

椿叶花椒组织培养增殖初探

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, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 以椿叶花椒带腋芽的茎段为外植体, 进行椿叶花椒组织培养与快速繁殖技术研究, 筛选出最佳消毒方法为 0.1% 升汞消毒 6 min, 最佳基本培养基为 WPM, 最佳增殖培养基为 WPM + 6-BA 0.2 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹, 其增殖效果最好, 培养 30 d, 增殖倍数达到 3.5 以上; 并分析了激素配比对椿叶花椒组培苗增殖的影响。

关键词: 椿叶花椒; 组织培养; 外植体; 增殖; 诱导

中图分类号: S 722.3 * 7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5710(2007)04-0017-03

A preliminary research on tissue culture of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. et Zuce.

LI Gui¹, LI Zhihui¹, TONG Fannping², YI Aiqin², SONG Qingan²

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

2. Hunan Forestry Academy, Changsha 410004, China)

Abstract: Using the caulis segment with axillary bud of *Z. ailanthoides* Sieb. et Zuce. explant, the tissue culture of the *Z. ailanthoides* Sieb. et Zuce. and breed quickly technology were studied. The results showed that: The best sterilized method was using 0.1% L mercury in 6 min, and WPM + 6-BA 0.2 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ is the best propagate development, culture 30 d, propagate multiple to above 3.5. The influence in the propagate of the tissue culture of *Z. ailanthoides* Sieb. et Zuce by different hormone mix were analyzed in the paper.

Key words: *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. et Zuce.; tissue culture; explant; propagate; induction

椿叶花椒 (*Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. et Zuce.) 为芳香科木本植物, 同时也是经济价值较高的树种, 其果皮可作调料, 种子可榨油, 根、茎、叶、果皮、种子均可入药, 是我国传统的高价值中药。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, 锐刺随树干长大而长大^[1]。生产上主要是以有性繁殖为主, 造成其品质退化, 生长缓慢, 株间整齐度差。通过组培生产的椿叶花椒苗木, 造林后生长迅速, 林相整齐, 对生产具有现实意义。

关于花椒的组织培养国内已有先例, 如许继宏和

杨云龙研究过花椒的组织培养^[2-3]; 林艳, 毕君^[4]等发表过有关日本花椒组培的论文; 朝仓花椒和山椒组织培养也有报道^[5-6], 但椿叶花椒的组织培养还未见报道。为此, 作者利用现有研究基础, 进行了花椒离体组培快繁研究, 已获得完整植株。并对椿叶花椒组织培养的增殖因素等进行试验与分析, 为该树种的组培增殖研究和生产提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

选用中南林业科技大学株洲校区经济林苗圃内椿叶花椒幼苗与 1 年生嫩梢作为外植体。切取嫩枝, 用自来水冲洗 10 min, 切割成带腋芽的小茎段, 用低浓度的洗洁精溶液清洗 2 ~ 3 遍, 再在流水下冲洗 15 min, 然后用无菌水清洗干净。

1.2 培养基的制备

收稿日期: 2007-04-16

修订日期: 2007-05-23

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)

作者简介: 李 贵 (1980-), 女, 硕士, 主要研究方向为植物生理及植物组培。

初代诱导分化培养基: WPM + BA $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

增殖培养基: 以 WPM 为基本培养基, 附加不同浓度的细胞分裂素与生长素(见表3、表9、表10);

以上培养基蔗糖浓度均为3%, 琼脂浓度为0.8%, 培养基 pH 值为5.8。

1.3 培养条件

培养室温度为 $23 \sim 26^\circ\text{C}$, 采用日光灯培养, 光照强度为 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$, 光照时数为 14 h/d 。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒时间的筛选

外植体清洗干净以后, 在无菌条件下于超净工作台上先用70%酒精消毒30 s, 再用0.1%升汞消毒3、6、8 min, 再用无菌水冲洗5~6遍, 然后切取1 cm左右带腋芽茎段, 接种到不加任何激素的MS培养基上, 25~30 d后观察不同消毒时间获得无菌外植体的情况(见表1)。表1结果表明, 0.1%升汞消毒6 min效果最好, 无菌外植体获得率为50%。

表1 不同消毒时间对获得无菌外植体的影响

消毒时间 (min)	污染芽数 (个)	死亡芽数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)	无菌外植体 获得率(%)
3	19	7	63.3	23.3	13.4
6	10	5	33.3	16.7	50
8	5	18	16.7	60	23.3

注: 接种芽数均为30个, 培养时间均为30 d。

2.2 基本培养基的筛选

外植体接种后经过25~30 d培养, 获得无菌外植体以后, 将外植体接种到4种基本培养基(均添加6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)上(见表2), 进行芽的诱导, 经过25~30 d的诱导培养, 调查各培养基上的增殖芽数和芽的生长量。表2结果表明, MS和WPM 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, 组培苗虽然高生长比较好, 但苗太细太弱, 不利于继代培养; 而在WPM培养基, 增殖倍数高, 达到116.7%, 组培苗的生长状况最好, 最高苗高达3.5 cm。

表2 不同基本培养基对增殖率的影响

基本培养基	增殖芽数 (个)	增殖芽最高 (cm)	生长状况	增殖倍数 (%)	综合 指标
MS	32	3.0	叶绿苗细	106.7	+
WPM	35	3.5	叶绿苗粗	116.7	++
B5	28	2.8	叶绿苗细	93.3	+
White	29	2.5	叶绿苗细	96.7	+

注: 接种芽数均为30个, 接种芽高均为1.0 cm。

2.3 激素配比对椿叶花椒组培苗增殖的影响

选取无菌粗壮茎芽, 切成1 cm左右的带顶芽或腋芽的茎段, 接种到附加不同激素配比的WPM培养基上, 试验因素及其水平设计见表3, 实验设计及试验结果见表4。

方差分析结果表明(表7、表8), BA对椿叶花椒组培的增殖率有显著性影响, NAA和IBA对椿叶花椒组培的苗高增量有显著性影响。极差R愈大的因素对指标的影响愈显著, 从表5、表6可知增殖率的R值以BA的最大, 苗高增量的R值以NAA和IBA的最大, 增殖培养基最佳组合为L1(BA 0.5 + NAA 0.5 + IBA 0.5)。可见对椿叶花椒组培的增殖和苗高的影响以BA、NAA和IBA为主要影响因素, BA对增殖的数量起主要作用, NAA和IBA对苗高生长起主要作用。

表3 试验因素及其水平设计 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

水平	因 素		
	BA	NAA	IBA
1	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0
3	1.2	1.2	1.2

表4 实验设计及结果

实验号	BA	NAA	IBA	增殖倍数	苗高(cm)
L1	1	1	1	3.03	2.7
L2	1	2	2	2.69	2.1
L3	1	3	3	2.34	2.0
L4	2	1	2	2.33	2.6
L5	2	2	3	1.76	1.8
L6	2	3	1	2.46	2.2
L7	3	1	3	2.18	2.2
L8	3	2	1	2.25	2.3
L9	3	3	2	1.78	2.0

表5 增殖倍数离差平方和的计算

	BA	NAA	IBA
K1	8.062 5	7.545 833	7.741 666 67
K2	6.547 421	6.696 032	6.794 444 44
K3	6.2	6.568 056	6.273 809 52
k1	2.687 5	2.515 278	2.580 555 56
k2	2.182 474	2.232 011	2.264 814 81
k3	2.066 667	2.189 352	2.091 269 84
R	0.620 833	0.325 926	0.489 285 71

表6 苗高离差平方和的计算

	BA	NAA	IBA
K1	6.791 667	7.458 333	7.208 333 33
K2	6.5	6.166 667	6.666 666 67
K3	6.5	6.166 667	5.916 666 67
k1	2.263 889	2.486 111	2.402 777 78
k2	2.166 667	2.055 556	2.222 222 22
k3	2.166 667	2.055 556	1.972 222 22
R	0.097 222	0.430 556	0.430 555 56

表7 增殖倍数方差分析表

变差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A = BA	0.653 897	2	0.326 948 49	6.647 228 49
B = NAA	0.188 288	2	0.094 143 89	1.914 050 59
C = IBA	0.369 211	2	0.184 605 29	3.753 232 05
e	0.098 371	2	0.049 185 69	
总和	1.309 767	8		

注: $F_{0.05} = 4.46$, $F_{0.01} = 8.65$, 表8同。

表8 苗高方差分析表

变差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A = BA	0.018 904	2	0.009 452 16	0.368 421 05
B = NAA	0.370 756	2	0.185 378 09	7.225 563 91
C = IBA	0.280 478	2	0.140 239 2	5.466 165 41
e	0.051 312	2	0.025 655 86	
总和	0.721 451	8		

表9 细胞分裂素 BA 对增殖率的影响

生长素种类及浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种芽数 (个)	增殖芽数 (个)	增殖芽最高 (cm)	生长状况	增殖倍数	综合指标
BA 0.5 + IBA 0.5 + NAA 0.5	40	142	3.2	叶绿苗细	3.55	++
BA 0.4 + IBA 0.5 + NAA 0.5	40	138	3.1	叶绿苗细	2.45	++
BA 0.2 + IBA 0.5 + NAA 0.5	40	144	3.5	叶绿苗粗	3.6	+++
BA 0.1 + IBA 0.5 + NAA 0.5	40	136	1.8	叶黄苗粗	3.4	++

表10 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 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种芽数 (个)	增殖芽数 (个)	增殖芽最高 (cm)	生长状况	增殖倍数	综合指标
BA 0.2 + IBA 0.5 + NAA 0.2	50	178	3.2	叶绿苗细	3.54	++
BA 0.2 + IBA 0.2 + NAA 0.5	50	165	3.1	叶绿苗细	3.3	++
BA 0.2 + IBA 0.1 + NAA 0.1	50	182	3.8	叶绿苗粗	3.64	+++
BA 0.2 + IBA 0.5 + NAA 0.5	50	145	2.6	叶黄苗细	2.9	++
BA 0.2 + IBA 0.2 + NAA 0.2	50	170	3.3	叶黄苗粗	3.4	++

$\text{mg/L} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg/L}$ 为椿叶花椒增殖最佳培养基, 增殖倍数达到 3.64, 增殖芽最高为 3.8 cm, 且组培苗生长健壮。

3 讨论

(1) 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达不到灭菌效果。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提高无菌外植体的获得率。

(2) 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, $\text{WPM} + 6 - \text{BA } 0.2 \text{ mg/L} + \text{IBA } 0.1 \text{ mg/L} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg/L}$ 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 3.5 cm, 增殖倍数达到了 3.6。

(3) 采取以下方法可有效控制玻璃化: 增加琼

2.4 增殖最佳培养基的筛选

随着继代培养次数的增多, 继代培养的组培苗出现退化现象, 愈伤组织生长旺盛、分化快, 但培养出来的苗纤细且部分呈现玻璃化现象。所以细胞分裂素与生长素的比例需要再调整。为此, 选取健壮组培苗为试材, 做单因子实验, 分别接种于附加相同生长素, 不同细胞分裂素水平的培养基上 (表9)。

培养 30 d 后, 细胞分裂素浓度为 0.2 mg/L 的培养基内增殖最佳, 增殖倍数达到 3.6, 增殖芽最高达 3.5 cm, 且组培苗生长健壮。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、不同生长素水平的培养基上 (见表10)。

培养 30 d 后, 细胞分裂素与生长素的比例为 1:1 的组合, 即培养基 $\text{WPM} + 6 - \text{BA } 0.2 \text{ mg/L} + \text{IBA } 0.1$

脂浓度, 提高培养基的硬度, 减少水分吸收; 将做好的培养基放置一段时间以降低其湿度, 等到表面不再有积水再接种; 增强光照, 适当降低培养室内温度; 正确调配培养基中激素比例, 降低培养基中细胞分裂素的用量。

参考文献:

- [1] 刘鲲. 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. 药用植物组织培养技术[M]. 北京: 中国农业技术出版社, 2003: 149-150.
- [4] 林艳, 毕君. 日本花椒组培苗瓶外生根影响因素研究[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): 353-354.