

蚬壳花椒组培苗的增殖研究

马英姿¹, 王平¹, 王晓明^{1,2}, 王丽萍¹

(1.中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2.湖南省林业科学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 为了筛选蚬壳花椒组培苗增殖的最优培养方案, 对影响组培苗增殖的因素进行了单因素试验。结果显示, 以MS为基本培养基, 添加0.5~1.0 mg/L 6-BA, 0.05~0.1 mg/L NAA 和使用添加物D对增殖影响显著, 但不同浓度差异不显著。对各单因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果表明, MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+添加物D 1.0 mg/L为蚬壳花椒增殖的最适培养基, 增殖系数可达到4。

关键词: 蚬壳花椒; 培养基; 增殖; 正交试验

中图分类号: S567.1⁺9

文献标识码: A

On factors affecting proliferation of shoot cluster of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl

MA Ying-zi¹, WANG Ping¹, WANG Xiao-ming^{1,2}, WANG Li-ping¹

(1. School of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract: To screen on the optimal cultural scheme affecting the induction of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl, the experiment was implemented by two steps. At first, with the single factor method carried out with MS as the optimal basal medium, the optimal cytokinin was 6-BA with concentration 0.5~1.0 mg/L; with NAA as the optimal auxin the concentration was 0.05~0.1 mg/L; no apparent effect of concentration of D was detected. The second, a scheme of orthogonal test, which includes 3 factors and 3 levels, was designed. The results shows: MS +6-BA 0.5 mg/L +NAA 0.05 mg/L +D 1.0 mg/L was the optimal cultural scheme, and the multiplication quotiety can reach 4.

Key words: *Zanthoxylum dissitum* Hemsl; culture medium; proliferation; orthogonal test

药用植物蚬壳花椒(*Zanthoxylum dissitum* Hemsl)为芸香科花椒属木质藤本植物, 中药名为单面针, 又名大叶花椒、大叶枇杷等, 其茎、叶、果皮均可入药^[1]。有关蚬壳花椒化学成分的研究已有报道^[2-3], 对蚬壳花椒的生境也进行了相关的调查^[4], 但至今尚无蚬壳花椒组织培养的报道。近年来随着蚬壳花椒药用价值的不断开发, 蚬壳花椒数量供不应求, 野生资源面临危机, 因此, 运用生物技术手段快速培养^[5-13], 对满足市场的需求和保护野生资源具有重要意义。笔者在蚬壳花椒离体胚培养试验的基础

上, 研究了影响蚬壳花椒继代培养的因素, 以期为加快蚬壳花椒繁殖速率, 促进蚬壳花椒组培苗生根以及工厂化育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

将蚬壳花椒离体成熟胚培养出的无菌苗作为外植体, 将带顶芽不带腋芽的无菌苗切成长度为1~1.5 cm, 接种在培养基中。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验

(1) 基本培养基的选择。选择MS, WPM, B5, White等4种培养基^[14-18], 分别添加0.5 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L NAA, 30 g/L蔗糖, 培养观察蚬壳花椒叶

收稿日期: 2006-10-22

基金项目: 株洲市千金药业股份有限公司项目(102); 中南林业科技大学青年基金项目(7001)

作者简介: 马英姿(1967-), 女, 河南巩义人, 博士研究生, 中南林业科技大学副教授。

色及生长情况, 确定最适基本培养基。

(2) 细胞分裂素及浓度的选择. 在基本培养基中, 分别添加 1.0 mg/L 6-BA, ZT, KT, CPPU, TDZ, 培养并筛选最适细胞分裂素后, 再分别设置 0.0(CK), 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 等 5 种质量浓度, 附加 0.1 mg/L NAA, 选择适宜的细胞分裂素质量浓度。

(3) 生长素及浓度的选择. 在以上筛选出的最适基本培养基、细胞分裂素及质量浓度范围的基础上, 分别添加 1.0 mg/L IBA, IAA, NAA, 培养筛选最适生长素; 设 0.0(CK), 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mg/L 5 种质量浓度, 培养后确定较适浓度范围。

(4) 添加物 D 浓度的选择. 在以上确定的培养基中加入添加物 D, 设置 0(CK), 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 4 种质量浓度, 培养观察, 确定适宜质量浓度。

以上单因素试验, 各设 4 次重复, 每个重复接种 5 瓶, 每瓶接种 5 个外植体, 培养温度(25±2) °C, 光强度 30~40 μmol/(m²·s), 每天光照 12 h, pH 值为 5.8~6.2, 培养 30 d, 观察并统计增殖系数. 增殖系数=总芽数/接种芽数。

1.2.2 多因素正交试验

在基本培养基中, 对经单因素试验筛选确定的细胞分裂素、生长素及添加物 D 的质量浓度进行配比试验. 设计正交试验 L₉(3⁴), 各因素均设 3 个水平^[5], 共 9 个处理. 每个处理接种 25 个丛芽, 试验重复 3 次. 30 d 后统计增殖系数, 并进行方差分析。

试验数据分析采用 SPSS13.0 数据统计分析软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对蚬壳花椒组培苗增殖的影响

在 WPM 培养基上的不定芽, 增殖系数达到 2.5, 但是生长不正常, 长势差, 苗细长, 叶微黄; 用 MS 培养的不定芽, 增殖系数达到 2.3, 且苗生长健壮, 茎节间长, 粗壮, 叶色较绿; White 与 B5 培养基的增殖系数很低, 不宜作为基本培养基. 方差分析表明, 不同培养基对组培苗增殖的影响极显著($p < 0.01$). 因此, 确定 MS 培养基为最适基本培养基。

2.2 不同细胞分裂素及其质量浓度对组培苗增殖的影响

添加 6-BA 与 ZT 的不定芽增殖系数分别为 2.6 和 2.7, 而添加 KT, CPPU, TDZ 的增殖系数分别为 1.4, 1.2, 1.3. 经观察, 5 种细胞分裂素对组培苗的长势、叶色、高度等的影响差异不大, 所以仅对增殖系数进行数据分析. 方差分析结果表明, 不同的细胞分裂素对组培苗增殖的影响差异显著($p < 0.01$); 6-BA 与 ZT 之间差异不显著, 但是二者与 KT, CPPU, TDZ 之间差异显著. 从增殖系数与生产成本两方面综合考虑, 选择 6-BA 作为蚬壳花椒组培苗增殖的细胞分裂素。

分别用 0.0(CK), 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L 的 6-BA 处理组培苗, 结果增殖系数分别为 1.46, 2.54, 2.56, 2.69, 2.51; 苗平均高度分别为: 0.6, 2.3, 2.0, 1.2, 1.0 cm. 方差分析表明, 不同质量浓度的 6-BA 对组培苗增殖有显著影响($p < 0.01$), 对试验数据进行曲线估计和回归分析, 得曲线估计中拟合度最高的为二次函数, 决定系数 $R^2=0.43$, 增殖系数的回归方程为: $y = -5.05 + 5.7x - 0.94x^2$, 相关系数 $r=0.63$. 随着 6-BA 质量浓度的升高, 二者的变化曲线呈抛物线状. 但是随着 6-BA 质量浓度的升高, 组苗生长高度却下降, 因此 6-BA 质量浓度的升高, 有利于增殖但不利于苗的长高, 综合考虑, 6-BA 适宜质量浓度为 0.5~1.0 mg/L。

2.3 不同生长素及其质量浓度对组培苗增殖的影响

用 NAA, IBA, IAA 处理组培苗, 其增殖系数分别为 2.3, 1.7, 1.3, 方差分析表明, 不同细胞生长素对增殖的影响极显著($p < 0.01$).

NAA 诱导丛芽形成的愈伤组织少, 增殖系数高, 叶色正常, 长势好. IBA 与 IAA 诱导丛芽时产生的愈伤组织多, 增殖系数低, 并且叶色发黄. 所以, 选择 NAA 为蚬壳花椒组培苗增殖的细胞生长素。

分别用 0(CK), 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mg/L 的 NAA 处理组培苗, 增殖系数分别为 1.8, 2.68, 2.73, 1.92, 1.87, 1.93; 不定芽的平均高度分别为 1.86, 2.79, 2.07, 1.80, 1.84, 1.55 cm. 将试验结果

的数据进行曲线估计与回归分析,曲线估计分析中二次函数的决定系数 $R^2=0.144$, 获得增殖系数的回归方程为 $y=-2.77x^2+11.3x-7.5$, 相关系数 $r=-0.57$. 表明 NAA 质量浓度对蚬壳花椒组培苗的增殖效果与不定芽生长的影响显著, 且 NAA 的质量浓度与增殖系数呈负相关, 当 NAA 质量浓度高于 0.1 mg/L 时, 不定芽的平均高度低于 2.0 cm , 说明 $0.05 \sim 0.1 \text{ mg/L}$ 的 NAA 比较适合蚬壳花椒组培苗的增殖与生长, 苗的长势也粗壮, 挺拔, 茎长, 叶色翠绿, 如果浓度过高, 则诱导形成更多的愈伤组织, 反而抑制了组培苗的生长和增殖.

2.4 不同浓度添加物 D 对组培苗增殖的影响

分别用 $0.0(\text{CK})$, 1.0 , 2.0 , 3.0 mg/L 添加物 D 处理后, 增殖系数分别为 2.5 , 3.5 , 3.61 , 3.7 ; 不定芽平均长度分别为 2.0 , 2.68 , 2.5 , 2.6 cm . 对组

培苗增殖的影响试验结果分析, 添加物 D 不同质量浓度对组培苗的增殖率和不定芽生长的影响极显著 ($p < 0.01$), 说明在蚬壳花椒增殖培养基中, 适当地加入添加物 D 有利于组培苗的增殖和生长. 多重比较结果表明, 在培养基中加入添加物 D 比对照的增殖系数和生长量都极显著地增加, 但添加物 D 不同质量浓度的处理之间没有明显差异. 从节约成本考虑, 1.0 mg/L 的添加物 D 比较适合蚬壳花椒增殖的培养.

2.5 适宜继代培养基的正交试验结果

根据以上单因素试验结果, 确定 6-BA 为因素 A, 设 0.5 , 1.0 , 1.5 mg/L 等 3 个质量浓度; NAA 为因素 B, 设 0.05 , 0.10 , 0.15 mg/L 等 3 个质量浓度; 添加物 D 为因素 C, 设 1.0 , 2.0 , 3.0 mg/L 等 3 个质量浓度, 设计正交试验 $L_9(3^4)$. 正交结果见表 1.

表 1 适宜继代培养基的正交试验筛选结果

Table 1 Result of subculture media orthogonal test

试验号	因素			增殖系数
	A(6-BA)	B(NAA)	C(添加物 D)	
1	0.5	0.05	1.0	3.9
2	0.5	0.10	2.0	3.6
3	0.5	0.15	3.0	3.1
4	1.0	0.05	3.0	2.9
5	1.0	0.10	1.0	2.8
6	1.0	0.15	2.0	2.6
7	1.5	0.05	2.0	2.8
8	1.5	0.10	3.0	2.7
9	1.5	0.15	1.0	2.5

方差分析表明, 因素 A, $F=936.42$, $p < 0.01$, 6-BA 对蚬壳花椒组培苗诱导增殖有显著差异, 增殖系数随浓度的增加而减小, 即 0.5 mg/L 6-BA 的增殖系数最大; 因素 B, $F=184.79$, $p < 0.01$, NAA 对蚬壳花椒组培苗诱导增殖有显著差异, 增殖系数随浓度的增加而减小, 即 NAA 为 0.05 mg/L 时增殖系数最大; 因素 C, $F=21.06$, $p < 0.01$, 添加物 D 对蚬壳花椒组培苗增殖有显著差异, 增殖系数也随浓度的增加而减小, 即 1 mg/L 时增殖系数最大. 各因素影响大小依次为: $\eta^2(\text{A})(0.995)$, $\eta^2(\text{B})(0.976)$, $\eta^2(\text{C})(0.824)$, 方差分析最优组合的结果为 $\text{MS}+0.5 \text{ mg/L}$ 6-BA+ 0.05 mg/L NAA+ 1.0 mg/L 添加物 D. 用

该培养方案培养 30 d 后蚬壳花椒组培苗增殖效果见图 1.

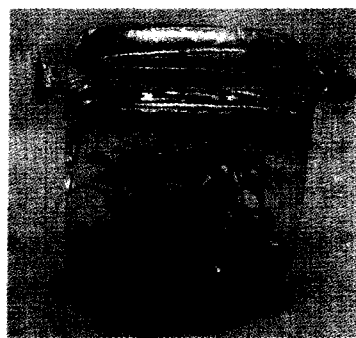


图 1 最优培养方案培养 30 d 后的蚬壳花椒组培苗

Fig.1 Result of proliferation with the optimal medium after 30 days culture

3 讨论

在基本培养基的选择中, 虽然用 WPM 培养的不定芽生长与分化均略低于 MS, 但是发现培养 45 d 以后, 用 WPM 培养的不定芽叶色正常、长势好、芽的高度一致。根据培养基的基本配方^[8], 对这几种培养基中钾、氮、钙的含量、硝酸盐的多少以及铵盐的有无进行了比较, 发现蚬壳花椒组培苗的增殖系数随无机盐浓度的增加而增高, 同时也随着这几种培养基中钙元素含量的增加而增高, 这与王树芝等^[19]的研究结果一致。如果长时间培养, WPM 似乎比 MS 更加合适。

在增殖培养时, 剪取不同长度的组培苗嫩梢, 对丛芽的诱导有较大影响。剪取的有效芽的长度应在 1.0 cm 以上, 低于 0.5 cm 的组培苗死亡率与玻璃化现象都明显上升, 严重影响了丛芽的生长与分化。另外, 也可以通过调节培养基成分、改善培养条件如光照、通风等、调节 pH 值来减少玻璃化苗的出现。

在试验中观察发现, 增殖培养的生长周期对丛芽的诱导和分化有显著影响。培养 45 d 的丛芽分化数高于培养 30 d 的丛芽的分化数; 45 d 以后丛芽的分化基本停止; 55 d 以后培养基老化对丛芽苗的生长不利。所以, 在蚬壳花椒组培苗增殖培养过程中, 过于频繁的继代, 反而达不到快速增殖的效果, 最佳培养周期宜为 45 d。

参考文献:

- [1] 刘玉壶, 吴献瑞, 吴容芳, 等. 中国植物志[M]. 第三十卷: 第一分册. 北京: 科学出版社, 1996: 103-104.
- [2] 汤俊, 朱卫, 屠治本. 蚬壳花椒化学成分的研究[J]. 中草药, 1995, 26(11): 563-564.
- [3] Tang Jun, Supinya Tewtrakul, Wang Zhengtao, et al. Aurantiamide acetate from stems of *Zanthoxylum dissitum* Hemsley[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2003, 12(4): 231-233.
- [4] 马英姿, 王平, 梁文斌. 蚬壳花椒的生境及生物学特性调查[J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 25-27.
- [5] 江巨鳌, 赵运林, 陈智勇, 等. 高羊茅愈伤组织再生系统的建立[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 29(5): 385-387.
- [6] 刘拥海, 俞乐, 黄伟华. 苦荞种子萌发条件和愈伤组织的诱导[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(1): 12-14.
- [7] 唐小艳, 易自力, 蒋建雄. 植物激素在高羊茅组织培养中的应用与进展[J]. 湖南农业科学, 2006(3): 134-136.
- [8] 钟军, 智旭丹, 杨波. 柱花草组织培养研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(5): 494-496.
- [9] 李建科, 黄俊轩, 李双跃, 等. 草木樨愈伤组织的诱导和芽的再生[J]. 天津农学院学报, 2007, 14(1): 28-30.
- [10] 罗成科, 彭正松, 蔡鹏. 三叶半夏叶片一步成苗离体培养技术[J]. 广西植物, 2007, 27(2): 260-264.
- [11] 栗茂腾, 王艳婷, 甘露, 等. 药用植物刺山柑快繁再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(1): 25-29.
- [12] 刘世彪, 陶民, 姜业芳, 等. 五柱纹股蓝的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 308.
- [13] 姚智, 高文远, 李克峰. 柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的研究[J]. 中草药, 2007, 38(2): 276-278.
- [14] 罗士韦. 组织培养技术的发展及其应用[J]. 植物生理学报, 1978, 4(3): 91-112-113.
- [15] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 318.
- [16] 颜昌敬. 植物组织培养手册[K]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 451-453.
- [17] 朱建华. 植物组织培养实用技术[M]. 北京: 中国计量出版社, 2001: 193-195.
- [18] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 105.
- [19] 王树芝, 田砚亭, 李云. 四倍体刺槐无性系组织培养技术的研究[J]. 核农学报, 2002, 16(1): 40-44.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平