

组培条件对油樟试管苗玻璃化的影响

魏琴^{1,2}, 周黎军², 宣朴³, 岳春芳³, 周锦霞², 张新申¹

(1. 四川大学 轻纺与食品学院, 四川 成都 610065; 2. 宜宾学院 生物工程系, 四川 宜宾 644007;

3. 四川省农科院 生物技术与核技术研究所, 四川 成都 610066)

摘要:研究了外植体年龄、处理方式对油樟试管苗玻璃化的影响及封口膜的透气性和培养基中不同浓度的蔗糖、琼脂、细胞分裂素(BA)浓度等因素对油樟试管苗玻璃化的影响。结果表明,以当年生带芽茎段为外植体玻璃化苗少,污染少;玻璃化苗的数量随着糖分及琼脂浓度的降低、BA浓度的增加而加重;封口膜的透气性与油樟苗的玻璃化关系不大。通过在培养基中适当调整蔗糖、琼脂、BA的浓度,可有效地控制油樟玻璃化苗数。

关键词:油樟; 玻璃化现象; 组织培养

中图分类号:Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8395(2006)05-0606-03

油樟[*Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao]是樟科樟属的珍贵树种,为中国特产,主产于四川省宜宾市,是宜宾市的优势经济树种。油樟油主要用于医药和香料工业,是重要的国防、轻工、医药等方面的稀有原料,在香精香料工业中占有重要地位^[1-3]。但目前因对油樟树叶掠夺式的采摘以及砍树挖兜提炼黄樟油,母树资源破坏严重,种子缺乏,种子繁殖途径严重受阻,而在油樟的试管苗生产研究中玻璃化苗的出现是油樟工厂化育苗的极大障碍。为此,本文对于组培中试管苗玻璃化的问题进行了研究,为开辟新的繁殖和生产途径提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 油樟带芽茎段采自宜宾邱场油樟种植园。

1.2 方法

1.2.1 不同年龄的外植体及处理 1-2年生带芽茎段, HgCl_2 消毒 25 min; 两种处理: (1) 扦插培养; (2) 剥幼芽培养。对剥出的幼芽进行或不进行二次灭菌, 接种在 $\text{MS} + \text{BA} 4 \text{ mg/L} + \text{NAA} 0.01 \text{ mg/L}$ 的培养基中, 培养 45 d 后观察玻璃化苗的出现情况。

1.2.2 透气状况试验 分设透气封口膜、单层聚丙烯塑料膜、牛皮纸 + 透气封口膜 3 种处理, 培养 45 d 后对玻璃化情况进行观察、统计。

1.2.3 培养基中各因素的试验 将未玻璃化的正

常苗进行继代培养。取继代培养所得试管苗(1.5-3 cm 左右), 以 MS 为基本培养基, 分别进行以下因素的试验: (1) BA 浓度试验, 分设 BA 0-10 mg/L 6 个处理; (2) 蔗糖浓度试验, 分设 20-50 g/L 4 个处理; (3) 琼脂浓度试验, 分设 4-8 g/L 5 个处理; 培养条件为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 日光灯照 10 h/d, 光照强度为 2 000 lx。采用单因子试验, 每处理 3 次重复, 每次重复 20 苗。培养 45 d 后观察玻璃化苗的出现情况。

2 结果

2.1 外植体年龄、处理对玻璃化的影响 从表 1 结果看, 2 年生茎段扦插时试管苗均不玻璃化, 但污染相当严重, 几乎不能采用; 而剥鳞片后不再进行灭菌的幼芽污染也很严重, 但玻璃化现象相对较少。剥鳞片后再进行灭菌处理的幼芽污染得到有效控制, 但玻璃化严重。采用当年生茎段既减少了污染率, 又减少了玻璃化比率。

2.2 封口膜的透气性与油樟苗的关系 将油樟试管苗接种在 $\text{BA} 4 \text{ mg/L} + \text{NAA} 0.01 \text{ mg/L} + \text{蔗糖} 30 \text{ g/L} + \text{琼脂} 6 \text{ g/L}$ 的培养基上培养, 45 d 后的统计结果见表 2。试验表明, 3 种处理的玻璃化率和芽增殖率差异不明显。

2.3 细胞分裂素(BA)浓度对油樟组培苗增殖和玻璃化的影响 在附加 $\text{NAA} 0.01 \text{ mg/L} + \text{琼脂} 6 \text{ g/L} + \text{蔗糖} 30 \text{ g/L}$, BA 浓度分别为 0、2、4、6、8、10

收稿日期: 2005-09-18

基金项目: 四川省应用基础研究基金和四川省教育厅自然科学基金资助项目

作者简介: 魏琴(1967-), 女, 教授

mg/L 的 6 种培养基上接种油樟苗,结果见表 3. 试验表明,在 0-4 mg/L 范围内,随着 BA 浓度的增加,油樟增殖苗数增多,无玻璃化苗出现,但当高达 6 mg/L 以上时,增殖苗数减少,玻璃化苗数明显增加.

2.4 蔗糖浓度对油樟试管苗玻璃化的影响 在附加 BA 4mg/L + NAA 0.01 mg/L + 琼脂 6 g/L,蔗糖浓度分别为 20、30、40、50 g/L 的 4 种培养基中接种油樟苗,统计结果见表 4. 试验表明,在蔗糖浓度为 20 mg/L 时玻璃化现象严重,30 mg/L 时生长正常,芽增殖系数高,40-50 mg/L 时,分化逐渐受抑制,50 mg/L 时试管苗部分萎蔫.

2.5 琼脂浓度对油樟试管苗玻璃化作用的影响 在附加 BA 4mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 30 g/L,琼脂浓度分别为 4、5、6、7、8 g/L 的 5 种培养基中接种油樟苗,统计结果见表 5. 试验表明,琼脂浓度为 4 g/L 的培养基中有较多的玻璃化苗,玻璃化程度也较严重;在琼脂浓度为 5 g/L 的培养基中玻璃化率下降;在 6-7 g/L 的培养基中无玻璃化苗,且苗增殖率未受影响;在 8 g/L 的培养基中无玻璃化苗,但出现部分萎蔫.

3 讨论

扦插的当年生枝条污染少(表 1)可能与维管

束的发育有关. 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. 扦插的当年生茎段上的腋芽尚未伸展,HgCl₂ 的处理对芽的直接伤害少,所以,几乎无玻璃化现象的发生. 2 年生带芽茎段的芽虽已伸展,但因已有多层鳞片的保护,HgCl₂ 对幼芽的影响较小,故未见玻璃化,但因茎段内维管束的发育已较完善,携带的内生菌较多,污染严重. 二次灭菌后的幼芽玻璃化严重,可能与升汞在细胞内残留,影响细胞分化有关.

从培养基条件看,影响油樟组织培养中试管苗玻璃化的因素很多,包括 BA 浓度、蔗糖浓度、琼脂浓度等(表 3-5). BA 浓度低(2-4 mg/L)时,促进直接分化成芽,BA 浓度(6 mg/L)高时,玻璃化苗之所以增加,而芽增殖系数之所以减少可能与高 BA 刺激细胞快速分裂,导致新生小芽点过多,营养供应不足有关^[4].

蔗糖可为细胞提供合成新化合物的碳架和能源,维持一定的渗透压^[5]. 当蔗糖质量分数为 3% 时,无玻璃化苗数的出现,说明碳素含量适宜,新陈代谢进程好,且分化多,油樟增殖率高;当蔗糖浓度增加,碳源过剩,将不利于油樟分化,增殖率反而降低,如表 4 所示.

琼脂作为凝固剂能影响培养体系的水分状况,

表 1 外植体年龄、处理对油樟试管苗玻璃化的影响

Table 1 The effects of age and treatment of explants on vitrification of test-tube plantlets in *C. longepaniculatum* (Gamble) N. chao

芽茎段	处理	接种数		玻璃化苗数		污染率/%		玻璃化比率/%	
		一次灭菌	二次灭菌	一次灭菌	二次灭菌	一次灭菌	二次灭菌	一次灭菌	二次灭菌
2 年生	扦插	60		0		85		0	
	剥幼芽	60	60	8	51	49	7	13.3	85
当年生	扦插	60		0		3		0	

表 2 不同透气条件下玻璃化苗的发生情况(45 d 统计)

Table 2 Appearance of vitrification test-tube plantlet under different gas permeation condition (at the time after 45 d)

处理	接种幼芽数/株	繁殖苗总数/株	芽增殖系数	玻璃化苗数/株	玻璃化率/%
透气封口膜	60	366	6.1	2	0.8
单层聚丙烯塑料膜	60	354	5.9	2	0.8
牛皮纸 + 透气封口膜	60	360	6.0	1	0.6

表 3 BA 浓度与玻璃化苗形成的关系(45 d 后统计)

Table 3 The relation between BA concentrations and vitrification plantlets (at the time after 45 d)

BA 浓度/(mg/L)	接种幼芽数/株	繁殖苗总数/株	芽增殖系数	玻璃化苗数/株	玻璃化率/%
0	60	60	1.0	0	0
2	60	174	2.9	0	0
4	60	364	6.1	0	0
6	60	360	6.0	12	6
8	60	120	2.0	19	27
10	60	78	1.3	26	33

表 4 蔗糖浓度对油樟试管苗玻璃化作用的影响(45 d 统计)

Table 4 The effects of sugar concentrations on vitrification of test-tube plantlets in

C. longepaniculatum (Gamble) N. chao (at the time after 45 d)

蔗糖浓度/(g/L)	种幼芽数/株	繁殖苗总数/株	芽增殖系数	玻璃化苗数/株	玻璃化率/%
20	60	348	5.8	44	13
30	60	366	6.1	0	0
40	60	306	5.1	0	0
50	60	102	1.7	0	0

表 5 琼脂浓度与油樟玻璃化苗形成的关系(45 d 统计)

Table 5 The relation between agar concentrations and vitrification plantlets (at the time after 45 d)

琼脂浓度/(g/L)	接种幼芽数/株	繁殖苗总数/株	芽增殖系数	玻璃化苗数/株	玻璃化率/%
4	60	258	4.3	56	22
5	60	372	6.2	17	8
6	60	366	6.1	0	0
7	60	360	6.0	0	0
8	60	342	5.7	0	0

从而影响试管苗的玻璃化^[6]. 琼脂浓度低(4-5 g/L)时,培养基水分过多,影响苗的生长和分化,有严重的玻璃化现象发生. 琼脂浓度过高(8 g/L)时,培养基内水分少,将影响植物对营养和矿物质的吸收(表 5). 萎蔫现象的出现说明试管苗已出现缺水状况.

总之,油樟试管苗玻璃化的发生起因于细胞生长过程中的 BA、琼脂、蔗糖浓度及外植体的年龄、处理方式等. 将当年生带芽茎段接种在 MS + BA 4 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L 上可得到污染少,玻璃化少,分化多的健壮试管苗.

参考文献

- [1] 程必强,喻学俭,丁靖培,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,李惟一,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[J]. 农村经济与科技,1995,8:31.
- [4] 郭达初,刘非厌,刘克斌. 控制重瓣丝石竹试管苗玻璃化的研究[J]. 杭州植物园通讯,1991(2):513-518.
- [5] 王家旺. 几种因素对油菜茎尖培养中玻璃化作用的影响[J]. 植物生理学通讯,1992,27(4):288.
- [6] 张宏志,唐前瑞,周朴华. 观赏植物试管苗玻璃化现象及防治研究进展[J]. 湖南农业大学学报,2000,26(4):318-322.

Study on the Vitrification of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao in Tissue Culture

WEI Qin^{1,2}, ZHOU Li-jun², XUAN Pu³,YUE Chun-fang³, ZHOU Jin-xia², ZHANG Xin-shen¹

(1. College of Light Industry and Food Engineering Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, Sichuan;

2. Department of Biological Engineering, Yibin University, Yibin 644007, Sichuan;

3. Institute of Biotechnology and Nuclear Technique, Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, Sichuan)

Abstract: The effects of explant age and treatment, mixing sugar concentration, agar concentration, BA concentration in culture medium and gas permeability on the vitrification of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao in tissue culture were investigated. When current growth stems with buds were used as explants, the numbers of vitrified or polluted shoots were less than that of the others. The numbers of vitrified plantlet increase with decreasing of sugar and agar concentration as well as increasing of BA concentration. The gas permeability of seal membrane almost has no relation to vitrification. The numbers of vitrified plantlet of *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao should be controlled by manipulating the concentrations of sugar, agar and BA in the culture medium.

Key words: *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao; Vitrification; Tissue culture

(编辑 李德华)