

## 新塔花的组织培养与快速繁殖

马丽娜<sup>1</sup>, 何江<sup>1,2</sup>, 李冠<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐830046

<sup>2</sup>新疆药物研究所, 乌鲁木齐830004

**摘要:**以新疆特有药用植物新塔花(*Ziziphora bungeana* Juz.)幼嫩茎段为外植体材料, 筛选初代培养、继代增殖与生根培养的条件, 建立了新塔花组织培养与快速繁殖体系。结果表明: 新塔花种子最适萌发培养基为MS+0.25 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 萌发率达57.78%; 茎段诱导腋芽最适培养基为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 诱导率为90.47%; 适宜芽增殖培养基为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+35 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, 20 d增殖系数达1.95; 最佳诱导根生长培养基为1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2% AC, 生根率达60%, 平均生根数为3.5, 20 d株高达4.5 cm。移栽至混合基质(营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1)中, 组培苗成活率为80.45%。

**关键词:**新塔花; 组织培养; 快速繁殖; 茎段

新塔花(*Ziziphora bungeana* Juz.)是唇形科(Labiatae)新塔花属多年生芳香半灌木植物, 别名小叶薄荷、唇香草(何江等2016)。国外主要分布于俄罗斯、中亚、中东等地, 我国仅分布于新疆, 是当地特有地产药材之一。性味辛、凉, 在治疗感冒咽痛、目赤肿痛、发热头痛、心悸失眠等症状中普遍应用, 并对强心利湿、理气化痰、消炎散结、疏散风热、清利头目等(刘勇民1999)有良好功效。有报道称其在临床上被用于治疗高血压、冠心病及心脑血管等疾病(Srivedavyasari等2015), 此外还具有抗心肌缺血的功能; 同时在心脏病与气管炎, 气短多汗, 水肿及肺脓肿等疾病治疗(Ozturk和Ercisli 2007)中均有应用。

目前, 关于唇形科植物的组织培养与快速繁殖多集中于小新塔花、百里香、薄荷、丹参等植物中, 并已达到相对成熟的阶段。如: 李晓东等(2009)以带腋芽的茎段为材料建立普通百里香的快繁体系; 徐世千等(2011)以百里香茎段和叶片为材料, 进行愈伤组织诱导, 发现茎段诱导效果更好。目前新塔花的组织培养未见相关报道。

近年来, 随着新塔花的药用价值被发现, 其宏观与形态解剖的鉴定(Karlygash等2016a)、有效成分提取工艺的优化(许云章等2013)、精油化学组分的分析和抑菌功效(Karlygash等2016b)等方面的研究逐步深入。目前已有“天香丹”等新塔花产品的出现, 随着其不断开发, 新塔花的规模化种植显得越来越重要。但是, 目前新塔花栽培中常出现苗期死亡、生长缓慢、种子成苗率低以及夏季病虫害等问题。本文以组织培养技术建立新塔花离

体快速繁殖体系, 以期在短时间内得到生长状况良好、大小均一、遗传性一致的组培苗, 这不仅能提高新塔花种苗的培育速率, 降低病菌及虫害对植物的侵扰, 加快其生产, 而且对种质优化与创新都具有重要意义, 并为其规模化生产提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

新塔花(*Ziziphora bungeana* Juz.)种子由新疆药物研究所何江副研究员鉴定提供。采集地位于新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市南山(N: 87°10'40.40", E: 43°29'43.18"), 采集时间为6月末至7月中旬。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 培养基的配制及培养条件

采用MS或1/2MS为基本培养基, 其蔗糖含量3%, 琼脂含量0.7%, pH 5.8~6.0, 高压灭菌条件为116°C 30 min。分别向各培养阶段的培养基中加入不同植物生长调节剂; 培养室温度为24~27°C, 光照强度60~70 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间16 h·d<sup>-1</sup>。

#### 1.2.2 种子消毒

选取饱满种子(千粒重: 0.240 g)置于含75%酒精的1.5 mL EP管中, 浸泡并振荡消毒40~50 s后, 无菌水冲洗3次; 再加入2% NaClO溶液消毒(时间为2、4和8 min), 用无菌水冲洗5次后将种子沥干, 放置于铺有无菌滤纸的培养皿上用于后续实验。

收稿 2018-06-22 修定 2018-07-16

资助 新疆维吾尔自治区天山创新团队计划(2017D14014)。

\* 通讯作者(guanli@xju.edu.cn)。

### 1.2.3 无菌苗的获得

将消毒灭菌后的种子置于含不同浓度植物生长调节剂(6-BA: 0.4、0.6、0.8、1.0 mg·L<sup>-1</sup>; NAA: 0.1、0.15、0.2、0.25 mg·L<sup>-1</sup>)的培养基中, 每个浓度3组重复, 每个重复种子数目为30粒, 接种15 d后统计萌发率, 30 d后测量株高, 筛选出适宜种子萌发的条件。萌发率=(15 d萌发种子数量/接种种子数量)×100%; 污染率=(15 d污染种子数量/接种种子数量)×100%。

### 1.2.4 腋芽诱导培养

将萌发30 d的无菌苗切成1 cm带有节位的小茎段, 分别置于由6-BA (0、1.0、1.5、2 mg·L<sup>-1</sup>)与NAA (0.1、0.2、0.3 mg·L<sup>-1</sup>)配比组成的10种MS培养基上, 每种培养基上接种7个茎段用于诱导外植体, 重复3组, 培养20 d后观察并统计苗玻璃化数、腋芽诱导率、株高和生长状况等相关指标。腋芽诱导率=(20 d萌芽外植体数量/接种外植体数量)×100%。

### 1.2.5 腋芽增殖培养

通过L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)设计进行4因素3水平的正交试验, A、B、C、D四种因子分别为6-BA (0.5、1、2 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA (0.1、0.2、0.3 mg·L<sup>-1</sup>)、GA<sub>3</sub> (0、0.3、0.5 mg·L<sup>-1</sup>)、蔗糖(25、30、35 g·L<sup>-1</sup>)。以不同配比含量组合下单芽在继代培养20 d后的芽增殖系数为考察指标, 比较四种因素对芽增殖的影响状况。根据正交设计进行9组实验, 每组重复3次, 每次接种10个诱导的单芽。芽增殖系数=培养20 d后的总芽数/接种时的茎节数。

### 1.2.6 生根培养

以大小、长度和生长状况一致的无根芽苗为材料, 在1/2MS培养基中添加不同浓度NAA (0.5、1、1.5、2 mg·L<sup>-1</sup>)或IAA (0.5、1、1.5 mg·L<sup>-1</sup>), 初步筛选适宜无根芽苗生根的生长素浓度, 每个浓度重复3次, 每次接种数为8; 进一步研究活性炭(0.1%、0.2%、0.5%)与NAA (0.25、0.5、0.75 mg·L<sup>-1</sup>)不同配比组合对生根的影响, 每个组合接种量为10。接种后观察芽苗的生根与生长情况, 并于20 d后统计相关指标: 生根率、平均生根数、根长和芽生长状况等。生根率=(生根总苗数/接种总苗数)×100%。

### 1.2.7 炼苗移栽

将上述新塔花生根苗瓶盖拧松置于组培室中

培养20 d, 之后移入温室内炼苗4 d, 完全打开瓶盖继续炼苗3 d后进行移栽; 将其从培养瓶中取出并用温水洗净根的基部, 移栽至罩有薄膜的混合基质(营养土:珍珠岩:蛭石=1:1:1)中, 保证一定的温湿度及光照条件, 20 d后统计组培苗的移栽成活率。成活率=(成活苗数/移栽苗数)×100%。

### 1.2.8 数据分析

试验所得数据选用SPSS 19.0和Excel 2010软件进行结果分析。

## 2 实验结果

### 2.1 新塔花的初代培养

#### 2.1.1 消毒时间的筛选

新塔花种子的污染率随2% NaClO消毒时间的增加而下降(表1), 接种5 d后种子开始萌动并露出胚根, 15 d后长出绿色子叶(图1-A)。当消毒时间4 min时, 萌发率为46.67%; 当消毒时间延长至8 min时, 萌发率降低为32.67%, 这说明过长的消毒时间, 消毒剂会对种子产生一定的毒害作用。种子消毒时间为4 min的萌发率显著高于其他消毒时间, 所以4 min为2% NaClO适宜消毒时间。

#### 2.1.2 无菌苗的获得

与对照组相比, 6-BA显著( $P<0.05$ )提高无菌种子萌发率(表2), 且随其浓度不断升高萌发率呈先增加后降低趋势, 在0.8 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA时萌发率最高, 为55.56%。当NAA为0.25 mg·L<sup>-1</sup>时, 种子萌发率为57.78% (表3), 无菌苗长势较好, 茎节间大; 萌发率随NAA浓度增加而增加, 30 d苗高2.0 cm以上。

#### 2.1.3 腋芽的诱导

在接种3~5 d后茎段的叶位处开始萌芽, 随后长出嫩绿色腋芽。研究发现6-BA对腋芽的诱导作用极显著( $P<0.01$ ); 而NAA的诱导作用不显著( $P>$

表1 2% NaClO不同消毒时间对新塔花种子消毒效果的影响  
Table 1 Effect of different disinfection time on the seed disinfection of *Ziziphora bungeana* Juz. by 2% NaClO

| 消毒时间/min | 污染率/%      | 萌发率/%                   |
|----------|------------|-------------------------|
| 2        | 27.33±0.24 | 30.67±3.05 <sup>b</sup> |
| 4        | 0          | 46.67±3.05 <sup>a</sup> |
| 8        | 0          | 32.67±3.05 <sup>b</sup> |

同列数据后小写英文字母表示不同处理间经Duncan法检验差异显著( $P<0.05$ ), 下表同此。



图1 新塔花茎段的组培快繁

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of *Ziziphora bungeana* Juz. via stem segment

A: 种子萌发15 d; B: 外植体腋芽诱导培养20 d; C: 芽增殖培养20 d; D: 增殖芽的根生长20 d; E: 增殖芽生根培养20 d; F和G: 添加活性炭生根培养20 d; H: 组培苗瓶盖拧松后在组培室中培养20 d并置于温室中炼苗7 d后, 移栽20 d的生长情况。

表2 6-BA对新塔花种子萌发率的影响

Table 2 Effect of 6-BA on the seed germination rate of *Ziziphora bungeana* Juz.

| 6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 萌发率/%                    |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 0                                     | 32.22±5.09 <sup>b</sup>  |
| 0.4                                   | 47.78±10.18 <sup>a</sup> |
| 0.6                                   | 53.33±6.67 <sup>a</sup>  |
| 0.8                                   | 55.56±1.92 <sup>a</sup>  |
| 1.0                                   | 51.11±1.92 <sup>a</sup>  |

表3 NAA对新塔花种子萌发率与无菌苗株高的影响

Table 3 Effect of NAA on seed germination rate and plant height of *Ziziphora bungeana* Juz.

| NAA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 萌发率/%                    | 株高/cm                |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| 0                                    | 27.78±1.92 <sup>b</sup>  | 0.7±0.2 <sup>b</sup> |
| 0.10                                 | 26.67±0.00 <sup>b</sup>  | 2.7±0.6 <sup>a</sup> |
| 0.15                                 | 33.33±3.34 <sup>b</sup>  | 2.0±0.9 <sup>a</sup> |
| 0.20                                 | 34.44±8.39 <sup>b</sup>  | 2.7±1.3 <sup>a</sup> |
| 0.25                                 | 57.78±18.95 <sup>a</sup> | 2.8±1.1 <sup>a</sup> |

0.05), 但添加一定浓度的NAA会提高腋芽诱导率, 且随其浓度升高茎段基部会产生少量黄褐色或绿色愈伤组织(表4)。在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA下茎段诱导腋芽的效果与生长状况最好, 为腋芽诱导的最佳条件, 诱导率高达90.47%, 芽高约

1.4 cm, 茎嫩绿, 叶大(图1-B); 当培养基为MS+ $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA时, 诱导腋芽株高最高, 平均达1.5 cm, 但诱导率较低(57.14%)。研究发现随6-BA浓度的增加, 腋芽的玻璃化现象严重, 这说明高浓度的6-BA不利于腋芽诱导和生长。

## 2.2 新塔花的继代增殖培养

由表5可知四种因素对新塔花芽增殖的影响效果为:  $\text{GA}_3 > 6\text{-BA} > \text{蔗糖} > \text{NAA}$ , 这表明不同因素组合对芽增殖的影响趋势不同。通过正交试验筛选出适宜芽增殖最优组合为 $\text{A}_1\text{B}_1\text{C}_2\text{D}_3$ 或 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_2\text{D}_3$ , 验证发现芽在 $\text{A}_1\text{B}_1\text{C}_2\text{D}_3$ 下增殖系数为1.95, 芽生长状况良好, 茎、叶均嫩绿色(图1-C), 在 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_2\text{D}_3$ 下增殖系数为1.83, 故适宜诱导芽增殖的培养基为MS+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{GA}_3$ + $35\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。

## 2.3 新塔花的生根培养与移栽

### 2.3.1 生长素对生根的影响

新塔花无根苗在单独使用NAA或IAA时, 均能在1周内诱导生根(表6), 其中NAA的诱导效果更好。随IAA浓度升高, 生根率、生根数及根长等指标均下降且生长的苗纤细, 培养基中添加IAA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 无根苗的生根数与生根率较对照显著提高。随NAA浓度升高, 与对照相比生根率

表4 不同浓度6-BA与NAA配比对新塔花腋芽诱导的影响

Table 4 Effect of different proportions of 6-BA and NAA on axillary bud induction of *Ziziphora bungeana* Juz.

| 激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> |     | 玻璃化数/个 | 诱导率/%                     | 株高/cm                 | 生长状况(20 d)         |
|-------------------------|-----|--------|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| 6-BA                    | NAA |        |                           |                       |                    |
| 0.5                     | 0   | 0      | 80.95±8.25 <sup>ab</sup>  | 0.8±0.2 <sup>c</sup>  | 叶大, 茎绿, 基部稍膨大      |
| 0.5                     | 0.1 | 0      | 90.47±8.25 <sup>a</sup>   | 1.4±0.8 <sup>ab</sup> | 叶大, 茎粗且绿, 基部稍膨大    |
| 0.5                     | 0.2 | 0      | 76.19±8.25 <sup>ab</sup>  | 1.1±0.6 <sup>bc</sup> | 叶小, 茎粗, 基部稍膨大      |
| 0.5                     | 0.3 | 1      | 80.95±8.25 <sup>ab</sup>  | 0.9±0.6 <sup>c</sup>  | 叶大, 茎粗, 基部少量愈伤     |
| 1.0                     | 0.1 | 2      | 80.95±21.82 <sup>ab</sup> | 0.8±0.4 <sup>c</sup>  | 叶大, 茎粗, 基部膨大       |
| 1.0                     | 0.2 | 2      | 71.42±14.29 <sup>ab</sup> | 1.0±0.6 <sup>c</sup>  | 叶大, 茎绿, 基部少量愈伤     |
| 1.0                     | 0.3 | 2      | 85.71±14.29 <sup>ab</sup> | 0.8±0.2 <sup>c</sup>  | 叶大, 茎粗且绿, 基部少量愈伤   |
| 2.0                     | 0.1 | 4      | 61.90±21.82 <sup>ab</sup> | 1.1±0.5 <sup>bc</sup> | 茎有粗有细, 基部稍膨大, 丛生芽少 |
| 2.0                     | 0.2 | 5      | 57.14±14.29 <sup>b</sup>  | 1.5±0.6 <sup>a</sup>  | 茎粗, 基部稍膨大, 长势不齐    |
| 2.0                     | 0.3 | 5      | 57.14±14.29 <sup>b</sup>  | 1.3±0.6 <sup>ab</sup> | 茎粗, 基部少量愈伤, 长势不齐   |

表5 不同因素组合对新塔花增殖的影响

Table 5 Effect of different factor combination on the propagation of *Ziziphora bungeana* Juz.

| 序号  | 因素                      |                        |                                     |                       | 增殖系数                    |
|-----|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
|     | 6-BA/mg·L <sup>-1</sup> | NAA/mg·L <sup>-1</sup> | GA <sub>3</sub> /mg·L <sup>-1</sup> | 蔗糖/mg·L <sup>-1</sup> |                         |
| 1   | 0.5                     | 0.1                    | 0                                   | 25                    | 0.80±0.20 <sup>bc</sup> |
| 2   | 0.5                     | 0.2                    | 0.3                                 | 30                    | 1.33±0.40 <sup>b</sup>  |
| 3   | 0.5                     | 0.3                    | 0.5                                 | 35                    | 0.83±0.21 <sup>bc</sup> |
| 4   | 1.0                     | 0.1                    | 0.3                                 | 35                    | 1.83±0.06 <sup>a</sup>  |
| 5   | 1.0                     | 0.2                    | 0.5                                 | 25                    | 0.50±0.10 <sup>c</sup>  |
| 6   | 1.0                     | 0.3                    | 0                                   | 30                    | 0.70±0.40 <sup>bc</sup> |
| 7   | 2.0                     | 0.1                    | 0.5                                 | 30                    | 0.37±0.12 <sup>c</sup>  |
| 8   | 2.0                     | 0.2                    | 0                                   | 35                    | 0.53±0.26 <sup>c</sup>  |
| 9   | 2.0                     | 0.3                    | 0.3                                 | 25                    | 0.63±0.26 <sup>c</sup>  |
| 均值1 | 0.989                   | 1.000                  | 0.678                               | 0.644                 |                         |
| 均值2 | 1.011                   | 0.789                  | 1.267                               | 0.800                 |                         |
| 均值3 | 0.511                   | 0.722                  | 0.567                               | 1.067                 |                         |
| 极差  | 0.500                   | 0.278                  | 0.700                               | 0.423                 |                         |

表6 生长素种类及其浓度对新塔花根系分化的影响

Table 6 Effect of different auxin species and concentrations on differentiation of rooting of *Ziziphora bungeana* Juz.

| 激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> |     | 生根率/%                    | 生根数                    | 根长/cm                 | 生长状况(20 d)      |
|-------------------------|-----|--------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|
| NAA                     | IAA |                          |                        |                       |                 |
| 0                       | 0   | 33.3±7.2 <sup>bc</sup>   | 4.6±2.4 <sup>d</sup>   | 1.6±0.6 <sup>a</sup>  | 根细, 长, 无须根      |
| 0.5                     | 0   | 62.5±12.5 <sup>a</sup>   | 10.6±3.2 <sup>a</sup>  | 1.1±0.2 <sup>b</sup>  | 根较粗, 有须根        |
| 1                       | 0   | 58.3±7.2 <sup>a</sup>    | 7.7±2.1 <sup>abc</sup> | 0.6±0.1 <sup>c</sup>  | 根粗(棒状), 表面有短小绒毛 |
| 1.5                     | 0   | 50.0±12.5 <sup>abc</sup> | 8.1±3.7 <sup>abc</sup> | 0.4±0.1 <sup>cd</sup> | 根粗(棒状), 短       |
| 2                       | 0   | 58.3±12.5 <sup>a</sup>   | 8.4±2.7 <sup>ab</sup>  | 0.3±0.1 <sup>d</sup>  | 根粗(棒状), 短       |
| 0                       | 0.5 | 54.2±19.1 <sup>ab</sup>  | 7.8±4.1 <sup>abc</sup> | 0.6±0.1 <sup>c</sup>  | 根微粗, 有须根        |
| 0                       | 1   | 50.0±12.5 <sup>abc</sup> | 5.2±3.8 <sup>cd</sup>  | 0.4±0.1 <sup>cd</sup> | 根粗, 短           |
| 0                       | 1.5 | 29.2±7.2 <sup>c</sup>    | 7.4±2.4 <sup>bcd</sup> | 0.3±0.1 <sup>d</sup>  | 根粗(棒状), 短       |

与生根数均增加, 但根也显著变短且易棒状化。 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA为适宜生根浓度, 根系较粗但基部有少量浅褐色愈伤组织(图1-D), 有须根分化现象, 生根苗长势虽好但茎纤细不利于植株移栽成活(图1-E), 生根率与平均生根数分别为62.5%和10.6。

### 2.3.2 活性炭对生根的影响

在只添加生长素的1/2MS培养基上小苗基部有不同程度的黄色或棕色愈伤组织, 故通过添加活性炭(AC)来减轻此情况以期达到壮苗效果(表7)。当不加生长素只添加AC, 随AC浓度增加, 生根率、生根数均先增加后降低; 在0.2% AC下生根数最高为5.8, 但植株矮小。当培养基中NAA为 $0.25\sim 0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生根数随AC浓度增加而呈现先增加后降低趋势; 当 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ 0.2% AC时, 生根率达60%, 生根数为3.5, 苗粗壮且长势良好(图1-F), 植株高达4.5 cm (图1-G); 故1/2MS+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+0.2% AC为适宜新塔花生根的条件。

### 2.3.3 组培苗移栽

增殖芽生根培养20 d后, 进行炼苗与移栽。移栽成活率达80.45%。移栽成活20 d后, 观察发现叶片变厚且表面气孔增多, 颜色深绿(图1-H)。

## 3 讨论

新塔花作为新疆特有的传统药材, 具有很好的药用价值与研究前景, 其野生资源已远不能满足市场需求。试验以种子萌发获得无菌苗, 通过幼嫩茎段诱导丛生芽进行扩繁, 首次建立了新塔花组培快繁体系。新塔花种苗的人工快速繁殖生

产, 对解决因滥采滥挖造成的野生资源破坏与流失等问题, 以及新塔花的合理开发与利用具有重要意义。新塔花为多年生半灌木植物, 因其生长环境使植株本身具有多种微生物, 故试验不直接选择野生植株茎段为外植体; 而其种子较小(王红丽等2014), 若生长在不适宜的环境条件下较易失去活力, 难以萌发; 所以试验以种子萌发的无菌苗茎段为外植体, 诱导出的腋芽不仅污染现象较少且易于再生而产生个体(罗士韦1979)。由于新塔花种子萌发率较低, 参考张春梅等(2013)筛选适宜银斑百里香种子萌发成无菌苗条件为 $0.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $0.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2,4-D, 故向培养基中添加不同种类植物生长调节剂来提高萌发率。新塔花种子的萌发率在只添加 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA或 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA下均显著提高, 且高浓度的6-BA对种子的萌发生长起抑制作用。

影响植物细胞、组织和器官形态发生有诸多因素, 其中植物生长调节剂的种类和浓度是主要因素(Hajam等2017)。试验中向MS培养基中添加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 促进了腋芽的诱导, 诱导率高达90.47%, 植株高1.4 cm。在新塔花腋芽诱导过程中发现6-BA诱导作用显著, 它不仅能促进细胞的分裂与膨大, 更利于茎生长、侧芽生芽及芽增殖, 但浓度过高则有抑制作用, 并伴随玻璃化现象。雷颖(2015)在百里香组织培养中发现一定浓度 $\text{GA}_3$ 可降低玻璃化苗的发生, 因此在芽增殖时添加适量 $\text{GA}_3$ 以期降低苗的玻璃化。试验发现在 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+ $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

表7 不同浓度AC与NAA组合对新塔花根系分化的影响

Table 7 Effect of different concentrations of AC and NAA combinations on differentiation of rooting of *Ziziphora bungeana* Juz.

| NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | AC/% | 生根率/% | 生根数                       | 株高/cm                     | 根生长状况(20 d) | 苗生长状况(20 d) |
|------------------------------------|------|-------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| 0                                  | 0.1  | 30    | $3.3\pm 1.5^{\text{bc}}$  | $3.2\pm 1.6^{\text{bc}}$  | 根一般粗        | 苗长势一般, 细    |
| 0.25                               | 0.1  | 60    | $2.8\pm 1.2^{\text{bcd}}$ | $4.0\pm 1.2^{\text{ab}}$  | 根细, 长       | 苗长势良好, 粗壮   |
| 0.50                               | 0.1  | 60    | $2.5\pm 1.4^{\text{bcd}}$ | $3.4\pm 1.0^{\text{bc}}$  | 根一般粗, 长     | 苗长势良好, 粗壮   |
| 0.75                               | 0.1  | 30    | $2.7\pm 0.6^{\text{bcd}}$ | $3.3\pm 1.1^{\text{bc}}$  | 根一般粗, 长     | 苗长势良好, 较粗   |
| 0                                  | 0.2  | 40    | $5.8\pm 2.2^{\text{a}}$   | $3.1\pm 1.3^{\text{bcd}}$ | 根一般粗, 长     | 苗矮小, 粗壮     |
| 0.25                               | 0.2  | 60    | $4.2\pm 1.3^{\text{ab}}$  | $3.5\pm 1.2^{\text{abc}}$ | 根一般粗, 长     | 苗长势良好, 粗壮   |
| 0.50                               | 0.2  | 60    | $3.5\pm 0.8^{\text{bc}}$  | $4.5\pm 1.3^{\text{a}}$   | 根一般粗, 长     | 苗长势良好, 粗壮   |
| 0.75                               | 0.2  | 40    | $2.2\pm 1.3^{\text{bcd}}$ | $3.1\pm 1.2^{\text{bcd}}$ | 根细, 长       | 苗长势一般, 较粗   |
| 0                                  | 0.5  | 20    | $1.5\pm 0.7^{\text{cd}}$  | $2.6\pm 0.7^{\text{cd}}$  | 根细, 短       | 苗矮小, 较粗     |
| 0.25                               | 0.5  | 20    | $1.0\pm 0.0^{\text{d}}$   | $2.4\pm 0.9^{\text{cd}}$  | 根一般粗, 长     | 苗矮小, 较粗     |
| 0.50                               | 0.5  | 30    | $3.0\pm 1.7^{\text{bcd}}$ | $2.0\pm 0.7^{\text{d}}$   | 根一般粗, 短     | 苗矮小, 较粗     |
| 0.75                               | 0.5  | 60    | $3.1\pm 1.0^{\text{bcd}}$ | $3.1\pm 0.9^{\text{bcd}}$ | 根一般粗, 长     | 苗长势一般, 较粗   |

GA<sub>3</sub>+35 g·L<sup>-1</sup>蔗糖条件下增殖的芽体生长良好, 丛生芽较多, 茎健壮, 叶嫩绿。在组织培养过程中向培养基添加蔗糖作为碳源和能源来提供植物生长所需的营养物质, 同时它对维持培养基的渗透压起重要作用, 试验中35 g·L<sup>-1</sup>蔗糖有利于新塔花的增殖。

新塔花增殖芽在不添加任何生长素的1/2MS培养基上能诱导生根, 但生根率较低且生根数较少不利于移栽; 而NAA比IAA更适于新塔花生根, 可能与IAA见光易被氧化破坏且易被细胞中的IAA分解酶降解有关。活性炭由于具有极高的吸附能力(Oláh 2017)已被广泛用于植物组织培养中(刘用生和李友用1994), 它还能将培养基变黑提供类似土壤的暗化条件, 有利于离体生根与根生长(Shinde等2010); 试验中添加0.1%~0.2%的活性炭与生长素配比使用达到壮苗效果, 生根植株长势较好, 基部无愈伤组织产生或较少, 推测为一定浓度的活性炭吸附了新塔花在建根培养时产生的酚类物质, 同时说明活性炭在植物生根培养过程中起着重要作用。

本试验以药用植物新塔花的无菌苗茎段为外植体, 通过腋芽增殖与诱导生根培养得到完整植株。利用快繁技术得到的组培苗遗传性状稳定, 能较好保持品种的优良特性, 为新塔花规模化种植提供实验依据, 并为新品种的培育提供理论与技术支持。

### 参考文献(References)

- Hajam MA, Hassan GI, Bhat TA, et al (2017). Understanding plant growth regulators, their interplay: For nursery establishment in fruits. *Int J Chem Stud*, 5 (5): 905–910
- He J, Yang WJ, Liu C, et al (2016). Herbal textual research on *Ziziphora* herba. *Mod Chin Med*, 18 (12): 1550–1554 (in Chinese with English abstract) [何江, 杨伟俊, 刘冲等(2016). 维吾尔药新塔花本草考证. *中国现代中药*, 18 (12): 1550–1554]
- Karlygash ZA, Zuriydda SB, Inna TI, et al (2016a). Macroscopic and morpho-anatomical diagnostic features of *Ziziphora bungeana* Juz. from Kazakhstan. *Int J Pharmacog Phytochem Res*, 8 (5): 812–819
- Karlygash ZA, Aigerim K, Ainur N, et al (2016b). Biological activity and preclinical study of toxicological action of the essential oil of *Ziziphora Bungeana* Juz. from Kazakhstan. *Int J Toxicol Pharmacol Res*, 8 (4): 275–280
- Lei Y (2015). Research on vitrification of *Thymus mongolicus* Ronn. during tissue culture. *Chin Wild Plant Res*, 34 (1): 15–18 (in Chinese with English abstract) [雷颖(2015). 百里香组织培养过程中玻璃化问题的研究. *中国野生植物资源*, 34 (1): 15–18]
- Li XD, Wang YF, Ma SM, et al (2009). Tissue culture and rapid propagation of *Thymus vulgaris*. *Hubei Agri Sci*, 48 (6): 1295–1297 (in Chinese with English abstract) [李晓东, 王永飞, 马三梅等(2009). 普通百里香的组织培养和快速繁殖. *湖北农业科学*, 48 (6): 1295–1297]
- Liu YM (1999). *Uyghur Medicine (Vol 1)*. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health Press, 446–451 (in Chinese) [刘勇民(1999). 维吾尔药志(上册). 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 446–451]
- Liu YS, Li YY (1994). The use of activated charcoal in plant tissue culture. *Plant Physiol Commun*, 30 (3): 214–217 (in Chinese) [刘用生, 李友用(1994). 植物组织培养中活性炭的使用. *植物生理学通讯*, 30 (3): 214–217]
- Luo SW (1979). Application of plant tissue culture on flowers. *Plant Physiol Commun*, (3): 3–11 (in Chinese) [罗士韦(1979). 植物组织培养在花卉上的应用. *植物生理学通讯*, (3): 3–11]
- Oláh R (2017). The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. *Vitis*, 56 (4): 161–171
- Ozturk S, Ercisli S (2007). Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. *Food Control*, 18 (5): 535–540
- Shinde KA, Patel RM, Shah RR (2010). Proliferation, rooting and acclimatization of micropropagated grape cv. Thompson seedless. *Int J Plant Sci*, 5 (1): 98–101
- Srivedavyasari R, Zhaparkulova KA, Sakipova ZB, et al (2015). Phytochemical and biological studies on *Ziziphora bungeana*. *Chem Nat Compd*, 81 (5): 1–3
- Wang HL, Zhang F, Lang W, et al (2014). Quality evaluations of seeds of *Ziziphora bungeana* Juz. Seed, 33 (11): 108–111 (in Chinese) [王红丽, 张帆, 兰卫等(2014). 新疆地产药材新塔花种子的质量评价. *种子*, 33 (11): 108–111]
- Xu SQ, Li XD, Zhang JG (2011). Callus induction and establishment of cell suspension culture system for *Thymus vulgaris* L. *Acta Agr Bor-Occid Sin*, 20 (10): 112–119 (in Chinese with English abstract) [徐世千, 李晓东, 张建国(2011). 百里香愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养体系的建立. *西北农业学报*, 20 (10): 112–119]
- Xu YZ, Meng QY, Liu WJ, et al (2013). Optimization of the extraction method of the volatile components from *Ziziphora clinopodioides*. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 19 (6): 108–112 (in Chinese with English abstract) [许云章, 孟庆艳, 刘文杰等(2013). 维吾尔药新塔花中挥发性成分提取方法的优化. *中国实验方剂学杂志*, 19 (6): 108–112]
- Zhang CM, Yan F, Chen JC (2013). Effects on the growing of aseptic seedlings of *Thymus Vulgaris* ‘Silver Posie’ with the conjunct use of hormone of different types and concentration. *J Beijing Union Univ*, 27 (4): 53–57 (in Chinese with English abstract) [张春梅, 闫芳, 陈杰昌(2013). 不同种类、浓度的激素配合使用对银斑百里香种子无菌苗生长的影响. *北京联合大学学报*, 27 (4): 53–57]

## Tissue culture and rapid propagation of *Ziziphora bungeana* Juz.

MA Li-Na<sup>1</sup>, HE Jiang<sup>1,2</sup>, LI Guan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

<sup>2</sup>Institute of Materia Medic, Xinjiang, Urumqi 830004, China

**Abstract:** The tissue culture and rapid propagation system of *Ziziphora bungeana* Juz. was established by utilizing its healthy tender stem as explant. We analyzed affecting factors of culture medium of hormone and additional nutrient for axillary bud induction, subculture proliferation and rooting culture. The results showed that the suitable medium for germination of seeds was MS supplemented with 0.25 mg·L<sup>-1</sup> NAA, the germination rate was 57.78%. The optimal medium for stem segments inducing adventitious buds was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, with an induction rate of 90.47%. The suitable combination of bud proliferation was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>+35 g·L<sup>-1</sup> sucrose. The multiplication coefficient was 1.95 after 20 days. The most optimum rooting medium was 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2% AC, with a rooting rate of 60%, the average rooting numbers of 3.5 and plant length of 4.5 cm for 20 days. Plantlets were transplanted to a potting mixture (1:1:1, nutritive soil: perlite: vermiculite) in trays with about 80.45% survival percentage.

**Key words:** *Ziziphora bungeana* Juz.; tissue culture; rapid propagation; stem segment

---

Received 2018-06-22 Accepted 2018-07-16

This work was supported by the Project of Tianshan Innovation Team in Xinjiang Uygur Autonomous Region (2017D14014).

\*Corresponding author (guanli@xju.edu.cn).