

激素对杜仲幼茎愈伤组织诱导及生长的影响^{*}

李 琰¹, 张朝红², 崔宏安¹

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

[摘 要] 以MS为基本培养基, 添加不同浓度的2, 4-D, NAA, BA, KT或其组合, 研究杜仲嫩茎愈伤组织的诱导及生长情况。结果表明, 3种生长素均可100%诱导出愈伤组织, 以0.5 mg/L 2, 4-D, 0.5~1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA效果较好; 2, 4-D和BA及KT的组合均不利于愈伤组织诱导, 低浓度的BA与NAA和BA组合能促进愈伤组织的诱导和生长, 其中1.0 mg/L NAA+0.3~0.5 mg/L BA, 1.0 mg/L BA+0.5 mg/L BA诱导出的愈伤组织生长旺盛, 富有光泽, 适合进一步继代培养, 而高浓度则起抑制作用; KT的加入对愈伤组织的诱导及生长均起抑制作用。

[关键词] 杜仲; 组织培养; 愈伤组织诱导; 激素

[中图分类号] S722.3⁺7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)01-0057-04

在药用植物组织培养研究中, 常发现培养细胞中含有各种有药用价值的代谢产物, 其中有些是利用微生物或化学方法不能合成的, 有些则是在整体植株中含量甚微或植物资源本身十分缺乏, 如呋喃香豆素衍生物Visadin在种子愈伤组织中的含量为0.1%~0.31%, 而在种子中含量仅为0.01%~0.06%^[1]。因而利用植物细胞培养技术生产有用的次生代谢产物已成为开发药用植物资源的重要途径^[2]。杜仲(*Eucnemia ulmoides* Oliv.)为重要的药用植物, 被认为是世界上最高级的降压药物^[3~5]。杜仲的药用成分绿原酸、桃叶珊瑚甙、京尼平甙、京尼平甙酸均为次生代谢产物^[6], 其在植株中含量低, 因而利用组织培养筛选高产细胞株系和进行有用成分的生产, 是一条可行方法, 大规模细胞培养必须以愈伤组织为材料。本试验主要就几种常用的植物生长素和细胞分裂素对杜仲愈伤组织诱导和生长的影响进行了研究, 以期对杜仲大规模细胞培养生产次生代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

供试材料为西北农林科技大学西林校区杜仲优树资源圃6年生杜仲优树L₃₃, 2002-03-20和2002-04-10采当年新生幼茎并迅速带回实验室后, 修去叶片, 切成3~4 cm小段, 用体积分数1%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%乙醇消毒40 s, 无菌水冲洗3~4次, 1 g/L HgCl₂消毒8 min, 无菌水冲洗4次, 无菌条件将其切成0.7 cm长的小段, 接种于培养基上。以MS为基本培养基, 加入蔗糖30 g/L, 用琼脂6 g/L固化, pH调至6.3, 分别添加不同浓度的2, 4-D, NAA, BA, KT等激素, 每处理接种20瓶, 每瓶接种2个外植体。在温度(25±2)℃, 光照12 h/d, 光照强度1 000~1 500 lx的培养室内培养20 d后, 调查出愈率。

2 结果与分析

2.1 3种生长素对愈伤组织诱导和生长的影响

2.1.1 2, 4-D浓度的影响 培养3 d后, 各处理幼茎两端开始膨大变白, 6 d时大部分外植体开始从两端长出愈伤组织。对照的幼茎一直无明显变化, 也无愈伤组织产生。培养20 d时, 3种生长素各浓度处理的外植体出愈率、愈伤组织的生长情况和颜色已有明显差异。2, 4-D处理的培养基出愈时间比其他2种均早, 愈伤组织呈乳白色, NAA和BA处理的出愈时间基本一致。愈伤组织状况随激素浓度不同差异较大。在不同浓度的2, 4-D中(表1), 以0.5 mg/L的出愈率最高, 为100%, 所诱导的愈伤组织生长也最好。2, 4-D浓度过高或过低均不利于愈伤组织的诱导和生长。2, 4-D浓度为4.0 mg/L时, 已完全抑制外植体产生愈伤组织。

* [收稿日期] 2003-03-06

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA502B0403); 西北农林科技大学青年科研专项基金

[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组织培养研究。

表 1 不同浓度 2, 4-D 对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 1 Effects of 2, 4-D on callus induction and growth th

2, 4-D 浓度/ (mg · L ⁻¹) 2, 4-D concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
0	40	0	0.00		- -
0.1	40	37	89.25	乳白色, 无光泽 Milk-white, fading	++
0.3	38	36	94.74	乳白色, 有光泽 Milk-white, glossy	+++
0.5	40	40	100.00	乳白色, 有光泽 Milk-white, glossy	++++
1.0	38	34	89.47	乳白色, 有光泽 Milk-white, glossy	+++
2.0	40	19	47.50	乳白色, 无光泽 Milk-white, fading	++
4.0	36	0	0.00		-

注: - - . 有明显抑制作用; - . 有抑制作用; + . 生长差; ++ . 生长一般; +++ . 生长较好; ++++ . 生长好; +++++ . 生长最好。下表同。

Note: - - . obviously contained growth; - . contained growth; + . worse growth; ++ . generally growth; +++ . good growth; +++++ . better growth; ++++++ . the best growth. It is the same in the following tables

2.1.2 NAA 浓度的影响 NAA 在 2.0 mg/L 以下时, 出愈率均在 90% 以上, 各处理间无明显差异, 但愈伤组织出愈时间、颜色、大小和继代后生长差异较大(表 2)。NAA 在 0.1~0.5 mg/L 时, 愈伤组织虽然长势较好, 但颜色暗淡, 没有光泽, 继代后生长缓慢。NAA 1.0 mg/L 时, 愈伤组织生长较好, 呈奶油色, 发亮, 有光泽, 转接后长势较好。NAA 在 1.0

mg/L 以下诱导出愈伤组织的时间基本一致, 为 7 d。NAA 为 2.0 mg/L 时, 诱导率和长势均较好, 继代后生长一般, 但诱导愈伤组织所需要的时间较 1.0 mg/L 以下晚 2~3 d。NAA 为 4.0 mg/L 时, 出愈时间比 2.0 mg/L 晚 2 d, 在仅有少量愈伤组织长出后, 逐渐发褐, 死亡。

表 2 不同浓度 NAA 对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 1 Effects of NAA on callus induction and growth th

NAA 浓度/ (mg · L ⁻¹) NAA concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
0	40	0	0.00		- -
0.1	40	36	90.00	灰绿色, 无光泽 Grey-green, fading	+++
0.3	38	37	97.37	黄绿色, 无光泽 Yellow-green, fading	++++
0.5	40	40	100.00	黄绿色, 无光泽 Yellow-green, fading	++++
1.0	38	38	100.00	奶油色, 有光泽 Creamy, glossy	++++
2.0	40	37	89.25	灰白色, 无光泽 Grey-white, fading	+++
4.0	40	9	22.50	灰白色, 无光泽 Grey-white, fading	+

2.1.3 BA 浓度的影响 BA 浓度为 1.0 mg/L 时出愈率最高, 愈伤组织呈黄绿色, 有光泽, 生长较好(表 3)。当 BA 浓度为 2.0 mg/L 时, 虽然出愈率和长势也较好, 但愈伤组织暗淡, 没有光泽, 继代后

生长缓慢。BA 不同浓度的处理出愈时间与 NAA 相同, 浓度为 0~1.0 mg/L 时, 各处理愈伤组织出现时间为 7 d, 2.0 mg/L 较之晚 2~3 d, 4.0 mg/L 则较 2.0 mg/L 晚 2 d。

表 3 不同浓度 BA 对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 3 Effects of BA on callus induction and growth th

BA 浓度/ (mg · L ⁻¹) BA concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
0	40	0	0.00		- -
0.1	40	7	17.50	灰白色, 无光泽 Grey-white, fading	+
0.3	38	11	28.95	灰绿色, 无光泽 Grey-green, fading	+
0.5	40	28	70.00	灰绿色, 无光泽 Grey-green, fading	++
1.0	40	40	100.00	黄绿色, 有光泽 Yellow-green, glossy	+++
2.0	38	35	92.11	灰白色, 无光泽 Grey-white, fading	+++
4.0	40	8	20.00	灰白色, 无光泽 Grey-white, fading	+

2.2 生长素和细胞分裂素交互作用对愈伤组织诱导和生长的影响

2.2.1 2, 4-D 与 BA 和 KT 交互作用的影响 在

0.5 mg/L 的 2, 4-D 中分别加入不同浓度的 BA 和 KT 时, 随着添加的细胞分裂素浓度的增加, 愈伤组织的诱导率明显下降, 诱导的愈伤组织长势也逐渐

衰退(表 4), 在 BA 和 KT 达 2 0 mg/L 时, 已完全抑制了愈伤组织的形成。

表 4 2, 4-D 与 BA, KT 交互作用对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 4 Effects of interaction of 2, 4-D and BA, KT on the callus induction and growth

激素浓度/(mg · L ⁻¹) Phytohormones concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
0.5 2, 4-D	40	40	100.00	++++
0.5 2, 4-D + 0.1 BA	40	38	95.00	+++
0.5 2, 4-D + 0.3 BA	38	30	78.95	++
0.5 2, 4-D + 0.5 BA	38	19	50.00	+
0.5 2, 4-D + 1.0 BA	36	2	5.56	-
0.5 2, 4-D + 2.0 BA	40	0	0.00	--
0.5 2, 4-D + 0.1 KT	40	36	90.00	++
0.5 2, 4-D + 0.3 KT	38	27	71.05	+
0.5 2, 4-D + 0.5 KT	40	19	47.50	+
0.5 2, 4-D + 1.0 KT	40	4	10.00	-
0.5 2, 4-D + 2.0 KT	40	0	0.00	--

2.2.2 NAA 与 BA 和 KT 交互作用的影响 在 NAA 为 1.0 mg/L 时, 加入低浓度 BA 对愈伤组织诱导率影响不大, 但有利于其生长(表 5)。当 BA 为 0.1 和 0.3 mg/L 时, 愈伤组织生长旺盛, 呈奶油色, 富有光泽, 生活力强; BA 为 1.0 mg/L 时, 愈伤组织的诱导和生长明显受到抑制; BA 为 2.0 mg/L 时, 愈伤组织有 50% 的出愈率, 但长势较差, 继代后很快枯死。加入 KT 对愈伤组织的诱导和生长有明显的抑制作用, 且浓度越大, 抑制作用越强。当 KT 为 1.0 mg/L 时, 已完全抑制了茎段愈伤组织的形成。

表 5 NAA 与 BA, KT 交互作用对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 5 Effects of interaction of NAA and BA, KT on the callus induction and growth

激素浓度/(mg · L ⁻¹) Phytohormones concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
1.0 NAA	38	38	100.00	++++
1.0 NAA + 0.1 BA	40	40	100.00	++++
1.0 NAA + 0.3 BA	40	40	100.00	++++
1.0 NAA + 0.5 BA	38	38	100.00	++++
1.0 NAA + 1.0 BA	38	30	78.95	+++
1.0 NAA + 2.0 BA	38	19	50.00	+
1.0 NAA + 0.1 KT	40	28	70.00	++
1.0 NAA + 0.3 KT	36	18	50.00	+
1.0 NAA + 0.5 KT	40	8	20.00	+
1.0 NAA + 1.0 KT	38	0	0.00	-
1.0 NAA + 2.0 KT	40	0	0.00	--

表 6 BA 与 BA, KT 交互作用对愈伤组织诱导和生长的影响

Table 6 Effects of interaction of BN and BA, KT on the callus induction and growth

激素浓度/(mg · L ⁻¹) Phytohormones concentration	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	生长情况 Growth status of the callus
1.0 BA	38	38	100.00	+++
1.0 BA + 0.1 BA	40	40	100.00	++++
1.0 BA + 0.3 BA	38	38	100.00	++++
1.0 BA + 0.5 BA	40	40	100.00	++++
1.0 BA + 1.0 BA	38	23	60.53	++
1.0 BA + 2.0 BA	36	7	19.44	+
1.0 BA + 0.1 KT	36	29	80.56	+++
1.0 BA + 0.3 KT	38	27	71.05	++
1.0 BA + 0.5 KT	40	16	40.00	+
1.0 BA + 1.0 KT	40	6	15.00	-
1.0 BA + 2.0 KT	40	0	0.00	--

2.2.3 BA 与 BA 和 KT 交互作用的影响 用 1.0 mg/L BA 和细胞分裂素 BA 配合使用诱导愈伤组织, 当 BA 浓度为 0.1~0.5 mg/L 时, 出愈率均达 100%, 且愈伤组织块随着 BA 的增加而增大(表 6)。BA 浓度高于 1.0 mg/L 后, 明显抑制愈伤组织的产生和生长。BA 培养基中加入 KT 明显抑制愈伤组织的产生和生长, 浓度为 2.0 mg/L 的 KT 已能完全抑制愈伤组织的形成。

3 讨 论

一般来说, 高生长素和低细胞分裂素有利于愈

伤组织的诱导及生长^[7],但生长素和细胞分裂素是愈伤组织的形成所必需的。本试验中,单独使用 2,4-D,NAA 和 BA 3 种生长素均可 100% 诱导出愈伤组织,这说明杜仲幼茎中已含有一定量的细胞分裂素,在愈伤组织诱导的培养基中可不再加入,而不是诱导时不需要细胞分裂素。对 3 种生长素,杜仲幼茎的反应不同,即各生长素的活性不同。2,4-D 的最适浓度为 0.5 mg/L,出愈时间最早;BA 为 1.0 mg/L,其出愈时间和 NAA 相当,NAA 最适浓度为 0.5~1.0 mg/L,其范围较宽,而且诱导出的愈伤组织长势最好。2,4-D 诱导出的愈伤组织在继代培养中,继续使用 2,4-D 会导致愈伤组织枯死,转入含有 NAA 的培养基继代培养时愈伤组织生长启动较晚,第一代生长缓慢,尽管许多有关杜仲愈伤组织诱导的适宜配方中均含有 2,4-D^[8~11],考虑到外植体内源激素的多变性和 2,4-D 的致癌作用,在作

为药源的杜仲组织培养中,可以用 NAA 来代替 2,4-D。

不同种类激素对外植体的效应表现为相互促进或拮抗。本研究表明,在 NAA,BA 中加入低浓度的 BA,促进愈伤组织的诱导和生长,高浓度时起抑制作用;在 2,4-D 中加入细胞分裂素 BA 或 KT 后,均抑制愈伤组织的诱导和生长,这与前人有关 2,4-D 与 BA 的配合有利于杜仲愈伤组织形成的结论不同^[11];KT 与 3 种生长素配合使用均不利于杜仲愈伤组织的诱导和生长,这与唐建军等^[11]在加入 0.6 mg/L KT 不利于杜仲愈伤组织的诱导结论一致。表现为 3 种生长素与 KT、2,4-D 与 BA 在杜仲幼茎愈伤组织诱导方面的拮抗,而 NAA 和 BA 与 BA 间既有拮抗也有促进。一般认为,KT 抑制禾本科植物愈伤组织形成^[7],而在双子叶植物中很少报道。

[参考文献]

- [1] 王兴军,毕玉平.利用细胞培养进行药物生产的研究[J].生物技术,1997,7(1):1-3
- [2] Stockigt J,Obitz P,Falkenhagen H,et al Natural products and enzyme from plant cell cultures[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 97-109
- [3] 周政贤.中国杜仲[M].贵阳:贵州科技出版社,1993:1-3
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 张康健,张檀.中国神树——杜仲[M].北京:经济管理出版社,1997:149-151
- [7] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:30-32
- [8] 藏埔,杨根堂,胡桂珍,等.培养基与外植体对杜仲愈伤组织诱导率的影响[J].特产研究,1998,(1):1-4
- [9] 唐建军,张禄源,何鸣筱.杜仲愈伤组织诱导培养及其次生代谢调控研究[A].首届国际杜仲学术会议文集[C].北京:中国林业出版社,1999:128-130
- [10] 王俊丽,李会肖,陈丕铃.杜仲悬浮细胞系的建立及其生长特性研究[A].首届国际杜仲学术会议文集[C].北京:中国林业出版社,1999:133-135
- [11] 唐建军,陈欣,志水胜好.培养条件对杜仲愈伤组织形成及次生代谢过程的影响[J].浙江大学学报(工学版),2002,35(2):193-198

Effect of phytohormones on shoot callus induction and growth of *Eucammia ulmoides* Oliv

LI Yan¹, ZHANG Zhao-hong², CUI Hong-an¹

(1 College of Life Sciences; 2 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The shoots of *Eucammia ulmoides* Oliv. as explants, the MS as the basic medium supplemented with 2,4-D, NAA, BA, KT, the callus induction and growth of *E. ulmoides* Oliv. were studied. The results showed that, calluses were induced 100 per cent when explants were cultured on MS medium supplemented with three auxins 0.5 mg/L 2,4-D, 0.5-1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA was best for callus induction and growth. Combination of 2,4-D and BA or KT was worse than 2,4-D singly. Low concentrated BA and NAA or BA combinations had better effect than singly, but high concentrated BA was bad. The best combination of callus induction and growth was 1.0 mg/L NAA + 0.3-0.5 mg/L BA or 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L BA, whose calluses were growing quickly, glossy, suitable for subculture. KT was bad for callus induction and growth.

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