

培养基和植物激素对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的研究

上官新晨, 郭春兰, 蒋艳, 沈勇根, 吴少福, 胡冬南

(江西农业大学 植物资源开发与利用研究室, 江西 南昌 330045)

摘要:为建立青钱柳组培快繁体系以解决青钱柳资源贫乏问题,以青钱柳茎段和叶片为外植体,对影响青钱柳愈伤组织诱导的基本培养基、激素种类及浓度等关键因素进行了研究。结果表明,基本培养基以改良 MS 诱导茎段愈伤组织效果最好,诱导率可达 89.09%;MS 诱导叶片愈伤组织效果最好,诱导率可达 81.82%;2,4-D 比 NAA 能够较快地诱导外植体产生愈伤组织,其中 2.0 mg/L 2,4-D 诱导率最高,可达 88.57%,且形成愈伤组织多。2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L 的组合对青钱柳茎、叶诱导愈伤组织效果最佳,茎、叶诱导率分别可达 91.57% 和 86.14%,且诱导出的愈伤组织生长快。

关键词:青钱柳;培养基;植物激素;组织培养

中图分类号:S792.120.1 **文献标识码:**A

A Study on Effects of Media and Plant Hormones on Callus Induction of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Stems and Leaves in Vitro

SHANGGUAN Xin - chen, GUO Chun - lan,

JIANG Yan, SHEN Yong - gen, WU Shao - fu, HU Dong - nan

(Plant Resources Exploitation and Utilization Laboratory, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: The effects of the basic media, the types and concentrations of plant hormones on callus induction of *cyclocraya paliurus* stems and leaves were studied in order to develop the *Cyclocraya paliurus* tissue culture system and resolve the problem of resources scarceness. The results showed that improved MS medium was the best for stem callus induction, the induction rate was 89.09%; MS medium was the best for leaf callus induction, the induction rate was 81.82%; 2,4-D was more effective in quickening callus induction than NAA, the medium of 2.0 mg/L got the highest induction rate which was 88.57%, and the explants formed more callus. The explants had the highest induction rate of callus on the medium of improved MS + 2,4-D 2.0mg/L + 6-BA 1.0mg/L, the induction rate of stems and leaves were 91.57% and 86.14%, and the calluses grew fast.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; medium; plant hormone; tissue culture

收稿日期:2006-08-29

基金项目:国家科技部星火计划(2002EA730001)和江西省科技厅资助项目

作者简介:上官新晨(1962-),男,教授,博士,从事植物资源开发与利用研究,E-mail:shangguanxc_818@sina.com。

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja] 为胡桃科 (Juglandaceae) 青钱柳属落叶乔木^[1], 是我国特有的珍稀单属植物, 国家重点保护濒危植物之一, 又名摇钱树、麻柳、青钱李等, 广泛分布于我国广东、广西、福建、台湾、浙江、江苏、安徽、江西、湖南、陕西、四川、云南、贵州等省区的海拔 420 ~ 2 500 m 的山区、溪谷或石灰岩山地, 是我国重点保护的珍稀特有濒危植物之一^[2]。据《中国中药志要》记载, 青钱柳的树皮、树叶具有清热解毒、止痛功能, 可用于治疗顽癣, 民间用其叶制成保健茶饮已约 200 年历史。近期研究表明, 青钱柳除有上述功效外, 还具有降低血糖和血脂、抗肿瘤及抗衰老等多种功能, 是很好的天然保健食品资源^[3~8]。

但现有的青钱柳资源主要是一些零星分布的天然林, 且大多处于深山老林和自然保护区中, 故可供利用的资源非常有限, 这严重制约着青钱柳的研究开发进程。更为重要的是青钱柳的繁殖困难, 主要表现为: ①种子具有深休眠性, 属难萌发的“二年种子”, 这在时间上影响了其繁育进程; ②种子败育很严重, 因而人工育苗出苗率低; ③扦插繁殖难生根, 成活率很低^[9]。因此, 研究青钱柳的人工繁殖技术成为开发利用青钱柳的当务之急。组织培养技术, 是工厂化育苗的重要措施, 也是科研工作的重要辅助手段, 必将是今后的研究重点之一, 对今后青钱柳的开发利用和产业化经营具有十分重要的意义^[10]。

1 材料和方法

1.1 材料预处理

于晴天中午光照强烈时^[11]在江西农业大学科技示范园内采集 3 年生青钱柳幼树上当年嫩枝和嫩叶作试验材料。采集生长健壮、无病虫害的嫩枝条和嫩叶用流水冲去表面的脏物, 除去多余的茎叶, 将所需部分用体积分数为 1% 洗洁精溶液浸泡 5 min, 再用软刷轻轻刷洗或用棉球仔细清洗外植体表面, 除去附着在外植体表面的尘土和部分菌体, 并用自来水反复清洗后, 在流水中冲洗约 2 h。沥水后, 嫩枝条切成 1.0 ~ 1.5 cm 长的茎段, 叶切成 0.5 ~ 1.0 cm², 在无菌条件下用 $\varphi = 70\%$ 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 用 1 g/L 升汞溶液对茎段灭菌 8 ~ 10 min, 对叶片消毒 6 ~ 7 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次。然后在超净工作台上将茎段剪成 1.5 cm, 叶片剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的方块接种到预先配好的培养基中, 用聚乙烯封口膜包扎好, 每瓶接种 1 个外植体^[12], 每处理接种 55 瓶, 试验重复 3 次。

1.2 筛选基本培养基

在 MS、B₅、N₆、H、White、WPM、DKW 和改良 MS (除 CaCl₂ 全量外, 其它元素为全量的 3/4, 下同) 等 8 种基本培养基, 均附加 2.0 mg/L BA、0.5 mg/L NAA 和 10 g/L V_c, 用 1 mol/L 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节培养基 pH 5.8, 观察愈伤组织的生长情况。

1.3 植物激素对愈伤组织诱导的影响

利用改良 MS 培养基, 分别添加不同浓度的生长素 2, 4-D、NAA 和细胞分裂素 6-BA、KT, 其质量浓度除 2, 4-D 为 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L, 其余质量浓度为 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L, 并设空白对照。

1.4 培养条件

培养室温度 (25 ± 1) °C, 光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 培养基类型对愈伤组织诱导的影响

由表 1、表 2 可知, 茎段诱导效果好于叶片, 从不同培养基对茎段诱导效果来看, 改良 MS 诱导效果最好, 诱导率达 89.09%, 其次是 MS 和 WPM, White 最差; 从不同培养基对叶片诱导效果看, MS 最好, 诱导率达 81.82%, 其次是 WPM 和改良 MS, White 和 N₆ 最差。

2.2 生长素对愈伤组织诱导的影响

将嫩茎段和叶片分别接种到附加不同浓度生长素的改良 MS 培养基上进行单因素愈伤组织诱导试验, 2, 4-D、NAA 等对青钱柳茎、叶外植体愈伤组织的诱导率的结果见图 1、图 2。

表 1 不同基本培养基对茎段愈伤组织诱导的影响

Tab.1 Effects of different basic media on stem segment callus induction

培养基	接种外植体数	出愈数	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织颜色	愈伤组织生长状况
MS	55	46	83.64	浅绿色	疏松,颗粒状,+++
B5	55	35	63.64	浅褐色	疏松,颗粒状,++
N6	55	18	32.73	浅褐色	致密,+
H	55	20	36.36	浅褐色	水泽状,+
White	55	11	20.00	褐色	致密,+
DKW	55	32	58.18	乳白色	疏松,颗粒状,++
WPM	55	41	74.55	乳白色	疏松,颗粒状,+++
改良 MS	55	49	89.09	黄绿色	疏松,颗粒状,++++

注: + 生长差; ++ 生长一般; +++ 生长较好; ++++ 生长好。

表 2 不同基本培养基对叶片愈伤组织诱导的影响

Tab.2 Effects of different basic media on leaves callus induction

培养基	接种外植体数	出愈数	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织颜色	愈伤组织生长状况
MS	55	45	81.82	浅黄色	疏松,颗粒状,++++
B5	55	27	49.09	黄色	疏松,颗粒状,++
N6	55	5	9.09	浅褐色	水泽状,+
H	55	32	58.18	乳白色	疏松,颗粒状,++
White	55	6	10.91	浅褐色	致密,+
DKW	55	15	27.27	乳白色	疏松,颗粒状,+
WPM	55	36	65.46	黄色	疏松,颗粒状,+++
改良 MS	55	41	74.55	黄绿色	疏松,颗粒状,+++

注: + 生长差; ++ 生长一般; +++ 生长较好; ++++ 生长好。

由图 1 可以看出: 2,4-D 对青钱柳不同外植体均有强的诱导作用。在不同浓度的 2,4-D 中,以 2.0 mg/L 的出愈率最高,茎、叶出愈率分别为 88.57% 和 85.71%。从愈伤组织生长情况来看,在浓度为 2.0 mg/L 时,以茎和叶诱导的愈伤组织均具有很好的光泽,且生长状况最好;但是当浓度达到 4.0 mg/L 时愈伤愈伤组织生长迅速下降,大部分呈灰褐色;浓度为 5.0 mg/L 时,抑制外植体产生愈伤组织,所有产生的愈伤组织均呈褐色;因此 2,4-D 对青钱柳不同外植体的最佳浓度诱导为 2.0 mg/L 左右。

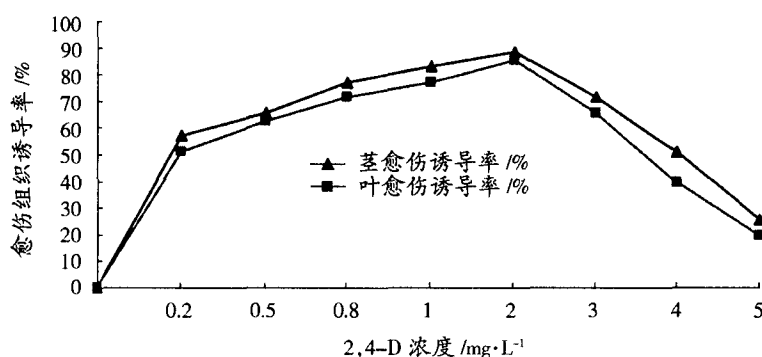


图 1 生长素 2,4-D 对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig.1 Effects of 2,4-D on the shoots and leaves callus induction

由图 2 可知,NAA 对青钱柳不同外植体也具有较强的诱导作用。在不同浓度的 NAA 中,以 1.0 mg/L 的出愈率最高,茎和叶分别为 85.71% 和 82.86%。实验观察中发现,NAA 的浓度在 0.2 ~ 0.5 mg/L 时,愈伤组织一般颜色暗淡且没有光泽,继代后生长缓慢;NAA 的浓度在 0.8 ~ 1.0 mg/L 时,愈伤组织生长好,颜色鲜艳,具有光泽,转接后长势好;浓度为 3.0 mg/L 以上时,愈伤组织长势差,生长缓慢,随后逐渐发褐,死亡;这是因为低浓度的生长素能促进生长,超过适宜浓度,由于生长素可诱导乙

烯的产生而干扰内部生理平衡,从而抑制生长,因此 NAA 对青钱柳不同外植体的最佳诱导浓度为 1.0 mg/L 左右。

2.3 生长素和细胞分裂素交互作用对愈伤组织诱导的影响

在单因素试验的基础上,将生长素 2,4-D 2.0 mg/L 和 NAA 1.0 mg/L 的最佳浓度分别与细胞分裂素 6-BA 以 $0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 \text{ mg/L}$ 等 7 个浓度对青钱柳茎段和叶片的愈伤组织诱导和生长进行交互试验,愈伤组织诱导情况见图 3 和图 4。

由图 3、图 4 可知,浓度为 2.0 mg/L 2,4-D 与 1.0 mg/L 6-BA 组合、 1.0 mg/L NAA 与 1.0 mg/L 6-BA 组合的出愈率均较高,前者茎、叶愈伤组织最高诱导率分别为 91.57% 和 86.14% ;后者茎、叶愈伤组织的最高诱导率分别为 85.24% 和 74.29% 。从生长情况来看, 2.0 mg/L 2,4-D 与 1.0 mg/L 6-BA 组合生长好,愈伤组织呈浅黄色,具有光泽,约 15 d 后,愈伤组织呈黄绿色,质地较紧密,此时的愈伤组织可作细胞培养的材料。在 6-BA 与 2,4-D 组合中,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织产生的量有所增加。当 6-BA 浓度在 3 mg/L 以上时,愈伤组织生长缓慢,逐渐变褐,其生长受到抑制。6-BA 浓度过低,就容易形成多核体阻止细胞分化,加速细胞衰老,逐渐死亡;而高浓度的 6-BA 将使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小,已形成的愈伤组织不能正常生长,逐渐变褐。相比之下,6-BA 与 NAA 组合诱导愈伤组织效果要略差。

在单因素试验的基础上,将生长素 2,4-D 和 NAA 的最佳浓度分别与

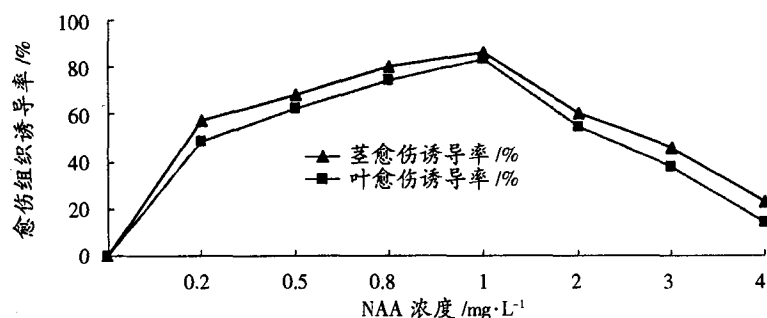


图 2 生长素 NAA 对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig. 2 Effects of NAA on the shoots and leaves callus induction

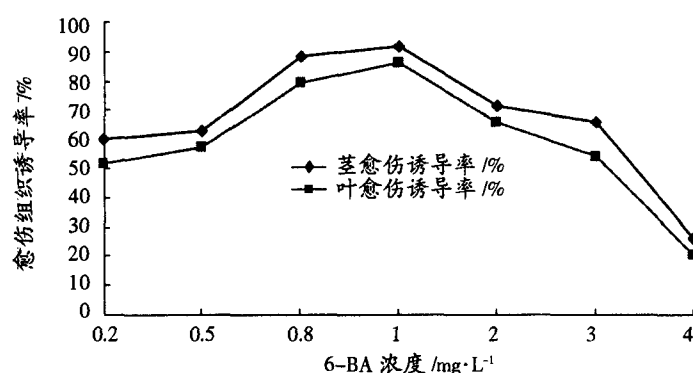


图 3 2,4-D 和 6-BA 交互作用对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig. 3 Effects of interaction of 2,4-D and 6-BA on the shoots and leaves callus induction

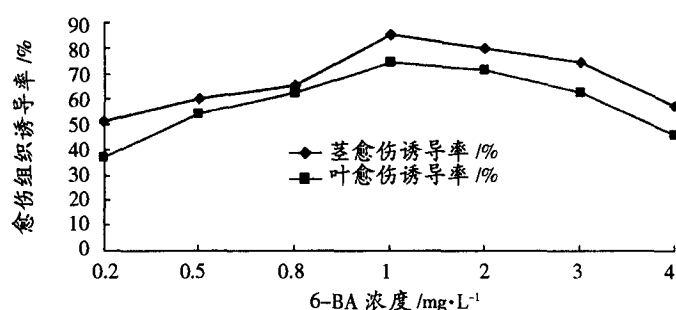


图 4 NAA 和 6-BA 交互作用对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig. 4 Effects of interaction of NAA and 6-BA on the shoots and leaves callus induction

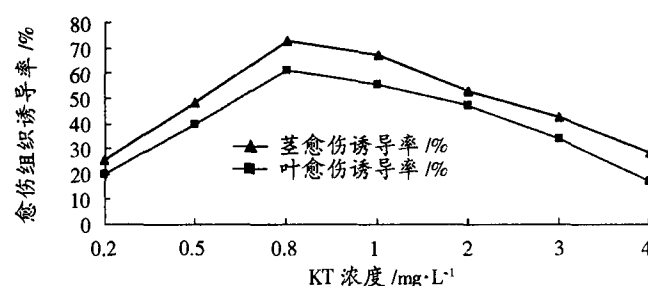


图 5 2,4-D 和 KT 交互作用对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig. 5 Effects of interaction of 2,4-D and KT on the shoots and leaves callus induction

细胞分裂素 KT 以 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L 等 7 个浓度对青钱柳茎段和叶片的愈伤组织诱导和生长进行交互试验, 愈伤组织诱导情况的结果见图 5 和图 6。

由图 5、图 6 可知, 浓度为 2.0 mg/L 2,4-D 与 0.8 mg/L KT 组合、1.0 mg/L NAA 与 0.8 mg/L KT 组合的出愈率均较高, 前者茎、叶愈伤组织最高诱导率分别为 72.86% 和 61.29% ; 后者茎、叶愈伤组织最高诱导率分别为 62.56% 和 60.02%。

从生长情况来看, 2.0 mg/L 2,4-D + 0.8 mg/L KT 组合生长较好, 愈伤组织呈黄绿色, 具有光泽。当 KT 浓度在 3.0 mg/L 以上时, 愈伤组织生长缓慢, 其生长受到抑制, 逐渐变褐, 死亡。相比之下, KT 与 NAA 组合诱导愈伤组织效果要略差。

3 讨 论

基本培养基能保证培养物的生存和最低生理活动的需要, 青钱柳茎段在改良 MS 培养基上诱导效果最好, 叶片在 MS 培养基上效果好, 其原因可能是青钱柳愈伤组织诱导需要稍高的氨态氮和硝态氮。

改良 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L 的组合对青钱柳茎、叶诱导愈伤组织效果最佳, 其次是单独使用生长素 2,4-D, 其最佳浓度为 2 mg/L。可能是因为高浓度的 2,4-D 会增强愈伤组织内多酚氧化酶活性, 从而导致愈伤组织褐化^[13]。生长素和细胞分裂素有效结合时, 能更强烈地刺激愈伤组织的形成^[14]。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第二十一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 18-19.
- [2] 应俊生, 张玉龙. 中国种子植物特有属 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 389-391.
- [3] 易醒, 谢明勇, 辜清, 等. 青钱柳对胆固醇调节作用的初步研究 [J]. 中国商办工业, 2000(4): 51-53.
- [4] 李磊, 谢明勇, 易醒, 等. 青钱柳多糖组分及其降血糖活性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(4): 484-486.
- [5] 上官新晨, 陈锦屏, 吴少福, 等. 青钱柳提取物对家兔实验性糖尿病模型降血糖作用的研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2003(6): 117-120.
- [6] 黄贝贝, 张文平, 傅颖媛, 等. 青钱柳对小鼠免疫功能的影响 [J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(5): 59-60.
- [7] 王文君, 蒋艳, 吴少福, 等. 青钱柳醇提取物对糖尿病小鼠降血糖作用的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(6): 562-566.
- [8] 徐明生, 沈勇根, 吴海龙, 等. 青钱柳水提物降糖作用的研究 [J]. 营养学报, 2004, 26(3): 230-234.
- [9] 史晓华, 徐本美, 黎念林, 等. 青钱柳种子休眠与萌发的研究 [J]. 种子, 2002(5): 5-7.
- [10] 郭春兰, 杨武英, 胡东南, 等. 青钱柳嫩枝扦插育苗的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(2): 254-257.
- [11] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 1-5.
- [12] 陈正华. 木本植物组织培养技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [13] 甘烦远, 郑光植, 彭丽平, 等. 云南红豆杉细胞的悬浮培养 [J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43-46.
- [14] 吕冬霞, 曲长福. 植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响 [J]. 北方园艺, 2004(5): 68.

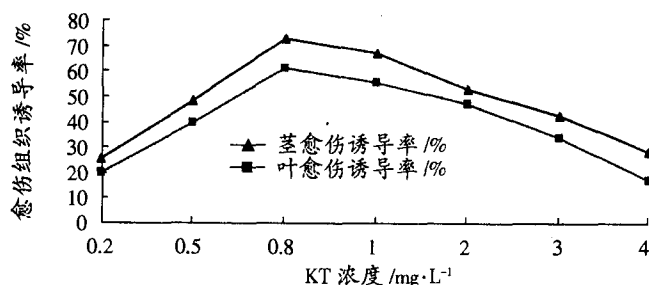


图 6 NAA 和 KT 交互作用对青钱柳茎段和叶片愈伤组织诱导的影响

Fig. 6 Effects of interaction of NAA and KT on the shoots and leaves callus induction