

细毛樟愈伤组织培养^{*}

周立刚¹ 程必强² 喻学俭² 王君健¹ 杨崇仁²

(¹华中理工大学药物研究所, 武汉 430074)

(²中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 从富含香叶醇的细毛樟(*Cinnamomum tenuipilum* Kosterm)叶片外植体诱导出愈伤组织。愈伤组织生长较合适的培养基为 pH 5.8 附加 IAA 2 mg/L 和 KT 0.1 mg/L 的 MS 培养基, 在 25 °C 下暗培养。愈伤组织无性系继代培养到第 6 代后芳香成分初步分析结果表明主成分仍为香叶醇。

关键词 细毛樟; 愈伤组织; 生长速率; 香叶醇

Callus culture of *Cinnamomum tenuipilum*

Zhou Ligang¹ Cheng Biqiang² Yu Xuejian² Wang Junjian¹ Yang Chongren²

(¹Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

(²Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences Kunming 650204)

Abstract Calli were induced from the leaves explants of a chemical type of *Cinnamomum tenuipilum* Kosterm which main aromatic component was geraniol. It was optimal for the callus growth by using MS medium in which IAA 2 mg/L and KT 0.1 mg/L were added into it. The optimum pH value in the medium was about 5~6, and optimum temperature was about 25 °C. Light inhibited callus growth. Preliminary identification of geraniol in the callus was carried out by gas chromatography. The results demonstrated that callus was capable of synthesizing geraniol the same as that of the original plant.

Key words *Cinnamomum tenuipilum* Kosterm; callus; growth rate; geraniol

细毛樟(*Cinnamomum tenuipilum* Kosterm)系樟科樟属植物, 仅分布于云南南部和西部的热带地区^[1], 其叶富含挥发油。细毛樟按精油的主成分可分为多个化学型如香叶醇型、芳樟醇型、金合欢醇型等^[2], 它们在形态上又很难区别, 使开发利用带来困难。本文报道香叶醇型细毛樟愈伤组织的培养及其挥发性成分的分析。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织诱导

实验所用的材料为香叶醇型细毛樟, 采自西双版纳热带植物园。取其幼嫩叶片, 先用自来水冲

1997-03-21 收稿

第一作者简介: 周立刚, 男, 1965 年出生, 博士, 副研究员, 从事植物次生代谢、植物与其它生物相互作用的研究。

* 云南省应用基础研究基金资助项目(97C037Q)

洗干净,放入0.1%的HgCl₂溶液中消毒15 min,用无菌水洗涤4次,将叶片切成0.5 cm见方,接种于诱导培养基上,于25℃下暗培养。用于诱导愈伤组织的培养基有4种,即MS、LS、6,7-V和B5基本培养基,并附加激素2,4-D 2 mg/L和KT 0.1 mg/L。

1.2 愈伤组织继代培养

将诱导出来的愈伤组织分离并培养于MS培养基上,30 d转代培养一次,经过6代驯化后,进行愈伤组织培养的研究。

1.3 培养条件

一般采用MS培养基 IAA 2 mg/L和KT 0.1 mg/L,pH 5.8、在25℃下暗培养。50 mL三角瓶内装培养基20 mL。同时,采用不同的激素组合、培养基、pH值、培养温度等,进行比较培养实验。

1.4 愈伤组织生长的测定

愈伤组织培养40 d后,冰冻干燥至恒重。生长以愈伤组织干重(mg/瓶)和生长速率(mg/瓶/d)作为指标。所得结果均为4次重复平均值,并附有标准差。

1.5 愈伤组织中芳香主成分香叶醇的初步鉴定

新鲜愈伤组织经水蒸汽蒸馏以及乙醚萃取取得挥发性提取物。气相色谱分析鉴定条件:日本岛津GC-9A气相色谱仪,C-R 3A微处理机,SE-54石英弹性毛细管柱30 m × 0.25 mm(美国J&W公司),汽化温度230℃,柱温80~200℃,程序升温3℃/min,载气N₂,柱前压力1.5 kg/cm²,进样量0.10 μL,FID检测。

2 结果与讨论

2.1 愈伤组织的诱导

细毛樟外植体接种于4种不同的培养基上,观察愈伤组织发生的天数。培养40 d后,计算愈伤组织的诱导率。结果如表1所示。叶片外植体培养一段时间后,从其切片边缘先后长出白色的愈伤组织。以MS和6,7-V两种培养基诱导效果最好,愈伤组织在这两种培养基上生长也较好。愈伤组织生长一段时间后,颜色逐渐变黄稍带褐色。将生长迅速、质地疏松的黄白色愈伤组织分离开来,在MS培养基上进行继代培养,到第6代后进行愈伤组织培养的实验。这时的愈伤组织经驯化培养后,生长逐渐加快,质地变得均一,也排除了从原植物叶片带来芳香成分的可能性。

2.2 激素对愈伤组织培养的影响

激素是植物组织培养中的主要调节因子。细毛樟愈伤组织的诱导和培养必需在基本培养基中添加激素。采用MS培养基分别进行了KT 0.1 mg/L与2,4-D、NAA和IAA的浓度(两个梯度)

表1 不同培养基对细毛樟愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of different media on callus inducing of *C. tenuipilum*

培养基 Media	愈伤组织 发生时间 Days when the calli began to be induced (d)	愈伤组织 诱导率 Inducing rate of the calli (%)	愈伤组织 生长状况 Growth status of the calli
MS	13	86.7	好 Good
6,7-V	14	88.9	好 Good
LS	17	73.3	中等 Middle
B5	20	63.8	差 Bad

表2 激素组合对愈伤组织生长的影响
Table 2 Effects of different hormone combinations on the callus growth of *C. tenuipilum*

激素组合 Combination of hormones (mg/L)	愈伤组织干重 Dry weight of callus (mg/flask)	生长速率 Growth rate of callus (mg/flask/d)
2,4-D 1+KT0.1	233.1 ± 21.5	2.41
2,4-D 2+KT0.1	269.2 ± 36.2	3.33
IAA 1+KT0.1	265.0 ± 36.5	3.22
IAA 2+KT0.1	303.0 ± 30.9	4.17
NAA 1+KT0.1	218.8 ± 18.4	2.07
NAA 2+KT0.1	259.1 ± 35.1	3.07

接种量为136.2 ± 9.0 mg/瓶。Inoculum quantity was 136.2 ± 9.0 mg/flask.

组合实验。结果如表 2 所示。IAA 2 mg/L 较适合于愈伤组织的生长。此外, 2, 4-D、IAA 和 NAA 浓度为 2 mg/L 对愈伤组织生长效果普遍优于浓度为 1 mg/L。故在以后的细毛樟愈伤组织培养研究中均采用 IAA 2 mg/L 和 KT 0.1 mg/L 的激素组合。

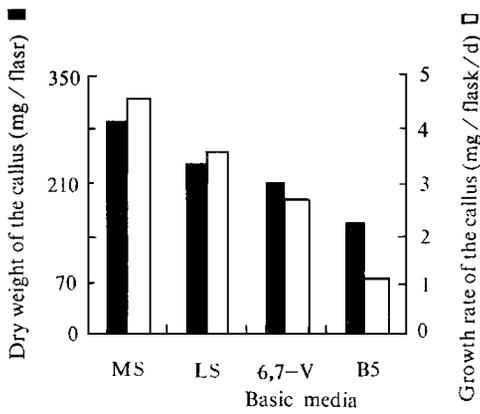


图 1 不同培养基对细毛樟愈伤组织生长的影响
(接种量为 125.2 ± 3.7 mg/瓶)

Fig. 1 Effects of different media on the callus growth of *C. tenuipilum*
(inoculum quantity was 125.2 ± 3.7 mg/flask)

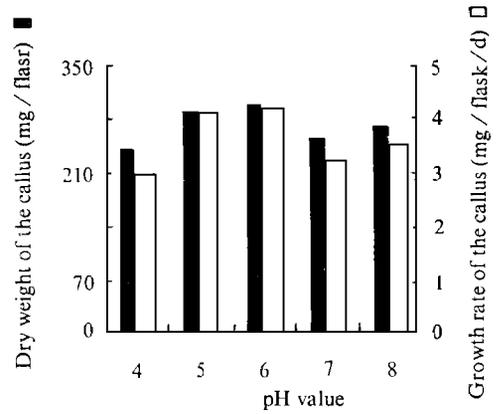


图 2 培养基 pH 值对细毛樟愈伤组织生长的影响
(接种量为 136.2 ± 9.0 mg/瓶)

Fig. 2 Effects of pH values in medium on the callus growth of *C. tenuipilum*
(inoculum quantity was 136.2 ± 9.0 mg/flask)

2.3 基本培养基的选择

为了进一步确认哪种培养基最适合于细毛樟愈伤组织培养, 选用了 4 种培养基即 MS、LS、6, 7-V 和 B5, 激素浓度为 IAA 2 mg/L、KT 0.1 mg/L。结果如图 1 所示, 愈伤组织生长以 MS 培养基最好, 干重和生长速率分别为 308.2 ± 6.5 mg/瓶和 4.57 mg/瓶/d。B5 培养基最差, 愈伤组织培养一开始颜色就变褐, 干重和生长速率分别为 176.1 ± 4.2 mg/瓶和 1.27 mg/瓶/d。故选用 MS 培养基为愈伤组织生长的培养基。

2.4 培养基 pH 值对细毛樟愈伤组织生长的影响

愈伤组织的最适生长要求培养基有一定的 pH 值。培养基 pH 对细毛樟愈伤组织生长的影响如图 2 所示。pH 为 5~6 时较适合于愈伤组织的生长, pH 值小于 5 或大于 6 时, 生长均减慢。故培养基的 pH 值应保持在 5~6 范围内。

2.5 温度和光照的影响

分别在不同的温度下培养细毛樟愈伤组织, 结果如图 3 所示。温度 25°C 最适合于愈伤组织生长, 27°C 以上对生长稍有抑制。说明该愈伤组织在较高温度下有良好的适应性, 这与细毛樟生长

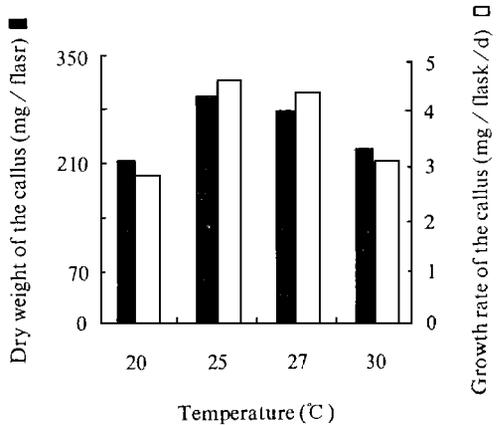


图 3 温度对细毛樟愈伤组织生长的影响
(接种量为 114.6 ± 6.2 mg/瓶)

Fig. 3 Effects of temperature on the callus growth of *C. tenuipilum*
(inoculum quantity was 114.6 ± 6.2 mg/flask)

在热带高温的生态环境相一致。为了了解光照对愈伤组织生长的影响,在 25 °C 下每天光照 10 h,光强 1 000 lx,发现光照能明显地影响其生长,愈伤组织容易变褐,质地变得坚硬,稍带绿色,生长明显减慢,干重和生长速率分别为 196.3 ± 4.3 mg/瓶和 2.04 mg/瓶/d,而对照(即 25 °C 下暗培养)的干重和生长率分别为 301.9 ± 6.9 mg/瓶和 4.68 mg/瓶/d。因此,光照对愈伤组织生长不利。

2.6 愈伤组织中挥发油的鉴定

愈伤组织经过几代驯化以后,组织变得均一,也排除了从原植物带来次生代谢物的可能性。为了确定离体培养的细毛樟愈伤组织能否产生原植物体中具有重要价值的香叶醇,是否保持了原植物体的生物合成能力,取愈伤组织鲜材料和母体植物的新鲜叶片,分别用水蒸汽蒸馏和乙醚萃取,提取物用气相色谱分析,结果表明其主要成分均为香叶醇,保留时间为 12.62 min。

3 小 结

从细毛樟叶香叶醇化学型的外植体成功地诱导出愈伤组织,通过继代培养筛选培养系,该培养系在 pH 值为 5.8 并附加 IAA 2 mg/L 和 KT 0.1 mg/L 的 MS 培养基上,25 °C 下暗培养生长良好,具有产生以香叶醇为主的挥发油的能力。鉴于有性繁殖过程中,优良性状易变异,造成细毛樟樟油主成分变化相当大,具有专一性次生代谢产物合成能力的愈伤组织培养系的建立,不仅使应用生物技术手段大量生产香叶醇提供了可能,也为进一步诱导再生植株及其大量繁殖奠定了基础。这将有可能使细毛樟资源的开发利用提高到一个新的层次。

参 考 文 献

- 1 李锡文. 中国植物志(第31卷). 北京: 科学出版社, 1982: 170
- 2 程必强, 许 勇, 喻学俭等. 细毛樟繁殖后代叶油化学成分的变化. 云南植物研究, 1991, 13 (2): 219 ~ 224