

# 花椒离体愈伤组织诱导研究

崔 丹,魏安智\*,侯 娜,刘玉林

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**以“凤县大红袍”花椒嫩叶为外植体,研究不同种类和浓度的植物生长调节剂、不同盐浓度的培养基以及同一低温不同处理时间对花椒愈伤组织诱导及其生长的影响。结果表明,MS 为最适培养基;诱导花椒愈伤组织较优的生长调节剂组合为,0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D,诱导出的愈伤生长旺盛,质地松散,无褐化现象;在 0℃处理 2、4 h 仍可以获得正常的愈伤组织,不影响再分化。

**关键词:**花椒;愈伤组织;诱导分化

**中图分类号:**S722.3      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)05-0138-04

## *In vitro* Callus Induction of *Zanthoxyhum bungeanum*

CUI Dan, WEI An-zhi\*, HOU Na, LIU Yu-lin

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The tender leaves of “Fengxian Dahongpao”, a cultivar of *Zanthoxyhum bungeanum* were used as explants to study the effect of different factors on callus induction and the growth of *Zanthoxyhum bungeanum*. The results showed that MS was the best medium. The preferable combination of growth regulators was 0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, in which the calli grew vigorously with loose texture, and without browning. Furthermore, normal callus could still be obtained when treated 2 and 4 h in 0℃, indicating low temperature treatment did not affect re-differentiation.

**Key words:** *Zanthoxyhum bungeanum*; callus; induced differentiation

花椒(*Zanthoxyhum bungeanum*)为芸香科花椒属落叶小乔木或灌木<sup>[1]</sup>,是我国主要香料和油料植物,加之根、茎、叶、果实均可入药,也是重要的药用树种之一,因此在我国被广泛栽培种植<sup>[2]</sup>。截至目前,大多数花椒处于野生散生状态,而现有栽培品种因受到树种自身、地理及人为因素的影响,遗传性状不能够稳定的表现<sup>[2]</sup>。此外,传统的播种育苗技术繁育速度缓慢,短期内难以满足市场大量需求具有一定的局限性,而寻求一种能在短期内大量繁育、性状稳定遗传的繁育方法,组织培养无疑是一种最佳选择。目前,已有学者利用组织培养技术进行花椒繁育研究并取得了一定的成果<sup>[1-4]</sup>。但是,愈伤组织的再生能力弱,丧失快是组织培养扩大应用于遗

传育种的关键问题,而采用低温处理对解决这一问题具有参考意义<sup>[5]</sup>。因此,本研究在前人组织培养研究的基础上,以“凤县大红袍”为研究对象,探索建立较为完善的愈伤组织诱导体系,为花椒组织培养技术深入研究及加快育种进程奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料来自温室盆栽样品,取无病害且当年抽枝的嫩叶作为外植体。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体消毒及处理 将材料用清水冲洗干净,75%的酒精浸泡 30 s 后,2%次氯酸钠消毒 6

收稿日期:2015-11-11 修回日期:2016-02-25

基金项目:秦巴山区重要林药泛素化筛选与规范化栽培关键技术研究(201204603);国家林业局林业公益性行业科研专项项目“花椒良种选育及丰产栽培技术研究”(201304706)。

作者简介:崔 丹,女,在读硕士,研究方向:林木遗传育种。E-mail:253822170@qq.com

\* 通信作者:魏安智,男,教授,研究方向:林木遗传育种。E-mail:weianzhi@126.com

min, 无菌水冲洗 5~6 遍, 备用。将消毒好的嫩叶切去尖端和基部, 中部切成 0.5 cm<sup>2</sup> 的小块, 然后接入配好的固体培养基中培养。

1.2.2 外源生长调节剂预处理 以 MS 为培养基, 分别以 6-BA(0.1、0.5、1.0 mg/L)、NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)、2,4-D(0.1、0.5、1.0 mg/L) 为影响因子进行单因素试验, 共 3 个水平, 9 个处理, 每个处理接种 30 瓶, 于 15 d 后观察生长情况并统计分析, 选择出最佳浓度; 之后, 再进行多因素分析, 选择最适的浓度组合。

1.2.3 盐浓度预处理 以 1/4 MS、1/2 MS、MS 作为低盐、中盐、高盐处理的培养基, 加入相同的植物生长调节剂, 接入外植体后培养, 每个处理 30 瓶, 于 15 d 后观察生长情况并统计, 然后选择出花椒愈伤组织诱导最佳的培养基。

1.2.4 低温预处理 将生长良好的愈伤组织切成 0.5 cm<sup>3</sup> 的小块, 接于附加最适浓度调节剂配比的 MS 培养基中, 于 0℃ 的冰箱中低温分别处理 2、4、6、8、10、12 h, 以不进行低温处理的作为空白对照(0 h), 每个处理 30 瓶, 于 15 d 后观察愈伤组织再分化情况。

1.2.5 培养条件 将上述不同预处理的培养基均放入温度(25±1)℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度 1 500~2 000 lx 的无菌环境中培养。

1.2.6 数据分析及处理 运用 Excel2007 软件对记录的数据进行整理; SPSS19.0 软件对数据进行单因素、多因素方差分析; 部分绘图使用 Sigma Plot 软件完成。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂预处理对愈伤组织诱导的影响

经过单因素方差分析处理得知, 在 0.1、0.5、1.0 mg/L 3 个浓度梯度下, 不同植物生长调节剂对花椒愈伤组织的诱导具有显著差异(表 1)。以 0.5 mg/L 的 2,4-D 诱导率最高, 为 73.3%; 低于 0.5 mg/L 诱导率未达到 50%, 但诱导后的愈伤组织质地很好, 松散且呈淡黄色; 增加 2,4-D 的浓度, 褐化现象严重, 导致诱导率下降, 说明 2,4-D 浓度过高会抑制愈伤组织的正常诱导, 所以 2,4-D 浓度应控制在 0.1~0.5 mg/L 范围内, 以质量浓度为 0.5 mg/L 最佳。作为对照试验, 逐渐增加 NAA 质量浓度愈伤组织的诱导率也随之提高, 当 NAA 的质量浓度为 1.0 mg/L 时, 诱导率为 36.7%, 达到极显著。

此外, 在分别添加 0.1、0.5、1.0 mg/L 3 个浓度 6-BA 的培养基中均未有愈伤组织生成, 说明单独使

用 6-BA 对花椒的脱分化作用不大。但是当一定浓度的细胞生长素和分裂素配合使用, 且比例相当时就可以促进愈伤组织的分化(图 1), 继而可以诱导出芽或根, 形成再生植株。

表 1 不同浓度 NAA 和 2,4-D 对愈伤组织诱导影响  
Table 1 Effects of NAA and 2,4-D on callus induction and growth

NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	2,4-D /(mg·L <sup>-1</sup> )	接种数 /个	诱导数 /个	诱导率 /%
0.1	0.0	30	0	0c
0.5	0.0	30	5	16.7b
1.0	0.0	30	11	36.7a
0.0	0.1	30	13	43.3b
0.0	0.5	30	22	73.3a
0.0	1.0	30	16	53.5b

2.2 培养基对愈伤组织诱导的影响

由图 1 可知, 不同浓度梯度的 6-BA(0.1、0.5、1.0 mg/L) 分别与 1.0 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D 配合使用都不同程度的促进愈伤组织诱导。但加入 0.5 mg/L 2,4-D 时, 愈伤组织诱导明显高于 1.0 mg/L NAA, 说明 0.5 mg/L 2,4-D 与 6-BA 组合更有利于愈伤诱导。其中, 6-BA 浓度越高, 出愈率越大, 愈伤组织质地也更紧密, 但旺盛的愈伤组织结构以松散为宜, 所以综上得出最佳培养基是 0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D。

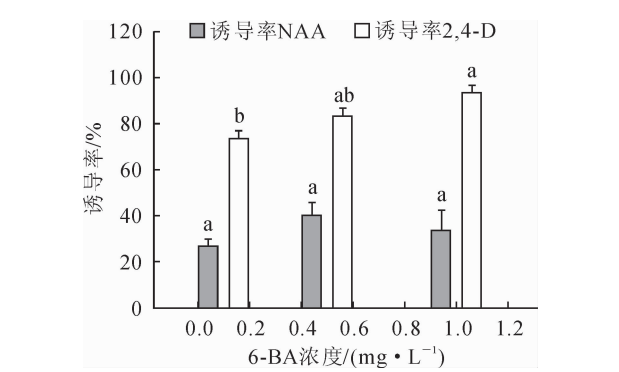


图 1 不同浓度梯度的 6-BA 分别与 1.0 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D 配合使用诱导

Fig.1 Effects of different concentrations of 6-BA used in combination with 1.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L 2,4-D

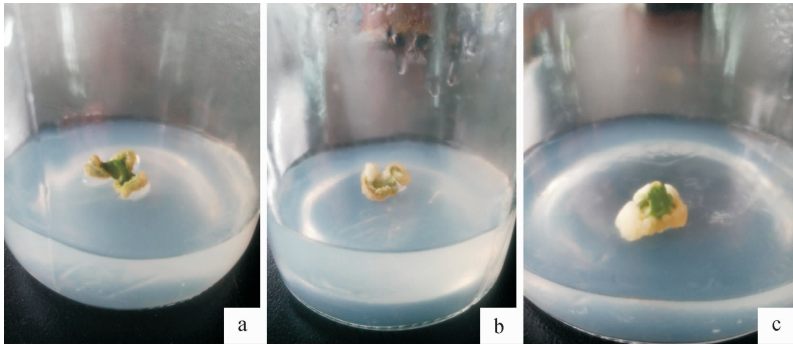
2.3 不同盐浓度预处理对愈伤组织诱导的影响

MS 培养基与 1/4、1/2 MS 培养基相比, 愈伤的诱导率最高且愈伤诱导的质地较好(图 2)。究其原因可能是与无机盐和离子浓度有关, MS 培养基中硝酸盐、钾和铵的含量大, 离子浓度高, 缓冲性好, 即使在配制、储存和消毒等过程中成分略有出入, 也不会影响离子间的平衡, 对加速愈伤组织的生长十分有利。而 1/4 MS、1/2 MS 培养基无机盐含量成分低, 不能保证愈伤所需的矿质元素, 影响愈伤生长, 综其以上得出, MS 培养基是比较理想的选择(表 2)。

表 2 不同盐浓度 MS 培养对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different salt concentrations in MS on callus induction

培养基	接种数/个	诱导数/个	诱导率/%	愈伤组织颜色、质地、生长情况
1/4MS	30	13	43.3	生长量很少、黄色、紧密
1/2MS	30	17	56.7	生长量较少、前期白色、后期黄色、紧密
MS	30	23	76.7	生长量大、淡黄色、疏松



注：a. 1/4MS(低盐)培养；b. 1/2MS(中盐)培养；c. MS(高盐)培养。

图 2 不同盐浓度处理效果

Fig. 2 The result of different salt concentrations

2.4 低温预处理对愈伤组织诱导的影响

在 0℃ 条件下处理不同时间对愈伤组织再分化具有显著差异。以处理 2、4、6 h 差异极显著,诱导率随时间递增呈现明显递减趋势,而且,表面褐化现象轻微加重,说明低温处理 4 h 是愈伤组织正常分化的阈值,超过 4 h 虽然可以分化但是褐化现象加重,对后期愈伤再分化有很大的影响;处理 8 h 时,较 6 h 相比诱导率降低了 6.67%,有显著差异,8~12 h 范围内,虽增加时间但是诱导率没有明显的降低,差异不明显,说明继续增加低温处理时间对愈伤的诱导没有较大的影响(图 3)。从总的结果来看,诱导率与低温处理时间呈正比关系,综合愈伤组织表面的形态变化,得到 0℃ 处理 2、4 h 可以获得正常的愈伤组织,并且不影响再分化。

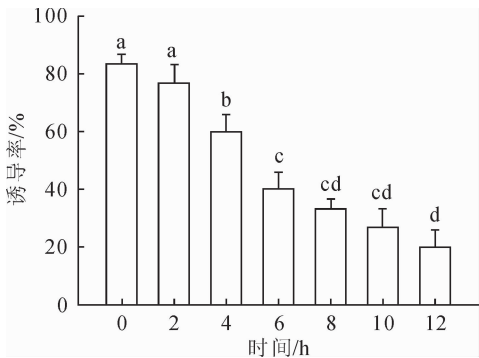


图 3 0℃ 处理不同时间对愈伤组织诱导的影响

Fig. 3 Effects of different inducing time in 0℃ on callus induction

3 结论与讨论

在植物组织培养中,外源生长调节剂的合理使

用对愈伤组织的诱导起关键性作用。细胞生长素与分裂素配合使用可以顺利诱导外植体脱分化形成愈伤,而单一作用对细胞脱分化不及前者<sup>[6-7]</sup>。王海霞<sup>[8]</sup>等研究发现,随着 NAA 浓度的增加,出愈率也随之增高,但水化现象越来越严重,说明 NAA 的质量浓度不应过高,以 1.0~2.0 mg/L 为宜。所以,本试验将 NAA 的浓度定为 1.0 mg/L。对比 NAA 和 2,4-D 的诱导率可知:在同样的浓度梯度下,2,4-D 的诱导率较 NAA 诱导率相比整体偏高,说明 2,4-D 对愈伤的诱导更有效。综合上述研究,促进花椒愈伤脱分化的最佳生长调节剂组合是 0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D。诱导出的愈伤生长旺盛,质地松散,无褐化现象,这与王港<sup>[9]</sup>等研究结果一致。目前,大部分学者主要是利用常见的植物生长调节剂,如 6-BA、IBA、NAA、2,4-D 等调控,也有新型植物生长调节剂 TDZ 的研究并取得很好的效果<sup>[9]</sup>。培养基选择方面,因 MS 培养基中含有大量的无机盐及适量的微量元素,对外植体的出愈提供良好的营养物质,所以较 1/4 MS、1/2 MS 培养基而言,MS 培养基更适合,也更有效。低温控制花椒愈伤诱导在以往的研究中很少涉及,然而低温处理对愈伤组织再生能力弱、丧失快这一问题具有参考意义,是组织培养扩大应用于遗传育种的关键所在,所以在王春艳<sup>[5]</sup>、王丽<sup>[10]</sup>等研究的基础上,本研究在低温 0℃ 处理不同时间影响外植体出愈方面进行初步的试验及探讨,发现低温 0℃ 处理短时间后恢复常温环境不影响愈伤的正常生长,这与细胞全能性理论符合<sup>[11]</sup>,且适宜的低温有利于出愈,且继代扩

大培养后愈伤组织的再生能力也并未减弱,这与朱晓花<sup>[12]</sup>等研究结果相一致。其他影响因素对愈伤组织的诱导及胚状体的正常生长是否有影响、如何影响,还有待进一步研究。同时,在愈伤组织正常生长研究的基础上,还要逐步提高增殖系数,扩大规模,形成生产化模式,为现代农林业良种繁育提供技术支撑。

参考文献:

[1] 毕君,赵京献,王春荣,等. 国内外花椒研究概况[J]. 经济林研究,2002,20(1):46-48.  
BI J,ZHAO J X,WANG C R,*et al.* World research progress in bunge pricklyash (*Zanthoxylum bungeanum*) [J]. Economic Forest Researches,2002,20(1):46-48. (in Chinese)

[2] 林艳,郭伟珍,毕君. 日本花椒组培苗瓶外生根影响因素研究[J]. 林业科技发展,2004,18(5):38-39.

[3] 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.  
GUO W Z,LIN Y,BI J,*et al.* Studay on tissue culture of *Zanthoxylum piperitum* DC var. *inerme* makino[J]. China Forestry Science and Technology,2005,19(5):19-21.

[4] 陈霄鹏,吕瑞娥. 日本无刺花椒的组培快繁技术[J]. 林业实用技术,2005(9):23-24.

[5] 王春艳,何力. 低温处理对水稻幼穗愈伤组织再生植株的影响[J]. 植物生理学通讯,1989(5):53.  
WANG C Y,HE L. Effects of low temperature on regenerated-plant of young ear callus from rice[J]. Plant Physiology Communications,1989(5):53.

[6] 李瑞雪,汪泰初,胡飞,等. 6-BA,IBA,NAA 对桑组培苗继代增殖的影响[J]. 农学报,2012,2(11):37-39.  
LI R X,WANG T C,HU F,*et al.* Influence of 6-BA,IBA and NAA on sub-proliferation of mulberry tissue culture[J]. Journal of Agriculture,2012,2(11):37-39. (in Chinese)

[7] 易永华. 生长素和细胞分裂素在芦笋组织培养中的作用[J]. 农药,1993,32(4):15-16.

[8] 王海霞,王平,王晓明,等. 蜆壳花椒愈伤组织诱导的影响因素[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(2):147-149.  
WANG H X,WANG P,WANG X M,*et al.* Effects of phytohormones on callus induction of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Nat. Sci. Edi. , 2008,34(2):147-149. (in Chinese)

[9] 王港,李周岐,刘晓敏,等. 花椒组织培养再生体系的建立[J]. 西北林学院学报,2008,23(3):117-119.  
WANG G,LI Z Q,LIU X M,*et al.* Establishment of tissue culture regeneration system of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(3):117-119. (in Chinese)

[10] 王丽,陈耀锋,张月琴,等. 低温与植物生长调节剂预处理对小

麦成熟胚培养特性的影响[J]. 西北植物学报,2013,33(5):1041-1046.  
WANG L,CHEN Y F,ZHANG Y Q,*et al.* Effect of low-temperature and plant growth regulator pretreatment on embryo culture characteristics of wheat mature embryo[J]. Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin. ,2013,33(5):1041-1046. (in Chinese)

[11] 陈耀锋. 植物组织与细胞培养[M]. 北京:中国农业出版社,2007:56-63.

[12] 朱晓花,孙吉雄,梁慧敏,等. 低温预处理与植物生长调节剂对结缕草愈伤组织诱导的影响[J]. 草业科学,2009,26(4):121-126.  
ZHU X H,SUN J X,LIANG H M,*et al.* Effect of low temperature and plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Zoysia japonica* cv. *qingdao*[J]. Pratacultural Science,2009,26(4):121-126. (in Chinese)

[13] 张日清,闻丽,刘友全,等. 低温预处理对油茶花药愈伤组织诱导的影响[J]. 中南林学院学报,2005,25(6):24-28.  
ZHANG R Q,WEN L,LIU Y Q,*et al.* Effects of low temperature pretreatment on callus induction from oil-tea anther[J]. Journal of Central South Forestry University,2005,25(6):24-28. (in Chinese)

[14] 刘玉冰,谭会娟,鲁艳. 红砂愈伤组织耐低温和盐胁迫的适应性[J]. 兰州大学学报:自然科学版,2016,46(6):68-72.  
LIU Y B,TAN H J,LU Y. Characteristics adapting to cold and salt stresses in callus culture of *Reaumuria soongorica* [J]. Journal of University: Nat. Sci. Edi. ,2016,46(6):68-72. (in Chinese)

[15] 马英姿,王平,王晓明,等. 蜆壳花椒组培苗的增殖研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(5):552-555.  
MA Y Z,WANG P,WANG X M,*et al.* On factors affecting proliferation of shoot cluster of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Nat. Sci. Edi. , 2007,33(5):552-555. (in Chinese)

[16] 侯娜,郭军战,王港,等. 东方百合组织培养研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(3):120-122.  
HOU N,GUO J Z,WANG G,*et al.* Tissue culture of *Lilium oriential* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(3):120-122. (in Chinese)

[17] 薛惠丹,李周岐. 花椒愈伤组织 EMS 诱变及变异研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(2):98-101.  
XUE H D,LI Z Q. Variation and EMS mutagenesis in callus of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(2):98-101. (in Chinese)

[18] 石文山. 沙漠乔桑离体快繁与试管苗生根基质的研究[J]. 北方园艺,2007(8):191-193.  
SHI W S. Study on rapid tissue culture and culture medium of tube seeding to the desert tall mulberry[J]. Northern Horticulture,2007(8):191-193. (in Chinese)