

油樟组织培养污染率控制试验

周锦霞,周黎军,魏琴*

(宜宾学院,四川 宜宾 644000)

摘要:以油樟带芽茎段为材料,在初代培养中进行了不同表面消毒方式、不同年龄、不同季节的外植体污染率试验。结果表明,Ca(ClO)₂和HgCl₂的配合使用有利于污染率的降低;当年生枝条的污染率低于二年生枝条。3月采集的材料污染率低于10月。这为增加油樟组培中无菌苗的得率提供了指导,也对其它木本植物组培的研究有一定的意义。

关键词:油樟;组织培养;污染率

中图分类号:Q94-331 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-5365(2006)06-0033-02

0 引言

油樟(*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao)是樟科樟属的多年生常绿乔木,其用途广泛,使用价值高,市场需求量大^[1-3]。然而,在其生产繁殖技术上,传统方法滞缓。应用组织培养技术,可望大幅度提高油樟繁殖速度。但是,油樟作为木本植物,在其组培过程中往往易产生如污染、褐变、玻璃化、不正常变异等问题。能否有效控制微生物污染是植物离体培养成功的首要技术之一,也是建立组培优良无性系的前提。要建立组培无性系需涉及外植体的选择、消毒剂的使用等诸多因素。本文就油樟组培中如何获取无菌苗即控制污染进行了尝试。对其茎段外植体进行组织培养,以期筛选出一套较好的灭菌方法和组织培养条件,利于快速获得无菌外植体,为建立其优良无性系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

油樟带芽茎段材料采自宜宾邱场油樟种植园。

1.2 方法

1.2.1 初代培养表面消毒方式选择试验

取二年生油樟带芽茎段用自来水冲洗3-4h后,肥皂水洗5min,自来水洗去肥皂水,再用KMnO₄洗30s,自来水洗去KMnO₄后在无菌条件下70%乙醇处理30s。采用3种方法进行表面消毒(表1),接种于MS+BA_{4mg/L}(单位以下同)+NAA_{0.01}的培养基中,第二天开始记录污染情况,直到培养45d后统计污染率(污染的外植体数占接种的外植体总数的百分率)、正常分化率(未污染的能产生丛生芽的芽数占接种的未污染的总芽数的百分率)。每处理150个外植体,重复3次。

1.2.2 不同年龄的外植体选择试验

在以上实验的基础上,选择当年生、一年生、两年生枝条做污染试验,消毒方式采用上述的Ca(ClO)₂与HgCl₂相结合的方法,接种前均不剥离,采用直接扦插法,接种于MS+BA_{4mg/L}+NAA_{0.01}的培养基中,第二天开始

记录污染情况,直到培养45d后统计污染率、正常分化率。每处理120个外植体,重复3次。

表1 油樟带芽茎段表面消毒方式及结果

处理	消毒前剥离情况	消毒后剥离情况	10% Ca(ClO) ₂ min	0.1% HgCl ₂ min	污染率 %	正常分化率 %
1	不剥离	至叶原基	0	25	49	79
			5	20	32	80
			25	0	76	82
2	至叶原基	不剥离	0	25	5	12
			5	20	4	10
			25	0	13	11
3	不剥离	不剥离	0	25	85	78
			5	20	70	81
			25	0	91	82

1.2.3 不同季节的外植体选择试验

分别于3月、7月、10月取当年生带芽茎段,消毒方式采用上述的Ca(ClO)₂与HgCl₂相结合的方法,接种前均不剥离,采用直接扦插法,接种于MS+BA_{4mg/L}+NAA_{0.01}的培养基中,第二天开始记录污染情况,直到培养45d后统计污染率、正常分化率。每处理120个外植体,重复3次。

2 结果与分析

2.1 初代培养中不同表面消毒方式的试验结果

若消毒前不剥离,消毒后剥离至叶原基(处理1)则污染率较高(32%-76%),正常分化率也较高(79%-82%);先剥离后消毒(处理2)则可大大降低污染率(4%-13%),但是同时也降低了正常分化率(10%-12%);消毒前后不剥离(处理3)则污染率高(70%-91%),正常分化率也较高(78%-82%)。

HgCl₂和Ca(ClO)₂分别单独使用时,使用HgCl₂的污染率低于Ca(ClO)₂的使用,二者均能使相当数量(79%、82%)的外植体正常分化,但

收稿日期:2006-02-20

基金项目:四川省教育厅青年基本资助项目(2003B039);四川省科技厅资助项目(04JY029-064)

作者简介:周锦霞(1958-),女,四川省宣汉县人,实验师,主要从事资源植物学研究。

*通讯作者:E-mail:Weiqlin2001-67@163.com;Tel:0831-3545069(O)

二者的结合使用更有利于污染率的降低,且不影响正常分化率。

2.2 不同年龄的外植体选择试验结果

从表2可知,尽管三种年龄的外植体正常分化率相当,但三种年龄的茎段外植体污染率差异大,其中以当年生枝条为外植体则污染率最低,一年生枝条其次,二年生枝条污染最严重。

表2 油樟不同年龄的带芽茎段污染情况及结果

处理	茎段年龄	污染率%	正常分化率%
1	当年生	2.5	95
2	一年生	50	93
3	二年生	71	92

2.3 不同季节的外植体选择试验

从表3可知,春季(3月)取材的污染率最低,秋季(10月)取材的污染率最高,且启动率及正常分化率降低至很低,甚至为0的水平。

表3 油樟不同季节的外植体选择试验污染情况及结果

处理	月份	污染率%	启动率%	正常分化率%
1	3月	3.8	97	93
2	7月	16	95	95
3	10月	48	5	0

3 讨论

表1中的处理1导致污染率较高,可能与对芽鳞片的消毒不彻底有关,正常分化率也较高,可能与消毒剂很少直接接触叶原基,几乎没有造成过多的伤害有关;处理2虽然降低了污染率,但正常分化率也降低,这可能与消毒剂直接接触叶原基,导致对叶原基过多的伤害有关;处理3尽管正常分化率高,但污染率也高。这三种方法均不是最好的方式,可能与2年生茎段的内生菌较多有关。

HgCl₂ 和 Ca(ClO)₂ 是植物组织培养中常用的表面消毒剂,但在进行

组织培养时,材料的表面灭菌效果因植物种类、器官的差异而不同^[4]。表1表明单独使用 HgCl₂ 或 Ca(ClO)₂ (即使灭菌时间相同)其灭菌效果均没有二者的配合使用好,这可能与 HgCl₂ 和 Ca(ClO)₂ 对不同的微生物作用效果不同有关。

在自然状态下木本植物各部分表层组织程度不同地受到各种微生物的污染。本实验发现当年生枝条作为外植体其污染最少(表2),这可能与维管束的发育有关。即当年生枝条较幼嫩,维管束发育不够完整,携带的内生菌较少。

无论从正常分化率、启动率还是污染率看3月份采取的外植体最好,这可能与这个时期材料积累了较丰富的营养物质和内源激素,其抵抗病菌的能力强,且有些病菌在该时期还没活跃起来有关^[5];10月份采取的外植体几乎不启动,且污染率高,这可能与植物已进入休眠期,但内源病菌仍较为活跃有关。

本试验结果表明,在油樟茎段培养接种时,在3月取当年生枝条为外植体污染率低,正常分化率高。

参考文献:

- [1] 程必强, 喻学俭, 丁靖坤, 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.
- [2] 罗中杰, 李维一, 魏琴, 等. 宜宾油樟的现状与未来[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(3): 317-319.
- [3] 廖时权. 宜宾县开发天然油樟, 农村经济与科技[J]. 1995, (8): 31.
- [4] 陈发兴, 林顺权. 植物离体培养中微生物污染的鉴定与控制[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(1): 67-71.
- [5] 于福科, 张广军. 玫瑰组织培养污染控制技术措施[J]. 陕西农业科学, 2002, (11): 47-48.

Contamination Rates Control Experiment in Tissue Culture of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chan

ZHOU Jin-xia, ZHOU Li-jun, WEI Qin
(Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract: The different season and age stem sections with buds as explants are tested in contamination rates, and the tests of different sterilizing modes to different explants are also done. The results show that HgCl₂ supplemented with Ca(ClO)₂ is to step down the contamination rate; the contamination rate from current growth shoot is lower than that from the second year growth shoot; the contamination rate of explants collected in March is lower than that in October. It provides a guidance for increasing germ free shoot yield in tissue culture of *cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao. It is also some significance in tissue culture of other woody plants.

Key words: *cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao; Tissue Culture; Contamination Rate