

# 大叶黄杨幼茎愈伤组织诱导的研究初报

曹彬<sup>1</sup>, 孙占育<sup>1</sup>, 张德仓<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 陕西省渭南职业技术学院, 渭南 714000; <sup>2</sup> 陕西省三原县农业局, 三原 713800)

**摘要:**以大叶黄杨的幼茎段为外植体,在添加 BA 和 NAA、IBA、2,4-D 不同激素组合的 MS 培养基上培养,对其愈伤组织进行诱导试验。结果表明:①生长素对愈伤组织诱导的效应为 2,4-D>NAA>IBA;②在不同激素组合培养基上均可诱导出愈伤组织,其中 MS+BA1.0~2.0 mg/L+NAA 1.0~1.5 mg/L、MS+BA1.5~2.0 mg/L+IBA1.0~1.5 mg/L、MS+BA0.5~1.0 mg/L+2,4-D 0.5~1.5 mg/L 等对愈伤组织的诱导效果最好,其诱导率分别为 74.3%、65.3%、81.1%。因此,通过科学配制不同激素组合的 MS 培养基,就能有效地诱导出大叶黄杨幼茎的愈伤组织。

**关键词:**大叶黄杨;幼茎;组织培养;愈伤组织诱导

**中图分类号:**Q813.1;S687.2 **文献标识码:**A

## Preliminary Study on Callus Induction of Tender Stem of *Euonymus Japonicus*

Cao Bin<sup>1</sup>, Sun Zhanyu<sup>1</sup>, Zhang Decang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Weinan Vocational and Technique College, Weinan, Shaanxi 714000;

<sup>2</sup>Sanyuan Department of Agriculture, Sanyuan, Shaanxi 713800)

**Abstract:** With young stem segment of *Euonymus japonicus* as explants, callus induction were studied on MS basal medium supplemented with different hormone combinations including BA and NAA、IBA、2,4-D. The result indicated that (1) The effect sequence of auxin was 2,4-D > NAA > IBA from the callus induction. (2) Callus were induced on medium of different hormone combinations, and MS+BA1.0~2.0 mg/L+NAA 0.5~1.5 mg/L、MS+BA1.5~2.0 mg/L+ IBA1.0~1.5mg/L、MS+BA0.5~1.0 mg/L+2,4-D 0.5~1.5mg/L etc. was the best one for callus induction, and the rate of induction was respectively 74.3%、65.3%、81.1%. So through scientific preparation, callus induction of young stem can be induced effectively, on MS medium with different hormone combinations.

**Key words:** *Euonymus japonicas*, young stem, tissue culture, callus induction

大叶黄杨 (*Euonymus japonicus* Thunb.) 卫矛科卫矛属,常绿灌木或小乔木,栽培甚普遍,耐干旱瘠薄耐烟尘,抗二氧化硫有毒气体较强,叶色青翠秀美,为园林绿化的观叶树种。主要通过扦插、播种和嫁接方式进行繁殖,繁殖系数较低,难以满足生产之需。采用植物组织培养技术可提高其繁殖系数,获得遗传性稳定、苗期一致的优质种苗。当前关于大叶黄杨组织培养试验研究及其报道不甚多<sup>[1-3]</sup>,鉴于此,笔者初步开展了植物激素对大叶黄杨幼茎愈伤组织诱导作用的试验研究,旨在为大叶黄杨组培快繁体系的建立提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间、地点

试验研究于 2007 年 4~5 月份,在本校组织培养实验室进行。

### 1.2 材料

1.2.1 外植体 采集校园内的当年生大叶黄杨幼茎作外植体。

1.2.2 试剂 试验用的均为分析纯试剂:(1)分裂素 BA (6- 苄氨基嘌呤);(2) 生长素 NAA (萘乙酸)、2,4-D (2,4- 二氯苯氧乙酸)、IBA (吲哚丁酸);(3) 琼脂粉;(4)蔗糖。

**第一作者简介:**曹彬,男,1955 年出生,陕西蒲城人,农学学士,副教授,主要从事园林树木栽培、植物组织培养教学和农业科研推广及调研工作。发表论文十多篇,曾获省农技推广成果三等奖。通信地址:715500 陕西省蒲城县东风路农校家属院,Email:caobin9393@126.com。

**收稿日期:**2008-04-25,修回日期:2008-05-31。

1.3 培养基与激素设计

1.3.1 基本培养基 试验所设计的培养基, 是以 MS 作基本培养基, 均加入 0.7%琼脂和 3%蔗糖<sup>[2,4]</sup>。

1.3.2 不同浓度的激素组合 细胞分裂素 BA 浓度设计

为 4 个处理: 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L; 生长素 NAA、2,4-D、IBA 浓度分别均设计为 3 个处理: 0.5、1.0、1.5 mg/L。MS 基本培养基与 4 种激素配制出 36 种不同浓度配比的诱导培养基<sup>[5-9]</sup>(见表 1)。

表 1 大叶黄杨幼嫩茎段愈伤诱导培养基

| 培养基代码 | 处理组合 / (mg·L <sup>-1</sup> ) | 培养基代码 | 处理组合 / (mg·L <sup>-1</sup> ) | 培养基代码 | 处理组合 / (mg·L <sup>-1</sup> ) |
|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|
| M1    | MS + BA 0.5 + NAA 0.5        | M13   | MS + BA 0.5 + IBA 0.5        | M25   | MS + BA 0.5 + 2,4-D 0.5      |
| M2    | MS + BA 0.5 + NAA 1.0        | M14   | MS + BA 0.5 + IBA 1.0        | M26   | MS + BA 0.5 + 2,4-D 1.0      |
| M3    | MS + BA 0.5 + NAA 1.5        | M15   | MS + BA 0.5 + IBA 1.5        | M27   | MS + BA 0.5 + 2,4-D 1.5      |
| M4    | MS + BA 1.0 + NAA 0.5        | M16   | MS + BA 1.0 + IBA 0.5        | M28   | MS + BA 1.0 + 2,4-D 0.5      |
| M5    | MS + BA 1.0 + NAA 1.0        | M17   | MS + BA 1.0 + IBA 1.0        | M29   | MS + BA 1.0 + 2,4-D 1.0      |
| M6    | MS + BA 1.0 + NAA 1.5        | M18   | MS + BA 1.0 + IBA 1.5        | M30   | MS + BA 1.0 + 2,4-D 1.5      |
| M7    | MS + BA 1.5 + NAA 0.5        | M19   | MS + BA 1.5 + IBA 0.5        | M31   | MS + BA 1.5 + 2,4-D 0.5      |
| M8    | MS + BA 1.5 + NAA 1.0        | M20   | MS + BA 1.5 + IBA 1.0        | M32   | MS + BA 1.5 + 2,4-D 1.0      |
| M9    | MS + BA 1.5 + NAA 1.5        | M21   | MS + BA 1.5 + IBA 1.5        | M33   | MS + BA 1.5 + 2,4-D 1.5      |
| M10   | MS + BA 2.0 + NAA 0.5        | M22   | MS + BA 2.0 + IBA 0.5        | M34   | MS + BA 2.0 + 2,4-D 0.5      |
| M11   | MS + BA 2.0 + NAA 1.0        | M23   | MS + BA 2.0 + IBA 1.0        | M35   | MS + BA 2.0 + 2,4-D 1.0      |
| M12   | MS + BA 2.0 + NAA 1.5        | M24   | MS + BA 2.0 + IBA 1.5        | M36   | MS + BA 2.0 + 2,4-D 1.5      |

1.4 方法

1.4.1 材料消毒处理和接种 把所采集的幼茎段带回室内流水冲洗干净后移入超净工作台, 用 70%乙醇液中浸泡 15s 后立即捞出, 用无菌蒸馏水冲洗 3 遍, 然后用 0.1%氯化汞泡 5~7 min, 捞出再用无菌蒸馏水冲洗 3~5 遍, 放置于无菌滤纸上吸干水分。用无菌手术剪刀把幼茎剪成 0.5cm 长的茎段, 然后用无菌镊子将其接种在不同组合的诱导培养基上。每种组合培养基均接种 15

瓶, 每瓶只接种 1 个茎段。

1.4.2 培养条件 各类培养基的 pH 值均调整为 5.8~6.0; 培养箱内温度为 23~25℃; 光照强度为 1200~1500Lux; 光照时间为 10~12 h。

1.4.3 结果统计 在接种第 40 天观察并统计以下两个项目数据<sup>[8,9]</sup>: (1) 愈伤组织诱导率(%) = 产生愈伤块数 / 接种茎段数×100%; (2) 不定芽诱导率(%) = 产生不定芽茎段数 / 接种茎段数×100%。

表 2 不同培养基组合对大叶黄杨幼茎愈伤组织及不定芽的诱导结果统计

| 产生愈伤 愈伤诱 产生不定 不定芽诱 |     |      |     |      | 产生愈伤 愈伤诱 产生不定 不定芽诱 |       |      |     |      | 产生愈伤 愈伤诱 产生不定 不定芽诱 |     |      |     |     |
|--------------------|-----|------|-----|------|--------------------|-------|------|-----|------|--------------------|-----|------|-----|-----|
| 培养基                | 茎块数 | 导率   | 芽茎数 | 导率   | 培养基                | 茎块数   | 导率   | 芽茎数 | 导率   | 培养基                | 茎块数 | 导率   | 芽茎数 | 导率  |
|                    | / 个 | / %  | / 个 | / %  |                    | 数 / 个 | / %  | / 个 | / %  |                    | / 个 | / %  | / 个 | / % |
| M1                 | 5   | 33.3 | 0   | 0    | M13                | 4     | 26.7 | 0   | 0    | M25                | 13  | 86.7 | 0   | 0   |
| M2                 | 8   | 53.3 | 0   | 0    | M14                | 5     | 33.3 | 0   | 0    | M26                | 11  | 73.3 | 0   | 0   |
| M3                 | 4   | 26.7 | 0   | 0    | M15                | 4     | 26.7 | 0   | 0    | M27                | 12  | 80.0 | 0   | 0   |
| M4                 | 5   | 33.3 | 1   | 6.7  | M16                | 3     | 20.0 | 0   | 0    | M28                | 14  | 93.3 | 0   | 0   |
| M5                 | 7   | 46.7 | 0   | 0    | M17                | 6     | 40.0 | 1   | 6.7  | M29                | 13  | 86.7 | 0   | 0   |
| M6                 | 10  | 66.7 | 0   | 0    | M18                | 7     | 46.7 | 0   | 0    | M30                | 10  | 66.7 | 0   | 0   |
| M7                 | 9   | 60.0 | 1   | 6.7  | M19                | 5     | 53.3 | 0   | 0    | M31                | 5   | 33.3 | 0   | 0   |
| M8                 | 13  | 86.7 | 2   | 13.3 | M20                | 9     | 60.0 | 2   | 13.3 | M32                | 8   | 53.3 | 0   | 0   |
| M9                 | 12  | 80.0 | 1   | 6.7  | M21                | 11    | 73.3 | 1   | 6.7  | M33                | 10  | 66.7 | 0   | 0   |
| M10                | 10  | 66.7 | 3   | 20.0 | M22                | 8     | 53.3 | 3   | 20.0 | M34                | 7   | 46.7 | 0   | 0   |
| M11                | 13  | 86.7 | 4   | 26.7 | M23                | 11    | 73.3 | 2   | 13.3 | M35                | 6   | 40.0 | 0   | 0   |
| M12                | 11  | 73.3 | 2   | 13.3 | M24                | 10    | 66.7 | 2   | 13.3 | M36                | 8   | 53.3 | 0   | 0   |

2 试验结果与分析

2.1 大叶黄杨幼茎的诱导培养基选择

从表 2 中可以看出, 36 种组合培养基对愈伤组织

均有诱导效果, 其中以 M6~M12、MS20~MS24、MS25~MS30 等 3 个区段范围培养基的诱导效果最为理想, 诱导率分别为 81.1%、74.3%、65.3%。说明不同激

表3 不同激素配比对大叶黄杨幼嫩茎段愈伤组织及不定芽的诱导结果统计

| 激素配比组合     | 愈伤组织的诱导结果      |             | 不定芽的诱导结果      |            |
|------------|----------------|-------------|---------------|------------|
|            | 产生愈伤组织茎块总数 / 个 | 愈伤组织诱导率 / % | 产生不定芽茎块总数 / 个 | 不定芽诱导率 / % |
| BA + NAA   | 107            | 59.4        | 14            | 7.8        |
| BA + IBA   | 83             | 46.1        | 11            | 6.1        |
| BA + 2,4-D | 117            | 65.0        | 0             | 0.0        |
| 平均         | 102.3          | 56.8        | 8.3           | 4.6        |

表4 BA 浓度对愈伤组织诱导的影响

| BA 浓度<br>/ (mg·L <sup>-1</sup> ) | 在生长素基础上的诱导率 / % |      |      |      |
|----------------------------------|-----------------|------|------|------|
|                                  | 2,4-D           | NAA  | IBA  | 平均   |
| 0.5                              | 80.0            | 37.8 | 28.9 | 48.9 |
| 1.0                              | 82.2            | 48.9 | 35.6 | 55.6 |
| 1.5                              | 51.1            | 75.6 | 55.5 | 60.7 |
| 2.0                              | 46.7            | 75.6 | 64.4 | 62.2 |

表5 不同生长素浓度对愈伤组织诱导的影响

| BA 浓度<br>/ (mg·L <sup>-1</sup> ) | 在生长素基础上的诱导率 / % |      |      |      |
|----------------------------------|-----------------|------|------|------|
|                                  | 2,4-D           | NAA  | IBA  | 平均   |
| 0.5                              | 65.0            | 48.3 | 33.3 | 48.9 |
| 1.0                              | 63.3            | 68.4 | 51.7 | 61.1 |
| 1.5                              | 66.7            | 61.7 | 53.4 | 60.6 |

素种类、不同浓度在一定范围内配制的 MS 组合可以作为大叶黄杨幼茎愈伤组织的诱导培养基。

从表3中可看出,在MS培养基添加BA与生长素的配比处理时,不同激素对幼茎愈伤组织的诱导效果顺序为:BA+2,4-D>BA+NAA>BA+IBA,它们的诱导率分别为65.0%、59.4%、46.1%。说明这3种生长素对大叶黄杨幼茎愈伤组织都有诱导效应,其中以BA+2,4-D组合的诱导效果最好。

## 2.2 不同激素浓度对愈伤组织诱导的影响

2.2.1 BA 浓度对愈伤组织诱导的影响 从表4可看出,在MS与生长素配比的36种培养基中,BA浓度对愈伤组织的诱导效应,以2.0、1.5 mg/L的效果最好,诱导率分别为62.2%、60.7%。

不同生长素间的诱导效应有较大差别:①2,4-D与MS的组合,以BA 0.5 mg/L、BA1.0 mg/L的诱导效果最好,诱导率分别高达80.0%和82.2%。②NAA与MS的组合,以BA1.5mg/L、BA2.0mg/L的诱导效果最好,其诱导率达75.6%。③IBA与MS的组合,以BA2.0mg/L的诱导效果最好,诱导率为64.4%。

2.2.2 生长素浓度对愈伤组织诱导的影响 从表5中可看出,在MS与BA组配的培养基中,生长素浓度对愈伤组织的诱导效应,以1.5、1.0 mg/L两种浓度的效果最好,诱导率分别为60.6%、61.1%。

同种生长素不同浓度的诱导效应有较大差别:(1)2,4-D以1.5、0.5 mg/L的诱导效果最好,诱导率分别是66.7%、65.0%;(2)NAA以1.0mg/L、1.5mg/L的诱导效果最好,其诱导率为68.4%、61.7%;(3)IBA以1.5 mg/L的诱导效果较好,其诱导率只为53.4%。

2.2.3 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响 从表2中可看出,在MS与BA、3种生长素的不同组合中,激素的不同种类及浓度间的对比对愈伤组织的诱导效应有着明显的不同。其中以BA0.5~1.0 mg/L与2,4-D0.5~1.5 mg/L、BA1.5~2.0 mg/L与NAA1.0 mg/L的两种不同激素对比对愈伤组织的诱导效果最为有利。就该试验设计的配比处理而言,大叶黄杨幼茎愈伤组织的最佳诱导培养基圈定为以下5种组合:MS+BA1.5mg/L+NAA1.0mg/L、MS+BA2.0mg/L+NAA1.0mg/L、MS+BA0.5mg/L+2,4-D0.5mg/L、MS+BA0.5mg/L+2,4-D1.5mg/L、MS+BA1.0mg/L+2,4-D0.5mg/L。

不同激素配比组合培养基所诱导的愈伤组织形态及体积是不同的(见图1、图3、图4和图6),而且出现了部分愈伤组织色泽的变化,或黄色(见图1),或浅褐色(见图9、图10),或深褐色(见图2、图5)。

## 2.3 不同诱导培养基对不定芽分化的影响

从表2、3可看出,36种培养基只在BA与NAA、

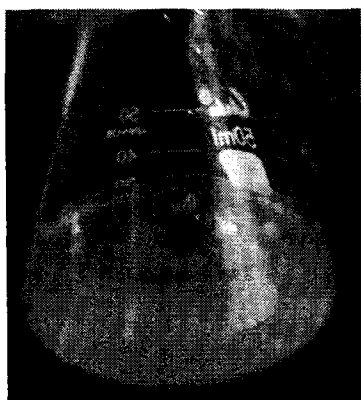


图1 在BA与2,4-D的配比中诱导出的愈伤组织形态,体积较大,细胞色泽渐变黄色。



图2 在BA与2,4-D的配比中诱导出的愈伤组织形态,体积较大,细胞已褐化。

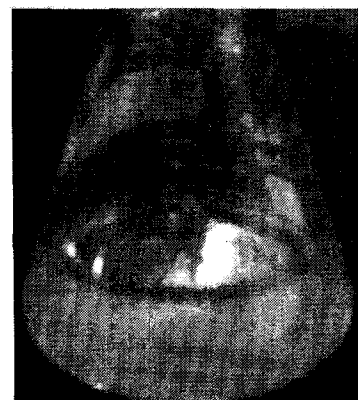


图3 在BA与NAA的配比诱导出的愈伤组织形态,体积中等,细胞幼嫩色泽正常。

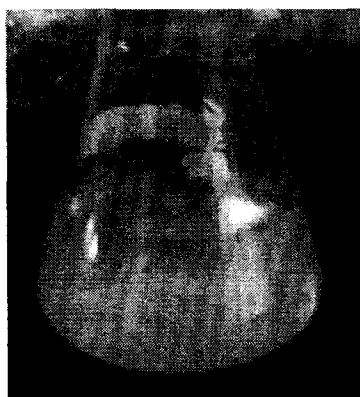


图4 在BA与NAA配比中诱导出的愈伤组织形态,细胞色泽正常。

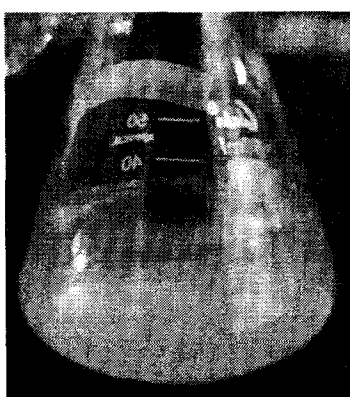


图5 在BA与NAA配比中诱导愈伤组织形态,体积中等,细胞已褐化。

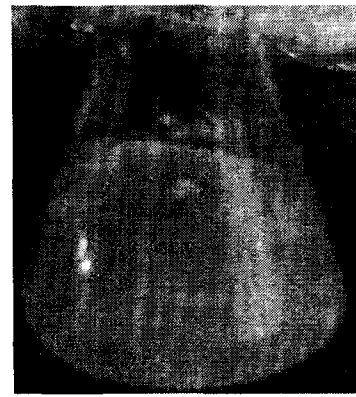


图6 在BA与IBA的配比中诱导愈伤组织形态,体积较小,细胞幼嫩色泽正常。

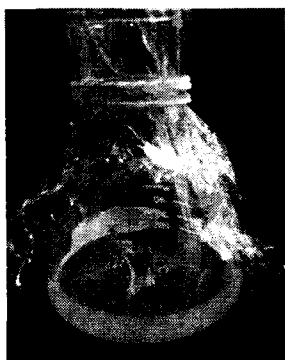


图7 在BA与NAA配比中分化出单个粗短的不定芽。细胞色泽正常。(侧视图)

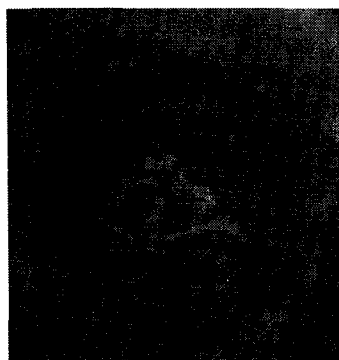


图8 在BA与NAA配比中分化出单个粗短的不定芽。细胞色泽正常。(俯视图)

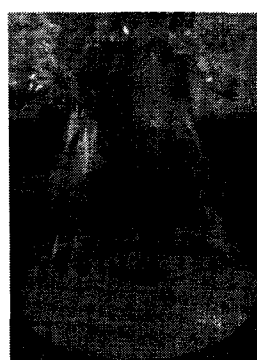


图9 在BA与NAA配比中分化出绿色幼小不定芽,细胞色泽变为浅褐色。

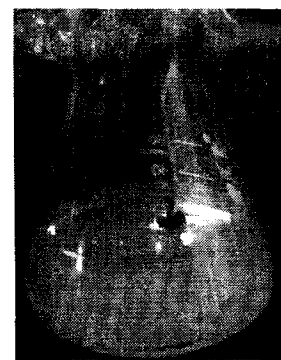


图10 在BA与IBA配比中分化出单个细长的不定芽,细胞色泽浅褐色。

IBA的部分配比组合中可分化出少量不定芽,且以单芽为多,形态不一(见图7、图8、图9和图10)。在MS+BA1.5~2.0mg/L+NAA 0.5~1.5 mg/L培养基中68个愈伤组织上,分化出13个不定芽,分化率是19.1%;在MS+BA1.5~2.0 mg/L+IBA0.5~1.5 mg/L培养基中49个愈伤组织上,分化了10个不定芽,分化率为20.4%。

### 3 小结与讨论

#### 3.1 培养基的选择

从36种不同配方培养基对愈伤组织的诱导效果上来看,MS是一种可选用的基本培养基。在MS与不同植物激素组合的系列配方中,筛选出适合于大叶黄杨幼茎愈伤组织诱导的培养基是:MS+BA0.5~1.0 mg/L+2,4-D 0.5~1.5 mg/L、MS+BA1.0~2.0 mg/L+NAA

1.0~1.5 mg/L、MS+BA1.5~2.0 mg/L+IBA1.0~1.5 mg/L。到底哪种配方的培养基可作为诱导大叶黄杨幼茎愈伤组织的最佳组合,还需在此基础上,通过大量实验来进一步证实和筛选。

### 3.2 激素种类及浓度的选择

植物激素的配比是影响愈伤组织诱导的主要因素,较高的细胞分裂素浓度与较低的生长素浓度合理配比有利于愈伤组织的诱导<sup>[4]</sup>。此试验初步研究了BA分别与2,4-D、NAA、IBA不同浓度配比对大叶黄杨幼茎愈伤组织诱导的影响,结果表明:0.5~1.0 mg/L BA与1.5 mg/L或0.5 mg/L 2,4-D配比的诱导效果最明显,愈伤组织体积较大(见图1、图2);1.5~2.0 mg/L BA与1.0~1.5 mg/L NAA配比的诱导效果较为明显,愈伤组织体积中等(见图3、图4和图5);BA与IBA配比所诱导的愈伤组织体积较小(见图6、图10)。研究不同植物激素的种类及浓度间的配比问题,是一项比较复杂的工作,该实验研究仅仅是初步的探索,未借助于数理统计手段来设计与分析<sup>[10]</sup>,今后应以上述结果为重要参考,继续做深入的研究,寻找出细胞分裂素与生长素的科学配比方案。

### 3.3 不定芽的诱导分化

此试验所设计的诱导培养基,主要是对大叶黄杨幼茎愈伤组织的诱导。在BA与NAA、BA与IBA组合的愈伤组织形成过程中,还诱导分化出了少量的不定芽,这有着多方面的原因<sup>[2,4]</sup>,或是腋芽发育而成,或由愈伤组织细胞分化而来的,或为不同激素配比影响所致,尚有待于以后深入的研究探讨。

### 3.4 愈伤组织的褐变问题

能否有效的控制褐变是植物组织培养成功与否的关键所在<sup>[4,11]</sup>。该实验所遇到的褐变现象,是多种因素

同时作用的结果,对愈伤组织的诱导与体积增大有严重的影响。要重视对引发褐变的机理深入研究,找到克服褐变的有效方法,使大叶黄杨幼茎愈伤组织的诱导技术更趋完善,将具有重大的理论和现实意义。

### 3.5 试验改进点

试验由于受条件的限制,存在不足之处,只是单一性地对愈伤组织诱导率进行研究,而未涉及到愈伤组织生长速度和生长量变化方面的研究,需要进一步改进和完善之。对两方面同时作深入的研究,更有可能筛选到最佳激素配比,从而选择出大叶黄杨幼茎愈伤组织的最佳组合MS诱导培养基。

### 参考文献

- [1] 闫志刚,石大兴.金心冬青卫矛的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,2005,41(5):635.
- [2] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991.
- [3] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模生产[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [4] 曹春英.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [5] 朱志国.金叶日本冬青组织培养研究[D].南京农业大学,2006.
- [6] 陈家龙,王广东.冬青的离体培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1123.
- [7] 李登中.金叶日本冬青的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(5):592.
- [8] 陈彦云,曹君迈,李国旗,等.罗布麻离体培养及快繁技术的研究[J].生物技术,2006,16(1):72-75.
- [9] 吕惠平,王起才,马纪.木那格葡萄快速繁殖及愈伤组织的诱导和继代[J].生物技术,2006,16(5):75-77.
- [10] 莫惠栋.农业试验统计[M].上海:科学技术出版社,1984.
- [11] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.