

TDZ对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响^{*}

张小红¹, 张红燕², 武军³, 闵东红³, 康冰¹, 李军超¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2 商洛地区农业学校, 陕西 商洛 726000;

3 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 利用已经连续培养 35~38 代, 其腋芽增殖生长能力已衰退的香椿试管苗为材料, 研究了 Thidiazuron (TDZ) 对叶、叶柄、茎段外植体形成愈伤组织的反应以及对腋芽增殖生长、生根的影响, 结果显示, TDZ + 0.2 mg/L NAA 能使不同外植体形成愈伤组织的能力显著提高, 其中茎段形成愈伤组织的能力较强。TDZ 小于 0.02 mg/L 时对芽的增殖生长起促进作用, 而且可恢复腋芽旺盛的分枝增殖能力; TDZ 高于 0.02 mg/L 则全面抑制生长, 并随质量浓度的升高变态苗增多; 经 TDZ 培养过的试管苗其生根率并未降低。

[关键词] Thidiazuron (TDZ); 香椿; 愈伤组织; 生长增殖

[中图分类号] S644.404⁺.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)05-0035-05

TDZ (Thidiazuron 噻二唑苯基脲) 是人工合成的苯基脲衍生物之一, 在很多植物材料中表现出很高的细胞分裂素活性^[1,2]。试验证明, 在许多植物组织的培养中, 它可以促进愈伤组织生长及芽的形成和繁殖, 活性大大超过一般细胞分裂素, 特别对于木本植物的组培具有突出的效果^[3,4]。TDZ 是苯基脲衍生物中在植物组织培养上最具潜力的新型生长调节剂之一。

香椿 (*Toona sinensis*) 是我国特有的一种材菜兼用的珍贵速生树种, 在农业和林业生产中具有重要的经济价值^[5]。近年来, 天然香椿资源遭受人为破坏严重, 现存极少。在自然状态下, 它主要靠根萌孽繁殖, 由种子萌发成苗的极少, 许多野生资源及地方名优品种面临资源丢失的危险。为保护香椿资源及加速一些珍贵品种的繁殖生产, 我国许多研究单位进行了组织培养和快速繁殖的研究^[6~10]。

本试验自 1997 年开始, 重点在几个菜用型品种上进行了组织培养研究, 已建立起离体快繁技术体系^[6]。试管苗在离体条件下已连续培养 40~46 代。但在培养 30 多代以后, 其生长增殖出现衰退, 表现为试管苗腋生枝数减少、主茎变细、叶变黄, 繁殖系数下降。为了恢复其生长增殖能力, 进行了 TDZ 在

愈伤组织诱导、腋芽增殖生长及对生根等方面的活性试验, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用外植体均取自 MS 培养基上继代 35~38 代的香椿无菌试管苗。

1.2 方法

诱导愈伤组织的外植体为叶、叶柄、茎段, 大小 0.5~1.0 cm, 培养前称重 (W_1), 培养 35 d 后再称重 (W_2), 按 $(W_2 - W_1) / W_1$ 计算外植体鲜重增加倍数; 诱导腋芽增殖生长时, 外植体切取 1~2 cm 带芽茎段; 生根培养时, 取大于 2 cm 的正常苗进行试验。

1.3 培养条件

基本培养基仍选用 MS 培养基, 蔗糖含量 30 g/L, 生根诱导时不含大量元素且蔗糖减半, 琼脂 5 g/L, pH 5.8, 培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度 2 000 lx, 光周期 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

在 MS 培养基中附加 0.000 005~0.2 mg/L TDZ, 叶外植体不产生愈伤组织, 只是随 TDZ 质量

^{*} [收稿日期] 2002-04-02

[基金项目] 陕西省科学院重点科研计划项目 (1998-36)

[作者简介] 张小红 (1968-), 女, 陕西商洛人, 助理研究员, 主要从事植物组织培养方面的研究。

浓度升高叶片肿胀弓起,近似于玻璃化状态。叶柄外植体产生的愈伤组织也很少,叶柄略有增粗,从叶柄两端切口产生少量愈伤组织。茎段外植体产生的愈伤组织则相对较多,茎段先增粗,后表皮纵裂,在裂口处及两端切口产生明显的愈伤组织。从外植体鲜重增加倍数看,当 TDZ 含量在 $0.01 \sim 0.02 \text{ mg/L}$ 时,达最大值。在含 TDZ 培养基中再附加 0.2 mg/L 的 NAA,3 种外植体均形成愈伤组织,其鲜重增加倍数显著提高。从试验结果(表 1)可以看出,叶外植体在含 NAA 的培养基中,当 TDZ 含量高于 0.002 mg/L 时,有部分外植体沿叶脉产生少量愈伤组织,在高于 0.1 mg/L 时,叶片同样有肿胀卷曲现象;叶柄及茎段外植体则比叶片产生较多的愈伤组织,其中茎段产生的最多,质量浓度在 $0.01 \sim 0.02 \text{ mg/L}$ 时,外植体鲜重增加倍数最高,达 18 倍之多,高于这个范围则开始下降。试验结果还表明,NAA 的存在对愈伤组织的产生起促进作用,愈伤组织出

现的时间提前,诱导率提高,产生的总量增多,茎段较叶、叶柄更易产生愈伤组织。

在本试验中诱导出的愈伤组织均呈浅绿或黄绿色,较致密;而同样的外植体在仅含 2,4-D 或 NAA 1.0 mg/L 的培养基上诱导出的愈伤组织均呈浅黄色,疏松状,在含 NAA 和 6-BA 的培养基上形成的愈伤组织与在含 TDZ 的培养基上形成的一样,呈浅绿色紧密状。从诱导效果看,TDZ 诱导叶及叶柄的愈伤组织形成的能力远远低于 2,4-D 及 NAA,对茎段则有较强的作用,但单一 TDZ 诱导茎段产生的愈伤组织量略低于二者。

不同来源、不同形态的香椿愈伤组织,经 6-BA,KT,ZT 及 TDZ 处理,均未能诱导分化出芽。但是,这种绿色致密的愈伤组织在继代培养过程中可以保持多代的分裂增殖能力,而疏松的愈伤组织极易褐化死亡,失去生长能力。

表 1 不同外植体对 TDZ 及 NAA 的反应

Table 1 Callus inducement of difference explants on TDZ and NAA medium

激素/(mg·L ⁻¹) Hormones		愈伤组织出现时间/d Days of callus inducement			诱导率/% Rates of callus inducement			鲜重平均增加倍数/倍 A verage multiple of explants weight increased		
TDZ	NAA	叶 Leaves	叶柄 Leaves stalks	茎段 Stem - explants	叶 Leaves	叶柄 Leaves stalks	茎段 Stem - explants	叶 Leaves	叶柄 Leaves stalks	茎段 Stem - explants
0.000 005						50	100	0	0	0.1
0.002				14		50	100	0	0.1	2.5
0.01			25	18		55	100	0.5	3.4	8.2
0.02			24	18		60	100	0.5	3.6	8.0
0.1			17	18		60	100	1.0	2.3	6.3
0.2			17	18		60	100	1.0	1.0	5.7
0.000 005	0.2	27	15	18		75	100	0.8	1.2	8.3
0.002	0.2	25	15	11		78	100	1.1	3.4	10.8
0.01	0.2	25	14	11	12	80	100	1.7	6.5	18.2
0.02	0.2	23	14	9	16	80	100	2.0	7.0	18.0
0.1	0.2	21	15	9	20	82	100	1.5	6.3	16.3
0.2	0.2	21	15	9	10	82	100	1.2	3.1	11.7

2.2 腋芽的增殖生长

在 MS 基本培养基中,附加 TDZ $0.000 001 \sim 0.1 \text{ mg/L}$,以 MS + 6-BA 0.2 mg/L + GA₃ 2.0 mg/L (CK₁) 和 MS + ZT 0.2 mg/L + GA₃ 2.0 mg/L (CK₂) 培养基(快繁试验中筛选出的最佳增殖培养基)为对照,观察 TDZ 对腋芽外植体的效应,培养 30 d 后统计结果(表 2)。由表 2 可以看出,当 TDZ 质量浓度为 $0.000 001 \text{ mg/L}$ 时,不仅苗高度较低而且平均分枝数最少,苗基部也不产生愈伤组织块,生长状态与对照接近,表明此质量浓度对苗的生长既无促进作用也无抑制作用。在 $0.000 005 \sim 0.005 \text{ mg/L}$ 时,苗平均高度最高且基本一致;当质

量浓度增高到 0.01 mg/L 时,增高生长受到抑制,只有部分苗有增高生长现象;质量浓度增高到 0.02 mg/L 以上时,苗的增高生长几乎全部受到抑制。

从腋芽萌发形成的侧枝数看,TDZ 的质量浓度小于 0.02 mg/L 时,平均侧枝数随质量浓度的升高而增加,在 0.02 mg/L 时分枝数最多,形成具多个侧枝的芽丛,平均产生侧枝数 2.83 个,但这一质量浓度又使增高生长完全受到抑制,所以芽体较小。当质量浓度进一步提高,其产生的分枝数减少。

苗茎基部随 TDZ 质量浓度的升高逐渐膨大、裂开,并产生浅绿色较致密的愈伤组织块,由统计结果(表 2)可以看出,形成的愈伤组织的大小与腋芽增

殖的侧枝数目趋势一致。当质量浓度为 0.02 mg/L 时,量最多,平均直径达 1.228 cm ,最大可达 1.7 cm 。高于这一质量浓度时,愈伤组织的生长随质量浓度的升高而减少。

从获得的增殖苗的质量和形态看,TDZ 质量浓度为 $0.000\ 001\text{ mg/L}$ 时,苗色较原继代培养的绿,但芽增殖数与对照接近,主茎细弱,高度低于对照。当质量浓度提高到 $0.000\ 005\sim 0.01\text{ mg/L}$ 时,苗叶绿而大,主茎粗壮,分枝较多,生长良好,苗质量高。培养中还观察到(表 2),在 TDZ 质量浓度 $\geq 0.01\text{ mg/L}$ 时,出现部分变态苗,表现为幼叶皱缩和玻璃化现象,在应用 6-BA 和 ZT 的培养过程中也有同样

现象。随质量浓度升高变态苗比率升高。在 $0.05\sim 0.1\text{ mg/L}$ 时,苗各方面生长都受到抑制,不仅分枝减少、高度降低,而且苗主茎瘦弱、叶黄,出现的变态苗较多。这些异形苗中除叶皱缩及玻璃化苗外,还出现 2 株叶柄呈扁平状和 1 株主茎四棱状的异常苗,这在其他类型激素培养过程中从未出现过。

与对照的培养结果(表 2)相比,TDZ 质量浓度为 $0.000\ 005\sim 0.01\text{ mg/L}$ 时,表现出较好的促进增殖生长的作用,苗的高度虽然较对照略低,但分枝数提高,主茎粗壮,叶色浓绿,苗质量总体上有所提高,使已经严重退化的试管苗又恢复了正常的增殖生长能力。

表 2 TDZ 对香椿试管苗的增殖生长效应

Table 2 Effect of TDZ on growth and proliferation of shoots in *Toona sinensis*

TDZ 质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration	处理苗数/株 No. of treated minicuttings	平均分枝数 Average No. of spouted shoots per explant	平均苗高/ cm Average height of shoots	苗基部愈伤 组织块直径/ cm Callus diam ters of explants	变态苗率/% Rate of abnormal shoots
0.000001	18	1.39	1.39	0.15	0
0.000005	18	1.89	1.75	0.544	0
0.002	18	2.0	1.72	0.694	0
0.005	18	2.06	1.70	0.783	0
0.01	12	2.25	1.55	0.85	10.8
0.02	18	2.83	0.94	1.228	17.64
0.05	18	1.72	0.95	0.933	22.22
0.1	18	1.5	0.9	0.633	25.81
CK ₁	28	1.42	2.01	0.680	0
CK ₂	25	1.30	2.32	0.765	0

2.3 对生根的影响

分别选取健壮的、高于 2 cm 并在 MS+TDZ 0.005 mg/L 培养基上连续培养 2 代的试管苗和在继代培养基 MS+6-BA 0.2 mg/L +GA 2.0 mg/L 上获得的试管苗进行生根试验,结果如表 3。由表 3 可见,二者生根率基本相同,表明经 TDZ 继代培养

的试管苗进入生根阶段后并不影响其根的形成。但若在生根培养基中附加 $0.000\ 005\text{ mg/L}$ TDZ 或者 0.005 mg/L 6-BA,经过 40~45 d 培养后,试管苗仍难以生根,说明 TDZ 或 6-BA 的存在均强烈抑制香椿试管苗的生根。

表 3 TDZ 对试管苗生根的影响

Table 3 Effect of TDZ on rooting

激素/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Homones			处理苗/株 No. of treated explants	生根率/% Percentage of rooting	继代培养中使用 的细胞分裂素 Used cytokinin in subculture
BA	TDZ	6-BA			
1.0			46	78.3	TDZ
1.0			43	79.1	6-BA
1.0	$0.000\ 005$		36	2.8	6-BA
1.0		0.005	45	6.7	6-BA

3 讨 论

TDZ 是一种具有较高生物活性的物质,在低质量浓度下即可表现出较强的细胞增殖作用。单一 TDZ 诱导香椿愈伤组织,采用的外植体组织来源不同,诱导效果不同。TDZ 对叶及叶柄愈伤组织的诱

导作用远不及对茎切段强烈,这可能是由于叶及叶柄比茎的形态分化更完全,脱分化比较困难,而茎形成层细胞本身就具有增殖生长能力,即使在离体条件下也不例外。同样在单一 NAA 或 2,4-D 诱导下,茎外植体可形成大量的愈伤组织,而叶及叶柄外植体产生的愈伤组织较少,只有经过连续 2~3 代的脱

分化培养后,其愈伤组织才能迅速增殖,二者脱分化需要的时间长、启动慢、生长高峰期较晚,这种差异是由外植体本身器官的差异造成的。在附加NAA和TDZ的培养基中,3种外植体的愈伤组织形成能力明显加强,表明生长素与TDZ之间的协同调节作用非常重要。一般认为,当培养基中生长素与CTK的比值高时形成愈伤组织,低时形成芽^[11]。但实际上,诱导愈伤组织使用的激素种类、浓度常因植物品种、生长状态和器官来源的不同而有差异,关于香椿的培养结果即表明了这一点。

TDZ在不同植物中表现出细胞分裂素活性的大小不同,在 $0.000\ 005\sim 0.01\text{ mg/L}$ 时,对香椿腋芽的增殖生长表现出较好的促进作用,而高于这一质量浓度则开始抑制生长。其对香椿腋芽增殖作用相当或高于 0.2 mg/L 6-BA或ZT的效果,即它的活性是6-BA和ZT的10~40倍。由本试验可知,TDZ对腋芽增殖及苗基部愈伤组织生长作用相同,二者的生长曲线基本一致,峰值点在同一质量浓度。而TDZ对苗增高生长作用不明显,在高于 0.01 mg/L 时即抑制增高生长。这种低质量浓度下促进生长,高质量浓度抑制生长的特性,可能是由于外植体内部的内源激素与TDZ的协同作用,低质量浓度下二者维持着一定的平衡状态,表现出促进生长作用,高质量浓度则打破了二者之间的平衡,全面抑制其生长。Letham^[12]指出,TDZ和一般细胞分裂素一

样,可促进休眠芽中的生长素合成。当质量浓度很低时,所产生的生长素水平可能对芽的生长是适合的,较高质量浓度则产生过高的生长素,对芽的生长反而不利^[11]。在TDZ培养中,原本已经退化的试管苗腋芽增殖生长能力又得到恢复,表现出良好的生长趋势,并且这种旺盛的增殖生长活性可以持续4~5代。

由本试验得知,经TDZ继代培养的试管苗,对生根影响不大,而在含 $0.000\ 005\text{ mg/L}$ TDZ或 0.005 mg/L 6-BA的生根培养基中几乎都不能生根,说明细胞分裂素能强烈抑制香椿试管苗的生根。在有关TDZ组织培养的报道^[2~4,12]中,多数都提到玻化苗和扁化现象,认为是由于TDZ质量浓度过高或处理时间过长所致。在香椿试管苗腋芽增殖生长试验中,随TDZ质量浓度的升高也出现玻化苗及变态苗,但这种变态只是部分叶柄及主茎呈扁平 and 四棱状,与一般说到的扁化(多个芽合并在一起呈扁平状)有所不同,这种现象是否是由于TDZ在促进细胞增殖生长时,对细胞有一定的拉长作用所引起,目前尚不清楚。

植物生长是一个多因素共同协作的过程,而本试验只涉及TDZ及NAA,6-BA等激素,对外植体自身内源生长调节物质的变化有待于做进一步的分析。

[参考文献]

- [1] 周俊彦, Collet G F. Thidiazuron 的细胞分裂素活性研究 I. 对番木瓜(*Carica pentagona*)愈伤组织诱导及芽生长的作用[J]. 西北植物学报, 1989, 9(4): 203- 210
- [2] 徐华松, 徐九龙, 黄学林. TDZ 在植物组织培养中的作用[J]. 广西植物, 1996, 16(1): 77- 80
- [3] Fellman C D. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation[J]. HortSci, 1987, 22: 1197- 1200
- [4] Mok M C. Biological and biochemical effects of cytokinininactive phenylurea derivatives in tissue culture systems[J]. HortSci, 1987, 22: 1194- 1197.
- [5] 陈静芬. 香椿栽培新技术[M]. 北京: 金盾出版社, 1997. 2- 5
- [6] 张小红, 陈彦生, 魏安智. 香椿离体快繁技术研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(4): 636- 641
- [7] 覃兰英, 林翔鹰, 李 青. 香椿的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1989, (1): 42- 43
- [8] 唐 明, 郑均宝, 潘冬梅, 等. BA 和 GA 3 对香椿离体培养中芽增殖的影响[J]. 林业科技通讯, 1994, (1): 14
- [9] 王春林, 杨群英, 薛爱红, 等. 香椿组织培养与快速繁殖的研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(4): 406- 407.
- [10] 杨其光, 陈学静, 张占鹏. 菜用太和香椿离体快繁[J]. 植物生理学通讯, 1989, (4): 43
- [11] 裘文达. 园艺植物组织培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 56- 79
- [12] Letham D S. Phytohormones in retrospects[M]. New York: Plencem Press, 1987, 7(1): 1- 27.

Effect of TDZ on callus inducement and shoot growth in tissue culture of *Toona sinensis*

ZHANG Xiao-hong¹, ZHANG Hong-yan², WU Jun³,
MIN Dong-hong³, KANG Bing¹, LI Jun-chao¹

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Agricultural College of Shangluo, Shangzhou, Shaanxi 726000, China; 3 College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The experiment was carried out upon the shoots of *Toona sinensis* which had degenerated on qualities of growth and proliferation after being subcultured 35-38 generations. The effects of Thidiazuron (TDZ) on callus inducement, proliferation and rooting have been studied. The results show that the quality of callus inducement would be increased obviously when supplemented with TDZ and 0.2 mg/L NAA in the MS medium, and stem explants would induce callus more easily than leaves and leaf-stalks. The results revealed that TDZ improved proliferation and growth of shoots when its concentration was lower than 0.02 mg/L, proliferation and growth of the shoots have been recovered from the degeneration. But when its concentration was above 0.02 mg/L, they were restrained completely, at same time, there were more abnormal shoots with increasing concentration in medium. The rooting rate of plantlets has not been decreased by subcultured in the medium which supplemented with TDZ.

Key words: Thidiazuron; *Toona sinensis*; callus; growth and proliferation

(上接第 34 页)

Studies on the induction factors of somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum* L.)

LI Bu-xun^{1,2}, CHENG Zhi-hui¹

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Yuanlongping High-Tech Agriculture Co., Ltd. Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: The results obtained from the single or combination effects of different concentration levels of 2,4-dichlorophenoxy (2,4-D), vitamin B₁ (V_{B₁}), casein hydrolysate (CH), adenosine (ADE) and sucrose on somatic embryogenesis (SE) in garlic indicated that 0.5 mg/L 2,4-D was favorable for SE, and with more pear-shaped and rod-shaped embryos. Increasing the concentration of V_{B₁} to 0.5-2.0 mg/L, the yield of embryos was promoted, and there was obvious interactive effects between higher concentration of V_{B₁} and 2,4-D. The concentration of sucrose 15-30 g/kg was promoted the occurrence of embryos, whereas more than 60 g/kg sucrose was inhibited the occurrence of embryos. MS + 2,4-D 0.5 mg/L + CH 500 mg/L + ADE 20 mg/L was the suitable medium for the subculture of embryogenic callus.

Key words: garlic; somatic embryo; induction factors