

## 山桐子茎段离体培养技术研究

蒋泽平, 梁珍海, 刘根林, 孙体如

(江苏省林业科学研究院, 南京 211153)

**摘要:**山桐子是具有较高观赏树种和利用的树种。通过正交试验等方法对山桐子茎段组织培养外植体灭菌、玻璃苗预防、增殖培养、根诱导等关键技术进行研究。结果表明:在南京山桐子最佳取材时间为4月下旬,在引进日本种源优良母株上选取外植体,经过0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒15s,灭菌成活率为76.7%;添加3.5%的白砂糖和增加培养容器的透气性,能很好地预防玻璃苗的发生;改良MS附加TDZ、BA、NAA等植物生长调节剂可有效促进试管芽苗增殖和生长,其中TDZ 0.05mg/L+BA 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L组合最适宜增殖与生长,增殖倍数达5.3,生长高度为2.7cm;适宜的生根培养基为1/2MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L+LH 100 mg/L+S 2%,生根率可达87%;经生根的试管苗移栽于蛭石(V):珍珠岩(V):泥炭(V)=6:3:1的混合基质,控制温度20~30℃,相对湿度85%~90%,保湿15~20d,其间适当遮荫,30d后成活率达85%以上。

**关键词:**山桐子;组织培养;玻璃苗;快速繁殖

**中图分类号:**S685.21;Q813.1+2 **文献标识码:**A

### Stem Segment Culture in Vitro of *Idesia polycarpa* Maxim.

Jiang Zeping, Liang Zhenhai, Liu Genlin, Sun Tiru

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153)

**Abstract:** *Idesia polycarpa* Maxim. is a plant with highly appreciative and useful value. This experiment concerning *Idesia polycarpa* Maxim. segment culture in vitro was committed on the explant sterilization, shoot vitrification control, shoot multiplication and root induction. The results showed that: (1) as for the one-year-old mother tree acclimated at Nanjing, Jiangsu Province, formerly introduced from Japan, the latter of April was optimal time in explant collection. After 0.1% HgCl<sub>2</sub> sterilization for 15s, the explants suitable for the forthcoming culture accounted up to 76.7%; (2) addition of 3.5% sugar and air-permeation improvement to culture containers could effectively control shoot vitrification; (3) the modified MS media supplemented with TDZ, BA and NAA could ameliorate the culture multiplication and growth, among which the combination of 0.05mg/L TDZ + 1.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA was optimal, with the multiplication time up to 5.3 and growth height up to 2.7cm; (4) the rooting medium, i.e. 1/2MS + 0.5 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA + 100 mg/L LH + 2% S was optimized, with rooting percentage up to 87%; (5) the root-developed plantlets transplanted in the substrate mixed with vermiculite, perlite and peat (volume ratio of 6:3:1) at 20~30℃, relative humidity of 85%~90% for 15~20d, favorably shaded, could get over 85% survival after 30d.

**Key words:** *Idesia polycarpa* Maxim, Tissue culture, Vitreous shoots, Rapid micropropagation

**基金项目:**国家林业局948项目“山桐子树种优良种质资源及培育技术引进”(2004-4-25),江苏省科技厅农业科技攻关项目“观果彩色树种山桐子的定向培育及组培快繁技术研究与开发”(BE2006340)。

**第一作者简介:**蒋泽平,男,1963年出生,本科学历,高级工程师。主要从事木本植物组织培养及林木良种选育研究。通信地址:211153 江苏省南京市江宁区东善桥江苏省林科院。Tel: 025-52745600 转 8041。E-mail: jiangzeping518@126.com。

**通讯作者:**梁珍海,男,1965年出生,博士,研究员。主要从事林木生态及植物组织培养研究。通信地址:211153 江苏省南京市江宁区东善桥江苏省林科院。Tel: 025-52745600 转 6004。E-mail: nanjingliang@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2006-09-30, **修回日期:**2006-10-16。

山桐子 (*Idesia polycarpa* Maxim.) 是大风子科山桐子属的落叶乔木, 树高达 20m。树皮灰白色, 树干通直。果实成串下挂似葡萄, 入秋后红艳夺目, 是优良的绿化观赏树种; 种子含油率高达 23.4%, 其油为半干性油, 可代替桐油, 又是经济价值很高的树种<sup>[1]</sup>。但山桐子种子发芽率低, 有性繁殖能力差, 扦插成活率不高<sup>[2-4]</sup>。从日本引进优良种源的山桐子中, 经过初选获得的优良单株, 用组培的方法繁殖, 将保持原植株的优良性状。笔者对山桐子茎段组织培养中的外植体灭菌、玻璃苗预防、增殖培养、根诱导等关键技术进行了探索, 试图加快优良性状山桐子的繁殖和推广。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2005—2006 年在南京进行。母株来自于日本引进经初选的优良单株。

### 1.2 外植体灭菌

将洗净的外植体用 75% 的乙醇溶液浸泡杀菌 30s, 无菌水冲洗 2~3 次, 然后置于消毒液中。消毒液分别采用 A<sub>1</sub> (17% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、A<sub>2</sub> (0.1% HgCl<sub>2</sub>)、A<sub>3</sub> [10% Ca (ClO)<sub>2</sub>], 消毒时间分别采用 B<sub>1</sub> (5s)、B<sub>2</sub> (10s)、B<sub>3</sub> (15s) 和对照, 采用随机区组排列, 表面消毒后用无菌水冲洗 3~4 次, 沥干水后迅速将带腋芽的茎段接到诱导培养基中, 每瓶接一个, 每次 30 瓶, 每组重复三次, 15 天后统计污染率、死亡率和成活率。

### 1.3 植物生长调节剂正交培养试验

待诱导出的不定芽长至 2cm 左右, 切下接入增殖培养基中进行增殖培养。增殖以改良 MS 为基本培养基, 选定 TDZ (0.02, 0.05, 0.08) mg/L、BA (1.0, 1.5, 2.0) mg/L、NAA (0.05, 0.1, 0.2) mg/L 3 种植物生长调节剂进行 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验<sup>[5]</sup>, 接种培养 35d 时观测试管芽苗

增殖倍数和芽苗生长高度。

### 1.4 玻璃苗预防处理

在不同浓度的白砂糖处理预防山桐子试管苗玻璃化试验中, 白砂糖的浓度分别为 3%、3.5%、4%、4.5% 四个浓度梯度; 在增加培养容器的透气性对试管苗玻璃化影响的试验中, 采用透气封口膜 (北京振泰园艺设施有限公司生产的规格为 4 孔 (12cm×12cm) 与封闭封口膜为材料进行培养, 具体试验为: 处理 I: 三角瓶封闭式封口材料; 处理 II: 三角瓶透气式封口材料。上述试验培养基均为改良 MS (Murashige and Skoog, 1962)+TDZ 0.02 mg/L+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2mg/L, 琼脂 (福建省石狮市狮头琼脂有限公司出品) 用量 0.65%, pH 5.8。

### 1.5 生根培养

芽苗生根培养基配比试验方法是将生长健壮的山桐子芽苗, 接种在 1/2MS 附加不同浓度的生长素 NAA, IBA, 以及不同浓度水解乳蛋白 (LH) 配比的培养基上, 进行生根培养。采用正交试验设计 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 的方案<sup>[5]</sup>, 观察根的分化过程, 调查生根数, 根长, 生根率等指标, 选择最佳生根培养基。每处理 30 瓶, 每瓶 5 个芽苗。

### 1.6 组培苗移栽管理

试管苗移栽试验方法是将已生根的试管小苗, 移栽于蛭石 (V) : 珍珠岩 (V) : 泥炭 (V) = 6 : 3 : 1, 6 : 3 : 3, 4 : 3 : 3 三种混合基质中, 控制环境温度 25~30℃, 相对湿度 85%~90%, 保湿、遮荫 15~20d, 35d 后统计成活率。

上述除有说明外, 所有培养基均加入 3% 的白砂糖和 0.65% 卡拉胶, pH 值为 5.8, 培养室温度白天为 25~30℃, 夜晚为 15~20℃, 光照强度 1500~2000 lx, 光照时间 12h/d。

表 1 不同药剂和不同消毒时间外植体灭菌结果

处理	消毒剂	消毒时间 (min)	污染率 (%)	死亡率 (%)	成活率 (%)
CK		0	100	0.0	0.0
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5	85.6	0.0	14.4
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	82.2	0.0	17.8
A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15	81.1	0.0	18.9
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	HgCl <sub>2</sub>	5	79.6	0.0	20.4
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	HgCl <sub>2</sub>	10	40.3	5.2	54.5
A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	HgCl <sub>2</sub>	15	12.9	10.4	76.7
A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	Ca (ClO) <sub>2</sub>	5	96.5	0.0	3.5
A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	Ca (ClO) <sub>2</sub>	10	84.4	0.0	15.6
A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	Ca (ClO) <sub>2</sub>	15	82.2	0.0	17.8

## 2 结果与分析

### 2.1 山桐子外植体消毒方法的筛选

不同药剂和不同消毒时间对外植体的灭菌试验结果表明 (见表 1): 不同处理间、不同消毒剂、不同消毒时间及不同消毒药剂与不同消毒时间的灭菌效果差异显著。说明山桐子外植体灭菌应考虑消毒的时间和消

毒的药剂才有助于提高成活率。本试验以 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> 处理效果最好, 即 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 15s 的成活率达 76.7%。

### 2.2 植物生长调节剂正交组合对山桐子试管芽苗生长的影响

植物生长调节剂正交组合对山桐子试管芽苗生长的影响试验结果 (见表 2) 表明, TDZ 与 BA 浓度是决

定芽苗增殖主要因子,由极差数据分析得知,TDZ的作用最大,其极差值为2.1,其次为BA,影响最小的是NAA。组合6的芽苗增殖与生长效果最好,增殖倍数达5.3,生长高度为2.7cm,且芽苗生长较壮;组合7和组合8,芽苗增殖倍数虽有小幅增加,但其芽苗生长高度大大下降,更为不利的是芽苗生长弱,叶片稀少、皱

缩,叶形不正常,茎细弱,甚至出现烂心、玻璃苗现象。所以,山桐子芽苗增殖最佳组合为改良MS+BA2.0mg/L+TDZ0.05mg/L+NAA0.05mg/L+白砂糖3%。

### 2.3 山桐子玻璃苗预防处理

不同浓度的白砂糖对山桐子试管苗玻璃化及其生长的影响(见表3)可看出,当白砂糖的浓度在3%~4.

表2 植物生长调节剂正交试验结果表

组合号	A (TDZ) (mg/L)	B (BA) (mg/L)	C (NAA) (mg/L)	增殖倍数 (条)	高度 (cm)	长势
1	0.02	1.0	0.05	2.8	2.9	较弱
2	0.02	1.5	0.2	3.0	3.1	较壮
3	0.02	2.0	0.1	3.4	3.5	粗壮
4	0.05	1.0	0.2	4.7	2.3	较壮
5	0.05	1.5	0.1	4.9	2.5	较壮
6	0.05	2.0	0.05	5.3	2.7	较壮
7	0.08	1.0	0.05	5.6	1.6	很弱
8	0.08	1.5	0.1	5.4	1.8	很弱
9	0.08	2.0	0.2	5.2	2.1	较弱

5%范围内,玻璃化苗发生的频率随浓度的增加而显著降低,且各处理间的差异显著。其中处理1即白砂糖的浓度为3%时,玻璃化苗率极显著高于其他处理。可以看出白砂糖浓度是影响玻璃化苗发生的重要因素,较高浓度的处理可减少玻璃化的发生,处理2、3、4差异不显著而且生长情况类似,故可选白砂糖3.5%作为继代培养适宜的浓度,采用处理2较为经济。

培养容器内的湿度和透光率等因素直接影响试管芽苗的生长,封口材料透气性不同造成培养物所处的微环境差异。通过试验发现:处理I玻璃化苗率为17.33%,处理II为5.36%。说明处于封闭状态下,容器内部微环境湿度大,气体缺乏交换,不利试管苗的健壮生长,容器内生长的芽苗细弱,叶色浅。用透气膜为封口材料,由于具有良好的透气性,降低了微环境中的湿

表3 不同白砂糖浓度对山桐子组培苗玻璃化及其生长的影响

处理	白砂糖浓度 (%)	玻璃化苗率 (%)	芽苗生长情况
1	3.0	17.33	玻璃苗多,叶色浅绿,生长快
2	3.5	5.67	玻璃苗少,叶色浓绿,生长快
3	4.0	5.33	玻璃苗少,叶色深绿,生长快
4	4.5	5.42	玻璃苗少,叶色深绿,生长快

度,利于试管芽苗呼吸交换,容器内生长的芽苗,叶色浓绿、健壮。

### 2.4 山桐子试管芽苗生根培养基筛选

将健壮苗培养长至高为2~3cm的山桐子试管芽苗,接入生根培养基试验,生根培养10d后,基部出现

愈伤组织,13d后可见基部分化出许多根点,18d后则生长白色小根,30d后统计结果并直观分析,结果见表4。

从表4结果表明,对山桐子生根影响最大的是IBA,其次是NAA,LH的浓度。配方5与配方6的生

表4 山桐子生根正交试验结果表

组合号	因子				结果			
	A(NAA) (mg/L)	B(IBA) (mg/L)	A*B	C (LH) (mg/L)	平均根长 (cm)	平均根数 (条)	生根率 (%)	长势
1	0.05	0.1	1	100	3.2	2.2	43	细弱
2	0.05	0.5	2	50	3.9	3.5	56	细弱
3	0.05	1.0	3	10	2.9	4.6	65	细弱
4	0.3	0.1	2	10	3.8	5.4	70	较粗
5	0.3	0.5	3	100	5.9	7.4	87	粗壮
6	0.3	1.0	1	50	2.2	5.6	82	较粗
7	0.5	0.1	3	50	3.5	4.7	76	细弱
8	0.5	0.5	1	10	3.8	3.6	78	细弱
9	0.5	1.0	2	100	1.7	4.8	80	细弱

根率分别达到87%和82%,但从平均根长和平均根数来看,配方5(1/2MS+IBA0.5mg/L+NAA0.3mg/L+LH100mg/L+白砂糖2%)为最佳生根培养基。

### 2.5 山桐子组培苗的移栽

移栽试验结果表明,在相同条件下,基质对山桐子试管苗移栽成活有影响。在成活所需时间,成活率都有

表5 三种基质对山桐子试管苗移栽成活的影响

组合	成活所需时间 (d)	成活率 (%)
6: 3: 1	25	85
6: 2: 2	29	72
4: 3: 3	32	64

明显差异。蛭石(V)珍珠岩(V)泥炭(V)=6:3:1,成活所需时间25d,成活率到85%,为最佳配比的混合基质。

### 3 小结

3.1 在组织培养中,接种污染率的高低直接影响启动培养的进度。此项试验中,即0.1%HgCl<sub>2</sub>消毒15s的成活率达76.7%。实践中先将需接种的材料置于温室内培养2周左右,每隔3~5天喷施一次杀菌剂,可有效降低接种污染率。

3.2 增殖培养试验结果认为:山桐子芽苗增殖最佳组合为改良MS+BA2.0mg/L+TDZ0.05 mg/L+NAA 0.05mg/L+白砂糖3%。

3.3 糖对试管芽苗的作用,主要为其生长提供碳源和调节渗透势,作为ATP的供给者,糖对离体培养物的生长具有重要作用。试验中发现提高白砂糖的浓度对控制玻璃化有促进作用,但并不能完全抑制玻璃化的发生,过高的白砂糖浓度会抑制试管芽苗的生长,说明玻璃化的发生不光是能量的不足,可能与代谢紊乱有关。通过不同封口材料培养试验表明,试管芽苗生长效果的差异是由于透气状况不同引起的。其原因与较高浓度的细胞分裂素类物质导致玻璃化原因类似,可能封闭状况下,较高浓度的BA加快了试管苗生长速度,芽苗呼吸作用大大增强,需要在培养的微环境中进行气体交换(水蒸汽、氧气、二氧化碳、乙烯等)<sup>[6-8]</sup>。在封闭状况下,容器内外气体得不到有效的交换,无法满足试管芽苗生长需求,导致玻璃化。采用透气类型的封口膜,改善了通气状况,促进了呼吸,使ATP供给较为丰富,满足了芽苗对ATP以及呼吸代谢产物的要求,试

管植株生长健壮。

3.4 生根培养试验结果表明,对山桐子生根影响最大的是IBA,其次是NAA,LH的浓度。平均根长和平均根数来看,1/2MS+IBA0.5 mg/L+NAA0.3 mg/L+LH100 mg/L+白砂糖2%为最佳生根培养基。

3.5 山桐子组培苗移栽基质以V(蛭石):V(珍珠岩):V(泥炭)=6:3:1较好。温度控制在20~25℃之间,湿度在移栽前后3~5天控制在95%以上,一周后控制在85%~95%左右,20天即可成活,成活率达80%以上。

### 参考文献

- [1] 周家骏,高林.优良阔叶树种造林技术.杭州:浙江科学技术出版社,1985:113-118.
- [2] 刘根林,梁珍海,蒋泽平.山桐子研究综述.江苏林业科技,2005,32(5):46-49.
- [3] Hirabuki Y. Significance of viable seeds of several woody pioneers stored in soil of a temperate mixed forest. *Ecological Review*, 1988,21(3):163-168.
- [4] 祝志勇,季永华,沈定夫,等.山桐子育苗试验初报.江苏林业科技,2001,28(2):6-8.
- [5] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学.北京:科学出版社,2000,6(3):149-156.
- [6] 梁海曼,周菊华.试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨.武汉植物学研究,1994,12(3):281-288.
- [7] 王哲之,胡正海.槐树组织培养中超度含水态苗发生与防治研究.应用与环境生物学报,1998,4(3):227-231.
- [8] 及华.刺槐玻璃苗愈伤组织分化再生正常植株.河北林学院学报,1994,9(2):102-104.
- [9] 钟士传,曹帮华.控制毛白杨新无性系试管苗玻璃化的研究.山东林业科技,2000,(2):17-19.
- [10] Matthieu. Falque, Daniel Compan & Rose Galzy. A method for the study of CO<sub>2</sub> exchange in vitro cultured *Vitis rupestris* plantlets [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1991,27:175-181.

(责任编辑:秦守亮)