

文章编号: 1008-3464 (2006) 01-0060-05

香樟优良无性系快繁技术的研究

吴幼媚, 王以红, 蔡铃, 黄金使, 韦颖文
(广西林业科学研究院 生物技术研究所, 广西南宁 530001)

摘要: 选择得油率 1.4% 以上, 其樟油含醇量 96% 以上、芳樟醇含量 93% 以上、樟脑含量低于 0.1% 的三年生香樟, 以当年生嫩枝为外植体进行快繁技术研究。结果表明: 无菌活体获取率最高的是每年 2、3 月接种的, 1 月接种的次之; 筛选出适宜香樟组织培养的基本培养基为 $MS_2[MS + Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O 200 \text{ mg/L}]$; 继代芽培养理想的激素组合为 6-BA 3.0~3.5 mg/L + IAA 2.0 mg/L, 继代周期 25~30 d, 芽增殖 3.5 倍, 年繁殖数 5.31×10^5 ; $MS_2 + IBA 3.0 \text{ mg/L} + NAA 1.5 \text{ mg/L} + \text{氯化胆碱 } 50 \sim 100 \text{ mg/L}$ 是不定根诱导的适宜培养基, 生根率达 86.7%; 组织培养再生植株移栽成活率最高的基质是塘泥, 成活率达 85%。

关键词: 香樟; 优良无性系; 快速繁殖

中图分类号: S722.89 文献标识码: A

Research of rapid propagation and tissue culture of elite clone *Cinnamomum camphora*

WU You-mei, WANG Yi-hong, CAI Ling, HUANG Jing-shi, WEI Ying-wen
(Institute of Biotechnology Research, Guangxi Academy of Forestry Sciences, Nanning 530001, China)

Abstract: Selected twigs of 3 years' *Cinnamomum camphora* (The rate of oil was over 1.4%, the ethanal content of the oil was over 96%, which over 93% was linalool and the content of camphor was under 0.1%) as explants to research the rapid propagation and tissue culture. The result showed that the survival rate of sterile twigs was highest in March and February and followed by January; The basic medium for camphor tissue culture was $MS_2[MS + Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O 200 \text{ mg/L}]$; The hormone of basic sub-culture medium was 6-BA 3.0~3.5 mg/L + IAA 2.0 mg/L, the period of sub-culture was 25~30 d, the number of multiplication was 3.5 times, the coefficient of multiplication in one year was 5.31×10^5 . The medium for rooting was $MS_2 + IBA 3.0 \text{ mg/L} + NAA 1.5 \text{ mg/L} + \text{choline chloride } 50 \sim 100 \text{ mg/L}$, the rate of rooting was 86.7%. The best soil for transplant was from tank which survival rate after transplant was 85%.

Key words: *Cinnamomum camphora*; elite clone; rapid propagation

芳樟醇有“香料之王”的美称, 气味清甜、诱人, 是能直接用于日用化工和调配食品生产的香精, 在国内市场紧俏。普通樟树的樟油芳樟醇含量低, 一般为 50%~60%, 生产上需要进行再次分离才能使用。香樟优良单株资源有限, 种子繁殖的植株主成分含量变异率高达 50%, 组织培养无性系再生植株是既能保证遗传性状又能快速发展优良资源的重要途径。

收稿日期: 2004-04-12; 修改日期: 2005-08-02。

基金项目: 广西科技厅科技攻关项目 (桂科攻 9820013)。

作者简介: 吴幼媚 (1959-), 女, 江西余干人, 广西林业科学研究院高级工程师; E-mail: Wuyoumei58@yahoo.com.cn.

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

试验材料由广西林业科学研究院林产化工研究所提供,为樟油芳樟醇含量在93%以上、樟脑含量低于0.1%的三年生香樟优良单株,以当年萌发的嫩枝为外植体。

1.2 研究方法

1.2.1 培养基 基本培养基(mg/L):(1)MS;(2)MS₁(MS+Na₂SO₄ 50);(3)MS₂(MS+Ca(NO₃)₂·4H₂O 200);(4)MS₃(MS+NaH₂PO₄ 17);(5)N₆。

初始培养基:(1)~(5)培养基分别以上述基本培养基添加6-BA 1 mg/L和IAA 0.5 mg/L组成。

诱导培养基(mg/L):(1)MS₂+6-BA 6.0+IAA 0.5;(2)MS₂+6-BA 6.0+IAA 2.0;(3)MS₂+6-BA 6.0+IAA 3.0;(4)MS₂+6-BA 5.0+IAA 0.5;(5)MS₂+6-BA 5.0+IAA 2.0;(6)MS₂+6-BA 5.0+IAA 3.0;(7)MS₂+6-BA 4.0+IAA 0.5;(8)MS₂+6-BA 4.0+IAA 2.0;(9)MS₂+6-BA 4.0+IAA 3.0;(10)MS₂+6-BA 3.5+IAA 0.5;(11)MS₂+6-BA 3.5+IAA 2.0;(12)MS₂+6-BA 3.5+IAA 3.0;(13)MS₂+6-BA 3.0+IAA 0.5;(14)MS₂+6-BA 3.0+IAA 2.0;(15)MS₂+6-BA 3.0+IAA 3.0。

继代培养基(mg/L):(1)MS₂+6-BA 5.0+IAA 2.0;(2)MS₂+6-BA 4.0+IAA 2.0;(3)MS₂+6-BA 3.5+IAA 2.0;(4)MS₂+6-BA 3.0+IAA 2.0;(5)MS₂+6-BA 3.0+IAA 3.0。

生根培养基(mg/L):(1)~(4)培养基以1/2 MS₂分别添加IBA 1.0、2.2、3.2、4.0;(5)~(13)培养基以MS₂分别添加IBA 1.0、1.5、2.0、2.2、2.5、3.0、3.2、3.5、4.0;(14)~(18)培养基以MS₂分别添加IBA 3.0+NAA 1.0;IBA 3.0+NAA 1.5;IBA 3.5+NAA 1.5;IBA 3.0+IAA 1.0;IBA 3.0+IAA 1.5。

上述培养基内含3%蔗糖、琼脂4.5 g/L,用1 mol/L NaOH或HCl调pH值为7.0,高温灭菌15~20 min。培养室温度25℃,光照强度1 200 lx。

1.2.2 外植体的表面消毒 每月在晴天进行枝条采集。首先用自来水冲洗外植体表面,然后选取具健壮腋芽的茎段,剪成长1.0~1.5 cm茎段,置于盛有干净水的烧杯内,用自来水漂洗3~4次,再用70%的乙醇消毒30 s,蒸馏水清洗干净乙醇后置于超净工作台,在无菌的条件下,用0.1% HgCl₂溶液消毒8~12 min,无菌水冲洗4~5次,接种于初始培养基上。

1.2.3 移栽试验 在不同的季节把生根植株分别移栽于三种基质内:(1)2/3红心土+1/3沙;(2)红心土;(3)塘泥。进行苗木移栽试验。

2 结果与分析

2.1 无菌活体的获取

以当年萌发的嫩枝为外植体,按1.2.2的方法进行消毒、接种试验。结果表明,2月份无菌活体的获取率最高,达60%,其次是3月,获取率为46%,气温较高的6~9月的无菌活体获取率最低。1月份是一年最冷之月,细菌活性降低,易于被药物杀死,2月、3月气温逐渐回升,树液开始流动,嫩芽长出,表面带菌少,易于彻底消毒。6~9月是南宁高温多雨季节,微生物种类多且活性强,一定浓度的HgCl₂药液难以将外植体彻底消毒,而加大浓度或延长消毒时间又易使茎段芽褐化死亡。当HgCl₂浓度和消毒时间相同时,香樟无菌活体的获取与自然环境、微生物的生物习性存在着密切关系。

表1 不同月份香樟外植体无菌活体获取效果 (1998年)
Tab. 1 Survival rate of sterilized camphor in different months (1998a)

接种时间/月 Time of inoculation /month	外植体数/段 Number of explant	无菌活体/段 Number of survival explant after sterilization	死亡/段 Number of dead explant after sterilization	活体获取率/% Survival rate of explant after sterilization
1	50	20	30	40
2	50	30	20	60
3	50	23	27	46
4	50	12	38	24
5	50	11	39	22
6	50	10	40	20
7	50	10	40	20
8	50	9	41	18
9	50	10	40	20
10	50	11	39	22
11	50	12	38	24
12	50	17	33	34

2.2 初代培养

2.2.1 不同基本培养基对腋芽生长的影响 根据香樟好肥的生物学特性,选择钾盐、铵盐及硝酸盐含量均高,微量元素种类齐全的MS培养基,以及在MS基础上加入一定量 Na_2SO_4 、 NaH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 所配成的培养基和 N_6 作为基本培养基进行初代培养试验。在初始培养基(1)~(5)内分别接入30颗无菌活体,60d的结果显示,香樟无菌活体接种前期腋芽诱导容易,生长快。培养15d时记录,(1)~(5)培养基分别抽芽24颗、23颗、27颗、24颗和23颗,抽芽率分别为80.0%、76.7%、90.0%、80%和76.7%;芽高0.2~0.8cm,随着培养时间的延续,培养基的成分对腋芽生长的影响逐渐显现:培养30~40d时,除初始培养基(3)外,其余的培养基使腋芽出现不同程度的褐化,到60d时绝大部分芽死亡。由此说明,培养基(3)最适宜香樟的培养。在MS培养基中加入 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$,一方面可以给苗木提供更多的 Ca^{2+} ,同时 NO_3^- 能促进植物对 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等阳离子的吸收;另一方面避免了初始芽的褐化。试验中也证明,选择培养30d时出现轻度褐化的腋芽转到培养基(3)时,随着培养时间的延长,腋芽褐化现象逐渐减轻,甚至消失。

2.2.2 不同外源激素种类和浓度组合对丛生芽诱导的影响 6-BA和IAA组合浓度对比对香樟丛生芽的诱导存在着一定的影响。试验结果表明,6-BA浓度在6mg/L时,诱导出的丛生芽成团状,难分化形成正常芽,培养60d时芽几乎褐化死亡;在3~5mg/L时,丛生芽增殖倍数随着浓度的增加逐渐增加到4~6倍,而且芽生长正常;但当浓度降低到3mg/L时,培养60d,细胞活性弱,内分泌物积累而危害自身,导致芽褐化死亡或芽细长、纤弱。可见6-BA 4~5mg/L是丛生芽诱导较适合的浓度。IAA与6-BA配合使用能使丛生芽分化正常、健壮,但当6-BA浓度大于IAA时,如诱导培养基(1)(2)(3)(4)(7)(10),丛生芽数多,生长慢,易出现玻璃化苗;6-BA浓度小时,丛生芽少、细长、弱,易出现褐化。培养试验证明,6-BA 4~5mg/L+IAA 2mg/L是香樟丛生芽诱导的理想激素组合。

2.3 继代培养

继代培养是组织培养苗木生产的主要程序。为了生产更多的苗木,每隔25~30d继代一次。试验结果表明,外源激素的组合、浓度配比不同则继代芽的生长质量不一致,直接影响着不定根诱导的效果。当6-BA:IAA为4~5:2时,芽增殖4~5倍,年繁殖数达 2.44×10^8 ,比其他配比的都大,但芽的质量差,玻璃化严重,芽无法诱导生根。6-BA:IAA为3.5:2时,芽增殖3.5倍,年繁殖数 5.31×10^5 ,虽稍次于上述配比,但培养的芽健壮,诱导生根率高。6-BA:IAA为3:2时,芽增殖3倍,年繁殖数 4.1×10^3 ,芽健壮,诱导生根率也高,但在炎热的夏天,芽易出现褐化死亡。因此,大规模生产时,除了夏天外,为了降低成本,上述两组配比的培养基(6-BA:IAA为3.5:2或3:2)可以交替使用。6-BA:IAA为3:3时,尽管IAA的浓度增加到3mg/L,而6-BA浓度没有增加,继代培

养芽无法萌动、生长。因此,香樟组培苗继代培养最适宜的外源激素配比是 6-BA : IAA 为 3.5 : 2。

2.4 不定根的诱导

2.4.1 基本培养基份量对不定根诱导的影响 选择继代培养健壮的芽条(高约 2.5~3.0 cm),分别插入生根培养基(1)(2)(3)(4)(5)(8)(11)(13)内培养,30 d 时检查,结果是(1)~(4)培养基内的苗木全部褐化死亡,(5)(8)(11)(13)培养基内的苗木生机勃勃,(11)培养基生根率达 85%。香樟生根培养要求养分充足,与许多植物不一样。

2.4.2 外源激素种类组合、配比对不定根诱导的影响 IBA 是诱导植物不定根较理想的外源激素。表 2 显示,当 IBA 浓度由 1 mg/L 增加到 3 mg/L 时,继代芽的生根率由零逐渐增加到 70.0%; IBA 浓度为 3 mg/L 时,每株苗长根 2 条以上,但 IBA 浓度继续增加到 3.5 mg/L,生根率为 50%,比前者降低,几乎没有长出 2 条以上不定根的苗木; IBA 浓度再继续增加到 4.0 mg/L,苗木生根率明显下降,其根系从愈伤组织上长出,推测芽条维管束未与根系相连,移栽无法成活。IBA 在植物体内运输困难,其浓度大则易引起苗木切口长出愈伤组织,不利生根。IAA 和 NAA 在植物体内运输容易,有利于促进生根。因此,在 IBA 3.0 mg/L 的培养基内加入一定浓度的 IAA 或 NAA,对香樟不定根的诱导有促进作用。NAA 辅助 IBA 刺激植物生根的活性比 IAA 强,加入 NAA 1.5 mg/L 的培养基的苗木生根率比加入 IAA 1.5 mg/L 的高 23.8%。可见,最适宜诱导不定根的激素组合为 IBA+NAA,浓度配比以 IBA : NAA 为 3.0 : 1.5,其生根率达 86.7%。

表 2 外源激素种类、组合配比对不定根诱导的影响

Tab. 2 Effect of different hormone and different concentration on the rooting rate

激素种类	激素浓度	接种株数	生根株数	生根率	不定根的形态特征
Name of hormone	Concentration of hormone /mg · L ⁻¹	Number of explant	Number of rooted explant	Rate of rooting/%	Configuration of adventitious root
IBA	1.0	30	0	0	
	1.5	30	2	6.67	根粗,苗木偶尔长根 1 条,无侧根
	2.0	30	4	13.33	根粗,质脆,长根 1 条,无侧根
	2.5	30	12	40.00	根粗,长根 1 条,无侧根
	3.0	30	21	70.00	根粗,50%的苗木长出 2 条以上的根系,无侧根
	3.5	30	15	50.00	根粗,长根 1 条,无侧根
	4.0	30	9	30.00	切口处长愈伤组织,长根 1 条,无侧根
IBA+NAA	3.0+1.0	30	21	70.00	根粗,50%的苗木长 2 条根,无侧根
	3.0+1.5	30	26	86.70	根粗,几乎所有苗木都长出 2 条以上的根,炼苗时,根系上长出少量侧根
	3.5+1.5	30	15	50.00	根粗,长根 1 条,无须根
IBA+IAA	3.0+1.0	30	20	67.67	根粗,长根 1 条,无侧根
	3.0+1.5	30	21	70.00	根粗,长根 1 条,无侧根

2.5 生根植株的移栽

当植株的根系长到 0.5~1.0 cm 时,将瓶苗置于大棚内炼苗 20~30 d,让苗木逐渐适应大自然环境,同时使苗木木质化程度加强,以提高对自然环境的抵抗力。此时,将植株从瓶内取出,用自来水清洗干净培养基后分别移栽于(1)(2)(3)移栽基质中。试验表明,3 种基质均能使苗木的移栽成活率在 70%以上,但以在塘泥上栽种的成活率最高,达 85%。塘泥肥沃,团粒结构好,疏松,苗木成活后生长快而健壮。红心土黏性大,疏水透气性差,贫瘠,移栽成活后苗木生长慢。

苗木移栽成活后(约 30~50 d)移入网室培育。为培育壮苗,每隔 5~6 d 施叶面肥(0.1%的多效丰产灵)一次,每 15~20 d 施复合肥(0.1~0.5%的液肥)一次,定期喷 0.1%的多菌灵、百菌清或甲胺磷等药物。6 月龄苗高 15~18 cm 时出圃造林。

3 结论

(1) 香樟优良无性系无菌活体的获取率以 2、3 月份接种的为高,达 60%,其次是 1 月份接种的。

(2) 香樟快速繁殖对培养基的成分要求比较严格, 参试的5种基本培养基, 仅有MS₂对其进行长期培养时, 芽不出现褐化。

(3) 试验筛选出丛生芽诱导适宜的激素组合是6-BA 4~5 mg/L+IAA 2 mg/L; 继代培养激素是6-BA 3.5 mg/L+IAA 2 mg/L 较理想; 不定根诱导的较佳激素组合是IBA 3.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L。培养周期25~30 d, 芽增殖倍数3.5倍, 年繁殖数 5.31×10^5 。

(4) 本试验中, 组织培养植株移栽理想的基质是塘泥, 其移栽成活率85%, 移栽季节宜选择温凉的春、秋、冬季。

参考文献:

- [1] 曹孜义, 刘国民, 王蒂, 等. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2002.
- [2] 陶静, 詹亚光, 姜静, 等. 白桦组织培养再生系统的研究 [J]. 东北林业大学学报, 1998, 26 (5): 6-9.
- [3] 崔瑾, 李谦盛. TDZ 和 KNO₃ 对芋试管球茎诱导的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39 (4): 311-313.
- [4] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭, 等. 植物组织培养外植体褐变的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 1999, 21 (3): 78-84.
- [5] 连芳青, 熊伟, 张露. 樟树茎段的离体培养和植株再生 [J]. 江西林业科技, 1992 (3): 20-21.
- [6] 索长江, 蔡试华. 香樟丛生芽的诱导和快速繁殖研究 [J]. 林业科技开发, 1997 (3): 29-30.

(责任编辑 裴润梅)

(上接第55页)

能源和以硝态氮、亚硝态氮为氮源生活, 对营养要求不高, 并可以脱氮除硫 (S²⁻), 与 *P. stutzeri* 不尽相同^[7,8]。此外, 由于其在厌氧条件下可以 S²⁻ 作为电子供体、以 NO₃⁻ 或 NO₂⁻ 作为电子受体, 使硝酸盐或亚硝酸盐还原为 N₂, 硫化物 (S²⁻) 氧化为 S 或 SO₄²⁻。N₂、S 和少量的 SO₄²⁻ 都是在自然水生态中可接受的无毒物质, 所以, 该菌株在水处理工程、微污染水的脱氮除硫 (S²⁻) 和在自然水体的生态调控中具有应用的价值。至于对它的分类鉴定和在环境工程水处理中的应用有待进一步研究。

鸣谢 本研究的电子显微镜照片由广西医科大学电镜室制作; 菌株的分子生物学鉴定部分的试验是在广西亚热带微生物资源保护利用重点实验室完成的, 得到冯家勋研究员以及段承杰、张鹏的帮助, 值此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 蒋辉. 环境水化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] 任南琪, 马放, 杨基先, 等. 污染控制微生物学 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002.
- [3] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [4] 马光庭, GOTTSCALK G, BLANT M. 降解四氯乙烯厌氧菌的分离和特征 [J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4 (2): 196-199.
- [5] 国家环保局. 水和废水检测分析方法 [M]. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.
- [6] 刘进元, 常智杰, 赵广荣. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [7] 周国勤, 陈兵, 吴伟. 假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 的生长特性及其反硝化活性 [J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24 (1): 46-50.
- [8] 孔瑛, 赵金生, 史德青, 等. 石油生物脱硫菌 *Pseudomonas stutzeri* UP-1 的筛选 [J]. 微生物学通报, 2004, 31 (3): 36-41.

(责任编辑 裴润梅)