

山茱萸腋芽诱导及增殖研究¹

王 会

(襄阳职北技术学院, 湖北 襄阳 441050)

【摘要】: 研究了消毒时间、基本培养基、不同激素组合、光照长度对山茱萸腋芽诱导及增殖影响。结果表明: 用 0.1%升汞溶液+吐温 80 消毒处理山茱萸嫩茎 14~16mm, 外植体的污染和死亡得到较好控制, 成活率高达 85.5%。在 1/2MS 基本培养基中, 添加 6-BA1.0mg·L⁻¹+GA0.5mg·L⁻¹+IBA0.5mg·L⁻¹腋芽诱导增殖系数达 4.8; 在山茱萸腋芽诱导增殖阶段, 能获得较高的增殖系数而又能较好控制玻璃化苗率光照时数应 14h/d。

【关键词】: 山茱萸; 腋芽诱导; 增殖

【中图分类号】: Q945.45 **【文献标识码】:** A

山茱萸 (*Macrocarpium officinalis*) 为山茱萸科、山茱萸属的落叶灌木、小乔木, 是我国传统的珍贵中药材, 也是一味集观赏、药用、食用和材用于一体的多用途植物。湖北襄阳种植山茱萸历史悠久, 但山茱萸的常规繁殖中种子繁殖速度慢且变异率大, 扦插繁殖成活率、生根率低, 嫁接繁殖则需要耗费大量的劳力和财力。所以利用组织培养技术来获取山茱萸优良无性系后代, 快速高效地获得大量无性系组培苗, 是山茱萸规模化种植的必然趋势。本试验通过基本培养基、不同激素组合、光照长度等对山茱萸腋芽诱导增殖影响的研究, 筛选出有利于腋芽诱导增殖的基本培养基及激素的最佳组合等条件, 为建立稳定的高频再生系统, 实现山茱萸工厂化、规模化生产提供技术支持。

1、试验材料和方法

1.1 试验材料

采自湖北襄阳保康山茱萸盛果期当年生的嫩茎。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒灭菌。将嫩茎用洗衣粉浸泡 30 分钟后流水冲洗, 再放入 75%酒精浸泡 30s, 然后在 0.1%升汞溶液+吐温 80 中分别灭菌 8~10min、11~13min、14~16min、17~19min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 在超净台上将嫩茎切成 1~1.5cm 茎段, 每段带 1 个腋芽, 接种在 1/2MS 培养基上, 每组 50 瓶。7d 后观察茎段生长状况、成活率。培养条件为温度 23±2℃, 每日光照 14h, 光强 2000~3000Lx。

1.2.2 基本培养基对山茱萸腋芽诱导增殖影响。将成活 10d 的山茱萸茎段转接在添加 6-BA1.0mg·L⁻¹+GA0.5mg·L⁻¹+IBA0.5mg·L⁻¹的 1/2MS、MS、B5、WPM 基本培养基上, 每组 20 瓶, 每瓶 1 个茎段, 重复 3 次。培养条件为温度 23±2℃, 光照

¹[收稿日期]: 2017-09-26

[项目来源]: 湖北省教育厅科学技术研究项目“山茱萸规范化种植技术研究与基地建设”B2014226。

[作者简介]: 王会 (1968-), 女, 副教授, 主要从事植物生物及种植技术的教学与研究工作。

14h·d⁻¹，光强 2000~3000Lx。培养 30d 后观察山茱萸茎段腋芽生长及增殖情况。

1.2.3 激素对山茱萸腋芽诱导增殖影响。在无菌操作台上将生

长健壮山茱萸瓶苗分切 1~1.5cm 大小带叶茎段，单株转接到添加不同激素配比的 1/2MS 培养基中（6-BA mg·L⁻¹: 0.5、1.0、2.0, GA mg·L⁻¹: 0.05、0.1、0.5; IBA mg·L⁻¹: 0.05、0.1、0.5），每瓶 5 株。利用 L₉ (3⁴) 正交表安排试验，每处理 20 瓶，重复 3 次。培养条件为：温度 (23±2) °C，光照 14h·d⁻¹，光照强度 2000~3000Lx。30d 后观察记录腋芽诱导增殖生长状况。

1.2.4 光照对山茱萸腋芽诱导增殖的影响。光照强度为 2000~3000 Lx，光照长度设置 4 个水平：10h/d、12h/d、14h/d、16h/d。将山茱萸茎段转接在添加 6-BA 1.0mg·L⁻¹+GA 0.5mg·L⁻¹+IBA 0.1mg·L⁻¹ 的 1/2MS 培养基上，每组 20 瓶，每瓶 5 个带叶茎段，重复 3 次。培养条件为温度 23±2℃。培养 30d 后观察山茱萸茎段腋芽生长及增殖情况。

以上 1/2MS 培养基均加入 0.8%琼脂，3%的蔗糖。培养基 pH 为 5.8。

2、结果与分析

2.1 HgCl₂ 消毒处理时间对山茱萸外植体灭菌效果的影响

用 0.1%升汞溶液+吐温 80 消毒处理山茱萸嫩茎，消毒时间短，则污染率高，消毒时间过长，污染率会降低，但会杀死嫩茎，这样都会导致接种嫩茎成活率低。从试验结果（表 1）看，用 0.1%升汞溶液+吐温 80 消毒处理山茱萸嫩茎 8~10min，污染率高达 79.3%，外植体成活率 20.7%。随着消毒处理增加，外植体污染率大大下降，但死亡率增加。当消毒处理时间增加到 17~19min，污染率降到 0，死亡率增加到 63.3%，所以成活率 36.7%。只有当消毒处理时间控制在 14~16min 时，虽然外植体污染率 10.5%，但死亡率只有 4%，使成活率为最高，达到 85.5%。因此，自室外采集山茱萸嫩茎作为外植体，用 0.1%升汞溶液+吐温 80 消毒处理，时间最好 14~16min，此时外植体的污染和死亡得到较好控制，成活率高达 85.5%。

表 1 HgCl₂ 消毒处理时间对山茱萸外植体灭菌效果的影响

消毒处理时	接种数	污染率%	成活率%
8~10min	50	79.3	20.7
11~13min	50	56.5	42
14~16min	50	10.5	85.5
17~19min	50	0	36.7

2.2 基本培养基对山茱萸腋芽诱导增殖影响

接种在添加 6-BA 1.0mg·L⁻¹+GA 0.5mg·L⁻¹+IBA 0.5mg·L⁻¹ 的 1/2MS、MS、B5、WPM 基本培养基上的山茱萸嫩茎段，培养了 2 周后腋芽陆续开始萌动生长并增殖形成丛芽，30d 后调查结果见表 2。在 MS 培养基上萌动的山茱萸腋芽生长很缓慢，叶片卷曲、玻璃化较严重。在 1/2MS、B5、WPM 基本培养基上萌动的山茱萸腋芽虽然生长正常，生长速度基本一致，但腋芽增殖的系数有明显差异。其中 1/2MS 基本培养基上诱导的腋芽丛增殖系数最高为 4.8。因此，对比 4 种基本培养基的腋芽丛诱导及增殖的表现，1/2MS 基本培养基是最适合山茱萸腋芽诱导增殖的。

表 2 基本培养基对山茱萸丛芽诱导增殖的影响

基本培养基	接种数	腋芽增殖系	丛芽生长状况
1/2MS	60	4.8	生长正常
MS		1.7	叶片卷曲、 玻璃化较严重
B5		2.3	生长正常
WPM		3	生长正常

2.3 激素对山茱萸腋芽诱导增殖的影响

山茱萸带叶茎段在 $L_9(3^4)$ 正交试验 9 个不同激素配比的培养液中培养 30 天时, 均呈现了不同程度的腋芽生长及增殖, 增殖腋芽丛苗的生长状况也出现了较大差异。

表 3 激素对山茱萸丛芽诱导增殖影响

处理	激素组合	增殖系数	增殖腋芽丛苗生长状况
1	6-BA0.5+GA0.1+IBA0.05	2.7	基部形成愈伤, 生长慢
2	6-BA0.5+GA0.5+IBA0.1	2.1	基部形成大量愈伤, 生长慢
3	6-BA0.5+GA1.0+IBA0.5	1.7	基部形成大通伤, 生长慢
4	6-BA1.0+GA0.1+IBA0.1	3.2	生长正常
5	6-BA1.0+GA0.5+IBA0.5	4.8	生长健壮, 叶色浓绿
6	6-BA1.0+GA1.0+IBA0.05	3.0	生长正常
7	6-BA2.01-GA0.1+IBA0.5	2.4	叶片卷曲玻璃化
8	6-BA2.0+GA0.5+IBA0.05	2.7	叶片卷曲玻璃化严重
9	6-BA2.0+GA1.0+IBA0.1	2.1	叶片卷曲玻璃化

由表 3 显示, 在处理 1~3 中, 增生的腋芽苗基部都形成愈伤, 且生长素所占比例越多的形成的愈伤越多; 在处理 7~9 中, 增生的腋芽丛苗都表现为玻璃化, 且分裂素所占比例越多的玻璃化现象越严重; 在处理 5 (6-BA1.0+GA0.5+IBA0.5) 中, 腋芽丛芽诱导增殖效果最好, 增殖系数达 4.8, 而且苗生长健壮, 叶色浓绿, 达到生根苗的要求, 不需要壮苗就可以直接生根培养。这也说明保持一定的细胞分裂素和生长素两类激素的比例对植物的芽增殖很重要。因此, 由 $L_9(3^4)$ 正交表试验结果可知, 在 1/2MS (琼脂 0.8%) 基本培养基中最适合山茱萸腋芽诱导增殖的激素配比组合是 $6\text{-BA}1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{GA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA}0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 光照对山茱萸腋芽诱导增殖的影响

由图 1 表明, 随着光培养时数由 10h/d 增加到 14h/d, 山茱萸腋芽诱导的增殖系数也逐渐增大, 玻璃化苗率逐渐降低。当光照长度为 14h/d, 山茱萸腋芽增生的增殖系数达到最大为 4.8, 玻璃化苗率接近最低值。而光照长度由 14h/d 增加到 16h/d, 山茱萸腋芽的增殖系数稍有降低, 而玻璃化苗率基本不变。说明光照长度在 10~14h/d 的范围内对山茱萸的增殖系数和玻璃化率影响较大, 特别是在 10~12h/d 之间, 山茱萸玻璃化苗率与光照长度之间存在极显著负相关, 而与增殖系数存在明显的正相关, 即光照时数越长, 增殖系数越大, 玻璃化苗率越小。光照长度由 16h/d 降到 14h/d, 山茱萸增殖芽苗的增殖系数和玻璃化苗率略有改变但不明显。所以, 在山茱萸腋芽诱导增殖阶段, 能获得较高的增殖系数而又能较好控制玻璃化苗率光照时数应 14h/d。

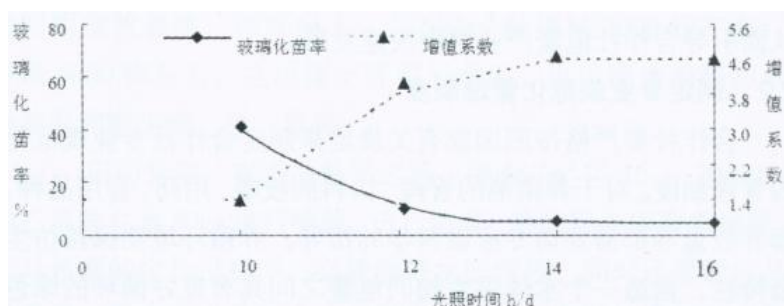


图 1 光照长度对山茱萸试管苗玻璃化影响

3、讨论

基本培养基是植物组织培养的物质基础，也是决定组织培养能否成功的关键。在基本培养基的筛选中，我们发现 1/2MS 培养基（0.8%琼脂）更有利于山茱萸腋芽诱导增殖丛芽。MS 培养基上诱导的腋芽玻璃化现象较严重，这可能是 1/2MS 培养基中较低的 NH_4^+ 有效地降低了玻璃化苗的发生率。

在培养基的各种成分中，没有哪一种能比植物激素所产生的影响更大。适当的细胞分裂素与生长素的比例是控制器官发育的模式。本试验中山茱萸腋芽诱导增殖丛芽培养受培养基中外源激素的影响很大，高浓度的分裂素 6-BA2.0 使增殖的腋芽玻璃化严重，而高浓度的生长素 IBA0.5 诱导培养的山茱萸基部形成愈伤，只有 6-BA1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的激素配比诱导山茱萸腋芽增殖效果最好，增值系数达到 4.8。

山茱萸在增殖培养中很容易玻璃化，本研究通过对基本培养基的筛选、培养基中激素配比的调整都对控制玻璃化苗的发生有较好的作用。同时，也发现光培养不仅对山茱萸腋芽诱导增殖有影响，也直接影响山茱萸玻璃化苗的发生率。光效应主要表现在光照强度、光照时间和光质等方面。本研究结果表明，光照时间长度不但影响山茱萸腋芽的增值系数，还影响山茱萸玻璃化苗率。在山茱萸腋芽诱导增殖阶段，能获得较高的增值系数而又能较好控制玻璃化苗率光照时数应 14h/d。

[参考文献]:

- [1]杨寻, 张扬, 等. 山茱萸科植物组织培养研究进展[J]. 种子, 2016 (8) : 52-54.
- [2]王清连主编. 植物组织培养, 北京: 中国农业出版社, 2002: 7-2.
- [3]沈海龙主编. 植物组织培养技术, 北京: 中国林业出版社, 2012: 7.
- [4]裴莉昕, 纪宝山. 山茱萸组培快繁研究[J]. 中国西部科技, 2015 (2) : 67-68.
- [5]谭文澄主编, 观赏植物组织培养技术, 北京: 中国林业出版社, 1991: 60-61