

山东抗寒香樟组培快繁体系的建立

王长宪¹, 刘 静¹, 黄艳艳¹, 胡淑芳¹
张 虹¹, 王厚新¹, 孙仲序^{*2}

(1. 泰安市泰山林业科学研究院 271000; 2. 山东农业大学园艺学院 271018)

摘要: 以北方抗寒香樟为试材, 建立无菌外植体, 筛选出侧芽分化最佳培养基 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, 继代最佳培养基为 MS + BA 5.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L, 同时进行了叶片再生分化试验研究。

关键词: 抗寒香樟; 外植体; 侧芽分化; 继代; 叶片再生

中图分类号: S722.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2324(2006)04-0513-04

ESTABLISHMENT OF FAST REPRODUCTIVE SYSTEM OF SHANDONG CHILLING TOLERANT *CINNAMOMUM CAMPHORA PRESL*

WANG Chang-xian¹, LIU Jing¹, HUANG Yan-yan¹, HU Shu-fang¹
ZHANG Hong¹, Wang hou-xin¹, SUN Zhong-xu²,

(1. Taishan Forestry Science Institute, Taian 271000 2. College of Horticulture Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: Aseptic explant is established from Northern China chilling tolerant *Cinnamomum camphora* Presl, and investigated that the optimal medium for lateral bud differentiation is MS medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L, and optimal multiplication culture medium is MS medium supplemented with 6-BA 5.0 mg/L and IBA 1.0 mg/L, and some experiments were done on redifferentiation.

Key Words: chilling tolerant *Cinnamomum camphora* Presl; explant; lateral bud differentiation; leaf redifferentiation

樟树(*Cinnamomum camphora* Presl)又名香樟, 樟科樟属, 树形雄伟壮观, 主干高大挺拔, 四季常绿, 冠大浓荫, 枝叶秀丽而有香气, 是我国南方城市非常优美优良的行道树, 也是风景园林中形成植物造园景观不可缺少的树种之一。但是自古有“樟不过江”的说法, 由于受这一说法的困扰加之立地条件所限, 使这一非常优良珍贵的树种不敢往江北迈进一步。我国北方许多城市在搞园林规划设计时很少提及此树。目前, 我国南方江淮地区的合肥、淮南、蚌埠等地都在广泛栽培此树, 上海、郑州等许多大城市进行了香樟的引种, 山东的日照、青岛、泰安、临沂等地区也作了香樟的引种驯化工作, 并初步获得成功。针对香樟喜温暖湿润气候, 耐寒性不强的生物学特性, 泰山林科院进行了园林常绿阔叶树种的抗寒基因转化研究, 初步探讨了抗寒香樟树再生体系建立的可能性, 为该树种的基因转化做了基础性工作, 现总结如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2004 年春在泰山林科院院内采集三年生香樟树枝条, 先用洗衣粉溶液刷洗枝条表面再用流水冲洗 1~2h, 然后剪成 10~20cm 的枝段放在光照培养箱中进行催芽培养。培养条件: 因香樟内生菌较重, 水培溶液用 1000×10^{-6} 多菌灵溶液, 培养温度 25℃ 左右。光照时间 12h/d。为保持培养液新鲜不生杂菌保证每

收稿日期: 2005-08-18

基金项目: 山东省科技厅“自然科学基金”资助项目

作者简介: 王长宪(1959-), 男, 研究员, 主要从事树木组培等方面科研工作。

2 天换水 1 次。培养一周后多数枝条开始萌芽,两周后新芽长到 0.5—2.5cm,切下新发侧芽在无菌水中浸泡 30min,置于超净工作台上备用。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌外植体的建立 把无菌水浸泡的新芽用无菌水冲洗 2 次后在超净工作台上进行常规灭菌。不同消毒时间和表面活性物质对消毒效果的影响试验采用 $L_4(2^2)$ 正交试验设计。各因素水平设置如表 1。共设计 4 个处理,5 次重复。先用 75% 的酒精浸泡 15s,再用 0.1 % 的升汞溶液加一定量的 0.1 % 吐温—80 浸泡 5—7min,酒精及升汞溶液浸泡时用手不断摇动灭菌瓶使溶液充分与材料接触灭菌更彻底,无菌水冲洗 3—5 次,无菌滤纸吸干水,接种在空白培养基上。在空白培养基中培养 10 天后统计污染情况。

表 1 香樟外植体建立 $L_4(2^2)$ 正交试验设计
Table1 Orthogonal design $L_4(2^2)$ of the explant

水平 Level	因素 Factor
	0.1 %
	升汞灭菌时间(min) Time
	0.1 % 吐温—80(ml) Tweenum 80(ml)
1	5
2	7

1.2.2 侧芽的诱导分化培养 在 MS 培养基上附加细胞分裂素和细胞生长素的不同浓度配比进行试验,共设置 4 种培养基(见表 2),4 种培养基的蔗糖浓度均为 30g/L,琼脂 7.5g/L,PH5.8,将灭好菌的外植体分别接种在 4 种培养基上,每种培养基接种 15 瓶,每瓶 3—4 株,接完后置于培养室进行光照培养,培养温度 25℃,光照时间 12h/d。

表 2 培养基激素配比试验设计
Table2 Hormones prescription design of the culture

处理号 Number		6-BA mg/L	NAA mg/L	2,4-D	IBA mg/L
侧芽诱导 Bud induction	I	1.0	0.05		
	II	1.0	0.1		
	III	1.0	0.25		
	IV	1.0	0.5		
叶片分化诱导 Leaves redifferentiation induction	I	0.2		1.0	
	II	0.5		2.0	
继代培养 Subculture	I	2.0	0.1		
	II	2.0	0.5		
	III	2.0			0.1
	IV	2.0			0.5
	V	4.0			1.0
	VI	5.0			1.0

1.2.3 叶片的分化诱导培养 香樟外植体灭完菌后进行分类,将叶片接种在 MS 培养基上附加不同浓度的分裂素 BA 和生长素 2,4-D 进行叶片愈伤组织的诱导。设置 2 种培养基见表 2,每种培养基接种 5 瓶,每瓶 3—4 片叶,叶片用剪刀沿叶片四周和叶脉剪伤口,正面向上平铺在培养基上。

1.2.4 继代培养 将已分化的苗木接种在以 MS 为基本培养基的分化培养基上,观察不同浓度的 BA、NAA、IBA 配合对苗木增殖生长的影响。设置 6 种培养基见表 2,培养基的蔗糖浓度均为 30g/L,琼脂 7.5g/L,PH5.8,将已经开始分化的试管苗分别接种到到这 6 种培养基上,每种培养基接种 15 瓶,每瓶 3—4 株,接完后置于培养室进行光照培养。培养温度 25℃,光照时间 12h/d。

2 结果与分析

2.1 无菌外植体的建立

表3 不同灭菌时间和表面活性剂对灭菌效果的影响

Table 3 Effect of different contamination control of the explant

处理序号 Number	处理 Treatment		真菌污染 Fungi contamination	
	升汞处理时间(min)	Time 吐温-80(ml) Tweenum 80(ml)	真菌污染率(%) Rate of contamination	污染部位 Contaminated part
1	5	0	0	—
2	7	1	6.7	外植体周围的培养基
3	7	0	26.7	叶腋、培养基
4	5	1	0	—

由于升汞有很强的杀菌能力,在组织培养中为常选灭菌物质,但处理时间稍长又会造成接种材料中毒,加入表面活性剂可以增加升汞在材料表面的展着能力。由表3可以看出,用升汞处理接种材料5min和7min,灭菌效果无明显差别;加表面活性剂吐温-80处理接种材料,灭菌效果明显好于不加吐温-80的;处理7min出现真菌污染更多,可能是由于接种时间、环境等随机性强的因素影响。另外,发现在经7min升汞处理的材料外层氧化褐化的现象较严重,幼叶脱落率很高。

2.2 侧芽分化诱导

加入1.0mg/L的BA与适量的NAA有利于侧芽的萌发,不同浓度的NAA对侧芽萌发的影响见表4。

表4 不同激素侧芽萌发诱导试验结果

Table 4 Effect of different hormones and concentrations on prapogation of bud

处理编号 Number	6-BA mg/L	NAA(mg/L)	侧芽萌动个数 Inducted amount	25天生长量(cm) Growth after 25 days	侧芽颜色 Colour
I	1.0	0.05	7	2.3	嫩绿色
II	1.0	0.1	8	3	嫩绿色
III	1.0	0.25	3	1.8	暗绿色
IV	1.0	0.5	1	0.5	暗绿色

表4结果表明,加入1.0mg BA后再加入适量NAA对侧芽的萌发有促进作用,加入NAA0.1mg/L的侧芽的生长量比加入NAA0.5mg/L侧芽生长量25天平均相差2.5cm.,且加入低于0.1mg/LNAA后苗木侧芽的颜色为嫩绿色,比加入较高浓度NAA的苗木分化能力更强。结果表明NAA对侧芽分化的影响占主导地位。

2.3 叶片愈伤组织分化诱导

不同浓度的BA和2,4-D配合对于香樟叶片产生愈伤组织的颜色、干湿度、外观形态及产生愈伤组织率的影响见表5。

表5 不同激素浓度对香樟叶片愈伤组织诱导的影响

Table5 Effect of different concentrations of hormones on induction of callus

处理编号 Number	6-BA(mg/L)	2,4-D(mg/L)	外观形态 Thickness	颜色 Colour	干湿度 humidity	愈伤率(%) Rate of forming callus
I	0.5	2	疏松	浅褐色	湿润	67%
II	0.2	1	致密	黑色	干燥	53%

表5结果表明,不同浓度的BA和2,4-D对比对叶片愈伤组织的诱导都有促进作用,但浓度为0.5mg/L的BA和2mg/L的2,4-D配比较0.2mg/L的BA和2mg/L的2,4-D对比对叶片愈伤组织的诱导率高出14%,且愈伤组织的颜色较浅表面更湿润疏松。

2.4 继代培养

2.4.1 不同浓度激素对香樟增殖系数、生长量的影响(见表6) 表6结果表明,BA及NAA对香樟侧芽

的增殖有促进作用,但 NAA 浓度在 0.1mg/L 时苗木出现发黄落叶和少量愈伤组织,生长缓慢,成苗率仅有 44.4%。增加 NAA 浓度,繁殖系数提高 1.7 可减轻苗木发黄落叶状况,成苗率可提高 11.2%,由此可看出 BA 及 NAA 适宜的配比为 BA2.0mg/L + NAA0.5mg/L。在 BA 浓度相同的条件下 IBA 对香樟增殖的促进作用随浓度的提高而增加,提高 BA 和 IBA 的浓度增值效果更加显著。BA 浓度为 2.0mg/L 时提高 IBA 浓度至 0.5mg/L 其增殖系数提高 1.5,生长量提高 0.5cm,大于 1cm 的侧芽出现率提高 4%。提高 BA 浓度至 4.0mg/L,提高 IBA 浓度至 1.0mg/L 其增殖系数提高 3.5,生长量提高 0.5cm,大于 1cm 的侧芽出现率提高 27%。提高 BA 浓度至 5.0mg/L,IBA 浓度仍为 1.0mg/L 其增殖系数提高 1.9,生长量提高 1.3cm,大于 1cm 的侧芽出现率提高 2%。由此得出,香樟增殖的最佳培养基为 MS + 5.0mg/LBA + 1.0mg/LIBA。

表 6 BA 和 NAA 对香樟增殖系数和生长量的影响
Table 6 Effect of BA and NAA on the growth and propagation

处理 编号 Number	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	增殖系数 Propagation	28 天生长量 Growth after 28 days (cm)	成苗率 (%) survival rate	大于 1cm 的侧芽 出现率 (%) Rate of the bud longer than 1cm
I	2.0	0.1		2.2	1.1	44.4	0.0
II	2.0	0.5		3.9	1.8	55.6	0.0
III	2.0		0.1	3.2	2.2	100.0	63.0
IV	2.0		0.5	4.7	2.5	100.0	67.0
V	4.0		1.0	8.2	3	100.0	94.0
VI	5.0		1.0	10.1	4.3	100.0	96.0

3 小结

组织培养中外植体的消毒处理是试验成功与否的关键。目前,组织培养中所用消毒剂以升汞居多消毒效果也较好。本试验主要研究了材料的预处理及消毒时间的控制对建立无菌外植体的影响。初采的材料务必要反复冲洗。利用 0.1% 升汞进行消毒时间以 5min 外加一毫升吐温 - 80 效果较好。但是升汞的渗透性强,不宜作外植体的清洗消毒剂,建议在组织培养中外植体消毒方面尝试使用更环保的物质,如 NaClO 等。

香樟侧芽的分化受 NAA 的影响较大。在加入一定量的 BA 情况下,加入 0.1mg/LNAA 对侧芽诱导初分化效果明显。

在对香樟叶片愈伤组织诱导时附加 BA 和 2,4-D 的合适配比是 1:4,这一配比能提高愈伤组织的诱导率。

在香樟继代培养中采用的激素种类,分裂素以 BA 为最佳,生长素以 IBA 为最佳。而且 BA 与 IBA 的最适配比是 5:1,即适宜香樟增殖的最佳培养基配方为 MS + 5.0mg/LBA + 1.0mg/LIBA。

参考文献

- [1] 胡连真,谢江华,黄素萍等. 香樟引种栽培试验初探. 河南林业科技, 2001, 21(1): 30, 33
- [2] 李金江. 香樟在郑州地区的引种与驯化. 河南林业科技, 2003, 23(2): 14 - 15
- [3] 聂新,陈秀芝. 樟组植物在上海地区的引种栽培. 上海交通大学学报, 2002, 20(增刊): 64 - 65
- [4] 毛春英,张纪德,王秀梅. 樟树引种驯化及抗寒育苗栽培技术. 山东林业科技, 2001, 26(6): 10 - 12
- [5] 赵家希. 樟树的绿化应用. 安徽林业, 2000, (6): 27
- [6] 林翔云,江崇基,林君如等. 纯种芳樟及其组培苗叶油的分析报告. 香料香精化妆品, 2002, (1): 11 - 12
- [7] 王成霖,邵蓓蓓. 樟树种子休眠和萌发的初步研究. 植物生理学通讯, 1984, (1): 29 - 30
- [8] 李乾振,吴丽君,陈碧华等. 芳樟工厂化育苗技术研究. 福建林业科技. 2001, 28(4): 21 - 24
- [9] 王贵明. 香樟的育苗和栽植技术. 陕西林业科技, 1998, (2): 71 - 72
- [10] 索长江,蔡斌华. 香樟丛生芽的诱导和快速繁殖研究. 林业科技开发, 1997, 3: 29 - 30