

椿叶花椒组织培养及植株再生

李 贵¹, 李志辉¹, 童方平², 易霭琴², 宋庆安²

(¹中南林业科技大学, 长沙 410004; ²湖南省林业科学院, 长沙 410004)

摘 要: 选用椿叶花椒带腋芽的茎段为外植体, 进行组织培养与快速繁殖技术研究。结果表明: 椿叶花椒初代愈伤组织诱导以 WPM+6-BA2.5mg·L⁻¹+NAA2mg·L⁻¹+IBA1mg·L⁻¹ 效果最好; 继代培养采用 WPM+6-BA0.2mg·L⁻¹+IBA0.1mg·L⁻¹+NAA0.1mg·L⁻¹, 培养 30d, 增殖在 5.6 倍以上; 生根培养 1/4MS+IBA0.5mg·L⁻¹, 20d 左右生根, 平均根量 4.6 条, 生根率 95%。

关键词: 椿叶花椒; 组织培养; 植株再生

中图分类号: Q813.1+2 **文献标识码:** A

Tissue Culture and Plant Regeneration of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb.et Zuce.

Li Gui¹, Li Zhihui¹, Tong Fangping², Yi Aiqin², Song Qingan²

(¹Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

²Hunan Forestry Academy, Changsha 410004)

Abstract: Selects the caulis segment with axillary bud of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb.et Zuce as explants carried on the industrialized rapid clone propagation technology research. The results showed that plant hormone combination of WPM+6-BA2.5mg·L⁻¹+NAA2mg·L⁻¹+IBA1mg·L⁻¹ was good for callus induction, WPM+6-BA0.2mg·L⁻¹+IBA0.1mg·L⁻¹+NAA0.1mg·L⁻¹ was good for cultivation of young plant, culture 30d, the coefficient of reproduction was up to 5.6. 1/4MS+IBA0.5mg·L⁻¹ was best for rootage, average roots were 4.6 after culture 20d, rooting rate was 95%.

Key words: *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb.et Zuce., tissue culture, plantlet regeneration

椿叶花椒 (*Zanthoxylum ailanthoides* Sieb.et Zuce.) 为芳香科花椒属木本植物, 分布于海拔 500~1500m 的密林或湿润地区。主要分布在浙江、福建、广东、广西、台湾等省区, 日本也有分布。椿叶花椒是一种典型的速生珍贵阔叶树种, 落叶乔木, 树干有乳凸锐刺, 随树干长大而长大。果皮可作调料, 种子可榨油, 根、茎、叶、果皮、种子均可入药, 是中国传统有效高价值中药, 是经济价值较高的树种^[1]。

目前, 椿叶花椒苗极少, 大都采挖野生资源进行种植, 无法满足当今椿叶花椒种植业的需求。生产上主要是以有性繁殖为主, 造成品质退化, 生长缓慢, 株间整齐度差。而通过组培生产的苗木, 生长迅速, 林相整齐, 有利于椿叶花椒的推广应用。关于花椒属植物的组织培养国内已有报道, 如花椒^[2,3]、日本花椒^[4]、朝仓花椒^[5]

和山椒^[6]都有报道, 但椿叶花椒的组织培养还只限于起步阶段^[9]。本文在前人的基础上对椿叶花椒组织培养及快速繁殖技术进行了研究, 以便为批量生产优良椿叶花椒苗提供理论基础和技术支撑, 缓解椿叶花椒种苗供需矛盾。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2005 年 9 月至 2007 年 7 月在湖南省林业科学研究院重点实验室进行。

1.2 材料来源与处理

外植体来源于中南林业科技大学(原中南林学院)株洲校区经济林苗圃内 1 年生椿叶花椒的嫩梢, 流水冲洗 30min, 切割成带腋芽的小茎段, 用 70%酒精消毒 30s, 无菌水冲洗 2~3 遍, 再用升汞消毒 6min, 无菌水

基金项目: 湖南省科技厅攻关重点项目, 速生乡土阔叶树新品种(系)选育关键技术研究(编号:06FJ3004)。

第一作者简介: 李贵, 女, 1980 年出生, 硕士研究生, 研究方向为植物生理及植物组培。通信地址: 410004 湖南省长沙市韶山南路 498 号中南林业科技大学研究生学院 05 级 5 班。Tel: 0731-5653836, E-mail: loveligui@sohu.com。

收稿日期: 2008-04-02, 修回日期: 2008-04-23。

冲洗 5~6遍,立即接种到培养基上。

1.3 培养基的制备

初代诱导分化培养基:WPM+6-BA2.5mg·L⁻¹+NAA2mg·L⁻¹+IBA1mg·L⁻¹+3%蔗糖 +0.8%琼脂;

增殖培养基:WPM+6-BA0.2mg·L⁻¹+IBA0.1mg·L⁻¹+NAA0.1mg·L⁻¹+3%蔗糖 +0.8%琼脂;

生根培养基:1/4MS+IBA0.5mg/L+1.5%蔗糖 +0.8%琼脂。

以上所有培养基 PH 值均控制在 5.8-6.0, 高压蒸汽灭菌 20min。

1.4 培养条件

培养室温度为 23~26℃,采用日光灯培养,光照强

度为 1500~2000lx,光照时数为 14h/d。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的选择

外植体接种后经过 25~30d 培养,获得无菌外植体(图 1)以后,将外植体接种到 4 种基本培养基(分别添加 6-BA2.5mg·L⁻¹,NAA2mg·L⁻¹,IBA1mg·L⁻¹)上,进行芽的诱导,经过 30d 的诱导培养,调查各培养基上的增殖芽数和芽的生长量(表 1)。表 1 结果表明:MS 和 WPM 这 2 种基本培养基比较适合椿叶花椒的生长,但是,在 MS 培养基上,组培苗虽然生长速度比较好,但苗太细太弱,不利于下一步培养。所以,椿叶花椒选择 WPM 培养基,增殖倍数高,达到 116.7%,组培苗的

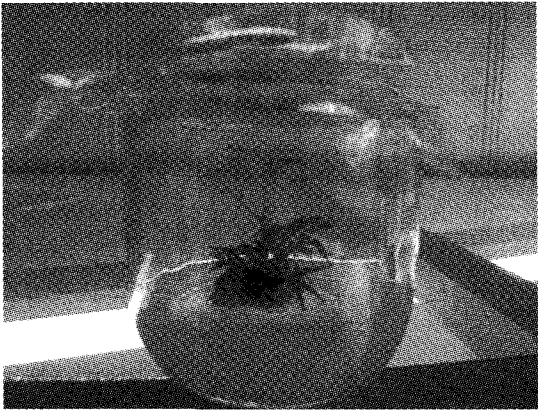


图 1 初代愈伤组织诱导

表 1 不同基本培养基对增殖率的影响

基本培养基	接种芽数	接种芽高/(cm)	增殖芽数	增殖芽最高/(cm)	增殖倍数/(%)	生长状况
MS	30	1.0	32	3.0	106.7	叶绿苗细
WPM	30	1.0	35	3.5	116.7	叶绿苗粗
B5	30	1.0	28	2.8	93.3	叶绿苗细
White	30	1.0	29	2.5	96.7	叶绿苗细

表 2 细胞分裂素 6-BA 对增殖率的影响

6-BA 浓度/(mg·L ⁻¹)	接种芽数	增殖芽数	增殖芽最高/(cm)	增殖倍数	生长状况
0.5	40	142	3.2	3.55	叶绿苗细
0.4	40	138	3.1	2.45	叶绿苗细
0.2	40	144	3.5	3.6	叶绿苗粗
0.1	40	136	1.8	3.4	叶黄苗粗

生长状况最好,最高苗高达 3.5cm。

2.2 增殖培养基的筛选

无菌苗获得后,选取粗壮茎芽,切成 1cm 左右的顶芽或者带腋芽的茎段,分别接种于附加不同细胞分裂素浓度配比的 WPM 培养基上做单因子试验(表 2)。

培养 30d 后,表 2 结果表明:细胞分裂素浓度为 0.2mg·L⁻¹ 时增殖最佳,增殖倍数达到 3.6,增殖芽最高为 3.5,且组培苗生长状况良好。在此基础上选取健壮

组培苗分别接种于附加相同细胞分裂素 6-BA0.2mg·L⁻¹、不同生长素浓度水平的培养基上(表 3)。

培养 30d 后,表 3 结果表明:细胞分裂素与生长素的比例为 1:1 时的组合:WPM+6-BA0.2mg·L⁻¹+IBA0.1mg·L⁻¹+NAA0.1mg·L⁻¹ 为椿叶花椒增殖最佳培养基,增殖倍数达到 5.6,增殖芽最高为 5.5cm,且组培苗生长健壮(图 2)。

表 3 不同生长素及其不同浓度对增殖率的影响

生长素种类及浓度 / (mg·L ⁻¹)	接种芽数	增殖芽数	增殖芽最高 / (cm)	增殖倍数	生长状况
IBA0.5+NAA0.2	50	178	5.2	4.5	叶绿苗细
IBA0.2+NAA0.5	50	165	5.1	4.3	叶绿苗细
IBA0.1+NAA0.1	50	182	5.5	5.6	叶绿苗粗
IBA0.5+NAA0.5	50	145	4.6	4.0	叶黄苗细
IBA0.2+NAA0.2	50	170	4.3	4.9	叶黄苗粗



图 2 长势良好的组培苗

2.3 生根培养和移栽

经继代培养 25~30d 后,选取健壮组培茎芽(选择标准为高 3.0cm 以上,粗 1.5mm 以上),接种于附加 IBA 不同浓度水平的 1/4MS 生根培养基上,20d 左右开始生根,1 个月后调查 6 种培养基上的生根情况。经方差分析结果表明(表 4、表 5):植物生长调节剂 I-

BA 使用浓度对为椿叶花椒组培苗生根的生根率、平均苗根数、平均根长都有促进作用,并都存在极显著性差异。IBA 浓度为 0.5~1.0mg·L⁻¹,对椿叶花椒组培苗生根的生根率影响最为显著,与其它浓度存在显著差异,并随浓度的升高而降低。经曲线回归分析,IBA 使用浓度与生根率之间呈抛物线分布规律,其回归方

表 4 IBA 不同浓度对试管苗生根的影响

IBA 浓度 / (mg·L ⁻¹)	接种苗数	生根苗数	生根率 / (%)	平均苗根数	平均根长 / (cm)	试管苗长势
ck	50	0	0C	0C	0C	无根苗壮
0.1	50	38.5	75B	2.2B	3.50B	根少苗壮
0.5	50	47.5	95AB	4.6A	4.00A	根多苗壮
1.0	50	40.5	81AB	4.2A	3.56B	根多苗纤弱
1.5	50	36.0	70AB	2.2B	3.12AB	根少苗纤弱
2.0	50	34.5	68B	2.0B	3.10AB	根少苗纤弱

注:生根率 LSD_{0.05}=16.644, LSD_{0.01}=22.554, 平均苗根数 LSD_{0.05}=0.631, LSD_{0.01}=0.854, 平均根长 LSD_{0.05}=0.244, LSD_{0.051}=0.331。

表 5 IBA 不同浓度对试管苗生根的结果分析

	变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	Sig.
生根率	组间	27574.167	5	5514.833	432.536**	0.000
	组内	306.000	24	12.750		
	总和	27880.167	29			
平均根数	组间	69.867	5	13.973	28.910**	0.000
	组内	11.600	24	0.483		
	总和	81.467	29			
平均根长	组间	47.990	5	9.589	66.962**	0.000
	组内	3.440	24	0.143		
	总和	51.430	29			



图3 组培苗生根

程为: $y=66.686+102.578x-118.995x^2+34.084x^3$

本试验中 IBA 浓度为 $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为最佳生根浓度, 生根率达到 95%, 平均苗根数为 4.6, 平均根长 4.00cm, 且组培苗生长健壮(图 3)。

将已生根的瓶苗从培养室内拿出, 放在温室大棚内进行炼苗, 加入少量水以保证苗木不失水分。炼苗 3d 后, 用清水把根部的培养基洗净, 再用百菌清或甲基托布津 1000 倍液浸泡 2~5min, 移栽到装有基质的穴盘中。基质采用①泥炭土:珍珠岩(1:1), ②泥炭土:珍珠岩(1:2), ③圃地表土, ④黄心土。每天检查温度和湿度, 及时调查, 根据土壤状况进行间歇补水, 30d 后测定成活率。试验结果表明:疏松且保水的圃地表土有利于椿叶花椒组培苗的移栽, 且生长状况良好, 成活率达 96%。

3 讨论

春季是植物生长旺盛的季节, 选择春季采样, 有利于无菌外植体的获得及组培苗的快速生长与分化。同时, 春季也是细菌滋生的季节, 因此初代培养时灭菌就比较难以控制, 时间太长容易杀死外植体, 太短又不足以杀死细菌以达到灭菌效果。椿叶花椒当年生的顶芽其木质化程度比较高, 且外被硬刺, 灭菌时难度稍大一点, 采用低浓度的洗洁精溶液清洗外植体可以将无菌外植体的获得率提高。

植物生长调节剂的种类和浓度对椿叶花椒的诱导和分化有较大影响, IBA 和 NAA 是生长素, 在组织培养中通常被用于促进细胞伸长生长和诱导细胞分裂。6-BA 是细胞分裂素, 用于促进细胞分裂与扩大, 诱导芽的分化, 当细胞分裂素与生长素的比例升高时, 诱导芽的分化, 这时细胞分裂素起主导作用^[7,8]。本试验中 IBA 以 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA 以 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA 以 $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最有利于芽的分化及愈伤组织的诱导, 因此 WPM+6-BA $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激素组合最适合椿叶花椒芽的分化与生长, 增殖芽最高达到了 5.5cm, 增殖倍数达到了 5.6 倍以上。

IBA 较适合椿叶花椒组培苗生根的诱导, 当附加的 IBA 浓度低于 1.0mg/L 时, 生根率随浓度的增加而增加, 产生不定根的时间随浓度的增加而缩短。而当生长素的浓度高于 1.0mg/L 后, 生根率反而下降, 同时产生的不定根出现畸形, 基部的愈伤组织随使用浓度的增加呈过度生长的趋势, 不利于以后的移栽。当生根培养基中生长素类生长调节剂 IBA 的用量为 0.5mg/L 时, 生根培养效果较好。在这样的培养基上进行椿叶花椒的生根培养, 20d 左右就可诱导出可见的不定根, 30~35d 就可以进行移栽, 生根率可达 95%。

本试验在移栽过程中, 幼嫩的组培苗有一种芳香族植物特殊的香味, 所以较易招老鼠及虫害。本试验中, 移栽时可以采用一次性塑料杯(杯底打洞)盛装基质并盖膜, 40d 后揭膜, 此方法可以避免其香味的散发以防止虫鼠的攻击。另外本试验在生根培养时可以采用激素速沾的办法使其瓶外生根, 试验已取得初步进展, 有待于进一步探索研究。

参考文献

- [1] 刘鲲, 刘友全, 何友军, 等. 不同衬质处理对椿叶花椒种子活力的影响[J]. 经济林研究, 2004, 22(4): 28-30.
- [2] 韩素英, 齐力旺, 杨云龙, 等. 花椒的离体培养再生植株[J]. 山西农业大学学报, 1995, 15(2): 202-204.
- [3] 许继宏, 马玉芳, 陈锐平, 等. 药用植物组织培养技术[M]. 北京: 中国农业技术出版社, 2003, 5: 149-150.
- [4] 林艳, 郭伟珍, 毕君, 等. 日本花椒组培苗瓶外生根影响因素影响[J]. 林业科技开发, 2004, 18(5): 38-39.
- [5] 郭伟珍, 林艳, 毕君, 等. 朝仓花椒组织培养快繁试验[J]. 林业科技开发, 2005, 19(5): 19-21.
- [6] 曾慎. 山椒的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 353.
- [7] 王小菁, 李玲. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002, 9: 4-5.
- [8] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 中国林业出版社, 1998, 8: 60-65.
- [9] 李贵, 李志辉, 童方平, 等. 椿叶花椒组织培养增殖初探[J]. 湖南林业科技, 2007, 34(4): 17-19.