

香椿茎段组织培养和再生技术研究*

许丽琼 涂炳坤**

(华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要 以孝感种源的3 a生香椿苗木为材料,分析了基本培养基对茎段组织培养的影响,研究了香椿茎段组织培养以及无菌苗的移栽技术。结果表明:0.1% HgCl₂对香椿茎段的消毒效果较好;MS比1/2 MS、B₅培养基更适于茎段的萌芽培养,萌芽率达80%。MS + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L GA₃ + 0.5 mg/L KT为最佳增殖培养基,增殖系数达到4.7。生根试验以1/2 MS + 1.5 mg/L IBA + 30 g蔗糖作为生根培养基较为适宜,生根率达到90%;在以河沙为基质时,移栽成活率达72.5%。

关键词 香椿;组织培养;培养基;萌芽率;增殖率

中图分类号 S 644.403.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2007)05-0697-04

香椿(*Toona sinensis*)为楝科香椿属植物,是一种材菜兼用的树种。植物组织培养作为现代生物技术的一部分,广泛应用于物种改良、植物快繁、植物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^[6-9],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。笔者通过筛选合适的培养基,对香椿的茎段进行了继代组织培养,并研究了香椿的生根培养和大棚移栽技术,以期对香椿的生物技术改良和优良品系的快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

试验苗木来自华中农业大学园艺林学学院山北教学基地。选用3 a生孝感种源的红香椿,高1.5 m,株行距15 cm×15 cm。种子系湖北天意特色种业公司提供。

1.2 材料消毒

香椿茎段3月份采自华中农业大学园艺林学学院山北教学基地。茎段采回后先用流水冲洗12 h,然后在超净台上用70%酒精处理30 s,分别用0.1% HgCl₂ + Tween 80和4% NaClO消毒10 min、15 min和20 min,消毒后均用无菌水冲洗4~5遍。

每一种消毒时间均需根据茎段的不同部位(上、

中、下)作适当的调整,每次消毒20个茎段,分成2个消毒瓶,重复2次。在超净台上接种。接种后每周观察记录茎段的变化;30 d后,统计各种时间下的污染率、死亡率、成活率。

死亡率(%)=(整个茎段褐变但没有被污染的茎段数目/总的茎段接种数)×100

1.3 基本培养基

以香椿茎段(带1个芽)为外植体,接种于MS(Murashige and Skoog)、1/2 MS、B₅ + 0.2 mg/L BA + 2.0 mg/L GA₃的培养基上诱导芽的萌发。培养基中加入3.0%葡萄糖和0.7%琼脂,用HCl或NaOH将pH值调至5.8~6.0,于121℃高温下灭菌20 min。每一处理接种20个外植体,重复3次;光照培养中,光照强度为1 000 lx,光照时间为12 h/d,培养温度为25℃。

1.4 采样时间

在香椿茎段芽的休眠期(10月至次年3月)到芽的生长期(4~9月),于不同生长期采样1次,茎段消毒后,接种在MS + 0.2 mg/L BA + 2.0 mg/L GA₃培养基上,每次接种30个外植体,培养期间,每周观察外植体的形态变化,接种30 d后,统计芽的污染率、死亡率。

1.5 嫩茎的继代增殖培养

以GA₃、BA、KT 3个因素进行正交试验L₉(3⁴)。选用一致的无菌苗在9种培养基上继代培

收稿日期:2006-10-31

* 武汉市科技攻关项目(992002049G)资助

** 通讯作者。E-mail: bktu@mail. hzau. edu. cn

许丽琼,女,1976年生,硕士。工作单位:华中农业大学研究生处,武汉 430070

养,每种处理接种20个,每瓶2个,重复3次。30 d后统计其增殖倍数。

增殖倍数(%)=(每次继代培养中增殖后的芽数/接种芽数)×100

1.6 生根培养

以大量元素、IBA、蔗糖3个因素进行正交试验 $L_9(3^4)$ 。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。1个月后统计生根率。所有继代培养与生根培养均为光照培养(光照强度为1 000 lx,光照时间为12 h/d),培养温度为25℃。

生根率(%)=(不定根的苗数/总接种苗数)×100

1.7 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,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)。每隔10 d观察移栽苗生长情况。30 d后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂 and 消毒时间对茎段的影响

从表1可知,香椿茎段用0.1% HgCl₂消毒15 min时,成活率最高,为56.0%,污染率较低,为35.0%。消毒20 min时,成活率最低,为51.0%,污染率为33.0%,可见用0.1% HgCl₂消毒15 min与消毒20 min的效果差别不大。另外,不管用哪种消毒方法,茎段的污染率都大于30.0%,成活率都不高(<60.0%),这种情况给试验初期无菌苗体系的建立造成了一定的障碍。因此对茎段进行消毒时,适宜消毒时间的选择主要以茎段上腋芽的承受能力(即成活率)为根据。试验中由于茎段表面密被星状毛,不利于灭菌,所以污染表现较早,一般在7~10 d左右。对香椿茎段而言,用4% NaClO消毒后的污染率均高于用0.1% HgCl₂消毒后的污染率,因此,对香椿茎段的消毒剂 and 消毒时间以0.1% HgCl₂ + 消毒30 min组合为最佳。

表1 不同消毒剂 and 消毒时间对茎段的影响¹⁾

Table 1 Effects of different disinfectant and disinfectant time on stem of *Toona sinensis*

消毒时间 Disinfectant time/min		污染率/% Contamination rate	死亡率/% Death rate	成活率/% Survival rate
4% NaClO	0.1% HgCl ₂			
	10	95.0 ± 1.7 a	5.0 ± 0.6 c	0.0 ± 0.0 d
	15	35.0 ± 2.3 c	6.0 ± 1.2 c	56.0 ± 2.3 a
	20	33.0 ± 1.7 c	16.0 ± 1.7 a	51.0 ± 0.6 ab
10		97.0 ± 0.6 a	3.0 ± 0.6 c	0.0 ± 0.0 d
15		55.0 ± 2.9 b	10.0 ± 0.6 b	35.0 ± 2.9 c
20		40.0 ± 4.0 c	12.0 ± 1.2 b	48.0 ± 2.3 b

2.2 基本培养基对茎段培养的影响

试验结果表明,利用3种培养基对不同大小的香椿试管苗进行培养,试管苗经1个月培养后,在MS培养基上,其萌芽率最高,达到80.0%,而且株高也最高,达到1 cm。B₅与1/2 MS培养基对茎段培养的效果差异不大,可能与培养基本身的营养有关,且都不如MS培养基的营养全面,这正与MS培养基是一种经典培养基是一致的。试验观察发现,MS培养基最有利于香椿茎芽的萌发,而且生长速度快,B₅与1/2 MS培养基的效果次之,故应以MS作基本培养基。

2.3 不同采样时间对茎段培养的影响

以香椿茎段为研究对象,在全年采样的过程中,由于在整个生长期茎段的木质化程度不一样,茎上腋芽的生长状态也不同,所以不同的采样时间之间,萌芽时间、污染率、成活率也存在着很大的差异。

由表2可以看出,3月12日、6月16日和8月31日采样的香椿茎段成活率较高,分别达到61.0%、56.0%和52.0%,同时,污染率也较低,分别为30.0%、44.0%和42.0%。就其萌发时间而言,以3月采样所需的萌发时间最长,需30 d左右。从表中还可以看出,在不同月份所采的试验材料,其死亡率都较低。

表2 不同采样时间对茎段培养的影响

Table 2 Effects of different sampling time on stem of *Toona sinensis*

采样时间(月/日) Sampling date(M/D)	03/12	04/20	06/16	08/31	10/12
萌芽时间 Germination time /d	30.0 ± 1.7 a	8.0 ± 0.6 d	10.0 ± 0.6 cd	12.0 ± 1.2 c	20.0 ± 1.2 b
污染率 Contamination rate /%	30.0 ± 2.9 d	50.0 ± 2.3 b	44.0 ± 2.3 bc	42.0 ± 1.7 c	70.0 ± 2.3 a
死亡率 Death rate /%	9.0 ± 1.7 ab	8.0 ± 0.6 ab	10.0 ± 1.2 a	6.0 ± 0.6 b	7.0 ± 0.6 ab
成活率 Survival rate /%	61.0 ± 2.9 a	42.0 ± 1.7 c	56.0 ± 2.3 ab	52.0 ± 2.3 b	23.0 ± 1.7 d

从试验结果可知,3月、10月为刚萌发的芽或饱满的休眠态的芽,虽能抽枝展叶,但需20~30 d才能发芽,且芽生长速度慢,而4月、6月、8月正处于生长旺盛期,且茎段呈半木质化,只需10 d左右即可发芽、生长,1个月后即可用于继代培养,获得无菌苗。所以,在生长旺盛期采样比较好,不仅成活率较高,而且萌芽时间早。

2.4 香椿茎段的继代增殖培养

细胞分裂素、生长素对植物器官分化、生长发育有着极其重要的影响。结果表明,第9种培养基即MS + 1.5 mg/L GA₃ + 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L KT对香椿幼茎的增殖效果最好,增殖倍数为4.7。第7种培养基(MS + 1.5 mg/L GA₃ + 0.2 mg/L BA + 1.0 mg/L KT)的增殖效果最低,增殖倍数为2.5。第1~5种培养基对香椿幼茎的增殖倍数差异不明显。试验过程中发现,嫩茎基部总有一定的愈伤组织,增殖芽就是从愈伤组织中长出(表3)。

表3 香椿茎段增殖培养试验结果

Table 3 The experiment of multiplication culture of stem of *Toona sinensis*

培养基附加成分/(mg·L ⁻¹) Additional components of culture medium			增殖倍数 Multiplication coefficient
GA ₃	BA	KT	
0.5	0.2	0.2	3.2±0.3 cde
0.5	0.5	0.5	3.5±0.2 bce
0.5	1.0	1.0	4.2±0.3 ab
1.0	0.2	0.2	2.7±0.2 de
1.0	0.5	0.5	3.9±0.2 abc
1.0	1.0	1.0	4.6±0.2 a
1.5	0.2	0.2	2.5±0.2 e
1.5	0.5	0.5	3.5±0.2 bed
1.5	1.0	1.0	4.7±0.3 a

2.5 生根培养

大量元素、IBA、蔗糖的正交试验结果见表4,以生根率、生根数为主要指标,其它指标作参考。从香椿生根萌芽率试验结果(表4)中可以看出,第3种培养基即1/2 MS + 1.5 mg/L IBA + 30 g蔗糖的生根率最高,达到90%,根长为6.1 cm。第7种培养基(0.5 mg/L IBA + 30 g蔗糖)生根率和根长在9种培养基中最低,其生根率仅为25.0%,根长为3.6 cm。第1~3种培养基在大量元素(1/2 MS)不变的条件下,生根率随IBA浓度和蔗糖含量的升高而提高;第7~9种培养基在去除大量元素的条件下,生根率和根长随IBA浓度的升高而提高,但生根率很低,均未超过30.0%;第4~6种培养基在大量元素(1/4 MS)的条件下,生根率和根长处于

表4 香椿生根萌芽率

Table 4 Inducement rate for root growth of *Toona sinensis*

培养基附加成分 Additional components of culture medium			生根诱导 Inducement of root growth	
大量元素 ¹⁾	IBA/(mg·L ⁻¹)	蔗糖 ²⁾ /g	根长 ³⁾ /cm	生根率 ⁴⁾ /%
1/2 MS	0.5	15	6.5 ± 0.2 b	70.0 ± 2.9 b
1/2 MS	1.0	20	7.6 ± 0.3 a	85.0 ± 2.3 a
1/2 MS	1.5	30	6.1 ± 0.2 b	90.0 ± 1.2 a
1/4 MS	0.5	20	6.0 ± 0.3 b	64.0 ± 2.9 b
1/4 MS	1.0	30	6.5 ± 0.3 b	70.0 ± 2.3 b
1/4 MS	1.5	15	5.2 ± 0.3 c	67.0 ± 2.9 b
0	0.5	30	3.6 ± 0.3 e	25.0 ± 1.7 c
0	1.0	15	4.0 ± 0.2 de	27.0 ± 2.3 c
0	1.5	20	4.5 ± 0.2 cd	30.0 ± 2.3 c

1)Mass element; 2)Sucrose; 3)Root length; 4)Rootage rate

第1~3种和第7~9种培养基之间(表4)。

2.6 生根苗移栽

香椿是一种极为耐旱但极怕涝的树种,积水可引起根部腐烂,导致植株死亡,基质对香椿无菌苗移栽成活率的影响列于表5。从中可以看出,河沙基质的移栽成活率最高,无菌苗移栽成活率达到72.5%。比例为1:1的土:珍珠岩和土:沙基质移栽成活率较低,其中,土:沙(1:1)基质移栽成活率最低,无菌苗移栽成活率仅为57.5%(表5)。

表5 基质对生根苗成活率的影响

Table 5 Effect of different transplanting media on the survival rate of *Toona sinensis*

基质 Basic material	移栽株数 No. of transplant	成活株数 No. of survival	成活率/% Survival rate
河沙 ¹⁾	80	58.0 ± 1.7 a	72.5 ± 1.4 a
土:沙 ²⁾ (1:1)	80	46.0 ± 2.9 b	57.5 ± 3.2 b
土:珍珠岩 ³⁾ (1:1)	80	51.0 ± 1.7 ab	63.8 ± 2.2 b

1)Sand; 2)Soil: Sand; 3)Soil: Pearl rock

3 讨论

香椿茎段在不同季节生长状态不同,在休眠期茎段完全木质化,可能带内生菌比较多,而且外植体一般较粗,影响灭菌的效果,所以其容易污染。在生长旺盛期,茎段为半木质化状态,能自然地抵抗细菌的侵入,因此所含内生菌较少,表面消毒后,诱导培养污染率较低,萌芽早,生长速度快,这一点与张小红^[10]的研究结果一致;而在生长季节诱导茎尖可以有效降低污染率^[11],但由于材料幼嫩,消毒时间难以把握,成活率比较低,故选择好适宜时期的香椿茎段,对快速获得无菌苗可达到事半功倍的效果。

另外,要使香椿试管苗能顺利完成从试管到田间的适应过程,移栽前的炼苗非常重要。炼苗能提高试管苗对外界环境的抵抗力,使它从一个完全封

闭的无菌的环境中进入完全开放的环境,适宜的炼苗过程,能增强植株的抵抗力,对移栽后的成活至关重要^[12]。本试验结果表明,在香椿试管苗的炼苗阶段,在自然光下,以不开盖炼苗 3~5 d,再打开瓶盖炼苗 3~5 d 效果较好。

香椿移栽过程中,以河沙为基质,其透水性、排水性好,且有一定的保水保肥作用,不仅香椿的移栽成活率高,而且苗后期生长旺盛,是一种较为理想的移栽基质。在含土的基质中,由于移栽后浇水的次数较多,易造成基质板结、积水,透气性不良,移栽效果差。同时,香椿也是一种喜热喜光的树种,移栽后,只要将其置于散射光丰富处,成活率一般可以得到保证。本试验于 2002 年 3 月、4 月分别进行了移栽,3 月份移栽的由于半个月都是阴雨天气,气温也较低,所以在移栽 1 周后,部分移栽苗叶片开始萎蔫腐烂,转移至室内后,其成活率也很低,有的移栽苗因沙内水分蒸发较慢,造成根部腐烂,植株死亡。对移栽成活的植株进行观察,发现在温度、光照适宜的情况下,移栽苗生长迅速,在移栽 3 周后主茎开始生长,在营养钵内经 30~40 d 的培养,苗高可达 8~10 cm。

在本试验中,无论是嫩茎的增殖培养,还是无菌苗的生根培养,苗的基部一般都易肿大。不利于嫩茎的生长,影响移栽成活率。在降低了培养基中的激素浓度后,基部仍然存有愈伤组织,虽然在继代培养中存在着激素的积累作用,但也不排除香椿的内源激素生长素水平可能较高。目前,香椿内源激素

水平测定的研究很少^[13],特别是在组织培养方面。本试验中愈伤组织没有分化,或愈伤组织难以分化的原因可能需从内源激素方面作进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 陈刚,贾敬芬,郝建国. 沙葱离体培养再生可育植株[J]. 植物研究, 2003, 23(1):51-55.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 金飏,何小弟,吴建华,等. 芍药离体培养初步研究[J]. 江苏农业科学, 2005(4):69-71.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 张玉洁. 香椿幼树光合作用及其影响因子研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(4):432-436.
- [10] 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.
- [11] 徐妙珍,李慧勤,王桂兰. 林木组织培养的障碍因素及对策[J]. 林业科技, 1996, 16(4):5-6.
- [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] 丁小飞. 香椿芽的休眠及内源激素的变化[D]. 武汉:华中农业大学园艺林学学院, 2005.

Tissue Culture and Regenerative Technology of Stem of *Toona sinensis*

XU Li-qiong TU Bing-kun

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

Abstract In this study, stem from three years old Chinese toon from Xiaogan was used as material to study the tissue culture and regeneration system in *Toona sinensis*. The results are as follows: the solution of 0.1% HgCl₂ was efficient for surface sterilizing of the stem; the culture medium with MS was fit for initiate culture, and the germination rate reached 80%. The optimum media for multiplication was MS plus with 1.0 mg/L BA, 1.5 mg/L GA₃ and 0.5 mg/L KT, by which the multiplied rate was up to 4.7. Rooting percentage was 90% on 1/2 MS medium added with 1.5 mg/L IBA and 30 g/L sucrose. The plantlets were transplanted into transplanting media with a survival rate of 72.5%.

Key words *Toona sinensis*; tissue culture; medium; germination rate; multiplication rate

(责任编辑:杨锦莲)