

文章编号: 0439-8114(2007)01-0024-03

香椿叶片组织培养和快繁技术的研究

许丽琼, 涂炳坤

(华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要:研究了香椿叶片组织培养以及无菌苗的移栽技术。结果表明, MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ NAA 培养基对香椿叶片愈伤组织诱导的效果最佳, 诱导率高达 100%, 诱导时间最短, 仅为 6d; MS+1.5 mg·L⁻¹ GA₃+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.5 mg·L⁻¹ KT 对香椿叶片分化出来的幼芽增殖效果最好, 其增殖率高达 63%; 1/2MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA+30g 蔗糖作为生根培养基最佳, 生根率达到了 89%。

关键词:香椿; 组织培养; 培养基; 诱导率

中图分类号:S644.4; Q813.1+2 **文献标识码:**B

Studies on Leaf Tissue Culture and Rapid Propagation of *Toona sinensis*

XU Li-qiong, TU Bing-kun

(College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The leaf tissue culture and transplant techniques of *Toona sinensis* were studied. The results showed that the MS culture medium with 1.0mg·L⁻¹ BA, 0.1mg·L⁻¹ KT and 0.5mg·L⁻¹ NAA was the best for the inducing leaf callus of *Toona sinensis*. The leaf inducement rate was 100% and the inducement time was six days. The MS culture medium with 1.5mg·L⁻¹ GA₃, 1.0mg·L⁻¹ BA and 0.5mg·L⁻¹ KT was the best for the leaf multiplication, the leaf multiplication rate was approximately 63%. The root growth culture medium with 1/2MS, 1.5mg·L⁻¹ IBA, and 30g cane sugar was optimum, and the root growth rate was 89%.

Key words: *Toona sinensis*; tissue culture; culture medium; inducement rate

香椿(*Toona sinensis*)是一种材菜兼用的速生树种,也是我国特有的木本蔬菜。植物组织培养作为现代生物技术的一部分,已广泛应用于物种改良、植物快繁、种子脱毒等科研和生产领域^[1-5]。近年来,国内对香椿的生物学特性、栽培技术和设施栽培等进行了研究和总结^[6-11],但对香椿外植体组织培养和快速繁殖方面的研究报道较少。香椿快速繁殖过程中的 3 个关键是无菌外植体的获得、繁殖速度及生根移栽^[12]。我们以香椿叶片为材料,研究了香椿叶片组织培养过程中叶片愈伤组织的诱导再生、生根培养和炼苗移栽等关键问题,为香椿的生物技术改良和优良品系的快速繁殖提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

香椿叶片于 4 月份采自华中农业大学园艺林

学学院山北教学基地。选用二年生孝感种源的红香椿,株高 1.5 m,株行距 15 cm×15 cm。叶片采回后先用流水冲洗 12 h,然后在超净台上用 70%酒精处理 30s,再按表 1 方法对叶片进行消毒。消毒后均用无菌水冲洗 4~5 遍。对叶片进行消毒时,采用的是先消毒复叶后切下小叶、叶柄的方法,每瓶消毒 2~3 个复叶。接种后,每周观察香椿叶片的形态变化,30 d 后,统计各消毒时间下的污染率、死亡率、成活率。死亡率=(整个叶片褐变但没有污染的叶片数目/总的叶片接种数)×100%

1.2 叶片的愈伤组织诱导

以叶片为外植体,采用正交试验 L₉(3⁴)。叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的方块。每皿接种 4 块,每处理 10 皿,重复 3 次。培养期间每周观察记录外植体的形态变化,30 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导天数为外植体接入培养基开始到边缘长出肉眼

收稿日期:2006-08-21

作者简介:许丽琼(1976-),女,湖北仙桃人,硕士,(电话)13659876729(电子信箱)xkjs@mail.hzau.edu.cn;通讯作者,涂炳坤,(电子信箱)bktu@mail.hzau.edu.cn。

表 1 香椿叶片的消毒方法

消毒剂	消毒时间/min		
	3	5	8
0.1%HgCl ₂ +吐温 80	3	5	8
4%NaClO	3	5	8

可见的淡黄色愈伤组织为止。诱导率=(产生愈伤组织的外植体块数/接种的外植体块数)×100%。

1.3 香椿叶片的继代增殖培养

以 GA₃、BA、KT 3 个因素进行正交试验 L₉(3⁴)。无菌苗在 9 种培养基上继代培养,每处理接种 20 个,每瓶 2 个,重复 3 次。30 d 后统计其增殖率[(分化出不定芽的芽数/接种的芽数)×100%]和[增殖倍数(每次继代培养中增殖后的芽数/接种芽数)]。

1.4 生根培养

以大量元素、IBA、蔗糖为 3 个因素进行正交试验 L₉(3⁴)。选取 2~3 cm 长、长势好的无菌苗,接种在 9 种生根培养基上,每一处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 个,重复 2 次。30 d 后,统计生根率。生根率=(不定根的苗数/总接种苗数)×100%。

1.5 移栽

选取生根培养基上至少长有 2~3 条 2.0 cm 以上不定根的试管苗,移出培养室,在自然光下,以不开盖炼苗 3~5 d,再打开瓶盖炼苗 2~3 d,然后移栽到灭菌基质上。基质分别为:河沙;土:沙(1:1);土:珍珠岩(1:1)。30 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂和消毒时间对叶片的影响

表 2 不同消毒剂和消毒时间对叶片的影响

消毒时间/min		叶片		
4%NaClO	0.1%HgCl ₂	污染率/%	死亡率/%	成活率/%
	3	52	15	33
	5	10	5	85
	8	9	70	21
3		70	20	10
5		23	10	67
8		5	90	15

由表 2 可以看出,用 0.1%HgCl₂ 对香椿叶片消毒 5min 时效果最佳,叶片成活率为 85%。当消毒 8min 时,叶片的成活率下降到 21%。由于香椿叶片是比较幼嫩的组织,消毒时间对叶片死亡率的影响比对污染率的影响大,因此在选择适宜的消毒时间(5min)时,除了考虑成活率之外,要以低的死亡率为参考。故对香椿叶片最佳的消毒剂和消毒时间为:70%酒精、30s+0.1%HgCl₂+吐温 80(2 滴)、5min。

2.2 叶片愈伤组织诱导

表 3 表明,6 号培养基 (MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ NAA)对愈伤组织诱导的效果最好,诱导率高达 100%,诱导时间最短(6d)。1 号培养基(MS+0.1 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ KT+0.1 mg·L⁻¹ NAA)的愈伤组织诱导率最低,为 72%,且诱导时间也较长(9d)。5 号培养基 (MS+0.5 mg·L⁻¹ BA+1.0 mg·L⁻¹ KT+0.5 mg·L⁻¹ NAA) 虽然也能获得最高的诱导率(100%),但与没有加 KT 的对照培养基对比 (MS+0.5 mg·L⁻¹ BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA),其愈伤组织容易老化,呈黄褐色,不利于继代培养和分化培养。

表 3 香椿叶片愈伤组织诱导结果

培养基编号	培养基附加成分/mg·L ⁻¹			愈伤组织诱导	
	NAA	BA	KT	天数/d	诱导率/%
1	0.1	0.1	0.1	9	72.0
2	0.1	0.5	0.5	7	85.5
3	0.1	1.0	1.0	6	94.0
4	0.5	0.1	0.5	6	89.0
5	0.5	0.5	1.0	7	100
6	0.5	1.0	0.1	6	100
7	1.0	0.1	1.0	8	86.0
8	1.0	0.5	0.1	6	92.0
9	1.0	1.0	0.5	7	95.0

2.3 香椿叶片的继代增殖培养

表 4 表明,9 号培养基 (MS+1.5 mg·L⁻¹ GA₃+1.0 mg·L⁻¹ BA+1.0 mg·L⁻¹ KT)对香椿叶片分化出来的幼芽增殖效果最好,其增殖率高达 63%,增殖倍数为 3.6。2 号培养基 (MS+0.5 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ BA+0.5 mg·L⁻¹ KT) 的效果最低,其增殖率仅为 27%,增殖倍数为 2.1。6 号培养基 (MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃+1.0 mg·L⁻¹ BA+1.0 mg·L⁻¹ KT) 虽然能获得很高的增殖倍数(3.1),但其增殖率只有 45%。

2.4 生根培养

从香椿生根诱导率试验结果(表 5)中可以看出,3 号培养基 (1/2MS+1.5 mg·L⁻¹ IBA+30 g 蔗糖)

表 4 香椿叶片增殖培养结果

培养基编号	培养基附加成分/mg·L ⁻¹			增殖培养	
	GA ₃	BA	KT	增殖率/%	增殖倍数
1	0.5	0.2	0.2	34	2.2
2	0.5	0.5	0.5	27	2.1
3	0.5	1.0	1.0	57	3.4
4	1.0	0.2	0.2	31	1.9
5	1.0	0.5	0.5	42	2.4
6	1.0	1.0	1.0	45	3.1
7	1.5	0.2	0.2	29	2.2
8	1.5	0.5	0.5	52	2.7
9	1.5	1.0	1.0	63	3.6

对香椿的生根率效果最佳,达到 89%,主根数为 4.7 根,根长为 6.9 cm。8 号培养基($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+15 g 蔗糖)生根率在 9 种培养基中最低,仅为 21%,主根数为 1.9 根,根长为 4.4 cm。

表 5 香椿生根诱导率结果

培养基 编号	培养基附加成分			生根诱导			
	大量元素	IBA $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蔗糖 g	根数 条	根长 cm	粗度 mm	生根率 %
1	1/2 MS	0.5	15	3.9	5.8	0.87	75
2	1/2 MS	1.0	20	4.3	6.4	0.95	82
3	1/2 MS	1.5	30	4.7	6.9	0.79	89
4	1/4 MS	0.5	20	2.1	5.6	0.83	68
5	1/4 MS	1.0	30	1.7	6.2	0.74	74
6	1/4 MS	1.5	15	1.8	5.1	0.86	62
7	0	0.5	30	1.6	4.2	0.76	32
8	0	1.0	15	1.9	4.4	0.57	21
9	0	1.5	20	2.4	4.9	0.62	24

2.5 生根苗移栽

从表 6 中可以看出,河沙基质的移栽成活率最高,香椿无菌苗移栽成活率达到 76.7%。比例为 1:1 的土:珍珠岩和土:河沙基质移栽成活率较低,其中,土:河沙(1:1)基质移栽成活率为最低,无菌苗移栽成活率仅为 56.7%。

表 6 基质对生根苗成活率的影响

基质	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%
河沙	120	92	76.7
土:河沙(1:1)	120	68	56.7
土:珍珠岩(1:1)	120	74	61.2

3 讨论

褐化现象在植物组织培养中普遍存在,它与菌类污染一样是植物组织培养的一大难题。在试验过程中,所采的香椿叶片褐化现象比较严重,一方面其与外植体组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶活性有直接关系^[13],而且在生长季节都含有较高的酚类物质;另一方面,也可能与消毒有关,因为幼嫩的材料容易受到化学消毒剂的伤害,而受伤害程度会直接影响褐化,如消毒后的嫩叶和叶柄有的接种第 2 天即出现褐化,几天后死亡。为了减轻褐化,则应选用新生枝中部的叶片和叶柄。

从试验中观察得知,NaClO 对叶片有一定的腐蚀作用,即使同样消毒 5 min,叶片轻者失绿,重者只剩下叶脉,不利于以后愈伤组织的诱导。叶柄褐化率比较高,表现出比叶片敏感,这可能由于叶柄

中含单宁成分较多所致。叶片污染主要是真菌污染,少有细菌污染。用 0.1% HgCl_2 对叶片进行消毒时,因为叶片比较幼嫩,加之含有酚类物质,当消毒时间超过 30s 后,第 2 天叶片周围的培养基就变成褐色,即使转入新鲜的培养基也不见好转。这可能与 Hg^{2+} 的残留有关^[14],因此在接种前用无菌水冲洗 7~8 遍,可减轻此症状。

另外,香椿试管苗的炼苗非常重要。香椿试管苗移栽前,在自然光下以不开盖炼苗 4~5 d,再打开瓶盖炼苗 3~5 d 效果较好。移栽的适宜季节为 4 月至 6 月底,此时苗成活率高,生长迅速。移栽成活的关键因素是在炼苗基础上选择透气性、排水性良好的基质,在管理上注意保湿、控温,同时注意遮荫、透气。同时,香椿根系在移栽过程中,容易受到损伤,其损伤程度往往会影响到香椿芽的萌发时间。因此,在移栽香椿苗木过程中,应尽量保持香椿根系的完整,减少过多根系的损伤,尤其是根系活动能力较强的侧根和须根部分。此外,在移栽过程中还应注意保持和提高地温,以促进新根的萌发。

参考文献:

- [1] 白文苑,沈慧敏.苍耳愈伤组织诱导及继代培养研究[J].甘肃农业大学学报,2006,41(1):65-68.
- [2] 翟晓巧,史俊华,范国强.结香树的组织培养及植株再生技术研究[J].河南农业大学学报,2006,40(1):27-30.
- [3] 何旭君,刘善辉,冯远来,等.海南龙血树组织培养快速繁殖技术研究[J].广东林业科技,2006,22(1):22-25.
- [4] 张立磊,李保印,郭巧玲,等.彩叶植物金叶绣线菊组织培养研究[J].经济林研究,2005,23(1):47-49.
- [5] 宗树斌,周春玲,牛立军,等.美国红枫的组织培养研究[J].山东林业科技,2006,162(1):1-3.
- [6] 吴丽君.香椿组培快繁效率的影响因子[J].中南林学院学报,2005,25(2):25-29.
- [7] 涂炳坤,丁小飞.化学药剂对香椿休眠解除的影响及其机理[J].园艺学报,2003,30(5):606-608.
- [8] 涂炳坤,丁小飞.香椿芽休眠萌发期间内源激素和碳水化合物的变化[J].林业科学,2003,39(4):159-161.
- [9] 王鹏程,涂炳坤,叶要妹,等.香椿种芽生产技术研究[J].种子,2002(5):78-79.
- [10] 王旭,刘向莉.香椿的休眠特性与生产应用[J].植物生理学通讯,2004,40(4):431-433.
- [11] 张小红,康冰,陈彦生,等.激素对香椿腋芽增殖生长的效应[J].西北植物学报,2001,21(4):756-760.
- [12] 张小红,陈彦生,康冰,等.香椿试管苗的生根和移栽[J].植物研究,2002,22(1):56-60.
- [13] ICHIHASHI S, KAKO S. Studies on clonal propagation of cattleya through tissue culture method: browning of cattleya [J]. Jap Soc Hort Sci, 1977, 46: 325-330.
- [14] 朱广廉.植物组织培养中外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-446.