

## 山苍子带芽茎段的组织培养\*

Culture of the *Litsea cubeba* of Buds

马崇坚, 邓艳敏

Ma Chongjian, Deng Yanmin

(韶关学院英东生物工程学院, 广东韶关 512005)

(Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong, 512005, China)

**摘要:**以山苍子 (*Litsea cubeba*) 带芽茎段作为外植体进行组织培养实验。实验以 MS 为基本培养基, 按不同比例添加激素, 配制成 3 种培养基: MS+ 2, 4-D0.5 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L, MS+ 2, 4-D1.0 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L, MS+ 2, 4-D0.5 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L, MS+ 2, 4-D1.0 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L, MS 培养基作为空白对照, 在暗培养和光照培养条件下进行愈伤组织和芽的诱导分化。结果显示: MS+ 2, 4-D1.0 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L 为诱导愈伤组织的最好培养基, 诱导率最高, 达 55.6%; MS+ 2, 4-D0.5 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L 为最好的萌芽培养基, 萌芽率最高, 达 60%; MS+ 2, 4-D1.0 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L 为最好的丛生芽增殖培养基, 增殖系数达 8±1.4。

**关键词:** 山苍子 愈伤组织 组织培养

中图分类号: S722.37 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)02-0156-02

**Abstract** The *Litsea cubeba* is a kind of precious aromatic trees with high economic benefit. This paper is about the tissue culture of *Litsea cubeba*'s buds. There were four mediums, such as MS+ 2, 4D0.5 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L, MS+ 2, 4D1.0 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L, MS+ 2, 4D0.5 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L and MS+ 2, 4D1.0 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L was being test in our experiment for inducing *Litsea cubeba* callus and differentiation, with MS medium as control. The results showed that MS+ 2, 4D1.0 mg/L+ 6-BA2.0 mg/L were the best medium for callus inducing, which ratio reached 55.6%. And the medium MS+ 2, 4D0.5 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L was the best for shooting. Otherwise, MS+ 2, 4D1.0 mg/L+ 6-BA3.0 mg/L could be the appropriate medium for multiplications.

**Key words** *Litsea cubeba*, callus, tissue culture

山苍子 [*Litsea cubeba* (Lour) Pers.] 是珍贵的野生芳香油料树种, 其果实、花、叶以及树皮中都含有芳香油, 广泛应用于食品、医药、化妆品等化工、轻工和环保行业中, 国内外需求量极大<sup>[1~5]</sup>。但山苍子至今仍多是分布零星, 不成规模。播种育苗大多采用野生种子进行, 没有建立优良的采种母树林基地。同时, 传统的播种育苗法繁殖系数较低, 无法满足种苗需求量剧增的需要, 而且耗时耗地<sup>[6,7]</sup>。近年来, 已有了少数关于山苍子组织培养的相关研究报道<sup>[8~10]</sup>, 但研究还处于探索阶段, 未见进一步的开发与利用的报道。本文以山苍子带芽茎段作为实验材料, 试图摸索

出适合于进行组织培养的培养基配方, 为进一步探索出一条通过组织培养的方法大量繁殖山苍子种苗的途径提供理论依据。

## 1 材料与方法

选择生长健壮、无病虫害、优良结实的山苍子单株, 取直径 0.3~0.5cm 的半木质化枝条, 用自来水冲洗浸泡 10~15min, 流水冲洗 1h, 取其带芽茎段于无菌条件下, 用 75% 酒精消毒 20s, 再用 0.1% 升汞处理 6~10min, 无菌水冲洗 5~6 次, 然后将材料切成 1~2cm 的小段供接种使用。

以 MS 为基本培养基, 按不同比例添加激素, 配制成不同的培养基 (见表 1), 并以 MS 培养基作为空白对照。接种后暗培养 1~2 周后转入光培养。培养温度为 (25±2)°C, 光照 1500~2000Lx, 光照时间 12h/d, 进行愈伤组织与芽的诱导分化。

收稿日期: 2005-01-26

修回日期: 2005-03-07

作者简介: 马崇坚 (1975-), 男, 广西容县人, 博士, 主要从事植物生理学及发育生物学研究工作。

\* 广东省韶关市重点课题 (韶科教 2001-02) 资助。

表 1 6-BA与 2,4-D的不同组合

Table 1 Different concentration of 6-BA and 2,4-D

处理 Treatment	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
1	2.0	0.5
2	2.0	1.0
3	3.0	0.5
4	3.0	1.0

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素配比对山苍子诱导愈伤组织的影响

山苍子带芽茎段接种后暗培养 18d 后,处理 2 和处理 3 外植体的切口处出现膨大并爆破。茎皮开始形成愈伤组织,培养 20d 时作为对照的处理 0 开始出现愈伤组织。处理 2 萌发时间最早,生长速度最快,愈伤组织的数量也最多,诱导率最高为 55.6%,但愈伤组织块较小(见图 1)。处理 0 和处理 3 的愈伤组织数量也增多,但体积大小不均,其中处理 3 的愈伤组织块最大,但数量较小(见表 2)。说明高浓度激素组合开始发生愈伤组织的时间比低浓度开始发生的时间短。在转入光培养后,愈伤组织逐渐转成绿色小突起团状体。



图 1 来自茎段的愈伤组织

Fig. 1 The callus comed from stalk

表 2 不同激素配比对山苍子诱导愈伤组织的影响

Table 2 Effects of different hormones on the callus of *Litsea cubeba*

处理 Treatment	出现愈伤组织的天数 Days of callus appear(d)	接种数(个) No. of inoculated	发生愈伤组织数(个) No. of callus happen	愈伤诱导率(%) Efficiency of callus induced	生长情况 Situation
0	20	11	6	45.5	雪花状,体积小 Incompact, smaller
1	0	10	0	0	无愈伤组织形成 no callus
2	18	9	5	55.6	浅绿色,团状,大小不均 Viridescant and inhomogenous
3	18	10	2	20.0	绿色,球状,体积最大 Green, biggest
4	20	10	1	10.0	深绿色,团状 bottle green group

### 2.2 不同激素配比对山苍子的诱导分化影响

暗培养期间,由于一些茎芽的切口含油较多而被

褐化。暗培养 2 周后发现芽的萌动,3 周后发现愈伤组织开始萌动。实验中观察到,在暗培养中芽萌动的速度较慢,缩短暗培养的时间提早光照培养可加快芽萌动和生长的速度。培养 20d 后愈伤组织不明显,但芽的启动率逐渐提高,刚开始的白色嫩芽尖,因光照而逐渐变成嫩绿色,其生命力很旺盛(见图 2)。2 个月 后,茎芽切口发现明显愈伤组织。而芽的生长也越来越旺盛,并出现丛生芽,形成上长丛生芽,下长愈伤组织的状态。部分带芽愈伤组织在培养一段时间后逐渐褐化。转换培养基时,可将丛生芽分开进行继续培养,成活率较高。

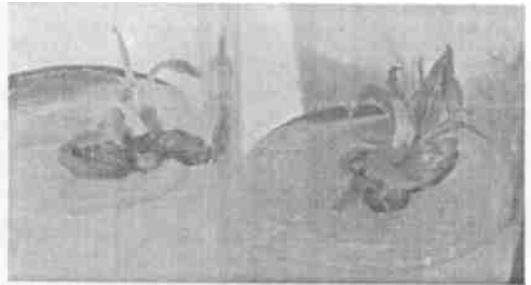


图 2 20d 山苍子试管苗

Fig. 2 20 days micro-plant of *Litsea cubeba*

从表 3 结果可见,暗培养 8d 最早发生芽萌动,直接进行光培养 5d 最早发现芽萌动。处理 3 的培养基为此次实验的诱导芽萌动的最佳培养基,它的诱导系数为 60.0%,处理 1 芽苗粗壮而少。处理 2 诱导芽苗萌发的几率也不错,它的芽苗较多且细长。处理 4 与处理 2 较为接近,其中不添加激素的。处理的芽苗生长适中。随着时间的延长,芽苗生长旺盛,外植体切口处出现愈伤组织萌动。

表 3 不同激素组合对山苍子的诱导分化影响

Table 3 Effects of different hormones to the bud breed of *Litsea cubeba*

处理 Treatment	开始发芽天数(暗/光) Days of geminate (Darkness/light)	接种数(个) No. of inoculated	第 20d 的有效芽数(个) Effective buds of 20th days	诱导系数 Induce quotients (%)
0	10/5	11	4	36.6
1	8/5	10	2	20.0
2	9/5	9	4	44.4
3	8/5	10	6	60.0
4	10/5	10	4	40.0

\*: 暗表示暗培养处理,光表示光照培养处理。Darkness treatment and light treatment.

### 2.3 不同激素配比对山苍子丛生芽增殖的影响

山苍子芽苗通过增殖培养后可产生大量的丛生芽萌发。从表 4 可以看出,对照培养基的增殖系数不显著,其中处理 4 的增殖系数最高,为  $8.0 \pm 1.41$ ,说明 MS+2,4-D 1.0mg/L+6-BA 3.0mg/L 培养基较

(下转第 160 页 Continue on page 160)

24.8 μm),极面观为深三裂圆形。具3孔沟,沟深且宽达两极,沟内具点状疣。外壁具网状雕纹。见图2(d e f)

### 3 结论

根据上述结果分析,山东槐属花粉在形状上均为长球形,均具3孔沟,大小差异不大,表现出了属的一致性。而从花粉粒表面雕纹和孔沟形状来看,明显分为三类:一类是花粉外壁具穴状雕纹,孔沟较浅且窄,如槐、龙爪槐,其亲缘关系相近,此结构支持了龙爪槐为槐的变型的分类;因龙爪槐外壁除较多穴状雕纹外,还具少量网状雕纹,明显区别于槐;二类是花粉外壁具点状坑雕纹,如苦参;第三类是花粉外壁具网状雕纹,孔沟较宽且深,如白刺花。上述结构特征,明显表现出种与种之间,种与变型之间的差异,可作为种

的分类依据,进行分种检索:

1. 花粉粒外壁具点状坑雕纹 ..... 苦参 *S. flavescens* Ait.
1. 花粉粒外壁具穴状和网状雕纹
  2. 孔沟较浅且窄,花粉粒外壁具穴状雕纹
    3. 具穴状雕纹 ..... 槐 *S. japonica* L.
    3. 具较多穴状雕纹和少许不规则网状雕纹 ..... 龙爪槐 *S. japonica* f. *pendula* Hort.
  2. 孔沟较宽且深,花粉粒外壁具网状雕纹 ..... 白刺花 *S. davidii* (Franch.) Skeels

参考文献:

[1] 陈汉斌,郑亦津,李法曾.山东植物志(下卷)[M].青岛:青岛出版社,1997.373-377.

(责任编辑:韦廷宗 邓大玉)

(上接第157页 Continue from page 157)

好,此激素浓度组合能促进其生长速度。处理1增殖率也较高,有徒长的趋势。从继续培养可看出,山苍子存活率与生命力都不错,培养60d后,大部分试管苗叶片完全展开,同时,植株上的腋芽也大量萌发。

表4 不同激素配比对山苍子丛芽增殖的影响

Table 4 Effect of different hormones to the mutiplication of bud breed of *Litsea cubeba*

处理 Treatment	接种数(个) No. of inoculated	第60d的有效芽数(个) Effective buds of 60th days	增殖系数 Multiplication quotients
0	6	4	1.3±0.6
1	5	14	6.5±0.2
2	2	4	2.0±1.4
3	2	6	3.0±1.4
4	2	16	8.0±1.4

### 3 结束语

在本试验中,山苍子带芽茎段接种后进行暗培养18d或20d左右愈伤组织萌动,以MS+2,4-D1.0mg/L+6-BA2.0mg/L培养基的愈伤组织诱导数量较多,愈伤组织诱导率最高,达55.6%。在诱导分化时,暗培养8d和光培养5d开始萌芽,以MS+2,4-D0.5mg/L+6-BA3.0mg/L培养基的诱导芽萌发率最高,达60%,且质量较好。在诱导全生芽增殖时,以MS+2,4-D1.0mg/L+6-BA3.0mg/L培养基的增殖系数最高,达8±1.4。这些实验结果说明,在山苍子的组织培养中,如果是愈伤组织为目的,最好先进行一段时间的暗培养,这样它发生愈伤组织的速度较快。如果是诱导顶芽、侧芽或腋芽为目的,侧一开始就直接进行光照培养,这样发生芽萌动的速度快。时

间短,数量较多,质量也较好。

在本实验中还观察到,以山苍子带芽茎段为外植体进行组织培养有严重褐变出现,原因是木本植物体内含有较多的酚类化合物,同时山苍子渗出的山苍子油亦加速褐化。

由于不断采伐野生山苍子,野生山苍子资源已经变得越来越少,本实验研究结果将为后续研究山苍子快速繁殖技术并大面积推广奠定良好的基础。

参考文献:

[1] 范繁荣,马祥庆,王荣溪.福建山苍子资源的现状及开发利用[J].自然资源,1994,3:72-75.

[2] 鲍逸培.中国山苍子油研究概况与进展[J].林产化学与工业,1995,2:73-77.

[3] 李世华.综合开发利用山鸡椒[J].云南农业科技,2000,6:41.

[4] 潘晓杰,陈卫军,侯红波.山苍子资源利用加工现状及开发前景的研究[J].经济林研究,2003,21(1):79-80.

[5] 吴士业,余伯良.山苍子——一种值得发展的高效经济林[J].中国野生植物资源,1999,18(1):22-24.

[6] 朱才熙.山苍子的生长特性与栽培技术[J].云南科技管理,1999,13:63.

[7] 吴松成,樊光毅,谢宗仁.山苍子的开发及栽培技术[J].江西林业科技,2003,1:15-16.

[8] Mao A A, Wetten A, Fay M F, et al. In Vito propagation of *Litsea cubeba* Pers. a multipurpose tree [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 263-267.

[9] 孙雁霞,石大兴,王米力,等.山苍子组织培养快速繁殖技术研究[J].四川林业科技,2002,23(1):64-67.

[10] 尹红.山苍子愈伤组织的诱导和培养条件[J].吉首大学学报(自然科学版),2000,21(4):3-5.

(责任编辑:邓大玉)