

日本野漆树的组织培养

李锦宇^{1,2}, 何小帆^{1,2}, 李旦³, 刘树娜^{1,2}, 邹家通^{1,2}, 和润喜^{1,4}, 何承忠^{1,2,4,*}

¹西南林业大学云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 昆明650224

²西南林业大学西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 昆明650224

³西南林业大学生物多样性研究院, 昆明650224

⁴西南林业大学西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 昆明650224

摘要: 日本野漆树(*Toxicodendron succedaneum*)是一种独特的木本油料树种, 以盛产漆蜡而闻名。本研究以带腋芽的茎段为外植体, 通过筛选外植体消毒方法, 控制褐变措施, 以及腋芽启动、壮苗培养和生根诱导等适宜培养基, 建立日本野漆树组织培养技术体系, 从而为该树种良种的工厂化育苗提供技术支撑。结果表明: 较适宜的外植体消毒方法为75%酒精浸泡10 s, 2%洁尔灭浸泡1.5 min, 0.1%升汞浸泡4 min。在MS培养基中添加0.8 g·L⁻¹ AC能有效地降低外植体的褐变。适宜的腋芽启动培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.8 g·L⁻¹ AC。壮苗培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ TDZ。培养基MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ ZT+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA适用于愈伤组织诱导。培养基1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA适用于生根诱导培养, 生根率达到93.33%。

关键词: 日本野漆树; 组织培养; 植株再生

漆树(*Toxicodendron vernicifluum*)为漆树科(Anacardiaceae)漆树属(*Toxicodendron*)多年生落叶乔木(杨胜辉2011), 属于重要的经济树种, 其产品主要为生漆, 故称之为“漆树”。作为我国最古老的经济树种, 在漆树韧皮部割取的生漆具有粘结性及独特的成膜性和抗腐蚀性, 已广泛应用于处理高端家具及漆器的表面, 并在此基础上发展出了独有的漆文化(王颖睿等2014)。此外, 漆籽中漆蜡(油)是制造高级化妆品、防水剂、肥皂、绝缘材料等精细化工品的天然理想原料, 其产品医疗卫生、生物检测、军工等领域具有广泛的应用价值, 而且漆油还是具有多种保健功效的主食木本油料之一(张鹏等2013)。

日本野漆树(*T. succedaneum*)对土壤条件和经营管理水平要求不高, 适生范围广(张鹏等2013)。该树种籽实产量高, 籽粒大, 漆蜡含量高且品质优良, 具有投入产出比高等特点, 属于以采籽产蜡为主的优良经济树种, 我国江西、湖南等地有引种栽培(刘伟等2008)。

由于受生漆等代谢产物的影响, 在枝条切口处易形成氧化膜, 从而导致穗条吸收土壤水分及营养、愈伤组织形成等障碍, 使得日本野漆树扦插繁殖与嫁接繁殖较为困难。目前, 日本野漆树的育苗技术主要采用实生繁殖育苗和埋根育苗。

但日本野漆树属于异花授粉, 且存在雌花败育现象, 实生繁殖的苗木不仅发生性状分离, 使其优良性状难以稳定保持, 而且采用实生苗营建的人工原料林约30%个体不结实, 严重影响经济效益。此外, 埋根育苗的增殖系数低, 扩繁苗木速率低, 采集根段还会对母树造成一定伤害。组织培养技术具有繁殖系数高, 繁殖速度快, 外植体取材对母体无伤害且用量少, 易保持母体优良性状等优点, 已成为许多植物商品化育苗的重要途径(Thomas 2008; Kim等2017)。本研究以带腋芽的茎段为外植体, 通过筛选外植体消毒方法, 控制褐变措施, 以及腋芽启动、壮苗培养、生根诱导等适宜培养基, 建立日本野漆树组织培养技术体系, 从而为该树种良种的工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 外植体材料培育

试验材料为日本野漆树[*Toxicodendron succe-*

收稿 2018-09-29 修定 2018-12-11

资助 国家十三五重点研发课题(2017YKD0600705)、云南省教育厅重大专项项目(ZD2013014)、云南省教育厅基金项目(2016YJS100)和云南省高校林木生物技术重点实验室开放基金项目(2018KF09)。

* 通讯作者(hcz70@163.com)。

daneum (L.) O. Kuntze], 品种为‘昭和福’。于初春(3月底)从江西省引种栽培的日本野漆树种植基地采集优树的根段, 直径1.5~2.5 cm, 带回后经过浸水处理, 在智能温室大棚内的苗床上埋根育苗, 待苗木高度达到20 cm以上时, 取其带侧芽的嫩茎作为外植体材料。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体预处理及消毒

选取无病虫害长势较好的幼苗带侧芽嫩茎, 剪去叶片, 在流水下将嫩茎表面清洗干净, 剪切为每段带1~2个腋芽的茎段后放入1 L的烧杯中, 加入1 mL洁尔灭, 杯口用纱布覆盖后在流水下冲洗1 h; 将冲洗完毕的茎段放入无菌瓶中, 置于超净工作台内进行后续操作。

首先采用75%酒精浸泡处理(10、15和20 s), 然后用不同浓度(1.0%、2.0%和3.0%)的洁尔灭分别浸泡处理(1、1.5和2 min), 最后放入0.1%升汞溶液浸泡处理(3、4和5 min)。共设计9种处理组合, 对外植体进行消毒。每种消毒剂处理后均使用无菌水冲洗, 其中, 酒精处理后冲洗1~2次, 洁尔灭浸泡后冲洗2~3次, 升汞溶液处理后冲洗3~5次。将消毒处理后的外植体基部切除少许形成新鲜切口, 接种到MS培养基上, 每瓶接种2个外植体, 每处理组合各接种10瓶, 设3次重复。接种后14 d, 统计外植体污染率和成活率。

1.2.2 外植体控制褐变

日本野漆树外植体内含有丰富的漆酚等物质, 极易褐化而死亡。以MS为基本培养基, 分别添加不同浓度的PVP (400、800和1 200 mg·L⁻¹)、半胱氨酸(50、100和500 mg·L⁻¹)和活性炭(AC; 0.5、0.8和1.0 g·L⁻¹)。共设计9种组合, 以接种于空白MS培养基的外植体每4 d转瓶一次作为对照。将采用适宜消毒方法处理后的外植体接种于不同培养基上, 每瓶接种外植体2个, 每处理组合接种10瓶, 设3次重复。接种14 d后, 观察统计外植体褐变率。

1.2.3 外植体腋芽启动培养

分别以MS、1/2MS和White培养基为基本培养基, 添加外植体控制褐变物质, 并加入不同浓度蔗糖(20、30和40 g·L⁻¹)、6-BA (1.0、2.0和2.5 mg·L⁻¹)和NAA (0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹), 采用L₉(3⁴)

正交设计, pH值为5.8~6.2。在超净工作台内将消毒处理后的外植体茎段上下两端及叶柄各切除少许, 然后将外植体斜插入培养基内, 叶柄基部与培养基保持分离2.0 mm左右。每处理接种20个外植体, 每瓶2个, 3次重复。培养20 d后, 统计腋芽萌发率。

1.2.4 腋芽壮苗培养

以MS为基本培养基, 添加30 g·L⁻¹蔗糖, 调节pH值为5.8~6.2, 加入6-BA (1.0、1.5和2.0 mg·L⁻¹)、ZT (0.1、0.3和0.5 mg·L⁻¹)和TDZ (0.01、0.05和0.10 mg·L⁻¹)三种植物生长调节物质, 采用L₉(3⁴)正交设计, 共9个处理组合。腋芽启动培养30 d后, 切去外植体基部约5 mm, 转瓶至9种处理组合的壮苗培养基上, 每组合接种20瓶, 每瓶1个腋芽, 3次重复。接种14 d后, 统计各处理组合的苗高及生长状况。

1.2.5 腋芽基部愈伤组织分化培养

分别以MS和White为基本培养基, 加入30 g·L⁻¹蔗糖, 调节pH值为5.8~6.2, 添加NAA (0、0.1和0.5 mg·L⁻¹)、ZT (0.1、0.2和0.5 mg·L⁻¹)、6-BA (0.1、0.5和1.0 mg·L⁻¹)和2,4-D (0、0.3 mg·L⁻¹)四种植物生长调节物质, 设计6个处理组合。将壮苗培养20 d的腋芽接种于不同组合的愈伤组织分化培养基上, 每组合接种10瓶, 每瓶接种腋芽1个, 3次重复, 14 d后, 统计分化出愈伤组织的腋芽数, 并计算愈伤组织诱导率。

1.2.6 生根诱导培养

分别以White、WPM和1/2MS为基本培养基, 添加30 g·L⁻¹蔗糖, 调节pH值为5.8~6.2, 加入0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.1 mg·L⁻¹ IAA, 进行诱导生根基本培养基筛选。进一步在筛选出的基本培养基中添加GA₃ (0、1.0 mg·L⁻¹)、NAA (0、0.5 mg·L⁻¹)、2,4-D (0、0.2 mg·L⁻¹)和IAA (0、0.1 mg·L⁻¹)四种植物生长调节物质, 共设计6种培养基。将分化出愈伤组织的腋芽取出, 于超净工作台内将愈伤组织边缘切除一部分, 接种至诱导生根培养基上。每种培养基接种10瓶, 每瓶接种1个带有愈伤组织的腋芽, 3次重复。培养35 d后, 观察并统计生根情况, 计算生根率。

1.2.7 炼苗与移栽基质筛选

适宜的炼苗方式及移栽基质可有效提高日本

野漆树组培苗的移栽成活率。将生根45 d以上生长健壮的日本野漆树组培苗,从培养室移至室内,带瓶盖放置7 d后打开瓶盖,以保鲜膜覆盖瓶口并在保鲜膜上开6~7个透气孔,放置30 d后将组培苗从培养瓶内取出,用清水将基部培养基冲洗干净,种植于不同配比的移栽基质中。

选用珍珠岩、园土、腐殖质、草炭4种基质进行配比,设计4个处理组合,每处理组合移栽10棵组培苗,3次重复。移栽后使用遮光网于室内培养20 d后观察并统计移栽成活率。

1.2.8 培养条件

培养基中均添加4.5 g·L⁻¹琼脂, 121℃高温灭菌20 min。培养条件为昼间温度(25±2)℃, 夜间温度(22±2)℃, 光照周期12 h·d⁻¹, 光照强度30~36 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度70%~80%。

1.2.9 数据统计与分析

所有数据于Excel 2010中进行整理, 使用SPSS 22.0软件进行数据处理与统计分析, 多重比较采用Duncan’s新复极差测验法(*P*<0.01)进行显著性分析。

结果统计中涉及的测定指标计算公式如下: 污染率(%)=污染外植体数/接种外植体数×100%; 成活率(%)=成活外植体数/接种外植体数×100%; 褐变率(%)=褐变外植体数/接种外植体数×100%; 腋芽萌发率(%)=腋芽萌发外植体数/总接种外植体数×100%; 愈伤组织诱导率(%)=分化出愈伤组织腋芽数/总接种腋芽数×100%; 生根率(%)=生根苗数/接种腋芽总数×100%; 移栽成活率(%)=移栽成活苗数/移栽苗总数×100%。

2 实验结果

2.1 不同消毒处理组合对外植体消毒效果及存活率的影响

方差分析与多重比较分析结果(表1)表明, 外植体污染率和存活率在9种消毒处理组合间的差异达到极显著水平, 其中, 处理组合S3的污染率最低(5.00%), 但外植体存活率也较低(28.33%); 处理组合S2与S8的污染率均为8.33%, 而S2的外植体存活率极显著地高于其他8种处理组合, 达到91.67%(表1)。因此, 综合考虑外植体的污染率与存活率, 适用于日本野漆树外植体的消毒方法为75%酒精浸泡10 s+2.0%洁尔灭浸泡1.5 min+0.1%升汞浸泡4 min。

2.2 不同处理组合对控制外植体褐变的效果

以每4 d转瓶一次作为对照, 在MS培养基中分别添加不同浓度的PVP、AC及半胱氨酸, 探讨不同组合对控制外植体褐变的效果。由表2可知, 处理组合B1与B10的控制褐变效果相同, 外植体褐变率均达到最大值(40.00%), 且与处理组合B2(31.67%)、B7(38.33%)差异均不显著。在MS培养基中添加AC对控制外植体褐变的效果明显优于使用PVP和低浓度的半胱氨酸, 而添加0.8 g·L⁻¹ AC与添加高浓度(500 mg·L⁻¹)半胱氨酸的外植体褐变率相近, 差异不显著。在试验操作中, 添加半胱氨酸的操作繁琐、耗时, 且成本远高于AC。因此, 通过在MS培养基中添加0.8 g·L⁻¹的AC是控制日本野漆树外植体褐变较为适宜的方法。

表1 不同消毒组合处理对外植体污染率的影响

Table 1 Effects of different disinfection combinations on contamination rate of explants

编号	消毒处理组合	污染率/%	存活率/%
S1	75%酒精消毒10 s+1.0%洁尔灭消毒1 min+0.1%升汞消毒3 min	81.67 ^A	11.67 ^E
S2	75%酒精消毒10 s+2.0%洁尔灭消毒1.5 min+0.1%升汞消毒4 min	8.33 ^D	91.67 ^A
S3	75%酒精消毒10 s+3.0%洁尔灭消毒2 min+0.1%升汞消毒5 min	5.00 ^D	28.33 ^D
S4	75%酒精消毒15 s+2.0%洁尔灭消毒1 min+0.1%升汞消毒5 min	13.33 ^D	53.33 ^C
S5	75%酒精消毒15 s+3.0%洁尔灭消毒1.5 min+0.1%升汞消毒3 min	66.67 ^B	28.33 ^D
S6	75%酒精消毒15 s+1.0%洁尔灭消毒2 min+0.1%升汞消毒4 min	10.00 ^D	71.67 ^B
S7	75%酒精消毒20 s+3.0%洁尔灭消毒1 min+0.1%升汞消毒4 min	6.67 ^D	65.00 ^B
S8	75%酒精消毒20 s+1.0%洁尔灭消毒1.5 min+0.1%升汞消毒5 min	8.33 ^D	50.00 ^C
S9	75%酒精消毒20 s+2.0%洁尔灭消毒2 min+0.1%升汞消毒3 min	56.67 ^C	35.00 ^D

同列中不同大写字母表示处理组合间在0.01水平上差异极显著, 下表同此。

表2 不同处理组合对控制外植体褐变的效果
Table 2 Effects of different treatment combinations
on explant browning control

编号	控制褐变方法	平均褐变率/%
B1	MS+400 mg·L ⁻¹ PVP	40.00 ^A
B2	MS+800 mg·L ⁻¹ PVP	31.67 ^{AB}
B3	MS+1200 mg·L ⁻¹ PVP	23.33 ^{BC}
B4	MS+0.5 g·L ⁻¹ AC	20.00 ^{CD}
B5	MS+0.8 g·L ⁻¹ AC	15.00 ^{DE}
B6	MS+1.0 g·L ⁻¹ AC	20.00 ^{CD}
B7	MS+50 mg·L ⁻¹ 半胱氨酸	38.33 ^A
B8	MS+100 mg·L ⁻¹ 半胱氨酸	28.33 ^{BC}
B9	MS+500 mg·L ⁻¹ 半胱氨酸	13.33 ^E
B10	每4 d转瓶一次	40.00 ^A

2.3 不同蔗糖浓度与植物生长调节物质对腋芽启动的影响

在MS和White培养基中加入0.8 g·L⁻¹ AC, 将消毒处理后的外植体接种于9种腋芽启动培养基上, 培养20 d后均有腋芽萌发。方差分析和多重比较分析结果(表3)表明, 接种于9种培养基上的外植体腋芽萌发率存在极显著差异, 其中, G2培养基上的腋芽萌发率最高, 达到91.67%, 与其他8种培养基的腋芽萌发率差异极显著, 且萌芽粗壮, 长势强, 生长快速; 其次为G4培养基, 腋芽萌发率为85.00%; G3培养基的腋芽萌发率最低(50.00%), 且腋芽萌发着生的叶片出现畸形。从基本培养基来看, MS培养基上萌发的腋芽粗壮, White培养基上萌发的腋芽直径处于中等, 而1/2MS培养基上萌发的腋芽细瘦。综合腋芽萌发率与萌芽生长情况, 适

用于日本野漆树外植体腋芽启动的培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹蔗糖+0.8 mg·L⁻¹ AC (图1-A)。

2.4 不同植物生长调节物质配比的壮苗效果

预试验中发现, 只有较为粗壮且达到一定高度的腋芽才能够分化出愈伤组织并形成不定根。因此, 对启动后的腋芽需要进一步壮苗培养, 以获得健壮的芽苗。由表4可知, 植物生长调节物质配比的9种培养基之间, 苗高差异达到极显著水平, 且不同基本培养基间的苗高也存在着极显著差异。其中, 随着6-BA浓度的升高, 芽苗从粗壮逐渐变为细弱, 苗木生长减缓, 芽苗叶片甚至出现脱落情况(SS8和SS9培养基)。对不同因素水平间方差分析表明, 6-BA对苗高的影响差异极显著, 而ZT和TDZ水平对苗高的影响差异不显著。综合腋芽生长状况和平均苗高, 培养基SS3的壮苗效果最好, 即适宜日本野漆树腋芽壮苗培养基为MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.10 mg·L⁻¹ TDZ (图1-B)。

2.5 不同植物生长调节物质配比与基本培养基对腋芽愈伤组织分化影响

对6种培养基上的腋芽愈伤诱导率进行方差分析, 结果表明, 不同基本培养基、不同植物生长调节物质及其浓度对愈伤组织分化的影响差异极显著($P<0.01$)。由表5可见, 在植物生长调节物质组合及其浓度相同的情况下, MS培养基的愈伤组织诱导率略高于WPM培养基, 但差异不显著(C1与C4培养基, C2与C5培养基, C3与C6培养基), 说明MS或WPM培养基不是腋芽愈伤组织分化的主要

表3 不同培养基对腋芽启动的影响
Table 3 Effects of different media on axillary bud initiation

编号	培养基	腋芽萌发率/%	萌芽生长状况
G1	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+20 g·L ⁻¹ 蔗糖	68.33 ^D	萌芽粗壮, 长势好, 生长较快
G2	MS+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+30 g·L ⁻¹ 蔗糖	91.67 ^A	萌芽粗壮, 长势强, 生长快速
G3	MS+2.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+40 g·L ⁻¹ 蔗糖	50.00 ^G	萌芽粗壮, 长势弱, 叶片畸形
G4	White+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+20 g·L ⁻¹ 蔗糖	85.00 ^B	萌芽粗壮, 长势强, 生长较快
G5	White+2.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+30 g·L ⁻¹ 蔗糖	61.67 ^F	萌芽中等, 长势好, 生长快
G6	White+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+40 g·L ⁻¹ 蔗糖	73.33 ^{CD}	萌芽短粗, 长势弱, 生长慢
G7	1/2MS+2.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+20 g·L ⁻¹ 蔗糖	58.33 ^F	萌芽中等, 长势较好, 生长较快
G8	1/2MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L ⁻¹ NAA+30 g·L ⁻¹ 蔗糖	63.33 ^{EF}	萌芽细瘦, 长势好, 生长较快
G9	1/2MS+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+40 g·L ⁻¹ 蔗糖	76.67 ^C	萌芽细瘦, 长势弱, 生长慢

萌芽直径>2.5 mm为粗壮, 萌芽直径在1.0~2.5 mm为中等, 萌芽直径<1.0 mm为细瘦。

表4 不同植物生长调节物质配比对壮苗的影响

Table 4 Effects of different proportions of plant growth regulators on seedling growth

编号	培养基	腋芽生长状况	平均苗高/cm
SS1	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ ZT+0.01 mg·L ⁻¹ TDZ	苗粗壮, 生长快, 叶色翠绿	7.70 ^C
SS2	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L ⁻¹ ZT+0.05 mg·L ⁻¹ TDZ	苗粗壮, 生长快, 叶色翠绿	8.27 ^B
SS3	MS+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ ZT+0.10 mg·L ⁻¹ TDZ	苗粗壮, 生长快, 叶片大且翠绿	8.90 ^A
SS4	MS+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ ZT+0.05 mg·L ⁻¹ TDZ	苗粗壮, 生长快, 后期基部叶片变黄	7.20 ^D
SS5	MS+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L ⁻¹ ZT+0.10 mg·L ⁻¹ TDZ	苗短粗, 生长缓慢, 叶色不正常	5.87 ^G
SS6	MS+1.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ ZT+0.01 mg·L ⁻¹ TDZ	苗短粗, 生长缓慢, 叶色不正常	5.47 ^H
SS7	MS+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L ⁻¹ ZT+0.10 mg·L ⁻¹ TDZ	苗细弱, 生长快, 叶色翠绿	6.60 ^E
SS8	MS+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L ⁻¹ ZT+0.05 mg·L ⁻¹ TDZ	苗细弱, 生长快, 后期基部叶片脱落	6.23 ^F
SS9	MS+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ ZT+0.01 mg·L ⁻¹ TDZ	苗细弱, 生长缓慢, 后期叶片全部脱落	4.87 ^I

表5 不同植物生长调节物质配比与基本培养基对愈伤组织分化的影响

Table 5 Effects of different plant growth regulators and basic media on callus differentiation

编号	培养基	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织生长状况
C1	MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ ZT+0.1 mg·L ⁻¹ 6-BA	70.00 ^B	愈伤组织疏松, 深绿色, 量多
C2	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.1 mg·L ⁻¹ ZT+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	86.67 ^A	愈伤组织疏松, 翠绿色, 量较多
C3	MS+0.2 mg·L ⁻¹ ZT+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L ⁻¹ 2,4-D	36.67 ^C	愈伤组织紧密, 深绿色, 量少
C4	WPM+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ ZT+0.1 mg·L ⁻¹ 6-BA	66.67 ^B	愈伤组织紧密, 黑色, 量少
C5	WPM+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.1 mg·L ⁻¹ ZT+1.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	83.33 ^A	愈伤组织疏松, 翠绿色, 量多
C6	WPM+0.2 mg·L ⁻¹ ZT+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L ⁻¹ 2,4-D	26.67 ^C	愈伤组织紧密, 黑色, 量极少

影响因素。在相同基本培养基的条件下, 组合NAA+ZT+6-BA的愈伤诱导率显著优于组合ZT+6-BA+2,4-D, 且愈伤组织数量较大, 表明NAA更适合于腋芽愈伤组织的分化。综合愈伤组织诱导率与愈伤组织生长状况, 最适于日本野漆树腋芽愈伤组织分化诱导的培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ ZT+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA (图1-C)。

2.6 不同基本培养基及植物生长调节物质配比对腋芽生根的影响

分别以White、WPM和1/2MS为基本培养基, 添加0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D和0.1 mg·L⁻¹ IAA, 进行腋芽生根基本培养基的筛选。结果发现, 接种于White和WPM培养基上的腋芽, 30 d后的存活率分别为50.0%和23.33%, 且叶片在后期均变黄而脱落, 也无生根现象。而接种于1/2MS培养基上的腋芽, 30 d后的存活率达到90.0%, 叶色翠绿, 少量腋芽形成了不定根。因此, 1/2MS培养基适用于日本野漆树腋芽的生根诱导培养。

由表6可知, 在1/2MS培养基中添加植物生长

表6 不同植物生长调节物质配比的生根诱导效果

Table 6 The rooting induction effect of different proportions of plant growth regulators

编号	培养基	生根率/%
R1	1/2 MS+1.0 mg·L ⁻¹ GA ₃ +0.1 mg·L ⁻¹ IAA	30.00 ^B
R2	1/2 MS+1.0 mg·L ⁻¹ GA ₃ +0.5 mg·L ⁻¹ NAA	93.33 ^A
R3	1/2 MS+1.0 mg·L ⁻¹ GA ₃ +0.2 mg·L ⁻¹ 2,4-D	16.67 ^C
R4	1/2 MS+0.1 mg·L ⁻¹ IAA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA	10.00 ^C
R5	1/2 MS+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ 2,4-D	13.33 ^C
R6	1/2 MS+0.1 mg·L ⁻¹ IAA+0.2 mg·L ⁻¹ 2,4-D	6.67 ^C

调节物质GA₃ (R1、R2和R3培养基), 其腋芽生根率明显高于另外3种培养基, 其中R2培养基的生根率达到93.33%, 极显著地高于其他培养基。此外, 在6种培养基中, IAA和2,4-D分别与其他植物生长调节物质组合(R1、R3、R4和R5培养基), 腋芽生根率最高仅为30.0% (R1培养基), 最低为10.0% (R4培养基), 而IAA+2,4-D配比组合(R6培养基)的生根率在6种培养基中最低(6.67%), 说明IAA和2,4-D不适用于腋芽的不定根诱导。由此可知, 日本野漆树

腋芽不定根诱导的适宜培养基为1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA (图1-D)。

2.7 不同移栽基质对比对组培苗移栽成活率的影响

对不同配比移栽基质的组培苗移栽成活率进行方差分析, 结果表明, 不同配比移栽基质对组培苗移栽成活具有显著影响($P<0.05$)。由表7可知, 基质配比组合T1的成活率最高(93.33%), T3成活率最低(46.67%), 而基质配比组合T1、T2和T4均含有腐殖土, 其组培苗移栽成活率也均高于T3, 说明腐殖土适用于日本野漆树组培苗移栽。综合比较分析可知, 日本野漆树组培苗移栽的适宜基质为园土+腐殖土+草炭, 其体积配比为1:1:1 (图1-E)。

3 讨论

植物离体快繁体系建立的首要条件是获得有活性的无菌材料(付姝颖等2015)。日本野漆树外植体分泌生漆, 使切口处形成氧化膜, 从而阻碍培养基中水分、营养物质与植物生长调节物质的吸收与渗入; 漆酚还容易导致外植体的褐变, 而且外植体材料携带有大量的内生菌, 在培养过程中经

常出现严重的污染问题, 导致外植体死亡而无法开展后续研究工作(图1-F)。因此, 筛选出适宜的外植体消毒方法及外植体控制褐变方法, 建立日本野漆树无菌体系是首要解决的难题。张寅玲等(2006)对富含内生菌的红掌组织培养研究中发现, 在培养基中添加1 000 mg·L⁻¹的制霉菌素能够抑制外植体所携带的细菌和真菌。王道植和朱忠荣(1987)采用75%酒精浸泡1 min, 再移至0.1%升汞浸泡1 min, 能够使漆树顶芽和腋芽外植体的污染率控制在13.3%以下。以小木漆叶片为外植体时, 采用75%酒精浸泡1 min, 再用1.0%洁尔灭(苯扎氯胺)浸泡1 min, 0.1%升汞浸泡20 min, 污染率仅为1.15%, 且在White培养基中添加100 mg·L⁻¹半胱氨酸, 褐变率为1.15%, 外植体成活率达到97.63% (赵月明等2015)。本研究以日本野漆树带侧芽的幼嫩茎段为外植体, 采用75%酒精浸泡10 s, 2.0%洁尔灭浸泡1.5 min, 0.1%升汞浸泡4 min, 污染率为8.33%。在培养基中添加0.8 g·L⁻¹ AC或500 mg·L⁻¹半胱氨酸, 均能够将外植体褐变率控制在15%以下, 然而从成本及操作简便化方面考虑, 选择使用0.8 g·L⁻¹ AC更为适宜。本研究的外植体污染率和褐变率均显著高于赵月明等(2015)的结果, 这可能是由于基因型与外植体材料不同, 对消毒处理的耐受性、消毒剂的吸收与利用效率存在差异而引起的。

小木漆的组织培养技术体系中, 经过增殖培养的不定芽能够直接用于生根诱导培养(罗一然等2017)。而日本野漆树属于难生根树种, 在大量预试验中发现, 培养获得的腋芽壮苗若其基部未分

表7 不同基质处理的移栽成活率
Table 7 The survival rates of transplants treated with different substrates

编号	基质配比	成活率/%
T1	园土:腐殖土:草炭=1:1:1	93.33 ^A
T2	珍珠岩:草炭:腐殖土=1:1:1	76.67 ^{AB}
T3	园土:珍珠岩:草炭=1:1:1	46.67 ^C
T4	腐殖土:珍珠岩:园土=1:1:1	66.67 ^B

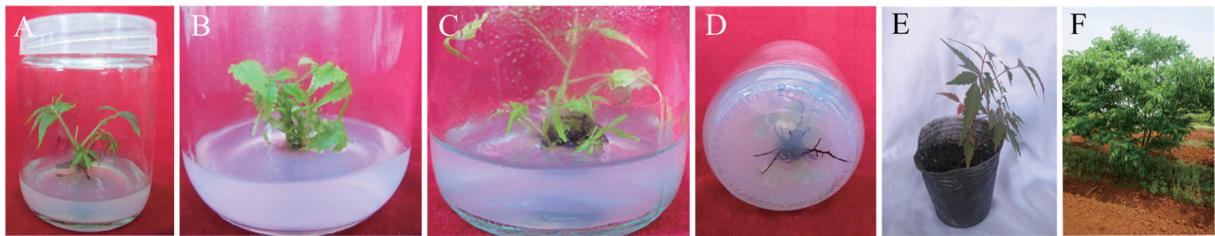


图1 日本野漆树的组织培养
Fig.1 Tissue culture of *T. succedaneum*

A: MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA诱导腋芽25 d生长情况; B: MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.10 mg·L⁻¹ TDZ壮苗30 d生长情况; C: MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ ZT+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA诱导腋芽基部愈伤组织形成情况; D: 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+ 0.5 mg·L⁻¹ NAA诱导生根35 d生长情况; E: 园土+腐殖土+草炭(1:1:1)炼苗60 d生长情况; F: 日本野漆树成树。

化出愈伤组织, 则无法形成不定根。因此, 日本野漆树的腋芽壮苗培养后, 需要进行愈伤组织分化培养, 之后才能够进行生根诱导培养。不同浓度的植物生长调节物质对诱导愈伤组织分化影响较明显, 且利用适当配比浓度的细胞分裂素与生长素组合是体细胞胚发生的关键因素(赵杨阳等 2017; Tokuji和Kuriyama 2003)。本研究分别以MS和WPM为基本培养基, 采用NAA、2,4-D、6-BA和ZT的不同配比组合进行日本野漆树腋芽愈伤组织分化培养, 结果表明, 基本培养基对愈伤组织分化影响不显著, NAA和2,4-D对愈伤组织分化具有极显著的影响, 配比组合为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA时, 形成的愈伤组织结构疏松, 翠绿色, 量较多, 诱导率达到83.33%~86.67%; 配比组合为MS+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D时, 分化形成的愈伤组织结构紧密, 黑色或深绿色, 量较少, 诱导率仅为26.67%~36.67%。

不同种类漆树的生根能力具有较为明显的差异。王道植和朱忠荣(1987)采用 $1/2\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA对‘官大木’和‘红尖大木’2个漆树优良品种进行诱导生根, 生根率达到93.3%。据邓晓安(1992)报道, 引田欲之以采自日本苗木中心的漆树种子萌芽, 接种于改良WPM+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA培养基上, 生根率为64.0%。罗一然等(2017)以 $1/2\text{MS}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA培养基诱导小木漆不定根发生, 生根率高达98.89%。赤霉素作为植物生长的必需激素之一, 调控植物生长发育的各个方向, 如种子萌发、下胚轴伸长、叶片生长等(黄先忠等2006)。本研究以 $1/2\text{MS}$ 为基本培养基, 添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的配比组合对诱导日本野漆树不定根发生具有较好的效果, 生根率最高可达93.33%, 而添加2,4-D和IAA的配比组合对不定根诱导效果均较差, 生根率仅为6.67%~30.0%, 表明2,4-D和IAA不适宜于日本野漆树组培苗生根诱导培养。此外, 日本野漆树组培苗通过愈伤组织分化形成不定根, 且组培苗移栽成活率可达93.33%, 表明这种生根方式对其移栽成活率不存在明显的影响。

参考文献(References)

- Deng XA (1992). Cultivation of in vitro plantlets of lacquer tree in tissue culture. *Guangxi Forest Sci*, 21: 187–189 (in Chinese without English abstract) [邓晓安(1992). 漆树萌芽组织培养试管苗的培育. *广西林业科技*, 21: 187–189]
- Fu SY, Pan CM, Liu LT, et al (2015). Tissue culture and rapid propagation of medicinal plant *Pithecellobium clypearia*. *Plant Physiol J*, 51: 2195–2200 (in Chinese with English abstract) [付姝颖, 潘超美, 刘良婷等(2015). 药用植物猴耳环的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51: 2195–2200]
- Huang XZ, Jiang CF, Liao LL, et al (2006). Progress on molecular foundation of GA biosynthesis pathway and signaling. *Chinese Bull Bot*, 23: 499–510 (in Chinese with English abstract) [黄先忠, 蒋才富, 廖立力等(2006). 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展. *植物学通报*, 23: 499–510]
- Kim D H, Gopal J, Sivanesan I (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC Adv*, 7: 36492–36505
- Liu W, Xie BX, Yu JF, et al (2008). Extraction techniques of lacquer wax in *Rhus succedanea*. *Nonwood Forest Res*, 26: 58–61 (in Chinese with English abstract) [刘伟, 谢碧霞, 余江帆等(2008). 日本野漆树漆蜡萃取技术. *经济林研究*, 26: 58–61]
- Luo YR, Han GW, Zhang X, et al (2017). Tissue culture of *Toxicodendron vernicifluum*. *J Southwest For Univ*, 37: 32–39 (in Chinese with English abstract) [罗一然, 韩国伟, 张雪等(2017). 小木漆组织培养技术研究. *西南林业大学学报*, 37: 32–39]
- Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv*, 26: 618–631
- Wang DZ, Zhu ZR (1987). A preliminary report on tissue culture technology of lacquer tree. *J Chin Lacquer*, 2: 4–8 (in Chinese with English abstract) [王道植, 朱忠荣(1987). 漆树组织培养技术研究初报. *中国生漆*, 2: 4–8]
- Wang YR, Pan HY, Wu Y, et al (2014). Status and prospects of the utilization of lacquer tree resource. *Furniture*, 35: 27–31 (in Chinese with English abstract) [王颖睿, 潘海云, 吴燕等(2014). 漆树资源利用现状及发展前景. *家具*, 35: 27–31]
- Yang SH (2011). Biological characteristics and prospect of development and utilization of *Toxicodendron vernicifluum*. *Inner Mongolia Investiga Design*, 34: 48–49 (in Chinese without English abstract) [杨胜辉(2011). 漆树的生物学特性及开发利用前景. *内蒙古林业调查设计*, 34: 48–49]
- Zhang P, Liao SX, Cui K, et al (2013). Resources and species

- of *Toxicodendron* and its industry development prospects in China. *World For Res*, 26: 65–69 (in Chinese with English abstract) [张鹏, 廖声熙, 崔凯等(2013). 中国漆树资源与品种现状及产业发展前景. *世界林业研究*, 26: 65–69]
- Zhang YL, Liu YJ, Huang JX, et al (2006). Tissue culture method of *Anthurium andraeanum* explants with entophytic microorganism. *Southwest Hortic*, 34: 9–11 (in Chinese with English abstract) [张寅玲, 刘艳军, 黄俊轩等(2006). 含内生菌外植体红掌组培方法的研究. *西南园艺*, 34: 9–11]
- Zhao YM, Zhao YM, He CZ, et al (2015). Study on the prevention and cure of browning and contamination during tissue culture of *Toxicodendron vernicifluum*. *Chin Agr Sci Bull*, 31: 33–38 (in Chinese with English abstract) [赵月明, 赵雁鸣, 何承忠等(2015). 漆树组织培养中污染与褐变的防治. *中国农学通报*, 31: 33–38]
- Zhao YY, Liu JY, Ma Z, et al (2017). Tissue culture and high-frequency regeneration of *Lepidium sativum*. *Plant Physiol J*, 53: 234–240 (in Chinese with English abstract) [赵杨阳, 刘佳钰, 马征等(2017). 家独行菜的组织培养与高频再生. *植物生理学报*, 53: 234–240]

Tissue culture of *Toxicodendron succedaneum*

LI Jin-Yu^{1,2}, HE Xiao-Fan^{1,2}, LI Dan³, LIU Shu-Na^{1,2}, ZOU Jia-Tong^{1,2}, HE Rui-Xi^{1,4}, HE Cheng-Zhong^{1,2,4,*}

¹Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

²Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forestry Administration, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

³Yunnan Academy of Biodiversity, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

⁴Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: *Toxicodendron succedaneum* is a unique oil-producing woody species that is famous for producing lacquer wax. The stems with axillary buds from new sprout were collected as initial explants to screen the explants sterilization method, measure to prevent explants from browning, and suitable media components for axillary buds initiation, strong seedling culture, callus differentiation and root induction. The aim was to establish the technical system of tissue culture of *T. succedaneum*, and provide technical support for the industrialized seedling raising of its elite variety. The results showed that the suitable sterilization condition was to be successively soak in 75% ethanol for 10 s, 2% benzalkonium chloride for 1.5 min, and 0.1% mercuric chloride for 4 min. The addition of 0.8 g·L⁻¹ activated carbon (AC) in the medium could effectively reduce the browning of explants. MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.8 g·L⁻¹ AC was suitable to axillary bud initiation. MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ TDZ was suitable to strong seedling culture. MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA+0.1 mg·L⁻¹ ZT+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ NAA was good at callus differentiation induction and root induction, respectively. The rooting rate reached 93.33%.

Key words: *Toxicodendron succedaneum*; tissue culture; plantlet regeneration

Received 2018-09-29 Accepted 2018-12-11

This work was supported by National Key Research Plan of China During the 13th Five-Year Plan Period (2017YKD0600705), Key Foundation of Yunnan Educational Committee (ZD2013014), Foundation of Yunnan Educational Committee (2016YJS100), and Foundation Key Laboratory for Forest Biotechnology in Universities of Yunnan Province (2018KF09).

*Corresponding author (hcz70@163.com).