

# 杜仲组培快繁的研究<sup>\*</sup>

李 琰<sup>1</sup>, 张 靖<sup>2</sup>, 辛转霞<sup>2</sup>, 王雅君<sup>3</sup>

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100;

3 渭南市农技推广中心, 陕西 渭南 714000)

[摘 要] 研究了植物生长调节剂、基本培养基、采样时间对杜仲腋芽诱导和生长的影响, 并对丛芽增殖培养基中植物生长调节剂浓度和生根培养基类型进行了筛选。结果表明, 最佳取材时间为4月中旬至6月下旬; 以MS为基本培养基, 在添加0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA 或者0.1 mg/L BA + 0.5 mg/L BA 的培养基中, 腋芽的诱导和生长较好; 继代增殖培养以MS + 0.5 mg/L BA + 0.01 mg/L NAA 的培养基丛芽数量最多, 增殖系数最高; 在White培养基上生根率可达57.5%。

[关键词] 杜仲; 组织培养; 快繁技术

[中图分类号] Q 943.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0079-04

杜仲(*Eucammia ulmoides* Oliv.) 是杜仲科单属单种植物, 为我国特有的名贵药用植物, 具有补肾壮腰和抑制肿瘤生长等作用, 特别是对血压有双向调节功能<sup>[1~3]</sup>。杜仲还是一种胶源植物, 杜仲胶具有良好的绝缘性、抗碱性、热塑性和形状记忆等特点, 因而受到世人的普遍重视<sup>[4]</sup>。杜仲一般采用种子繁殖, 但种子发芽率不高, 而且实生后代个体间药用有效成分和杜仲胶含量差异显著, 不利于新选育出的高药高胶型杜仲优系的推广<sup>[5]</sup>。对杜仲进行组培快繁研究, 可在较短时间内获得大量遗传性状一致的优良种苗, 不仅有利于优良品种的推广, 保证药用及工业原料供应, 还对保护野生种质资源具有重要意义。本试验主要研究植物生长调节剂、基本培养基、采样时间等对杜仲腋芽萌发率和芽苗生长的影响, 并进行继代增殖培养基和生根培养基的筛选研究, 以为杜仲快繁体系的建立提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 初代培养

采集西北农林科技大学杜仲优树资源圃4~6年生高药型品种科大3号的当年生枝条, 带回实验室切成带2~3个腋芽的小段, 用10 mL/L 洗洁精洗涤并用自来水反复清洗后, 流水冲洗2 h, 体积分数70%酒精消毒40 s, 无菌水冲洗4次, 1 g/L Hg-Cl<sub>2</sub> 消毒4~8 min, 再用无菌水冲洗4次后, 把茎段

切成只带一个腋芽的小段备用。将带腋芽的茎段分别接种在BA质量浓度为0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 的MS培养基上, 进行细胞分裂素对腋芽的诱导试验; 在MS + 0.5 mg/L BA 的培养基上再加入NAA 或 BA, 浓度均依次设为0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 mg/L, 进行生长素浓度对腋芽的诱导试验; 分别采用MS, B<sub>5</sub>, H 和White 4种基本培养基, 均附加0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA, 进行基本培养基对杜仲腋芽诱导的试验; 在附加0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA 的MS培养基上, 进行采样时间对杜仲腋芽的诱导试验。将带腋芽的茎段形态学上端向上插入培养基, 每瓶接种2个, 每个处理接种20瓶, 定期观察腋芽萌发情况, 30 d统计不同处理中萌发腋芽的生长情况。

### 1.2 继代增殖培养

在添加0.5 mg/L BA 的MS培养基上依次附加浓度为0.00, 0.01, 0.03, 0.05, 0.10 mg/L 的NAA, 以初代培养中MS + 0.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA 培养基上诱导的腋芽萌发芽苗为材料, 切成每段带1个腋芽的茎段, 进行NAA 对腋芽增殖的影响试验。

### 1.3 生根培养

以增殖培养中添加0.01 mg/L NAA 的无菌短枝为材料, 参照Nakazawa 等<sup>[6]</sup>的生根方法, 将无菌短枝基部用100 mg/L NAA 浸蘸3~5 s, 然后扦插

\* [收稿日期] 2003-12-24

[基金项目] 国家林业局948项目(99-4-23); 西北农林科技大学青年科研专项部分内容

[作者简介] 李 琰(1971-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 主要从事植物学及药用植物学研究。

在无激素的MS,B<sub>5</sub>,H,W hite 4 种基本培养基上,进行不同培养基对试管苗的生根试验。

2 结果与分析

2 1 植物生长调节剂对腋芽萌发和生长的影响

2 1 1 BA 对腋芽萌发和生长的影响 接种 6 d 后,杜仲茎段部分腋芽已开始生长,10 d 时已长出 1 cm 左右。由表 1 知,低浓度的BA 对腋芽的萌动和

生长有利,在 0 0~0 5 mg/L 时,随着BA 浓度的升高,萌芽率和芽的高度都逐渐增加。在BA 浓度为 0 5 mg/L 时,不仅外植体腋芽萌芽率高,而且增高生长比较明显,基部形成愈伤也比较小。高浓度BA 对外植体腋芽的萌动及腋芽的生长均产生一定的抑制作用,BA 浓度为 2 0 mg/L 时,仅有 5% 左右的腋芽萌发,且萌芽后逐渐玻璃化,生长很快停止。不加激素时,腋芽不能萌芽。

表 1 BA 对杜仲茎段腋芽诱导和生长的影响

| Table 1 Effects of BA on axillary bud induction and growth of <i>E. ulm oides</i> Oliv. stem |                                             |                      |                             |                            |                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|
| BA/<br>(mg · L <sup>-1</sup> )                                                               | 接种外植体数<br>No. of<br>explants<br>inoculation | 萌发数<br>No. of<br>bud | 萌芽率/%<br>Rate<br>of budding | 芽苗高/cm<br>Height<br>of bud | 基部形成<br>愈伤情况<br>Callus form ing<br>status on base |
| 0 0                                                                                          | 36                                          | 0                    | 0 00                        | 0                          | -                                                 |
| 0 1                                                                                          | 38                                          | 12                   | 31 58                       | 2 80                       | +                                                 |
| 0 3                                                                                          | 40                                          | 16                   | 40 00                       | 3 14                       | ++                                                |
| 0 5                                                                                          | 36                                          | 19                   | 52 78                       | 4 79                       | +                                                 |
| 1 0                                                                                          | 34                                          | 10                   | 29 41                       | 2 10                       | +                                                 |
| 2 0                                                                                          | 38                                          | 2                    | 5 26                        | 1 14                       | -                                                 |

注: - . 无愈伤组织; + . 愈伤组织量极少; ++ . 愈伤组织量少; +++ . 愈伤组织量多。下表同。  
Note: - . No callus; + . Little callus; ++ . A little callus; +++ . Much callus The following tables are the same

2 1 2 BA 与 NAA , BA 的交互作用对腋芽萌发和生长的影响 当培养基中含BA 0 5 mg/L ,NAA 0 00~0 05 mg/L 时,随NAA 浓度增加,杜仲茎段腋芽萌芽率和芽苗高度明显上升(表 2)。当NAA 浓度为 0 05 mg/L 时,萌芽率达91. 67%,芽平均高度达 7. 59 cm。NAA 浓度继续增加,萌芽率和芽高度

开始明显下降,基部愈伤组织增多。  
由表 3 知, BA 对杜仲茎段腋芽的诱导效果在低浓度时与NAA 相似,但适应范围较宽,在 0 00~0 10 mg/L 时,萌芽率和芽高的增长均随浓度升高而明显上升。随浓度进一步升高,萌芽率和芽高度略有下降,但不明显,而基部愈伤组织则明显增多。

表 2 NAA 浓度对杜仲茎段腋芽诱导和生长的影响

| Table 2 Effects of NAA on axillary bud induction and growth of <i>E. ulm oides</i> Oliv. stem |                                             |                      |                             |                            |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|
| NAA/<br>(mg · L <sup>-1</sup> )                                                               | 接种外植体数<br>No. of<br>explants<br>inoculation | 萌发数<br>No. of<br>bud | 萌芽率/%<br>Rate<br>of budding | 芽苗高/cm<br>Height<br>of bud | 基部形成<br>愈伤情况<br>Callus form ing<br>status on base |
| 0 00                                                                                          | 38                                          | 20                   | 52 63                       | 4 90                       | +                                                 |
| 0 01                                                                                          | 38                                          | 23                   | 60 53                       | 5 51                       | +                                                 |
| 0 03                                                                                          | 40                                          | 30                   | 75 00                       | 6 08                       | +                                                 |
| 0 05                                                                                          | 36                                          | 33                   | 91 67                       | 7 59                       | +                                                 |
| 0 10                                                                                          | 38                                          | 24                   | 63 16                       | 4 14                       | ++                                                |
| 0 20                                                                                          | 40                                          | 13                   | 32 50                       | 2 09                       | ++                                                |
| 0 50                                                                                          | 38                                          | 7                    | 18 42                       | 1 18                       | +++                                               |

表 3 BA 浓度对杜仲茎段腋芽诱导和生长的影响

| Table 3 Effects of BA on axillary bud induction and growth of <i>E. ulm oides</i> Oliv. stem |                                             |                      |                             |                            |                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|
| BA/<br>(mg · L <sup>-1</sup> )                                                               | 接种外植体数<br>No. of<br>explants<br>inoculation | 萌发数<br>No. of<br>bud | 萌芽率/%<br>Rate<br>of budding | 芽苗高/cm<br>Height<br>of bud | 基部形成<br>愈伤情况<br>Callus form ing<br>status on base |
| 0 00                                                                                         | 36                                          | 19                   | 52 78                       | 4 84                       | +                                                 |
| 0 01                                                                                         | 40                                          | 21                   | 52 50                       | 4 94                       | +                                                 |
| 0 03                                                                                         | 36                                          | 28                   | 77 78                       | 5 69                       | +                                                 |
| 0 05                                                                                         | 38                                          | 32                   | 84 21                       | 6 84                       | +                                                 |
| 0 10                                                                                         | 38                                          | 35                   | 92 11                       | 7 31                       | ++                                                |
| 0 20                                                                                         | 36                                          | 33                   | 91 67                       | 7 29                       | ++                                                |
| 0 50                                                                                         | 34                                          | 31                   | 91 18                       | 7 27                       | +++                                               |

2 2  采样时间对腋芽萌芽和生长的影响

由表 4 可知, 于 3 月下旬到 9 月采集的带腋芽的杜仲茎段, 在适宜的激素浓度和培养基上均可萌发, 但萌芽率和生长情况随取材时间的不同差异很大。其中 4 月中旬至 6 月下旬采集的枝条萌芽率最高, 达 90% 左右, 且生长状况较好, 污染率也较低。而 4 月中旬以前和 6 月底以后所采集的枝条, 腋芽萌芽率和生长状况均很差。造成上述情况的原因可

能与外植体腋芽的发育程度和内源激素水平差异有关。4 月中旬以前, 茎段上的腋芽发育时间短, 分化不充分, 接种后萌芽率低; 随着采样时间推迟, 消毒时虽然延长了消毒时间(以不杀死外植体为原则), 但污染率逐渐增加。这是由于随着外植体的生长, 内生菌逐渐增加, 尤其在 9 月下旬后, 芽进入休眠状态, 且外被较厚的芽鳞, 使材料消毒和腋芽诱导困难, 即使能诱导出腋芽, 生长也较缓慢, 并变为畸形。

表 4  采样时间对杜仲茎段腋芽诱导和生长的影响

| Table 4  Effects of sampling times on axillary bud induction and growth of <i>E. uimoides</i> Oliv. stem |                                       |                   |                          |                         |                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 采样时间<br>Sampling times                                                                                   | 接种外植体数<br>No. of explants inoculation | 萌发数<br>No. of bud | 萌芽率/%<br>Rate of budding | 芽苗高/cm<br>Height of bud | 污染率/%<br>Rate of pollution |
| 03-20                                                                                                    | 40                                    | 13                | 32.20                    | 3.18                    | 0.00                       |
| 04-16                                                                                                    | 38                                    | 34                | 89.47                    | 7.20                    | 5.00                       |
| 05-29                                                                                                    | 36                                    | 33                | 91.67                    | 7.24                    | 10.00                      |
| 06-28                                                                                                    | 32                                    | 27                | 84.38                    | 7.27                    | 20.00                      |
| 08-02                                                                                                    | 28                                    | 15                | 52.00                    | 5.21                    | 30.00                      |
| 09-25                                                                                                    | 18                                    | 3                 | 16.67                    | 1.59                    | 55.00                      |
| 10-25                                                                                                    | 4                                     | 0                 | 0.00                     |                         | 90.00                      |

2 3  不同基本培养基对腋芽萌芽和生长的影响

由表 5 知, 高盐的 MS 培养基有利于杜仲茎段腋芽的萌发和芽生长, 萌芽率达 92.11%, 且芽苗节间较长。而低盐的几种培养基中, 腋芽萌发率和芽苗生长均不如 MS 培养基, 盐浓度最低的 White 培养基中腋芽萌发最少, 生长最差, 且玻璃化较严重。

的芽苗生根率为 32.5%, 而 White 培养基上则高达 57.5%, 且根较粗, 有 3~4 条分枝, 苗生长健壮。

表 5  基本培养基对杜仲茎段腋芽诱导和生长的影响

| Table 5  Effects of basic media on axillary bud induction and growth of <i>E. uimoides</i> Oliv. stem |                                       |                   |                          |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| 基本培养基<br>Basic media                                                                                  | 接种外植体数<br>No. of explants inoculation | 萌发数<br>No. of bud | 萌芽率/%<br>Rate of budding | 芽苗高/cm<br>Height of bud |
| MS                                                                                                    | 38                                    | 35                | 92.11                    | 7.92                    |
| B <sub>5</sub>                                                                                        | 36                                    | 27                | 75.00                    | 3.71                    |
| H                                                                                                     | 36                                    | 25                | 69.44                    | 4.43                    |
| White                                                                                                 | 40                                    | 16                | 40.00                    | 2.10                    |

表 6  NAA 对杜仲茎段腋芽增殖的影响

| Table 6  Effect of NAA on axillary bud growth of <i>E. uimoides</i> Oliv. stem |                                  |                         |                            |                           |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| NAA /<br>(mg · L <sup>-1</sup> )                                               | 平均丛芽数<br>No. of adventitious bud | 芽苗高/cm<br>Height of bud | 腋芽数<br>No. of axillary bud | 基部形成愈伤情况<br>Height of bud |
| 0.00                                                                           | 3.7                              | 7.09                    | 5.2                        | -                         |
| 0.01                                                                           | 8.3                              | 5.55                    | 6.0                        | +                         |
| 0.03                                                                           | 5.5                              | 4.08                    | 7.5                        | ++                        |
| 0.05                                                                           | 4.6                              | 3.21                    | 5.1                        | ++                        |
| 0.10                                                                           | 2.3                              | 2.14                    | 4.7                        | +++                       |

2 4  NAA 对继代增殖的影响

培养基中 BA 浓度为 0.5 mg/L 时, 不同浓度的 NAA 对杜仲幼芽的继代增殖影响较大。由表 6 知, 不加 NAA 时, 形成的丛芽苗数较少, 但芽苗节间较长, 生长健壮。NAA 浓度为 0.01 mg/L 时, 形成的丛芽苗数较多, 芽苗节间较短, 增殖系数最大。总之, NAA 浓度越大, 杜仲形成的芽苗节间越短, 苗高逐渐降低, 基部的愈伤组织块逐渐增大。

表 7  基本培养基对试管苗生根的影响

| Table 7  Effects of basic media on root induction |                                 |                    |                          |
|---------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------|
| 基本培养基<br>Basic media                              | 接种芽苗数<br>No. of bud inoculation | 生根数<br>No. of root | 生根率/%<br>Rate of rooting |
| MS                                                | 40                              | 0                  | 0.0                      |
| B <sub>5</sub>                                    | 40                              | 0                  | 0.0                      |
| H                                                 | 40                              | 13                 | 32.5                     |
| White                                             | 40                              | 23                 | 57.5                     |

2 5  基本培养基对试管苗生根的影响

由表 7 可知, MS 和 B<sub>5</sub> 培养基上的芽苗未能生根; H 和 White 培养基上的芽苗在 10~15 d 时开始生根, 呈乳白色, 在培养基中的根部根毛较少, 而暴露空气中的根部根毛浓密。30 d 时, H 培养基上

3  讨  论

在组织培养中, 常根据培养基配方中含盐量的不同将培养基分为 4 大类<sup>[7]</sup>: 第一类为富集元素平衡培养基, 即高盐培养基; 第二类为高硝酸钾培养基; 第三类为中等无机盐含量的培养基; 第四类为低无机盐培养基。在组培中, 要根据外植体本身生理状态的不同选用不同类型的培养基。在杜仲快繁研究中, 关于腋芽诱导和生根培养基基本培养基的筛选还

未见报道。本试验结果表明,杜仲茎段腋芽在高盐的 MS 培养基上的萌发和生长状况最好,随着培养基盐浓度的降低,腋芽萌发率和芽生长均呈下降趋势,低盐的 White 培养基最不利于腋芽的萌发和生长,这与笔者等<sup>[8]</sup>在不同培养基对杜仲愈伤组织诱导和生长的研究中所得结论类似。陈正华<sup>[9]</sup>总结了 97 种木本植物的快繁培养基,发现芽诱导时有 70 种植物采用了 MS 及修改的高盐培养基。本研究的生根培养试验结果表明,中、低盐的 H 和 White 培养基有利于生根培养,高盐的 MS 不利于生根,这与一般植物生根培养时需要低盐浓度培养基的结论一致。

在培养基中,常根据培养材料和培养目的不同而添加一种或几种植物生长调节物质。以杜仲茎段为外植体诱导愈伤组织时,在培养基中加入 1.0 mg/L NAA 和 0.3~0.5 mg/L BA 的组合,或加入 0.10~0.50 mg/L BA 和 0.5 mg/L BA 的组

合<sup>[10]</sup>,即高生长素与低细胞分裂素的组合,有利于愈伤组织的形成。同样以杜仲茎段为外植体,诱导腋芽伸长进行快繁时,谷文英等<sup>[11]</sup>认为,培养基中细胞分裂素与生长素的质量比为 10:1 时腋芽萌发率最高,达 100%,这与本研究含 0.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA 和 (0.10~0.50) mg/L BA + 0.5 mg/L BA 的培养基中腋芽萌发率最高的结论相近,即高细胞分裂素与低生长素的组合,有利于腋芽的萌发和伸长。据文献<sup>[11]</sup>报道,在 1.0 mg/L BA 分别与 NAA, BA, IAA 3 种生长素各 0.1 mg/L 的组合中,腋芽萌发率均达到 100%,但因未设置 3 种生长素的浓度梯度试验,因而未能表现出三者的活性差异。而本研究在达到最高芽萌发率时,设 BA 浓度为 0.5 mg/L,并设置了 NAA 和 BA 的不同浓度梯度试验,体现了不同种类生长素的活性差异。

#### [参考文献]

- [1] 张康健, 张 檀. 中国神树——杜仲[M]. 北京: 经济管理出版社, 1997. 149- 151.
- [2] 赵玉英, 耿 权. 杜仲化学成分研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 46- 52.
- [3] 李家实, 阎玉凝. 杜仲皮与叶化学成分的初步研究[J]. 中药通报, 1996, 11(8): 41- 42.
- [4] Hayman E P, Yokoyama H, Bai K Z. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* Oliv. by 2-diethylaminoethyl-3, 4-dichlorophenyl ether[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78- 82.
- [5] 张康健, 苏印泉, 张 檀, 等. 中国杜仲优良品种选育[M]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2002. 1- 3.
- [6] Nakazawa Y, Toda Y. *Eucommia ulmoides* Oliv.: in vitro culture and the production of iridoids, lignans, and other secondary metabolites. Biotechnology in Agriculture and Forestry[J]. Medicinal and Aromatic Plants, 1995, 33: 215- 231.
- [7] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 30- 32.
- [8] 李 琰, 张存莉, 严忠海, 等. 不同培养基对杜仲愈伤组织诱导和生长的研究[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(3): 37- 39.
- [9] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 24.
- [10] 李 琰, 张朝红, 崔安安. 激素对杜仲幼茎愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(1): 57- 60.
- [11] 谷文英, 裴德清, 朱登云, 等. 杜仲茎段培养的初步研究[J]. 莱阳农学院学报, 1999, 16(1): 6- 9.

## Study on tissue culture micropropagation of *Eucommia ulmoides* Oliv.

L I Yan<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, XIN Zhuan-xia<sup>2</sup>, WANG Ya-jun<sup>3</sup>

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

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

3 Centre of Agriculture Technology Extension of Weinan, Weinan, Shaanxi 714000, China)

**Abstract:** The influences of axillary bud induction on growth, plant growth regulator's concentration on multiplication of adventitious bud and basic media on root induction through plant growth regulators were studied, and the basic media, sampling times of *Eucommia ulmoides* Oliv were selected. The results showed that favorite time for explant collection was from the middle ten days of April to the last ten days of June. MS as the basic medium supplemented with 0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA or 0.1 mg/L BA + 0.5 mg/L BA was beneficial for axillary bud induction and growth. The number of adventitious bud and the rate of multiplication were best on MS supplemented with 0.5 mg/L BA + 0.01 mg/L NAA. Rooting rate arrived 57.5% on White medium.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; tissue culture; micropropagation technology