

杜仲愈伤组织诱导的研究*

李 琰¹, 张朝红², 崔宏安¹, 丁虹茹³

(1 西北农林科技大学 生命科学学院; 2 园艺学院; 3 林学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用杜仲优树的幼叶、嫩茎及种子无菌苗的下胚轴、子叶、真叶、根为外植体, 以B₅和MS为基本培养基, 添加1.0 mg/L NAA和0.3 mg/L BA, 进行了不同外植体种类、外植体大小、试验接种方式、外植体采样时间、光照条件、培养基pH值共6种因素对杜仲愈伤组织诱导的影响试验。结果表明, 在杜仲愈伤组织诱导中, 田间材料幼叶取样时间以3月中旬为好, 幼茎的取材时间以4月中旬以前最佳; 无菌苗以下胚轴、子叶、真叶诱导效果较好; 诱导愈伤组织的培养基pH值以6.3较适宜; 培养室的光照条件以12 h光照、12 h暗培养较有利于愈伤组织诱导; 茎段的大小和接种方式以0.7 cm长度横放方式诱导效果较好。

[关键词] 杜仲; 组织培养; 愈伤组织诱导

[中图分类号] S722.3⁺7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0153-05

杜仲(*Eucammia ulmoides* Oliv.)为我国特有经济林木, 也是一种名贵的药用植物, 具有补肾壮腰和抑制肿瘤等作用^[1,2], 特别是对血压有双向调节作用。杜仲的次生代谢产物松脂素二糖甙、桃叶珊瑚甙、绿原酸等为降血压的主要成分, 丁香素二葡萄糖甙还具有防止性功能低下、增强记忆力、增强运动耐久力、安定镇静、抗氧化、降低胆固醇和中性脂肪等功效^[3,4]。杜仲还是一种胶源植物, 杜仲胶具有良好的绝缘性、抗酸碱性、热塑性和形状记忆等特点, 因而受到世人的普遍重视^[5-7]。但是, 杜仲树生长缓慢, 且剥皮对树的生长有影响^[8]。为了更有效地保护杜仲种质资源, 采用组织培养技术, 在组织和细胞水平上促成杜仲有效次生代谢产物及杜仲胶的生物合成, 就可以在不受田间条件制约的情况下, 进行以生产杜仲次生代谢产物为目的的细胞培养。而大规模的细胞培养, 高产细胞系的筛选, 都必须以诱导愈伤组织为基础。本试验就杜仲愈伤组织诱导时外植体的选择及最佳取材时间、接种方式等进行了探讨, 以期为进一步工作的顺利开展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 田间材料 采集西北农林科技大学西林校区杜仲优树资源圃杜仲嫩茎及叶。茎切成3~4 cm

长的小段, 叶切成1 cm宽长条, 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3~4次, 1 g/L HgCl₂消毒8 min, 无菌水冲洗4~5次后备用。

1.1.2 无菌苗培育 选用当年饱满种子, 浸泡24 h后剥去种皮用清水反复冲洗, 体积分数70%酒精消毒1 min, 无菌水冲洗3~4次, 1 g/L HgCl₂消毒15 min, 无菌水冲洗4~5次, 接入1/2 MS培养基中, (25±2) 自然光照培养, 萌发成苗30 d后备用。

1.2 方法

将幼茎切成长度1.0 cm, 分别采用横放、竖放、纵切平放(切面向下)3种接种方式进行不同接种方式对愈伤组织的诱导试验; 将茎分别切成长度0.3, 0.5, 0.7, 1.0 cm, 采用横放的接种方式进行不同长度外植体对愈伤组织诱导的试验; 分别于03-20, 04-10, 04-30和05-20采集梢部幼叶和幼茎进行不同外植体采集时间对愈伤组织的诱导试验, 将幼茎切成0.7 cm长段, 幼叶切成0.5 cm×0.5 cm的方块接种; 不同外植体对愈伤组织诱导试验以种子无菌苗的真叶、子叶、下胚轴、根为材料, 将真叶、子叶切成0.5 cm×0.5 cm方块, 下胚轴和根切成0.7 cm长的段进行接种; 光照条件(连续24 h光照、12 h光照、12 h暗光; 连续24 h暗光)和pH值(4.8, 5.3, 5.8,

* [收稿日期] 2002-11-05

[基金项目] 国家“十五”攻关项目(2001BA502B0403)

[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研究。

6.3, 6.8) 对愈伤组织诱导试验将幼茎切成 0.7 cm 接种。培养基 pH 用 PHS-2C 型酸度计测量。每个处理接种 20 瓶, 每瓶接种 2 个外植体。

1.3 培养基和培养条件

无菌苗的真叶、子叶、下胚轴、根和叶片愈伤组织诱导采用 $B_5 + 1.0 \text{ mg/L NAA} + 0.3 \text{ mg/L BA}$; 茎段诱导愈伤组织采用 $MS + 1.0 \text{ mg/L NAA} + 0.3 \text{ mg/L BA}$ 。以上培养基中加入蔗糖 30 g/L , 用琼脂 6 g/L 固化, 高压灭菌前将 pH 值调至 6.3。培养室温度 (25 ± 2) , 暗光培养时将培养瓶放于不照光培养架上并用黑布覆盖, 除光照条件试验外, 其余均采用光照 12 h/d , 光照强度 $1000 \sim 1500 \text{ lx}$, 培养至可以转接时, 统计愈伤组织诱导率。

2 结果与分析

2.1 外植体大小与接种方式对愈伤组织诱导和生长的影响

由表 1 可知, 不同接种方式的出愈率明显不同, 纵切平放的接种方式出愈率最低, 长势也比较差, 而横放、竖放的出愈率差异不大, 均在 90% 以上, 但横放愈伤组织从两端长出, 相对于竖放的一端长出来, 愈伤组织量更大。不同长度外植体横放时出愈率没有明显差异, 但其生长势及转接后愈伤组织的生长情况有明显差异(表 2), 以外植体较长时诱导的愈伤组织生长为好, 长度 0.7~1.0 cm 差异不明显, 但为了节约材料和空间, 以 0.7 cm 较好。

表 1 接种方式对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 1 Effects of ways of implanting on callus induction and growth

接种方法 Implanting method	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus
横放 Horizontally implanting	40	38	95.00	长势较好, 愈伤从两端长出 Good, callus forming in two edges
竖放 Vertically implanting	38	35	92.11	长势较好, 愈伤只从一端长出 Good, callus forming only from one edge
纵切平放 Horizontally implanting after radially cut	36	19	52.78	边缘少量长出后发褐 Forming little callus from edge, soon becoming brown

表 2 不同长度外植体对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 2 Effects of different length explants on callus induction and growth

外植体长度/cm Shoot length	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus	继代后生长情况 Growth status
0.3	40	40	100.00	出愈较早, 但很快发褐 Callus forming early, soon becoming brown	差 Bad
0.5	38	36	94.74	出愈较早, 愈伤组织块小 Callus forming early, but little	一般 Middle
0.7	38	37	97.37	生长旺盛, 愈伤组织块大 Callus grow well and big	好 Good
1.0	40	40	100.00	生长旺盛, 愈伤组织块大 Callus grow well and big	好 Good

2.2 外植体采样时期对愈伤组织诱导的影响

尽管均采梢部相同部位的幼叶和幼茎, 但随着采样时间的推迟, 茎和叶诱导愈伤组织的能力明显下降(表 3)。03-20 的茎和叶的出愈率均为 100.00%, 出现愈伤组织所需时间分别为 4 和 9 d。05-20 时, 茎出愈率下降到 88.23%, 出愈时间 12 d, 较 03-20 推迟了 8 d; 而叶不能诱导出愈伤组织。从出愈时间、出愈率和培养天数来看, 同时期的茎比叶更容易诱导出愈伤组织。不同时期采样诱导出的愈伤组织的生长和继代后生长情况均以 03-20~04-10

为好, 即 4 月中旬以前外植体愈伤组织生长好。因此, 以自然生长的材料进行杜仲愈伤组织诱导时, 采样时间以 4 月中旬以前为好。

2.3 外植体种类对愈伤组织诱导的影响

杜仲种子萌发为子叶出土型, 在无菌萌发 30 d 后具 2~3 片真叶时, 选用真叶、子叶、下胚轴和根 4 种材料进行试验, 前 3 种均诱导出愈伤组织, 出愈率无明显差别(表 4), 但出愈时间、愈伤组织颜色、生长情况差别很大, 以下胚轴最易诱导出愈伤组织。根接种 3 d 后开始膨大, 形成新的侧根, 但培养 30 d 仍

未出现愈伤组织

表 3 外植体不同采集时间对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of sampling times for explants collection on the callus induction

外植体种类 Type of explant	时间 (月-日) Date	外植体数 No. of explants	出愈时间/d Days the callus beginning	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	培养时间/d Days of culture	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus	愈伤组织颜色 Colour of the callus
茎 Shoot	03-20	40	4	40	100.00	12	+++++	奶油色, 有光泽 Creamy, glossy
	04-10	38	6	37	97.37	20	+++++	奶油色, 有光泽 Creamy, glossy
	04-30	36	8	34	94.44	25	++++	淡黄色, 无光泽 Light-yellow, fading
	05-20	34	12	30	88.23	32	++	淡黄色, 无光泽 Light-yellow, fading
叶 Leaf	03-20	40	9	40	100.00	25	+++++	淡绿色, 有光泽 Light-green, glossy
	04-10	37	16	35	94.59	32	+++++	淡黄色, 无光泽 Light-yellow, fading
	04-30	38	20	20	52.63	40	+	淡黄色, 无光泽 Light-yellow, fading
	05-20	36		0	0.00			外植体逐渐干枯 Explant becoming blasting

注: 培养时间指愈伤组织生长到可用于转接的时间; +. 生长差, ++. 生长一般, +++ . 生长较好, ++++. 生长好, +++++. 生长最好。下表同。

Note: Days when the callus begin to subculture; + refers to worse growth, ++ refers to general growth, +++ refers to good growth, ++++ refers to better growth, +++++ refers to the best growth. The following tables are just the same.

表 4 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of different explants on the callus induction

外植体种类 Type of explant	接种外植体数 No. of explants inoculation	出愈时间/d Days the callus beginning	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	培养时间/d Days of culture	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus	愈伤组织颜色 Colour of the callus
下胚轴 Hypocotyl	40	6	40	100.00	14	+++++	奶油色, 有光泽 Creamy, glossy
子叶 Cotyledon	40	10	38	95.00	25	++++	淡黄色, 有光泽 Light-yellow, glossy
真叶 Leaf	40	14	40	100.00	28	++++	淡绿色, 有光泽 Light-green, glossy
根 Root	40		0	0.00			

2.4 光照条件对愈伤组织诱导的影响

3 种光照形式的愈伤组织诱导率均较高(表 5), 但愈伤组织颜色及继代后生长情况差异较大, 12 h 光照, 12 h 暗培养处理的愈伤组织呈奶油色, 有光泽, 生长旺盛, 继代培养后生长较好; 连续暗光处理

诱导出的愈伤组织在量上和 12 h 光照处理差异不大, 但其愈伤组织呈乳白色, 没有光泽, 继代后在暗光处理下几乎不生长, 在 12 h 光照处理下, 会逐渐变得有光泽, 但生长缓慢; 24 h 全光照处理诱导的愈伤组织, 无光泽, 继代后很快干枯死亡。

表 5 光照条件对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of light on callus induction

光照条件 Condition of light	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	愈伤组织颜色 Colour of the callus	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus	继代后生长情况 Subculture growth status
连续 24 h 光照 Light	38	37	97.37	淡黄色, 无光泽 Light-yellow, fading	+++	继代后干枯 Becoming blasting after subculture
h 光照, 12 h 暗光 12 light-12 dark	36	36	100.00	奶油色, 有光泽 Creamy, glossy	+++++	继代后生长旺盛 Growing better after subculture
连续 24 h 暗光 Dark	40	40	100.00	乳白色, 无光泽 Milk-white, fading	+++++	继代后逐渐产生光泽, 但生长缓慢 Becoming glossy and growing slowly after subculture

2.5 培养基 pH 值对愈伤组织诱导的影响

由表 6 可知,不同 pH 值虽然对杜仲愈伤组织诱导率的影响差异不大,均在 90% 以上,但在愈伤组织生长量上差异较明显,pH 6.3 的愈伤组织块直

径为 pH 4.8 的 3 倍以上,pH 6.8 时,愈伤组织生长又受到抑制,故杜仲愈伤组织诱导培养基 pH 值以 6.3 较为合适。

表 6 不同 pH 值对愈伤组织诱导的影响

Table 6 Effects of pH on callus induction

培养基 pH 值 Medium pH	接种外植体数 No. of explants inoculation	愈伤组织块数 No. of callus induction	出愈率/% Percentage of callus induction	愈伤组织生长情况 Growth status of the callus
4.8	34	34	100.00	++
5.3	38	36	94.74	+++
5.8	40	39	97.50	++++
6.3	38	38	100.00	+++++
6.8	39	37	94.81	+++

3 讨 论

愈伤组织的诱导和增殖主要受外植体本身、培养基和培养条件 3 方面因素的共同影响,其中外植体是人们最难以控制的,这与外植体本身的生长发育和生理生化状态有关,因而对外植体的筛选是组培中很关键的技术。在本研究中,杜仲无菌苗作为外植体出愈率高,愈伤组织生长旺盛,不受季节影响,尤其以下胚轴作外植体时,诱导率和生长状况最佳。但一般杜仲种子发芽率较低,几乎不到 30%^[9],且幼苗培养需 30 d 左右,只有在外界茎叶采集比较困难或不适合培养时,才可选择。以幼叶作为外植体时,在 3 月中旬幼叶刚展开时采叶比较好,污染小,便于消毒,出愈率也高,从接种到转接只需 25 d 左右。4 月中旬以后虽然叶量较大,但诱导率下降,培养时间延长,愈伤组织继代后长势也较差。而对于

茎,在 3 月中旬采集时,虽然诱导率高,培养时间仅需 12 d 就可转接,愈伤组织生长较好,但大量采集会影响树的生长,所以到 4 月中旬幼茎伸长后采集比较合适,过晚虽然采的也是先端幼嫩部分,但污染率高,诱导率下降,诱导出的愈伤组织也不利于继代。

培养基的 pH 值可通过影响培养物对营养元素的吸收、呼吸代谢、DNA 合成、植物激素进出细胞等直接或间接地影响愈伤组织形成。培养基的 pH 值因培养材料的来源不同,大多数植物都要求在 pH 5.6~5.8 的条件下进行培养,但植物不同,其最适 pH 也不一样,如芥菜胚要求 pH 为 5.4~7.5,番茄为 6.5^[10]。在杜仲愈伤组织诱导中发现,pH 在 4.8~6.8 的诱导率差异不大,均在 90% 以上,但对愈伤组织的长势影响差异较大,只有 pH 6.3 时愈伤组织长势最好,过高或过低都起抑制作用。

[参考文献]

- [1] 周政贤. 中国杜仲[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1993: 1- 3
- [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, 1986, 11(8): 41- 42
- [4] 唐建军, 张禄源, 何鸣筱. 杜仲的研究与应用进展[J]. 植物学通报, 1998, 15(6): 47- 51
- [5] 严瑞芳. 杜仲胶研究新进展[J]. 化学通报, 1991, (1): 1- 6
- [6] 严瑞芳. 论杜仲胶的研究开发[A]. 张康健. 中国杜仲研究[C]. 西安: 陕西科技出版社, 1992: 19- 23
- [7] Hayman E P, Yokoyama H, Bai K Z. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucammia umoides* Oliv. By 2-diethylaminoethyl-3, 4-dichlorophenylther[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78- 82
- [8] 李正理, 崔克明. 杜仲再生树皮的不正常发育[J]. 植物学报, 1984, 26(3): 252- 257
- [9] 王秀松, 胡东波, 詹庆才. 杜仲愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北林学院学报, 1994, 9(4): 32- 35
- [10] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 45- 46

Study on callus induction of *Eucammia ulmoides* Oliv.

L IYan¹, ZHANG Zhao-hong², CUI Hong-an¹, DING Hong-ru³

(1 College of Life Sciences; 2 College of Horticulture; 3 College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In callus induction of *Eucammia ulmoides* Oliv., we used shoot, leaf of superior trees and hypocotyl, cotyledon, leaf, root of the sterile seedling as explants. Factors affecting callus induction of the explants of type, length, ways of implanting, sampling time, light and pH were studied on MS and B5 medium supplemented with 1.0 mg/L NAA and 0.3 mg/L BA. The results showed that, middle of March proved to be a favorite time for immature leaves as explants. Before middle April was the time suitable for shorts. Hypocotyl, cotyledon and leaf of sterile seedling were best. The best pH for the callus induction was 6.3. 12 hour light and 12 hour dark was benefit for the callus induction. 0.7 cm shoot explants implanted horizontally in the medium was best.

Key words: *Eucammia ulmoides* Oliv; tissue culture; callus induction

欢迎订阅 2004 年《中国农村小康科技》科普月刊

《中国农村小康科技》是由中国科协主管、中国农学会主办的全国唯一以宣传农村小康建设为目的的科普期刊,是引导农民致富和促进农村小康建设的桥梁与纽带。办刊宗旨为:纵论小康政策,弘扬小康文化,展示小康模式,推广小康产业,发展小康经济,推进小康进程。办刊思路为:立足新农村,面向新产业,服务新农民,建设新小康。主要内容包括:准确报道中央关于全面建设农村小康社会的方针政策与工作部署;大力宣传全国农村小康建设的先进典型、先进人物、先进事迹,交流农村小康建设的工作经验;及时推出全国农村小康建设的新经验、新思路、新动态、新进展;广泛介绍全国农村小康建设的发展模式,经营之道;积极推广与农村小康建设有关的新技术、新产品和最新科技成果;大力弘扬先进的小康文化,全面展示社会主义新农村和新农村的精神风貌。

本刊的读者对象主要为各级政府主管农业农村工作的领导干部,各级小康办、扶贫办的工作人员,从事小城镇建设、农村小康建设和农业科技示范园区的推广及研究人员,农业产业化龙头企业,农民科技示范户、专业户,乡村种养大户等。

《中国农村小康科技》为月刊,激光照排,彩色封面,印刷精美,每月 5 日出版,国内外公开发行,国内统一刊号为 CN 11-3871/N,大 16 开本,48 页,每期单价 3.80 元,全年 12 期,合计 45.60 元。本刊全国邮发代号 18-161,如错过邮局订阅,可向本刊编辑部直接订阅。订阅者邮局汇款:100026,北京市朝阳区麦子店街 20 号(农业部北办公区)中国农学会编辑出版部。联系电话:010-64194480;传真:010-64194705。银行转帐:开户银行:农行北京分行朝阳支行营业部,账号:040101040003509,户名:中国农学会。