿，叶对数最多；处理2-6　芽少，基部有较多的浅黄略带透明的愈伤组织团。

处理2-1的效果表明，在进行柱穗醉鱼草嫩芽组培的茎芽增殖时，在其培养基中不加入NAA的情况下，同样能使其芽增殖。处理2-1与处理2-4的柱穗醉鱼草芽愈伤组织和丛生芽出现的时间一致；处理2-6芽愈伤组织出现的时间与前两者一致。其中以处理2-4的芽增殖效果最好，其芽的增殖倍数高，且增殖出来的芽颜色深绿，故较适宜的柱穗醉鱼草嫩芽外植体组培茎芽增殖培养基以MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L为佳。

表8　茎芽增殖较好处理的效果

Tab. 8　Effect of bud proliferation of three good treatments

处理	因子		芽平均增殖倍数
	A	B	
2-1	0.1 (A_1)	0 (B_1)	3
2-4	0.5 (A_2)	0.02 (B_2)	5
2-6	0.5 (A_2)	0.1 (B_3)	2

2.3　第三阶段继代培养的试验结果

在上述培养的基础上，在其培养基中加入不同浓度的6-BA进行柱穗醉鱼草嫩芽外植体组培的继

维普资讯 http://www.cqvip.com

代培养。7 天后观察到有愈伤组织的出现，顶芽生长。当培养到第 10 天时，在愈伤组织上出现了第一批丛生芽，各处理的生长状况如下（见表 9）。

处理 3 - 1 颜色较深，基部愈伤组织较少；丛生芽较少，高 3 ~ 4 cm；茎杆粗壮，叶腋内着生较多小枝。

处理 3 - 2 颜色鲜绿，愈伤组织量居中；丛生芽最多，高 2 ~ 3 cm；叶腋很少抽枝。

处理 3 - 3 颜色较浅，基部易形成愈伤组织，其上着生有少量丛生芽；高 1 ~ 2 cm；茎杆矮小细弱。

表 9 各处理的继代培养效果比较

Tab. 9 Effect comparison of subculture of different treatments

处理	A 因子	芽平均增殖倍数
3 - 1	0.1 (A_1)	10
3 - 2	0.5 (A_2)	13
3 - 3	1.0 (A_3)	7

从表 9 的柱穗醉鱼草嫩芽继代培养的试验结果可以看出，在其培养基不加入 NAA 的情形下，培养基中适当浓度的 6-BA 能大量诱导其丛生芽的出现，表明本阶段组培所用的培养基以处理 3 - 2（加入 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 的培养基）增殖倍数最高，丛生芽出现数量最多，腋芽出现少。加入的 6-BA 浓度过低、过高都不宜，较适宜的柱穗醉鱼草嫩芽外植体继代培养的培养基以用 MS + 6-BA 0.5 mg/L 为佳 。

表 10 各处理的生根培养效果比较

Tab. 10 Effect comparison of rooting culture of different treatments

处理	A 因子	生根率/%	5% 显著水平	1% 显著水平
4 - 1	0.02	53.85	a	A
4 - 2	0.1	39.47	b	B
4 - 3	0.5	39.13	b	B

注：方差分析中，F 值为 11.495**，$F_{0.01}$ (2, 9) = 8.022。

2.4 第四阶段生根培养的试验结果

柱穗醉鱼草嫩芽外植体经多次继代培养形成无根试管苗，转接到生根培养基上作第四阶段的生根培养，10 天后开始生根。25 天后统计其结果（如表 10）。处理 4 - 1、处理 4 - 2 和处理 4 - 3 三种生根培养基对柱穗醉鱼草芽诱导生根条数存在极显著性差异，以处理 4 - 1（加入 NAA 浓度为 0.02 mg/L）生根率最高，故较适宜的柱穗醉鱼草嫩芽生根培养的培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L + AC 0.3 % 。

3 结论和讨论

（1）本项研究结果表明：在应用柱穗醉鱼草的秋嫩芽作外植体进行组培时，其外植体的消毒用 0.1 % 升汞液浸泡 7 min 效果较好，既可基本杀死其上微生物，而又不毒害外植体。组培过程中较适宜的诱导培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA0.02 mg/L，茎芽增殖培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L，继代培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L，生根培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.02 mg/L + AC 0.3 % 。

（2）柱穗醉鱼草的组织快繁增殖倍数较高，每 5 ~ 6 周继代一次，每次可增殖约 10 ~ 13 倍，因此，用组培方法可实现柱穗醉鱼草快速繁殖的目的，以解决大量园林绿地栽培对其的需要。当前柱穗醉鱼草组织培养技术的研究少见报道，本试验所研究出的柱穗醉鱼草嫩芽组培各阶段较适宜的培养基配方还有待进一步完善。

（3）在柱穗醉鱼草的组织培养中，外植体消毒是一个比较重要的环节。在其芽膨大的始期，因芽表面密被白色星状毛消毒不易彻底，加上柱穗醉鱼草对消毒剂特别敏感，稍过量便会中毒死亡，此特性在其组培中应给予关注。

[下转第 86 页]

维普资讯 http://www.cqvip.com

(5):106-109.

[6]李 昆,崔永忠,张春华,等.金沙江干热河谷区退耕还区造林树种的育苗技术[J].南京林业大学学报(自然科学版),2003,127(6):89-92.

[7]马焕成.干热河谷造林新技术[M].昆明:云南科技出版社,2001.

[8]South DB,Boyer. JN,Bosch I, Survival Bad growth of loblolly pines as influenced by seedbed grade:13 - year results [J]. South J. Appl. F0r,1985,9(2):74-78.

[9]Caulfield J P. South DB、Beyer. JN Nursery seedbed density is determined by short - term or long term objectives [J]. South J. Appl. For,1987(11):9-14.

[10]South D B. Rationale for growing southern piae seedlings at low seedbed densities[J]. New Forests,1993(7):63-92.

[11]中国林业标准汇编(种苗卷)[S].北京:中国标准出版社,1998.

[上接第78页]

参考文献:

[1]孙卫邦,孔繁才.云南柱穗醉鱼草观赏植物资源的调查研究[J].园艺学报,2002,29(1):81-83.

[2]杨 德.试验设计与分析[M].北京:中国农业出版社,2002.

[3]季 蒙.胡也醉鱼草引种及繁殖栽培技术研究[J].辽宁林业科技,1996(4):5-7.

[4]段新玲,苏雪痕.蓝花大叶醉鱼草组培快速繁殖的研究[J].林业科技通讯,1999(10):17-19.

[5]孔卫邦,孔繁才.紫花醉鱼草种子萌发条件的研究[J].种子,2002(6):8-9.

[6]关文灵,陈贤.醉鱼草观赏植物资源及其利用[J].西南农业学报,2006,19(增刊):371-374.

[7]曾春霞,孙卫邦.花叶日本醉鱼草的微型快繁[J].植物生理学通讯,2004,40(2):199.

[8]Miller A.. The distribution and ecology of *Buddleja davidii* Fr. in Britain, with particular reference to condition supporting germination and the establishment of seeding[M]. D. Phil. thesis. CNAA: Oxford Polytecnic,1984.

[9]段新玲,任岁动,于军.白花大叶醉鱼草的离体培养和植株再生[J].植物生理学报,2002(12):533.

[10]余朝秀,关文灵.野百合组织培养的研究[J].西部林业科学,2005,34(2):76-78.

[11]罗思宝,黄 萍,张时刚,等.泸定百合多倍体诱导试验[J].西部林业科学,2007,36(1):74-78.