

# 蚬壳花椒组培苗的生根试验

王丽萍<sup>1</sup>, 王平<sup>1</sup>, 王晓明<sup>1,2</sup>, 王海霞<sup>1</sup>, 李俊彬<sup>1</sup>

(1. 中南林业科技大学, 湖南长沙 410004; 2. 湖南省林业科学研究院, 湖南长沙 410004)

**摘要:** 以蚬壳花椒无菌组培苗为试材, 采用单因子、双因子以及正交试验研究 IBA、NAA、IAA、活性炭、基本培养基(大量元素、微量元素、有机质)对组培苗生根的影响。试验结果表明: 基本培养基、IBA、NAA 对不定根的分化有较大影响, 蚬壳花椒组培苗适宜的生根培养基为 1/3MS+IBA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+ NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>, 生根率达 78%, 移栽成活率可达 95%。

**关键词:** 蚬壳花椒; 组织培养; 生根

中图分类号: S567.7

文献标志码: A

文章编号: 1003-8981(2007)01-0034-04

## Rooting of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl Plantlet in Vitro

WANG Li-ping<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, WANG Xiao-ming<sup>1,2</sup>, WANG Hai-xia<sup>1</sup>, LI Jun-bin<sup>1</sup>

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

2. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, Hunan, China)

**Abstract:** The effects of different basal medium and hormones and activated carbon on rooting of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl plantlet in vitro were researched, by single-factor experiment, two-factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the basal medium, IBA and NAA all had great effects on differentiation of adventitious roots, and the rooting rate could reach 78% while plantlets were cultivated on 1/3MS supplemented with IBA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> and NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>, which was the optimized medium, and the survival rate of plantlets transplanted was up to 95%.

**Key words:** *Zanthoxylum dissitum* Hemsl; tissue culture; rooting

蚬壳花椒 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl, 别名为单面针、大叶花椒、山枇杷, 是芸香科花椒属植物<sup>[1]</sup>。蚬壳花椒含有多种生物碱, 具祛风活络散瘀、止痛、解毒、消肿等功效, 其根、茎、叶均可入药, 常用来治疗牙痛、腰痛、咳嗽、妇女月经过多、产后月经不调等疾病<sup>[2,3]</sup>, 是“妇科千金片”的主要成分, 具有十分重要的开发利用价值。但是蚬壳花椒的种子在自然条件下发芽率低, 其资源远远不能满足市场的需求<sup>[4]</sup>。为解决蚬壳花椒资源匮乏, 加速其在医药等行业的应用, 笔者于 2004 年进行了蚬壳花椒组培技术的研究。本文中主要研究影响蚬壳花椒组培苗生根的因素。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以蚬壳花椒无菌组培苗为试材, 将培养 25 d 左右, 苗高 2~3 cm, 苗木粗壮的组培苗接种在培养基上, 进行不定根的诱导。生根培养 30 d 后调查生根情况。

### 1.2 培养基的制备

基本培养基为 MS、WPM、White、B<sub>5</sub> 4 种, 附加成分 BA、NAA、IAA、IBA、活性炭等, pH 值为 5.8, 琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>, 蔗糖浓度 30 g·L<sup>-1</sup>。附加成分按细胞分裂素与生长素不同的配比加入基本培养基中, 培养基用

收稿日期: 2006-09-21

基金项目: 湖南省株洲市千金药业股份有限公司与中南林业科技大学生命科学院合作项目“单面针人工快繁技术中试研究”(编号: 102)。

作者简介: 王丽萍(1980—), 女, 辽宁朝阳市人。在读硕士研究生, 主要研究药用植物组织培养及化学成分分析。

300 mL的广口瓶分装,每瓶 30 mL,封口膜包扎,在 121℃和 1.1 kg·cm<sup>-2</sup>条件下,用高压蒸汽灭菌锅灭菌 25min。

### 1.3 试验设计

#### 1.3.1 基本培养基对组培苗生根的影响试验

基本培养基为 1/2MS、1/2WPM、1/2White、1/2B<sub>5</sub>,分别添加 IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,选择生长健壮的组培苗接种于 4 种培养基中,共 5 个处理,每个处理接种 25 个丛芽,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率,取平均值,进行单因子分析<sup>[5~8]</sup>。

#### 1.3.2 生长素种类对组培苗生根的影响试验

以优化的生根基本培养基为基础,分别添加 2.0 mg·L<sup>-1</sup>的 IBA、NAA、IAA,共 3 个处理,每个处理接种 25 个丛芽,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根数,取平均值,进行单因子分析。

#### 1.3.3 IBA 浓度对组培苗生根的影响试验

以优化的生根基本培养基为基础,分别添加 0.1、0.5、1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup>的 IBA,共 4 个处理,每个处理接种 25 个丛芽,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根数,取平均值,进行单因子分析。

#### 1.3.4 最佳生根培养基的筛选试验

在以上选出的基本培养基、生长素及其浓度范围的基础上,进行基本培养基中的大量元素与微量元素,生长素种类与浓度配比试验。设计正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>),因素 A 为 MS(1/2MS、1/3MS、1/4MS),因素 B 为 IBA(0.3、0.5、0.7 mg·L<sup>-1</sup>),因素 C 为 NAA(0、0.05、0.07),各因子均分为 3 个水平<sup>[9~12]</sup>。共九个处理,每个处理接种 25 个丛芽,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根数,取平均值,进行方差分析。

### 1.4 培养条件

全部培养过程在控温培养室中进行。培养温度(25±2)℃,光强度 30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间为 12 h·d<sup>-1</sup>。

## 2 结果分析

### 2.1 基本培养基对蚬壳花椒组培苗生根的影响

单个丛芽接种到附加 IBA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>的 4 种不同基本培养基上 15~20 d 后,在各培养基上均可见丛芽切口处产生白色的愈伤组织,但尚未分化不定根。随着诱导时间的延长,逐渐有不定根形成。试验结果经方差分析表明:不同基本培养基对组培苗生根有显著影响,接种在 1/2MS、培养基上的组培苗生根率达 64%,并且叶色正常,长势好。其次为 1/2WPM 生根率 30%,但是生长基本正常,但 1/2White 与 1/2B<sub>5</sub> 培养基生根率低于 20%,叶色发黄,因此,最佳基本培养基为 1/2MS(见表 1)。

### 2.2 不同生长素对蚬壳花椒组培苗生根的影响试验

将组培苗接种到附加 2.0 mg·L<sup>-1</sup>的 IBA、NAA、IAA 的 1/2MS 培养基上,培养 30 d 后,经方差分析结果表明(表 2),不同生长素对蚬壳花椒组培苗生根的影响极显著,从表 2 可以看出,2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA 处理生根率最高达到 70%,而经过 NAA 处理的组培苗,茎基部形成较多的愈伤组织,叶色发黄,掉叶,而 IBA 处理的组培苗叶色浓绿,IAA 处理的组培苗生根率低、苗长势弱。因此,诱导蚬壳花椒组培苗生根的最适宜的生长素为 IBA,其次为 NAA,IAA 不适用于蚬壳花椒组培苗生根。

表 1 不同基本培养基对蚬壳花椒组培苗生根的影响<sup>†</sup>

培养基	接种丛芽数/个	生根丛芽数/个	生根率/%
1/2MS+IBA 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	48	64a
1/2WPM+IBA 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	23	30b
1/2White+IBA 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	11	14c
1/2B <sub>5</sub> +IBA 1.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	8	10c

<sup>†</sup> 采用 Duncan 新复极差法进行平均数比较,同一栏内不同字母表示在 P<0.05 水平不同处理之间存在显著差异。以下相同。

表 2 不同生长素对蚬壳花椒组培苗生根的影响

培养基	接种丛芽数/个	生根丛芽数/个	平均生根数/条	生根率/%
1/2MS+IBA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	55	5	73.6a
1/2MS+NAA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	50	4	67.6a
1/2MS+IAA 2.0 mg·L <sup>-1</sup>	75	25	4	33.2b

因此,诱导蚬壳花椒组培苗生根的最适宜的生长素为 IBA,其次为 NAA,IAA 不适用于蚬壳花椒组培苗生根。

### 2.3 IBA 浓度对蚬壳花椒组培苗生根的影响试验

方差分析结果表明(表3),不同浓度的IBA对组培苗生根有显著影响,并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 $R^2=0.9556$ ,生根率的回归方程为: $y=26.67+22.3x-22.80x^2$ ,相关系数 $r=0.78^*$ ( $F$ 检验的概率 $P=0.02, P<0.05$ ),随着IBA浓度的升高,二者的变化曲线呈抛物线状。对回归方程求一阶导数并令其等于零,求解极值点,可得出令生根率取得极大值时的IBA浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.4 NAA 浓度对蚬壳花椒组培苗生根的影响试验

NAA浓度对蚬壳花椒组培苗生根的影响试验结果如表4,并对试验结果进行方差分析、曲线估计、回归分析,回归方程为 $y=54.07+8.94x$ ,相关系数为 $r=0.95^{**}$ ( $F$ 检验的概率 $P=0.006, P<0.01$ ),NAA浓度对组培苗生根的影响极显著,曲线估计为直线。试验结果表明:当NAA浓度过高时会先产生愈伤组织,而后在愈伤组织上诱导出不定根,当浓度高于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时都会出现愈伤组

表3 IBA 浓度对组培苗生根的影响结果

培养基	接种丛芽数 /个	生根丛芽数 /个	平均根数 /个	生根率 /%
1/2MS+IBA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	21	2	28.0 b
1/2MS+IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	36	2	48.0 a
1/2MS+IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	38	3	51.6 a
1/2MS+IBA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	39	4	53.0 a

表4 NAA 浓度对蚬壳花椒组培苗生根的影响

培养基	接种丛芽数 /个	生根丛芽数 /个	平均根数 /个	生根率 /%
1/2MS+IBA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	41	3.0	55.0 d
1/2MS+IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	44	3.5	59.0 c
1/2MS+IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	47	3.9	62.0 b
1/2MS+IBA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75	51	4.	68.0 a

织,浓度越高愈伤组织越多,虽然生根率随NAA浓度的升高而增加,但是出现了黄叶、掉叶的现象,有的甚至死亡。因此,NAA的浓度不应高于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.5 正交试验筛选出蚬壳花椒组培苗生根的适宜培养基

正交试验结果与分析(表5、6)表明,基本培养基、IBA、NAA对组培苗生根有显著影响,其影响顺序为:基本培养基>NNA>IBA,即基本培养基与IBA为主效,IBA对整个正交试验的影响不大,方差分析最优组合的结果为: $1/3\text{MS}+\text{IBA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.6 活性炭对蚬壳花椒组培苗生根的影响

将蚬壳花椒组培苗接种到培养基为: $1/3\text{MS}+\text{IBA } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,附加活性炭 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,30 d后统计结果表明,培养基中添加活性炭对蚬壳花椒组培苗不定根的诱导并无促进作用,在不添加活性炭的情况下,组培苗生根率能达到78%,而在添加活性炭的条件下,组培苗生根率不足5%。可能是由于活性炭不仅能吸附有害物质,而且也能吸附培养基中的生长素,从而不能发挥诱导生根的作用<sup>[13]</sup>。

## 3 结论与讨论

(1)研究表明,培养基、生长素的种类及浓度对蚬壳花椒组培苗生根有较大影响。基本培养基中大量元素含量降低能促进不定根的产生,以1/3为最佳,培养基中单独添加NAA、IBA即可诱导蚬壳花椒组培苗生根,有些学者的研究表明<sup>[14]</sup>,2种或2种以上的生长素或生长素与细胞分裂素配合使用,大大提高不定根的诱导率。本试验结果亦表明,生长素NAA与IBA配合

表5 筛选适宜培养基的正交试验结果

试验号	A(MS)	因素B(IBA) /( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	C(NAA) /( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	生根率 /%
1	1/2MS	0.3	0	23
2	1/2MS	0.5	0.01	17
3	1/2MS	0.7	0.05	34
4	1/3MS	0.3	0.01	63
5	1/3MS	0.5	0.05	78
6	1/3MS	0.7	0.0	50
7	1/4MS	0.3	0.05	53
8	1/4MS	0.5	0.0	53
9	1/4MS	0.7	0.01	63

表6 正交试验的方差分析结果<sup>†</sup>

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P
MS	0.71	2	0.36	571.89	0.64
IBA	0.05	2	0.002	3.631	0.015*
NAA	0.032	2	0.16	25.723	0.71
互作	0.052	2	0.26	41.635	
误差	0.06	9	0.001		

† \*显著水平 $P=0.05$ 。

使用对蚬壳花椒组培苗的不定根诱导比单独使用效果更佳即:  $1/3MS + IBA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2)研究表明,活性炭能吸附培养基中的有害物质,在植物组织培养的许多方面都有积极作用<sup>[9]</sup>。在生根阶段,活性炭对诱导某些植物的生根十分有利。同时也有研究指出活性炭对生根有抑制作用。本次试验结果表明,蚬壳花椒接种在培养为:  $1/3MS + IBA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{活性炭} 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基上不能诱导不定根发生。可能是因为活性炭不仅吸附了培养基中的有害物质,同时也吸附了培养基中的生长调节剂所致。在固体培养基中,当活性炭用量为0.05%时,常量的生长调节剂不表现作用<sup>[15]</sup>。因此,如果在蚬壳花椒不定根诱导阶段使用活性炭,应进一步研究其中生长素的用量。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物科属检索表(补编第二册)[K]. 北京: 北京出版社, 2002.
- [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.
- [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.
- [4] 李黎, 陈菲, 官伟. 药用植物组织培养的研究进展[J]. 林业科技情报, 2005, 37(1): 6.
- [5] 王晓明, 聂启英, 李永欣, 等. 灰毡毛忍冬新品种组织培养的无菌体系建立[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 14-16.
- [6] 杨振国, 孟庆繁, 唐晓杰, 等. 酸樱桃组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止[J]. 经济林研究, 2004, 22(2): 47-48.
- [7] 毕方斌, 谭晓风, 张智俊, 等. 油茶离体培养诱导再生植株的研究[J]. 经济林研究, 2004, 22(2): 5-9.
- [8] 林光平. ABT生根粉在油茶扦插育苗上的试验[J]. 经济林研究, 2005, 23(3): 36-38.
- [9] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师范专科学校学报, 2000, 2(2): 97-99.
- [10] 张国杰, 程春峰. 药剂处理对金银花扦插繁殖的影响[J]. 经济林研究, 2005, 23(2): 54-55.
- [11] 曾斌, 克热木·伊力, 郑华云, 等. 巴旦杏砧木组织培养及植株再生[J]. 经济林研究, 2005, 23(2): 21-23.
- [12] 梁称福, 范适, 李学松, 等. 芦荟试管苗生根试验研究[J]. 经济林研究 2006, 24(2): 26-28.
- [13] 卜学贤, 陈维纯. 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用[J]. 植物学报, 1998, 14(4): 401-405.
- [14] 徐进, 王玉珍, 刘小京, 等. 霍霍巴组培快繁技术体系研究 I 分化和生根培养中的激素配比[J]. 河南农业科学, 2004, (8): 21-24.
- [15] 刘用生, 曾兆云, 王秀芹, 等. 活性炭吸附作用的生物鉴定[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(2): 123-126.

[本文编校: 黄宁廷]