

# 香椿种子无菌苗再生体系的建立

杨超臣, 张 婷, 朱天然, 曹丽仙, 李建安

(中南林业科技大学 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 为了建立香椿无性系规模化组培快繁技术, 以成熟香椿种子在无菌条件下萌发的幼苗茎段为外植体, 研究不同基本培养基和不同植物生长调节剂对丛芽诱导、增殖、壮苗及生根的影响。结果表明: 最佳消毒处理为 20% NaClO 消毒 20 min, 萌发率为 80.56%, 污染率为 27.27%; 萌发培养基为 WPM 或 1/2MS + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; 最佳丛芽诱导培养基为 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 增殖倍数为 4.82; 最佳壮苗培养基 MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>; 最佳生根培养基 MS + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA, 生根率为 78.16%, 平均生根条数为 4.8。炼苗后, 移栽到园土:草炭土:珍珠岩体积比为 2:2:1 的基质中, 成活率达 77.5%。本研究为香椿良种快繁提供了一条新途径, 并较其他外植体(叶片、带芽茎段)为起始材料有不受取材条件限制的优点。

**关键词:** 香椿种子; 组织培养; 快速繁殖; 丛生芽

中图分类号: S723.1<sup>+</sup>3

文献标志码: A

文章编号: 1003—8981(2018)03—0114—06

## Establishment of rapid propagation for sterile seedlings of *Toona sinensis* by tissue culture

YANG Chaochen, ZHANG Ting, ZHU Tianran, CAO Lixian, LI Jian'an

(Central South University of Forestry & Technology, The Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Changsha 410004, Hunan, China)

**Abstract:** In order to establish the tissue culture and rapid propagation system of *Toona sinensis*. In this study, the seedlings of mature *Toona sinensis* seed germination under sterile conditions were used as explants to study the influence of different medium and different plant growth regulators on bud induction, hyperplasia, sound seedling and rhizogenesis and establish a complete system of tissue culture and rapid propagation. The results showed that the best disinfection treatment was 20% NaClO disinfection for 20 min, the germination rate was 80.56%, the contamination rate was 27.27%. The best germination medium was 1/2 MS or WPM+3.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, and the best medium for bud induction was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA +1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, the proliferation times was 4.82. The best Seedling medium was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.05 mg·L<sup>-1</sup> IAA+2.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. The best medium for rooting was MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA, the rooting rate was 78.16%, and the average number of rooting shoots was 4.8. The survival rate was 77.5% in the medium of 2:2:1 in peat soil: peat soil: perlite. The research supplied a new way for rapid propagation of *Toona sinensis*.

**Keywords:** seeds of *Toona sinensis*; tissue culture; rapid propagation; buds

香椿 *Toona sinensis* 楝科 Meliaceae 香椿属 *Toona*(Endl.)Roem, 是我国珍贵的速生用材树种, 素有“中国桃花心木”之美誉, 也是园林绿化的

优良树种, 同时也是兼具营养价值、食用价值、药用价值的木本蔬菜, 主要采食其嫩叶和芽<sup>[1]</sup>。香椿作为木本蔬菜的栽培方式主要是设施栽培和

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201104052, 201304802)。

作者简介: 杨超臣, 硕士研究生。

通信作者: 李建安, 教授, 博士, 博士研究生导师。E-mail: lja0731@126.com

引文格式: 杨超臣, 张 婷, 朱天然, 等. 香椿种子无菌苗再生体系的建立[J]. 经济林研究, 2018, 36(3): 114-119.

矮化密植栽培<sup>[2]</sup>,其常规育种方法是根蘖繁殖和种子繁殖。由于香椿根系深,根量少,根蘖繁殖率低,且香椿种子自然条件下萌发率低。组织培养作为一种高效的无性繁殖技术,可以实现种质资源创新和良种工厂化培育,现常与其他育种技术相结合,如:基因工程、原生质融合和花药培养等,是品种选育和种质资源创新的重要技术手段<sup>[3]</sup>。近年来,较多学者对香椿组培进行大量研究,但主要以带芽茎段<sup>[4]</sup>、叶片<sup>[5]</sup>作为初代培养材料,以香椿种子为初始培养材料的研究报道较少。本研究以成熟香椿种子在无菌条件下萌发的幼苗为外植体,研究不同基本培养基和不同植物生长调节剂对丛芽诱导、增殖、壮苗及生根的影响,建立了完整的组培快繁体系,为香椿的工厂化育苗提供理论基础,以期为遗传转化提供可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

香椿 *Toona sinensis* 成熟种子来自河南农业科学院,常温避光下保存,试验在中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室进行。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 无菌苗的获得

试验材料预处理:挑选大小均匀一致、籽粒饱满的成熟香椿种子,然后用洗衣粉浸泡 10 min,在流水下冲洗 2 h,再用 40 °C 温水浸泡催芽,浸种 12 h 后暗培养 24 h。然后经 75% 无水乙醇表面灭菌 1 min 后用无菌水冲洗 4~5 次。用以下 3 种材料灭菌处理:1%NaClO(有效成分)、0.1%HgCl<sub>2</sub>、10%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,无菌水冲洗 4~5 次,充分去掉残余的消毒液,然后将灭菌好的种子放在无菌滤纸上吸干水分,转接至 WPM 培养基上。每个处理接种 20 瓶,每瓶 1 粒种子,重复 3 次,培养 15 d 后统计污染率、萌发率。

#### 1.2.2 培养基的筛选

把预处理的种子用 1% NaClO 灭菌处理 20 min。分别接种在 WPM、MS、1/2MS 培养基上,并添加不同浓度 GA<sub>3</sub> (0、3、5 mg·L<sup>-1</sup>)。每个处理接种 15 瓶,每瓶 2 粒种子,重复 3 次。统计萌发所用时间、成苗率,以胚根露出超过种子长度为萌发标准,观察培养 40 d 后的幼苗生长情况。

#### 1.2.3 丛生芽的诱导

选取培养 45 d 后长势一致的香椿无菌苗为材料,切成长度为 2.0 cm 带芽茎段,接入含有 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA (0.05、0.1、0.5 mg·L<sup>-1</sup>)、GA<sub>3</sub> (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 的培养基中

进行丛生芽诱导培养,45 d 后统计丛生芽诱导率、增殖倍数。每处理接种 20 个带芽茎段,重复 3 次。

#### 1.2.4 无菌苗壮苗培养

以培养 45 d 的香椿丛生芽为材料,培养基中添加 6-BA (0.5、1.0 mg·L<sup>-1</sup>)、IAA (0.05、0.1、0.5 mg·L<sup>-1</sup>)、GA<sub>3</sub> (2.0 mg·L<sup>-1</sup>),优化出壮苗培养基,45 d 后统计苗高及生长情况。每处理接种 20 瓶,每瓶 1~2 个单芽,重复 3 次。

#### 1.2.5 生根培养

以壮苗后的单个芽苗为材料,切取生长健壮(高度 4 cm 左右)的单个芽苗接种在含有 IBA (0.1、0.5、1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA (0、0.1、0.5 mg·L<sup>-1</sup>) 的生根培养基上,45 d 后统计生根率、生根条数及根系生长情况。每处理 15 瓶,每瓶 1~2 个芽苗,重复 3 次。

#### 1.2.6 炼苗移栽

将生根 45 d 的试管苗打开瓶盖在人工气候室中炼苗 2 d,保持其湿度为 65% 左右。去掉根部的培养基,然后移栽到园土:草炭土:珍珠岩体积比为 2:2:1 的混合基质中,移栽初期保持盆内微环境相对湿度为 75%~85%。30 d 后统计移栽成活率<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.7 培养条件

培养基中均添加 30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖和 7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂,添加植物生长调节剂后调 pH 值为 5.8。121 °C 高温灭菌 20 min。培养条件为:温度 25±2 °C、光照周期 12 h/d、光照强度为 30 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、相对湿度为 60%~70%。

## 1.3 数据处理与统计分析

利用 Excel 2016、SPSS 22.0 软件进行数据处理、统计分析,数据均为“平均数±标准偏差”格式,采用 Duncan's 新复极差测验法 ( $P < 0.05$ ) 进行显著性分析。在结果统计中所涉及的测定项目计算公式如下:萌发率 (%) = 萌发的种子数 / (接种的种子数 - 污染的种子数) × 100%; 污染率 (%) = 污染种子数 / 种子总数 × 100%; 成苗率 (%) = 成苗数 / (接种的种子数 - 污染的种子数) × 100%; 增殖倍数 = 增殖后获得的单芽个数 / 接种的外植体数; 生根率 (%) = 生根的苗数 / 接种的芽苗数 × 100%; 平均生根条数 = 每处理生根的总根数 / 生根的总苗数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同灭菌处理对香椿种子萌发和污染情况的影响

由表 1 可知, A<sub>1</sub> ~ A<sub>13</sub> 处理污染率明显低

于 A<sub>14</sub> 处理, 说明各灭菌材料的不同处理时间都有灭菌作用, 并且各处理的灭菌效果有差异, 1%NaClO 和 0.1%HgCl<sub>2</sub> 处理时随着处理时间的延长, 污染率降低, 而 10%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理时并没有这种趋势, 其中处理 A<sub>9</sub> 的污染率最低, 为 3.33%。A<sub>1</sub> ~ A<sub>13</sub> 处理萌发率明显低于 A<sub>14</sub> 处理, 说明灭菌处理对种子萌发有一定的伤害作用, 其中除对照外, 处理 A<sub>12</sub> 的萌发率最高, 为 87.37%。由表 1 知, 相同灭菌时间下, 0.1%HgCl<sub>2</sub> 的灭菌作用要明显好于 1%NaClO 和 10%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 但 0.1%HgCl<sub>2</sub> 处理的种子萌发率远远低于 1%NaClO 和 10%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 并达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。因此, 处理 A<sub>4</sub> 的灭菌效果最好, 即用 1%NaClO 处理 20 min, 香椿种子污染率为 25.00%, 萌发率为 82.32%。

## 2.2 不同培养基及添加不同 GA<sub>3</sub> 浓度对种子萌发的影响

不同培养基、不同 GA<sub>3</sub> 浓度的添加影响种子的初始萌发时间、成苗率和幼苗生长状况, 见表 2。由表 2 可知, 在同等激素水平下, 以 WPM 和 1/2MS 作为基本培养基, 成苗率差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但都显著高于 MS 培养基 ( $P < 0.05$ )。同一种培养基时, 随着添加 GA<sub>3</sub> 浓度的增加, 初始萌发时间缩短, 但浓度过高会使根系浮在培

表 1 不同消毒剂 and 消毒时间对香椿种子消毒效果的影响<sup>†</sup>  
Table 1 Effect of different disinfection and sterilizing time on seeds of *Toona sinensis*

编号 No.	消毒剂类型 Type of disinfectant	处理时间 Processing time /min	污染率 Contamination rate /%	萌发率 Germination rate /%
A <sub>1</sub>	1%NaClO	5	51.67±5.77 <sup>cd</sup>	76.09±2.92 <sup>cd</sup>
A <sub>2</sub>	1%NaClO	10	46.67±7.64 <sup>d</sup>	80.98±2.87 <sup>abcd</sup>
A <sub>3</sub>	1%NaClO	15	35.00±5.00 <sup>e</sup>	79.61±3.33 <sup>bcd</sup>
A <sub>4</sub>	1%NaClO	20	25.00±5.00 <sup>f</sup>	82.32±3.00 <sup>abc</sup>
A <sub>5</sub>	1%NaClO	25	21.67±2.89 <sup>fg</sup>	78.75±3.31 <sup>cd</sup>
A <sub>6</sub>	0.1%HgCl <sub>2</sub>	5	16.67±2.89 <sup>gh</sup>	24.02±0.85 <sup>e</sup>
A <sub>7</sub>	0.1%HgCl <sub>2</sub>	10	11.67±2.89 <sup>hi</sup>	15.14±3.52 <sup>f</sup>
A <sub>8</sub>	0.1%HgCl <sub>2</sub>	15	8.33±2.89 <sup>ij</sup>	3.61±3.13 <sup>g</sup>
A <sub>9</sub>	0.1%HgCl <sub>2</sub>	20	3.33±2.89 <sup>i</sup>	0.00±0.00 <sup>g</sup>
A <sub>10</sub>	10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5	63.33±2.89 <sup>a</sup>	77.38±7.43 <sup>cd</sup>
A <sub>11</sub>	10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	55.00±5.00 <sup>bc</sup>	85.46±4.78 <sup>ab</sup>
A <sub>12</sub>	10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15	60.00±5.00 <sup>ab</sup>	87.37±1.59 <sup>a</sup>
A <sub>13</sub>	10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20	48.33±2.89 <sup>cd</sup>	74.24±5.17 <sup>d</sup>
A <sub>14</sub>	对照 CK	—	96.67±2.89	100.00

<sup>†</sup> 同一指标数据用不同小写字母标识表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。  
Values in the same column with different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). The same as below.

培养基表面, 不利于幼苗生长。因此, 在 WPM 或 1/2MS 培养基上添加 3.0 mg·L<sup>-1</sup>GA<sub>3</sub>, 可以缩短香椿种子萌发时间, 有利于幼苗生长 (B<sub>4</sub> 或 B<sub>5</sub> 组)。

表 2 不同培养基及添加不同 GA<sub>3</sub> 浓度对种子萌发的影响  
Table 2 Effects of different medium and GA<sub>3</sub> concentration on seed germination

编号 No.	培养基类型 Culture medium type	GA <sub>3</sub> / (mg·L <sup>-1</sup> )	初始萌发天数 Initial germination days /d	成苗率 Planting percent /%	幼苗生长状况 Growth of seedling
B <sub>1</sub>	WPM	0	3	76.56±3.68 bc	长势一般, 根在培养基中、侧根较多、较细
B <sub>2</sub>	1/2MS	0	3.5	77.92±0.88 ab	长势一般, 根在培养基中、侧根较多、较细
B <sub>3</sub>	MS	0	4	70.07±1.18 e	长势差, 根在培养基中、侧根少、细
B <sub>4</sub>	WPM	3	2	77.12±1.78 ab	长势好, 根在培养基中、侧根多、粗壮
B <sub>5</sub>	1/2MS	3	2.5	80.04±0.89 a	长势好, 根在培养基中、侧根多、粗壮
B <sub>6</sub>	MS	3	3	72.39±1.54 de	长势较好, 根在培养基中、侧根少、根系短粗
B <sub>7</sub>	WPM	5	1.5	73.69±1.54 cd	长势较好, 根系多、少量浮在培养基表面
B <sub>8</sub>	1/2MS	5	1.5	76.04±0.97 bc	长势较好, 根系较多、部分浮在培养基表面
B <sub>9</sub>	MS	5	2.5	66.69±1.48 f	长势一般, 根系大部分浮在培养基表面

## 2.3 不同植物生长调节剂对丛生芽诱导的影响

由表 3 可知, 在只添加 GA<sub>3</sub> 的 C<sub>1</sub> 组中, 不能诱导出香椿丛芽, 当 6-BA 浓度为 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 时, 诱导出的香椿丛芽数量多而小, 生长缓慢。当培养基中添加 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 并附加 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 的 GA<sub>3</sub> 时, 丛芽增殖倍数达到 4.82, 丛芽粗壮, 生长旺盛 (见图 1C)。随着 6-BA 浓度的增加, 丛芽增殖倍数降低, 并有愈伤产生, 不利于后期壮苗培养。因此, 适合香椿丛芽诱导的最佳培养基为:

MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (C<sub>5</sub> 组)。

## 2.4 不同植物生长调节剂对香椿试管苗壮苗培养的影响

由于丛生芽诱导的无菌苗较瘦弱, 进行壮苗培养有利于得到健壮芽苗。由表 4 可知, 只添加 2.0 mg·L<sup>-1</sup>GA<sub>3</sub> 的 D<sub>1</sub> 组可以促进芽苗生长, 但芽苗细弱, 添加 6-BA 和 IAA 后, 芽苗基部都有膨大现象 (D<sub>2</sub> ~ D<sub>7</sub> 组)。当 6-BA 浓度一定时, 随着 IAA 浓度的增加, 苗高有所降低, 当 IAA 浓度达

表 3 不同植物生长调节剂对丛生芽诱导的影响  
Table 3 Effects of plant growth regulators on the induction of cluster buds

编号 No.	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	芽增殖倍数 Proliferation multiple of bud	丛生芽生长情况 Growth of plexus bud
C <sub>1</sub>	0.0	0.00	1.0	1.0	无从芽, 生长缓慢
C <sub>2</sub>	0.5	0.05	1.0	4.08±0.03 d	丛芽小, 生长缓慢
C <sub>3</sub>	0.5	0.10	1.0	4.18±0.06 cd	丛芽小, 生长缓慢
C <sub>4</sub>	0.5	0.50	1.0	4.37±0.08 b	丛芽小, 生长缓慢、少数有愈伤
C <sub>5</sub>	1.0	0.05	1.0	4.32±0.06 bc	丛芽粗壮, 生长旺盛
C <sub>6</sub>	1.0	0.10	1.0	4.82±0.08 a	丛芽粗壮, 生长旺盛
C <sub>7</sub>	1.0	0.50	1.0	4.13±0.06 d	丛芽粗壮, 生长旺盛, 少量愈伤
C <sub>8</sub>	2.0	0.05	1.0	2.97±0.16 g	丛芽粗壮, 生长旺盛, 少量愈伤
C <sub>9</sub>	2.0	0.10	1.0	3.23±0.08 f	丛芽粗壮, 生长旺盛, 大量愈伤
C <sub>10</sub>	2.0	0.50	1.0	3.38±0.12 e	丛芽粗壮, 生长旺盛, 大量愈伤

表 4 不同植物生长调节剂对香椿试管苗壮苗培养的影响  
Table 4 Effects of different plant growth regulators on seedling culture of *Toona sinensis*

编号 No.	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )	平均苗高 Average height of seedling /cm	生长状况 Growth condition
D <sub>1</sub>	0.0	0.00	2.0	4.44±0.27 b	芽苗较细弱, 长势较好
D <sub>2</sub>	0.5	0.05	2.0	4.87±0.25 a	基部稍膨大, 芽苗粗壮, 长势好
D <sub>3</sub>	0.5	0.10	2.0	4.54±0.24 ab	基部膨大, 长势好
D <sub>4</sub>	0.5	0.50	2.0	4.30±0.25 b	基部膨大, 少量愈伤, 生长慢
D <sub>5</sub>	1.0	0.05	2.0	3.56±0.24 c	基部稍膨大, 增殖, 不利于壮苗, 芽苗较短
D <sub>6</sub>	1.0	0.10	2.0	3.43±0.16 c	基部膨大, 增殖, 不利于壮苗, 芽苗短
D <sub>7</sub>	1.0	0.50	2.0	3.27±0.19 c	基部膨大, 增殖, 大量愈伤, 玻璃化

到 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 时有愈伤产生。当 6-BA 为 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, 芽苗有增殖现象发生, 不利于壮苗培养。因此, 香椿无根苗壮苗的最佳培养基为: MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> (D<sub>2</sub> 组)。

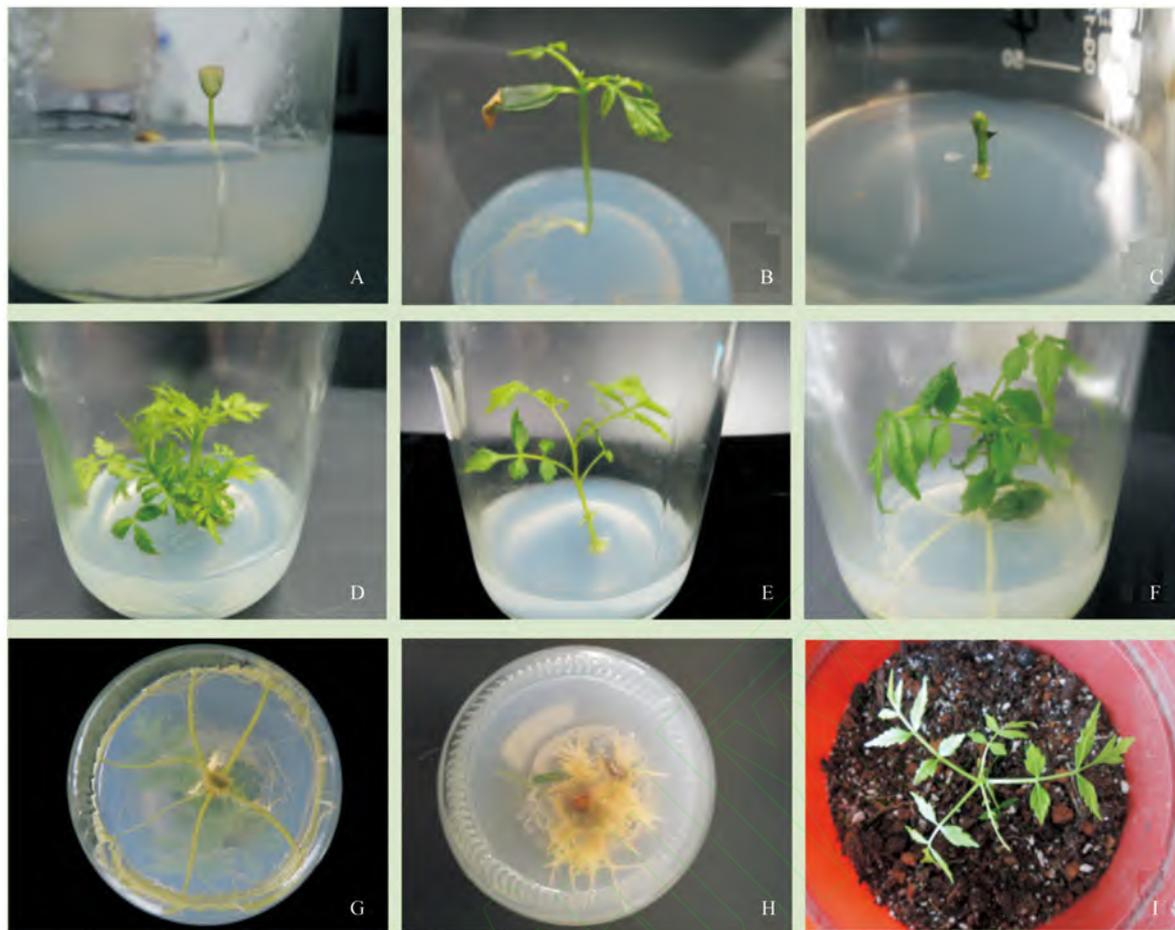
#### 2.5 不同植物生长调节剂对生根的影响

由表 5 可知, 当培养基中 (E<sub>1</sub> 组) 没有添加任何植物生长调节剂, 芽苗的生根率和生根条数都为 0。当培养基中只添加 IBA 时, 随着 IBA 浓度的增加, 生根率和平均生根条数增大, 当 IBA 浓度为 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 时, 10 d 后有白色根系产生, 45 d 后生根效果最佳, 生根率为 78.16%, 平均生根条数为 4.8, 根系发达 (见图 1F、1G)。当培

养基中加入 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA 时, 随着 NAA 浓度增加生根率逐渐下降, 并且根系分化不明显, 芽苗基部产生愈伤并有玻璃化现象产生, 不利于后期炼苗移栽 (见图 1H)。因此, MS + IBA 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 为生根的最适培养基 (E<sub>5</sub> 组)。将生根 45 d 的试管苗打开瓶盖在人工气候室中炼苗 2 d, 保持其湿度为 65% 左右。去掉根部的培养基, 然后移栽到园土: 草炭土: 珍珠岩体积比为 2:2:1 的混合基质中, 移栽初期保持盆内微环境相对湿度为 75%~85%。30 d 后统计移栽成活率达到 77.5% (见图 1I)。

表 5 不同植物生长调节剂对生根的影响  
Table 5 Effects of plant growth regulators on the percentage of rooting

编号 No.	IBA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	生根率 Rooting rate /%	生根数 Rooting number	根系生长状况 Growth condition of root
E <sub>1</sub>	0.0	0.0	0.00	0.00	无根系产生
E <sub>2</sub>	0.1	0.0	68.47±1.68 c	1.43±0.10 d	主根少, 短, 细弱, 无须根
E <sub>3</sub>	0.5	0.0	71.26±1.47 bc	2.21±0.08 c	主根少, 短, 细弱, 须根少
E <sub>4</sub>	1.0	0.0	74.40±2.16 ab	2.72±0.12 b	主根较多, 长, 细, 须根较多
E <sub>5</sub>	2.0	0.0	78.16±1.20 a	4.80±0.13 a	主根多, 长, 粗壮, 须根多
E <sub>6</sub>	2.0	0.1	60.66±2.71 d	丛根	基部大量愈伤, 根浮在表面, 部分玻璃化
E <sub>7</sub>	2.0	0.5	40.50±3.70 e	丛根	基部大量愈伤, 根浮在表面, 玻璃化严重



A. 种子萌发 5 d; B. 萌发 12 d, 长出真叶; C, D. 丛生芽的诱导; E. 壮苗培养; F, G. 生根培养, 正常根; H. 丛生根 I. 炼苗移栽。  
A. 5 days of seed germination; B. after 12 days of germination, the leaves grow; C, D. clustered buds induction;  
E. strengthening cultivation; F, G. rooting culture, normal root; H. clustered root; I. Hardening-seedling and transplantation.

图 1 香椿种子无菌苗组培快繁

Fig. 1 Tissue culture and rapid propagation of *Toona sinensis*

### 3 结论与讨论

在植物组织培养中, 菌类污染是实验成功与否的关键因素之一。根据不同种子选择合适的消毒材料、消毒时间是降低组织培养中外植体菌类污染和快速、高效地获得无菌材料的关键步骤, 常用的消毒剂有: 酒精, 溴水, 次氯酸钠, 过氧化氢, 升汞, 抗生素和高锰酸钾等, 其中升汞被认为是目前消毒效果最好的。本试验在对香椿种子灭菌处理时发现 3 种材料都有灭菌的作用。虽然升汞对香椿种子灭菌效果最好, 但种子萌发效果明显低于次氯酸钠和双氧水, 这与江涛等<sup>[7]</sup>在毛竹种子组培灭菌试验中研究结果一致。培养基对植物组织培养有一定的影响, 1/2MS 培养基是油桐种胚再生体系建立的较佳培养基<sup>[8]</sup>。WPM 培养基是最适合美国流苏离体胚萌发启动的基本培养基<sup>[9]</sup>。吴俊长等<sup>[10]</sup>发现将珙桐种胚接种于 WPM 培养基上, 外表面 2 d 后形成少许致密氧化物, 些许褐化, 后期生长快速。本试验中, 1/2MS

和 WPM 培养基对香椿种子的成苗率影响差异不大, 但都显著高于 MS 培养基, 可能原因是 MS 培养基中无机盐含量高影响种子的萌发。

增殖倍数的高低反映了植物快速繁殖的速度和效率, 是工厂化育苗时预估苗木生产总量的重要指标, 在丛生芽的诱导培养中, 6-BA 的使用比较常见, 但常与其他植物生长调节剂一起使用<sup>[11]</sup>。本试验中, 随着培养基中添加 6-BA 浓度的升高, 香椿芽苗的增殖倍数呈先增大后减小的趋势, 与大花型红花蝴蝶兰组培增殖结果一致<sup>[12]</sup>; 随着 NAA 浓度的增加, 芽膨大变形成绿色半透明的畸形苗, 基部出现愈伤并有玻璃化现象产生, 与百合科巴迪亚寿组培增殖结果一致<sup>[13]</sup>。有学者研究表明, 增殖倍数过高会引起组培苗的弱化, 生长势变差<sup>[14]</sup>。本试验中当 6-BA 浓度为  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 增殖倍数显著高于 6-BA 浓度为  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 但从芽小, 生长缓慢。

由于丛芽诱导的无菌苗较瘦弱, 在培养中添加细胞分裂素和生长素进行壮苗, 有利于得到健

壮芽苗。已有学者进行大量研究,迷人杜鹃在  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}2\text{-ip} + 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$  的培养基上壮苗效果最佳<sup>[15]</sup>。莖叶紫金牛的最佳壮苗培养基为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT} + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$ <sup>[16]</sup>。本试验结果表明:当培养基中添加较低浓度的 6-BA ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时, IAA 浓度降低更有利于壮苗培养,可能原因是随着培养时间的延长,芽苗体内的激素在逐渐升高,过高的激素对芽苗的生长有抑制作用<sup>[17-18]</sup>;高浓度的生长素和细胞分裂素组合会使芽苗增高效果减弱并有愈伤产生,这与田奥磊等在武夷岩茶壮苗生长培养试验中研究结果一致<sup>[19]</sup>。在进行生根诱导培养时, IBA 和 NAA 是最广泛应用的植物生长调节剂。本试验结果表明:培养基中添加 IBA 的浓度越高,生根率越高,芽苗根系生长情况越好,这与陈珂在红椿生根培养试验中结果一致<sup>[20]</sup>。当 IBA 浓度为  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,随着 NAA 激素浓度的提高,生根率降低,根部愈伤组织增多,与晏姝等在南洋楸和郭树义等在乌腺金丝桃组培生根试验中研究结果一致<sup>[21-22]</sup>。

目前,香椿组织培养常以叶片、带芽茎段为起始外植体,许丽琼等<sup>[5,23]</sup>以叶片为起始外植体诱导香椿组培苗时发现,获得无菌叶片时容易出现褐化现象。梁明勤等<sup>[24]</sup>以带芽茎段为起始外植体发现,在生根培养时添加  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{AC}$  的处理不仅生根率高,而且芽苗粗壮。马勤<sup>[25]</sup>研究发现以带芽茎段为起始外植体进行组织培养时受到取材的限制,其中以 6 月中旬—7 月下旬的当年生半木质化的非休眠期腋芽茎段为最佳。本研究以种子获得无菌苗为起始外植体建立香椿的组培快繁技术体系,可以不受取材时间的限制,并且以种子为起始外植体诱导的香椿无菌苗,其下胚轴和子叶更易诱导出愈伤组织,可为下一步香椿组织培养的间接发生体系打下基础。后续将对叶片和下胚轴诱导愈伤组织及其诱导分化成芽这一部分内容进行研究,为其规模化生产提供多途径的技术依据。

#### 参考文献:

- [1] 祁承经,汤庚国. 树木学(南方本)[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
- [2] 张荣,校彦赞,朱牧笛,等. 滇中地区香椿萌芽特性和设施内采摘技术研究[J]. 西南林业大学学报,2016,36(3):60-65.
- [3] 蒋时姣,钟宇,张帆,等. 柳杉种子无菌苗组培快繁体系的建立[J]. 植物生理学报,2014,50(7):1039-1044.
- [4] 张晓申,邢廷茂,王慧瑜,等. 香椿组织培养与快速繁殖技术的研究[J]. 江西农业学报,2011,23(10):58-59,62.
- [5] 许丽琼,涂炳坤. 香椿茎段组织培养和再生技术研究[J]. 华中农业大学学报,2007(5):697-700.
- [6] 吴玲利,柯镇峰,龚春,等. 白木通组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学报,2015,51(6):903-908.
- [7] 江涛,李晨曦,陈磊,等. 毛竹组织培养中成熟种子消毒方法[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):103-106.
- [8] 李泽,谭晓风,张琳,等. 油桐种胚再生体系的建立[J]. 经济林研究,2012,30(4):119-122.
- [9] 吴秀燕,张鸽香. 美国流苏离体胚的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2017,53(2):227-233.
- [10] 吴俊长,李萌,曹福祥,等. 珙桐种子快速繁殖技术的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2016,36(2):66-70,95.
- [11] Rehana S, Alam MS, Islam KS, Samad MA. Influence of growth regulators on shoot proliferation and plantlet production from shoot tips of banana. *Prog Agric*, 2013, 20(1-2): 9-16.
- [12] 谈静,张英杰,郭文姣,等. 外源激素对大花型红花蝴蝶兰组培增殖、促壮及生根的影响[J]. 分子植物育种,2018,16(3):943-947.
- [13] 茅汝佳,高燕. 巴迪亚寿的组织培养及育苗技术[J]. 浙江农业科学,2018,59(3):477-481.
- [14] 吴秀华,张艳玲,周月,等. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. 植物生理学报,2013,49(8):759-763.
- [15] 吴雅文,李枝林,白天,等. 迷人杜鹃组培快繁技术的研究[J]. 种子,2015,34(3):112-116.
- [16] 孙英坤,胡绍庆,庞基良,等. 珍稀濒危物种莖叶紫金牛高效快繁体系的建立[J]. 植物学报,2017,52(6):764-773.
- [17] 李泽,谭晓风,袁军,等. 油茶良种‘华硕’的组织培养及高效生根[J]. 植物生理学报,2014,50(11):1721-1726.
- [18] 吴玲利. 白木通组织培养再生体系的建立[D]. 长沙:中南林业科技大学,2016.
- [19] 田奥磊,高俊杰,李丹丹,等. 武夷岩茶大红袍的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2017,53(4):619-624.
- [20] 陈轲. 红椿组织培养技术研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2016.
- [21] 晏姝,胡德活,韦如萍,等. 南洋楸组培快繁技术优化研究[J]. 中南林业科技大学学报,2017,37(6):65-69.
- [22] 郭树义,陈静,王翠霞,等. 乌腺金丝桃茎尖离体培养基激素配比筛选[J]. 经济林研究,2017,35(1):68-72.
- [23] 许丽琼,涂炳坤. 香椿叶片组织培养和快繁技术的研究[J]. 湖北农业科学,2007(1):24-26.
- [24] 梁明勤,郭群鹏,陈世昌,等. 菜用香椿组培快繁技术研究[J]. 园艺与种苗,2016(3):58-61.
- [25] 香椿 T<sub>4</sub> 品系组培快繁技术研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.

[ 本文编校: 刘铁钢 ]