

## 不同因素对油樟愈伤组织生长的影响

魏琴<sup>1</sup>, 李想韵<sup>2</sup>, 王丽<sup>3</sup>, 周黎军<sup>1</sup>, 张萍, 邓骞远 (1. 宜宾学院西南特色经济植物保护与利用重点实验室, 四川宜宾 644000; 2. 西南大学, 重庆北碚 400716; 3. 四川农业大学农学院, 四川雅安 645014)

**摘要** [目的]筛选油樟组培条件。[方法]以油樟带芽茎段为外植体,通过愈伤组织诱导率、污染率、褐变等指标研究无机盐、光照、抗生素等因素对愈伤组织生长影响。[结果]愈伤组织在2种培养基上均能明显增殖,且MS的培养效果好于1/2MS。由带芽茎段诱导的新生愈伤组织略带绿色。继代培养后,黑暗中诱导和培养的愈伤组织为淡黄色或白色,光照下培养的愈伤组织为褐色。愈伤组织诱导率和外植体污染率都随抗生素浓度的增加而降低,25~50 mg/L的链霉素处理出愈率最高(60%~72%),污染率最低(0~15%),死亡率也最低(0)。在相同浓度下,使用链霉素外植体死亡率最低。[结论]MS培养基+25~50 mg/L链霉素是油樟组培的最佳条件。

**关键词** 油樟; 组培; 愈伤组织

中图分类号 S722.3\*7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)17-07135-03

### Influence of Several Factors on the Growth of Callus of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao ex H. W. Li

WEI Qin et al (Key Lab of Southwest Special Economic Plant Protection and Utilization, Yibin College, Yibin, Sichuan 644000)

**Abstract** [Objective] The objective of the research was to screen out the condition of tissue culture of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao ex H. W. Li. [Method] Taking the *C. longepaniculatum* stems with bud of as explants, the effect of factors such as mineral salt, illumination, antibiotics on the callus growth were studied according to indexes of callus induction rate, pollution rate and browning etc. [Result] The callus could be obviously proliferated on 2 kinds of mediums. The cultural effect of MS was better than that of 1/2MS. The callus induced from the stems with bud was a little green. After subcultured, the callus induced and cultured under darkness was amber or white and callus cultured under illumination was brown. The induction rate of callus and the pollution rate of explants were decreased with the increment of antibiotics concentration. When phytomycin was 25~50 mg/L, the forming ratio of callus was highest (60%~72%), pollution rate (0~15%) and death rate (0) was also lowest. The death rate of explants, treated with phytomycin at the same concentration was lowest. [Conclusion] The optimum condition of tissue culture of *C. longepaniculatum* was MS medium+25~50 mg/L phytomycin.

**Key words** *C. longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li; Tissue culture; Callus

油樟(*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao ex H. W. Li)是樟科樟属的珍贵树种,为中国特产,是四川省宜宾市的优势经济树种<sup>[1]</sup>。油樟全身是宝——油樟树兜含3%~5%黄樟素,是合成洋茉莉醛的重要原料;鲜叶含油量达3.8%~4.5%,主要成分桉叶油素高达55.0%<sup>[2]</sup>,广泛用于医药、化工、香料、食品和国防工业;油樟种子榨油,可供制皂、作润滑油<sup>[3]</sup>。油樟作为木本植物,在其组培过程中易出现污染、褐变严重等问题,直接影响组织培养研究进程。能否有效控制微生物污染和培养物褐变是植物离体培养成功的关键,也是建立组培优良无性系的前提<sup>[4]</sup>。周锦霞等<sup>[5]</sup>研究发现,通过选用1年生带芽茎段作为外植体可有效控制污染率,魏琴等<sup>[6]</sup>在控制油樟组培过程中玻璃化现象方面取得了重要进展。王丽等<sup>[7]</sup>也对油樟愈伤组织培养进行了初步研究,但是影响愈伤组织生长的因素尚未见报道。笔者以油樟带芽茎段为外植体,通过愈伤组织诱导率、污染率、褐变等指标研究无机盐、光照、抗生素等因素对愈伤组织生长的影响,以筛选出一套更好的油樟组培条件,旨在为进一步的遗传转化试验和细胞培养生产次生代谢产物试验奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 材料 油樟1年生带芽茎段采自四川省宜宾市邱场乡。

#### 1.2 方法

1.2.1 外植体消毒处理。用毛刷刷洗油樟带芽茎段,并置于自来水下冲洗2~4 h;然后在超净台上用70%的酒精漂洗茎段15 s,再用无菌水清洗3~5次,然后用0.1%的升汞+吐温3~4滴漂洗外植体6 min,最后用无菌水处理8次。

**基金项目** 四川省科技厅资助项目(04JY029-064)。

**作者简介** 魏琴(1967-),女,四川屏山人,教授,从事植物细胞工程研究。

**收稿日期** 2008-04-07

1.2.2 愈伤组织的诱导。将外植体接种到MS+BA 2 mg/L(单位下同)+NAA 0.01基本培养基上,28℃暗培养,诱导出愈伤组织。

1.2.3 无机盐培养。将初代培养的愈伤组织(平均直径约1 cm)分别转接到1/2MS+BA2+NAA0.01和MS+BA2+NAA0.01 2种培养基上,每种培养基接种20个愈伤组织,培养温度28℃,暗培养。每隔10 d观察1次结果,直到40 d。

1.2.4 光照培养。将上述2种培养基中的愈伤组织各取4瓶(每瓶中各有1个直径为1 cm的愈伤组织)置于暗处(厚壁纸盒中)培养14 d后,与光照条件下培养的愈伤组织进行观察和比较。培养温度28℃,光照强度1 000 lx,每天光照12 h。

1.2.5 添加不同抗生素。将氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素分别配成50 mg/ml的母液,按照计算好的吸取量分别量取氨苄、卡那霉素和链霉素母液0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 ml到200 ml的MS+BA2+NAA0.01培养基中,使它们的最终使用浓度分别为50、100、200、300、400 mg/L 5个梯度。灭好菌的培养基冷却到45℃左右(不烫手)加入。将油樟带芽茎段接种到加有不同浓度抗生素的各种培养基上,35 d统计外植体的污染、死亡及愈伤组织诱导和生长情况。以不加抗生素的MS+BA2+NAA0.01为对照。

### 2 结果与分析

2.1 不同培养基对愈伤组织增殖的影响 表1表明,愈伤组织在2种培养基上均有明显的增殖效果,用MS培养的效果比用1/2MS培养的效果稍好一些,但差异不明显(图1)。

2.2 光照对愈伤组织增殖的影响 图2表明,由带芽茎段诱导的新生愈伤组织略带绿色(图1-I)。继代培养后,黑暗中诱导和培养的愈伤组织为淡黄色或白色(图1-II),光照下培养的愈伤组织为褐色(图1-III),褐化的愈伤组织还能

表1 无机盐对愈伤组织继代增殖的影响

Table 1 Effects of inorganic salt on callus subculture and multiplication

个

培养基 Culture medium	培养时间 Culture time											
	10 d			20 d			30 d			40 d		
	好 Good	中 Middle	差 Bad	好 Good	中 Middle	差 Bad	好 Good	中 Middle	差 Bad	好 Good	中 Middle	差 Bad
1/2 MS	0	4	16	0	13	7	10	10	0	16	4	0
MS	0	4	16	0	18	2	11	9	0	19	1	0

注:好,愈伤组织的直径 3~4 cm;中,愈伤组织的直径 2~3 cm;差,愈伤组织的直径为 1~2 cm。

Note: Good, middle and bad mean the diameters of callus are 3~4 cm, 2~3 cm and 1~2 cm.

继续生长出白色或浅绿色新生愈伤组织(图 1-IV)。



注: I, 1/2 MS; II, MS. Note: I, 1/2MS; II, MS.

图1 无机盐对愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effects of inorganic salt on callus growth

### 2.3 抗生素对外植体污染及愈伤组织生长的影响 由表 2

表2 不同浓度抗生素对外植体污染率控制和愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different concentrations of antibiotic on pollution rate control of explant and callus induction rate

	抗生素浓度 Antibiotic concentration // mg/L	出愈率 Callus induction rate // %	死亡率 Mortality rate // %	污染率 Polluted rate // %	愈伤组织生长状况 Growth status of callus
对照 Control	0	75	0	48	+++
氨苄青霉素 Amp	25	30	20	20	+++
	50	15	30	10	++
	100	12.5	50	0	+
	200	0	50	0	-
	300	0	60	0	-
	400	0	80	0	-
卡那霉素 Kam	25	43	26	25	+++
	50	35	40	0	++
	100	32	80	0	+
	200	20	80	0	+
	300	0	100	0	-
	400	0	100	0	-
链霉素 Str	25	72	0	15	+++
	50	60	0	0	+++
	100	50	40	0	++
	200	50	40	0	++
	300	40	60	0	+
	400	40	60	0	+

注:出愈率=产生愈伤组织的外植体数/未污染和死亡的外植体数;死亡率=死亡的外植体数/接种的外植体数;污染率=污染的外植体数/接种的外植体数。+++ ,长势好; ++ ,长势较好; + ,长势一般; - ,没有生长现象。

Note: Callus induction rate=number of explant inducing callus / unpolluted and dead explant number. Mortality rate=number of dead explant / number of inoculated explant. Polluted rate=number of polluted explant / number of inoculated explant. +++, ++ and + stand for good, relatively good and normal growth vigor. - stands for no growth.

重,死亡率也随抗生素浓度升高而升高。由此可见,抗生素在杀灭病菌的同时也对植物体造成了一定的毒害。

### 3 讨论

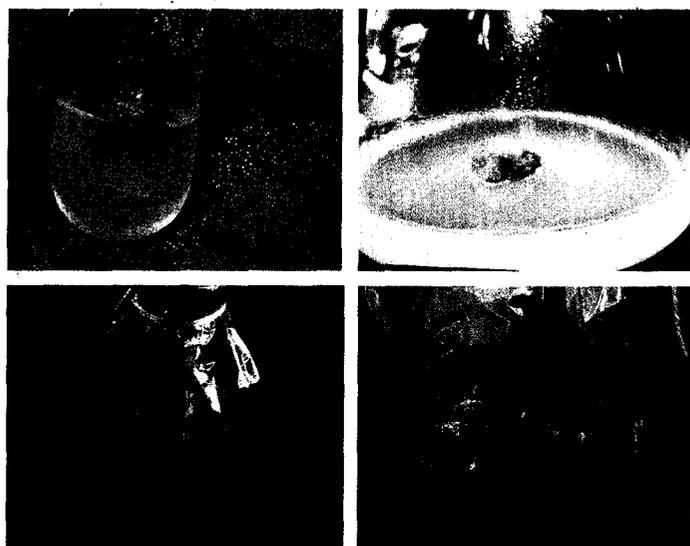
该试验中,MS基本培养基上诱导的愈伤组织生长势略好于1/2MS,这可能与部分木本植物组培对无机盐有特殊要求有关。

褐化的发生分为2种形式,一是因环境胁迫造成的细胞程序性死亡(也叫凋亡),二是酚类物质积累所致<sup>[9]</sup>。该试验中,在暗培养下,愈伤组织在较长时间内为白色或淡黄色

可知,培养基中无论加入的是氨苄青霉素、卡那霉素还是链霉素,其愈伤组织诱导率和外植体污染率都随抗生素浓度的增加而降低,而死亡率却随抗生素浓度的增加而增加。3种抗生素中,在培养基中加入25~50 mg/L的氨苄青霉素时,虽然有一定的出愈率,但也有一定的死亡率和污染率;当浓度增加至50 mg/L以上时,污染率得到了控制,但出愈率下降,甚至为0;在培养基中加入卡那霉素时有类似的情况出现,高浓度的卡那霉素导致外植体完全死亡;在培养基中加入25~50 mg/L的链霉素时出愈率最高(60%~72%),而污染率最低(0~15%),死亡率也最低(0),即使是在400 mg/L的高浓度下死亡率也仅为60%。在3种抗生素中,在相同浓度下使用链霉素时外植体死亡率最低。

从愈伤组织的生长状况看,抗生素并不直接影响愈伤组织的生长。当抗生素浓度低时,愈伤组织生长良好,但污染率很高;反之,污染率低,但愈伤组织受到的伤害比较严

(图1-II),而光照下在相同时间内褐化(图1-III),褐化的愈伤组织还能正常生长(图1-IV),说明大部分褐化的细胞不是程序性死亡所致,可能是油樟愈伤组织在光照下次生代谢产物的积累所致。光照一方面加速细胞衰老,另一方面,酚类物质氧化生成的醌使愈伤组织由内而外显现出暗褐色或棕褐色<sup>[10]</sup>。很多情况下,生产的醌类物质逐渐扩散到培养基中,抑制其他酶的活性,最终毒害到整个愈伤组织,甚至导致其死亡。然而,在油樟的愈伤组织培养中发现褐变的愈伤组织仍能继续生长,说明产生的次生代谢产物没有或



注: I. 带芽茎段诱导的新生的愈伤组织; II. 黑暗条件下诱导的愈伤组织; III. 褐化的愈伤组织; IV. 能产生新鲜愈伤组织的褐化愈伤组织。

Note: I. New callus from stems with buds; II. Callus induced under dark condition; III. The brown callus; IV. The brown callus induced under dark condition.

图 2 光照对愈伤组织生长的影响

Fig. 2 Effects of illumination on callus growth

很少对细胞造成伤害,这为通过油樟的愈伤组织培养生产

(上接第 7133 页)

上的培养基,将苗移入腐殖土中,浇透水,放入塑料大棚中,成活率达 95%以上(图 2)。成活后定期施用营养液,以促进苗的生长。



图 2 紫斑百合的再生植株

Fig. 2 Regenerated plant of *Lilium nepalense* D. Don

### 3 讨论

研究发现,紫斑百合小鳞茎的分化能力与外加植物激素的种类关系很大,在生长素类物质中,IBA 对鳞片分化为小鳞茎效果最好,不仅数量多,而且体积大,生活力较强。在继代增殖过程中 NAA 比 IBA 效果更好,但诱导生根时,仅需较低浓度的 IBA,若浓度较高,则不利于生根。

次生代谢产物奠定了很好的基础。

不同植物对不同抗生素的敏感程度是不同的。该试验中,几种供试的抗生素中,链霉素对污染的控制、愈伤组织诱导等综合效果最佳,这与链霉素表现出很低的毒性有关。而油樟对卡那霉素敏感可能与卡那霉素对植物的毒性较大有关。油樟愈伤组织诱导中的抗生素试验为油樟遗传转化试验奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 魏琴,罗扬.油樟油对植物病原真菌活性的抑制作用[J].中国油料作物学报,2006,28(1):63-66.
- [2] 杨梅娇.不同光照强度对一年生油樟苗生长的影响[J].浙江林业科技,2006,26(3):41-43.
- [3] 程必强,喻学俭,丁靖岩,等.中国樟属植物资源及其芳香成分[M].昆明:云南科技出版社,1997:34-35.
- [4] 罗中杰,李惟一,魏琴,等.宜宾油樟的现状及其未来[J].四川师范大学学报:自然科学版,2001,24(3):317-319.
- [5] 廖时权.宜宾县开发天然油樟[J].农村经济与科技,1995(8):31.
- [6] 周锦霞,周黎军,魏琴.油樟组织培养污染率控制试验[J].宜宾学院学报,2006(6):33-34.
- [7] 魏琴,周黎军,宣朴,等.组培条件对油樟试管苗玻璃化的影响[J].四川师范大学学报,2006,29(5):606-608.
- [8] 王丽,魏琴.油樟愈伤组织诱导培养研究[J].四川师范大学学报:自然科学版,2007(30):159-161.
- [9] 辜夕容.银木组织培养繁殖研究[J].广东林业科技,2001,17(1):38-39.
- [10] 刘淑芳,汤浩茹.几种抗生素对梨叶片愈伤组织和不定鞘诱导的影响[J].果树学报,2005,22(5):454-457.

以鳞茎的不同部位为外植体,分化能力也有较大差异。

在同一鳞茎中外侧较肥厚的鳞片小鳞茎的形成能力较强,内侧的鳞片小鳞茎的形成能力较弱。在同一鳞片中,分化能力最强的是中间偏下部位,这可能与生物的遗传势和鳞茎的营养成分有关。

进一步研究发现,同一种处理,接种的外植体大容易诱导分化产生不定芽,且生长也较快,反之,外植体过小易干枯死亡。这可能与外植体本身所含细胞的相互作用有关。

该研究只需一步诱导就可形成不定芽,没有经过典型的愈伤组织阶段,这种情况可能是由于外植体某些部位的细胞,在重新分裂后直接形成了分生细胞团,然后又形成了器官原基,进一步发育形成了器官(不定芽)<sup>[9]</sup>。采取的一步成苗法<sup>[10]</sup>在生产实践中更具优势。因为它减少了转种次数,节省了人力和物力,大大缩短了培养周期(比一般的培养可缩短 2~4 周),而且繁殖系数高,便于大规模生产,从而为野生花卉的开发利用提供了一条有效途径。

### 参考文献

- [1] 汪发缙,唐进.中国植物志:14 卷[M].北京:科学出版社,1980:116-128.
- [2] 赫建平.平陆百合鳞片组织培养中小鳞茎发生的条件及生物全息现象初探[J].植物学通报,1992,9(S):30.
- [3] 谢从华,柳俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:26-28.
- [4] 王红霞,胡琼华,陈小兰.通江百合的组织培养[J].植物生理学通讯,2000,36(2):132.

### 科技论文写作规范——讨论

着重于研究中新的发现和重要方面,以及从中得出的结论。不必重复在结果中已评述过的资料,也不要模棱两可的语言,或随意扩大范围,讨论与文中无多大关联的内容。