

花椒组织培养再生体系的建立

王 港¹, 李周岐^{1*}, 刘晓敏¹, 侯 娜¹, 刘淑明²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以凤椒的嫩茎和嫩叶为外植体,研究了不同种类和浓度的细胞分裂素(TDZ、ZT、6-BA 和 KT)和生长素(IBA 和 NAA)组合对花椒组织培养再生体系的影响,建立了完整的花椒组培再生体系。结果表明:嫩叶是诱导花椒愈伤组织较好的材料;MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+BA 0.5 mg·L⁻¹能成功诱导嫩叶产生愈伤组织,诱导率达 90%,且愈伤组织生长良好;MS+TDZ 0.03 mg·L⁻¹+BA 0.1 mg·L⁻¹能成功的诱导愈伤组织分化出正常的不定芽,诱导率达 70%;芽增殖的适宜培养基为 MS+0.4 mg·L⁻¹6-BA+0.3 mg·L⁻¹IBA,增殖系数为 20;1/4MS+0.4 mg·L⁻¹IBA 能成功诱导健壮的无根苗生根,生根率 90%以上。

关键词:花椒;再生体系;组织培养;TDZ;不定芽

中图分类号:722.37

文献标识码:A

文章编号:1001 7461(2008)03 0117 03

Establishment of Tissue Culture Regeneration System of *Zanthoxylum bungeanum*

WANG Gang¹, LI Zhou-qi¹, LIU Xiao-min¹, HOU Na¹, LIU Shu-ming²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Soft stems and amture leaves were used as explants to study the tissue culture regeneration system of *Zanthoxylum bungeanum*. The results showed that the amture leaves were suitable materials for calli inducing and the best medium was MS+0.5 mg·L⁻¹ 2,4 D+0.5 mg·L⁻¹ BA, and the inducing ratio was as high as 90%. The medium of MS+0.03 mg·L⁻¹ TDZ+0.1 mg·L⁻¹ NAA was the best one for shoot regeneration from calli. The regeneration ratio could be up to 70%. On the medium of MS+0.4 mg·L⁻¹ 6 BA+0.3 mg·L⁻¹ IBA, the adventitious could be multiplied rapidly. The multiplication coefficient was about 20. When the shoots with a length of 2cm were cultured on the medium of 1/4MS+0.4 mg·L⁻¹ IBA, more than 90% of them rooted and developed normally.

Key words: *Zanthoxylum bungeanum*; tissue culture; adventitious buds; regeneration system

传统的自然选育和杂交等育种手段耗费时间长,且随机性较大,这已远远不能满足人类社会发展的需要。以转基因为主的现代生物技术育种以其快速、高效及定向的特点,确定了其在未来植物乃至整个生物育种中的主体地位。林木再生周期长,更加迫切需要现代生物技术育种手段的引入,再生体系的建立是开展现代生物技术育种的前提条件。但由

于木本植物结构复杂,研究起步晚,只有对杨树等少数树种建立了完整的再生体系。

花椒是我国重要的香料植物和木本油料树种,还可入药,在我国被广泛栽植,有的地方甚至已经成了支柱产业。但同时也存在许多问题,如栽培品种老化,育种手段落后等^[1-3]。花椒的组织培养前人已做了部分研究^[4-7],尤其是对日本无刺花椒的组培研

收稿日期:2007-10-15 修回日期:2008-01-19

基金项目:陕西省 13115 重大科技专项(2007ZDKJ-127);西北农林科技大学植物遗传育种专项(05YZ040);国家林业局重点科学技术研究计划项目(2007-02)

作者简介:王港(1982),男,贵州六盘水人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。

*通讯作者:李周岐(1962-),博士,教授,博士生导师,主要从事林木遗传育种研究。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn.

究已取得了一定的成果^[4-6],但多是通过芽生芽的途径来进行的。这种途径只能达到快繁的目的,要利用现代生物技术手段进行花椒的育种,还必需建立通过愈伤途径的组织培养再生体系。

在前人研究的基础上,笔者对花椒再生体系,尤其是愈伤组织的形成和分化不定芽进行研究,以期建立由愈伤诱导分化芽途径的再生体系,为花椒育种开辟新的途径,同时也为其他木本植物再生体系的建立提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用花椒(*Zanthoxylum bungeanum*)品种为凤县大红袍(凤椒)。春季,采取刚抽出的嫩茎和嫩叶为外植体,采样植株树龄约 5 a。

1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织诱导 将材料用自来水冲洗干净,75%酒精浸泡 10 s 后,用 0.1%升汞消毒,消毒时间设定 2、4、6、8、10 min 4 个梯度,无菌水冲洗 5 次,备用。接种时,叶片剪去边缘,延主脉剪成 0.5 cm²的小片,嫩茎去掉两头及带腋芽部分,切成 0.5 cm 长的小段。2 种外植体分别接在附加不同浓度及配比的 NAA、6-BA 和 2,4-D 的 MS 培养基上(表 1)。每种处理接种 50 瓶,每瓶 2 块(段),培养 10 d 时统计诱导率并观察生长情况。培养条件为 25±1℃,每日补充光照 14 h,光照强度 1 500~2 000 lx。

1.2.2 愈伤组织再分化培养 将生长良好的愈伤组织切成约 0.5 cm²的薄片,接于附加不同浓度及配比的 TDZ、NAA、ZT 及 6-BA 的 MS 培养基中培养,诱导愈伤组织再分化。每种处理接种 40 瓶,每瓶 3 块。培养条件同上。

1.2.3 不定芽增殖培养 将愈伤组织产生的不定芽切成带 1~2 个腋芽的小段,接于附加不同浓度及配比的 6-BA、NAA 和 IBA 的 MS 培养基中进行培养增殖。每种处理接种 30 瓶,每瓶接种 3 个芽。培养条件同上。

1.2.4 不定芽生根培养 取健壮带顶芽的茎段切成 2 cm 长,接入含有不同浓度的 IBA 和 NAA 的 MS、1/2MS、1/4MS 培养基中诱导生根。每种处理接种 50~60 瓶,每瓶接种 1 段。培养条件同上。

1.2.5 炼苗及移栽 当根长 2 cm 时,将瓶口打开炼苗,3 d 后,移栽到室内花盆中,基质为沙子:珍珠岩:腐殖质=1:1:1 及 1:2:1,盖上覆盖保鲜

膜或地膜保湿,3 d 后逐渐延长透气时间,并移至自然光下。每种基质移栽 50 盆,每盆 2 株。

2 结果与分析

2.1 外植体及消毒时间的确定

试验表明,叶片用 0.1%的升汞消毒 4 min 可以获得最好效果,污染率约 25%,材料存活率可达 70%;嫩茎用 0.1%升汞消毒 8 min,可取得最佳效果,污染率 30%左右,存活率可达 60%。

2.2 愈伤组织诱导

研究表明,叶片愈伤组织由叶背叶脉附近产生,嫩茎也能诱导出愈伤组织,但在培养 20 d 后逐渐老化。只有添加 2,4-D 的培养基才能诱导出愈伤组织(图 1-A)。

与 2,4-D 配合使用时,6-BA 浓度在 0.5~1.0 mg·L⁻¹时愈伤组织均能较好生长,但随着浓度增大,其结构逐渐变得紧密(表 1)。

表 1 花椒嫩叶愈伤组织诱导

Table 1 Calli inducing from amature leaves of *Z. bungeanum*

激素及浓度/(mg·L ⁻¹)	诱导率/%	愈伤组织生长、颜色、质地
6-BA0.5+NAA0.5	0	—
6-BA0.5+NAA1.0	0	—
6-BA1.0+NAA0.5	0	—
6-BA1.0+NAA1.0	0	—
6-BA0.5+2,4-D0.5	33	生长量较大,前期米黄色,后期逐渐变绿,较松散
6-BA0.5+2,4-D1.0	82	生长量最大,前期浅黄色,后期逐渐变绿,松散
6-BA1.0+2,4-D0.5	88	生长量大,前期米黄色,后期逐渐变绿,紧密
6-BA1.0+2,4-D1.0	79	生长量大,前期米黄色,后期逐渐变绿,较紧密

2.3 愈伤组织的继代和分化不定芽

试验表明,结构致密的愈伤组织在相同培养基上继代培养 15 d 后逐渐老化死亡,而较松散的淡黄色愈伤组织则可稳定生长并经分化培养一段时间后逐渐变为绿色,然后分化出大量不定芽(图 1 B)。较好的愈伤组织继代培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹(表 1)。

由表 2 可知,花椒不定芽分化最佳培养基为 MS+TDZ 0.03 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹。培养 45 d 时,50%左右的愈伤组织开始分化出芽来,在随后的 15 d 内,剩余的愈伤组织陆续分化出

丛生芽,诱导率接近 100%,且分化开始后,不断有芽生出。TDZ 是诱导花椒愈伤组织分化不定芽的关键因素,当 TDZ 浓度高于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,产生的不定芽大量玻璃化,而 TDZ 浓度低于 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不能诱导愈伤组织分化不定芽。

表 2 花椒愈伤组织分化不定芽

Table 2 Shoot regeneration from calli of *Z. bungeanum*

激素及浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	不定芽分化情况
6-BA2.0+NAA0.1	愈伤组织逐渐变绿,没有分化不定芽
6-BA5.0+NAA0.1	愈伤组织逐渐变绿,没有分化不定芽
ZT2.0 NAA0.1	愈伤组织逐渐变绿,没有分化不定芽
ZT5.0+NAA0.1	愈伤组织逐渐变绿,没有分化不定芽
TDZ0.01+NAA0.1	愈伤组织逐渐变绿,没有分化不定芽
TDZ0.03+NAA0.1	40 d 以后逐渐分化出芽,有的长成叶,有的长成芽
TDZ0.05 NAA0.1	40 d 以后逐渐分化出芽,2/3 左右的芽玻璃化
TDZ0.1+NAA0.1	40 d 以后逐渐分化出芽,但呈现玻璃化

2.4 不定芽增殖

由表 3 可以看出,含 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 的 MS 培养基为花椒不定芽增殖的最佳培养基。经 25 d 培养,平均增殖系数为 6.2(图 1 C)。研究表明,用 NAA 代替 IBA 也能较快增殖,但芽苗基部肿大并愈伤化,影响芽苗质量。最初诱导产生的不定芽在增殖培养基上生长缓慢,随着芽苗继代次数的增加,生长速度逐渐加快,这可能与 TDZ 抑制顶芽生长有关^[8-9]。

表 3 不定芽增殖培养

Table 3 Shoot multiplication of *Z. bungeanum*

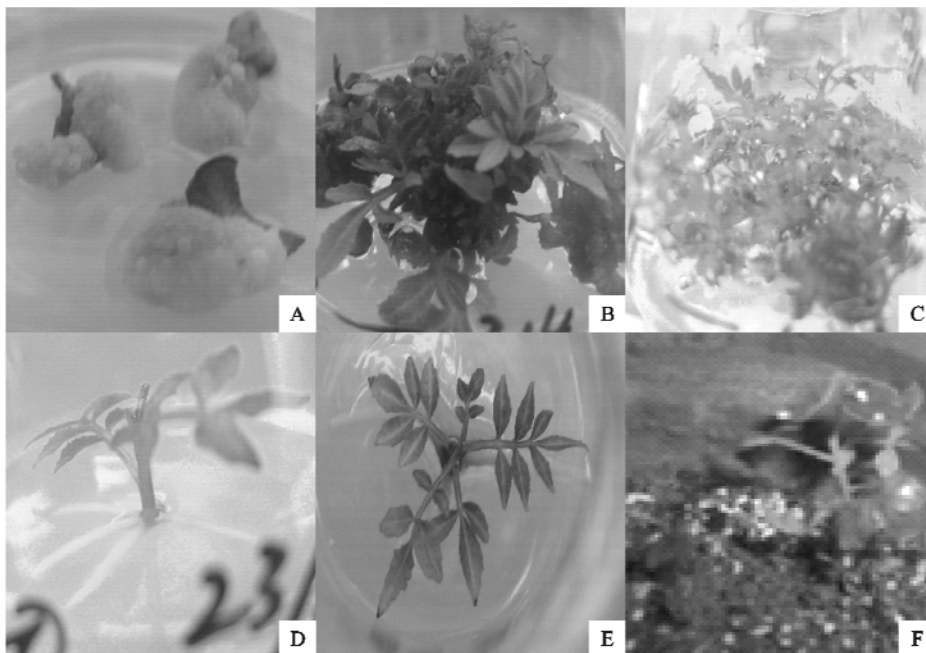
激素及浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	增殖系数	生长情况
6-BA0.1+IBA0.1	1.4	顶芽生长好,侧芽萌发慢,
6-BA0.1+IBA0.3	2.3	顶芽快速抽长,侧芽萌发慢,
6-BA0.1 IBA0.5	2.7	顶芽快速抽长,侧芽萌发慢,
6-BA0.3+IBA0.1	6.4	侧芽萌发快,顶芽生长缓慢,整体长势较弱
6-BA0.3 IBA0.3	6.2	侧芽萌发快,顶芽生长好,整体长势较强
6-BA0.3+IBA0.5	4.3	侧芽萌发快,顶芽生长好,整体长势较强
6-BA0.5+IBA0.1	3.2	侧芽萌发快,顶芽很快停止生长,长势很弱
6-BA0.5+IBA0.3	6.0	侧芽萌发快,顶芽生长好,整体长势较强
6-BA0.5+IBA0.5	2.0	芽基部和叶片着生处有愈伤组织出现,部分芽尖有玻璃化的趋势

2.5 不定芽生根

试验表明,含 IBA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1/4MS 培养基为最佳生根培养基,培养 10 d 时生根率在 90% 以上,一般可产生不定根 3~6 条(图 1 D)。当 IBA 的浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,也能诱导出根,但不定根数量明显减少(一般为 1~3 条)。用 NAA 代替 IBA 时,根部肿大,不能诱导根的分化。

2.6 炼苗及移栽

当根长 2 cm 时,将瓶口打开炼苗,幼苗叶色逐渐加深(图 1-E),以沙子、珍珠岩、腐殖质按 1:2:1 为基质移栽成活率较高(约 80%)(图 1-F)。



(A, 愈伤组织; B, 愈伤组织分化不定芽; C, 不定芽增殖; D, 生根培养; E, 炼苗; F, 移栽)

图 1 花椒组织培养再生过程

Fig. 1 Regeneration process of *Z. bungeanum* from tissue culture