

## 杜仲叶片愈伤组织诱导的激素优化研究

李 琰<sup>1</sup> 姜在民<sup>1</sup> 唐 锐<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学校医院, 杨凌 712100)

**摘 要** 以杜仲优树 L33 的幼叶为材料, 在 B5 培养基上添加不同浓度的生长素与细胞分裂素进行愈伤组织诱导研究, 结果表明: 无激素的培养基上不能诱导出愈伤组织, 单独加入 2,4-D、NAA 和 IBA 均可诱导出愈伤组织, 以  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D、 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 出愈率最高, 达 100%, 且愈伤组织生长较好; 在适宜浓度的生长素的培养基上加入细胞分裂素时, KT 的加入对愈伤组织的诱导及生长起抑制作用;  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA +  $0.3 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 与  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA +  $0.3 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA 的组合可明显促进愈伤组织的诱导和生长, 适合进一步继代培养。

**关键词** 杜仲; 组织培养; 愈伤组织诱导; 激素

Phytohormones combination on leaf callus induction of *Eucommia ulmoides*LI Yan<sup>1</sup> JIANG Zai-Min<sup>1</sup> TANG Rui<sup>2</sup>

(1. College of life Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)

(2. Hospital, Northwest A&amp;F University, Yangling 712100)

**Abstract** The leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. L33 as explants, the B5 being as the basic medium supplemented with auxin, the combination of auxin and cytokinin, the callus induction and growth of *E. ulmoides* Oliv. were studied. The results showed that, callus wasn't formed on the no phytohormones media. Callus was induced when explants were cultured on B5 medium supplemented with 2,4-D, NAA and IBA only.  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D,  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA were induced 100 per cent for callus induction, and was good for the growth; When the cytokinin was added in the proper auxin medium, KT was bad for callus induction and growth; The best combination of callus induction and growth was  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA +  $0.3 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA or  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA +  $0.3 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA, whose calluses were growth quickly, suitable for subculture.

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

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是杜仲科单属单种植物, 为我国特有的经济树种, 国家二类重点保护植物, 也是一种名贵的药用植物, 其树皮具有补肝肾、强筋骨、益腰膝、除酸痛和降血压等功效, 特别是对血压有双向调节作用, 被认为是世界上最

高级的降压药物, 因而受到世人的普遍重视<sup>[1,2]</sup>。而杜仲的药用成分绿原酸、桃叶珊瑚甙、京尼平甙、黄酮类等均为次生代谢产物<sup>[3-5]</sup>, 其在植株中含量低, 且杜仲树生长缓慢, 剥皮对树的生长有影响<sup>[6]</sup>。随着生物技术的发展, 用组织培养生产有

基金项目: 西北农林科技大学青年科研专项基金

第一作者简介: 李琰 (1971—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事植物学及药用植物组织培养研究。

收稿日期: 2005-06-27

用的次生代谢产物已取得了相当大的成绩<sup>[7]</sup>,为了更有效地保护杜仲资源,利用细胞培养生产天然产物药物是开发利用珍贵药用资源的重要途径<sup>[8,9]</sup>。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叶愈伤组织诱导和生长的影响进行了研究,以期为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 的幼叶,采后迅速带回实验室,用 1% 洗洁精洗涤并用自来水清洗后,用 70% 酒精消毒 40 s,无菌水冲洗 3~4 次,1 g · L<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 min,无菌水冲洗 4 次,在无菌条件下将其切成 0.5 cm × 0.5 cm 的方块,接种于培养基上。以 B5 为基本培养基,加入蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup>,用琼脂 6 g · L<sup>-1</sup> 固化,pH 调至 6.3,分别添加不同浓度的 2,4-D, NAA, IBA, BA, KT 等激素,每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个外植体。在温度(25 ± 2) °C,光照 12 h · d<sup>-1</sup>,光照强度为 1 000 ~ 1 500 lx 的培养室培养 30 d 后,调查出愈率。

## 2 结果与分析

### 2.1 2,4-D, NAA, IBA 对愈伤组织诱导和生长的影响

幼叶接种后 4 d 表面开始发皱,逐渐在主脉处

长出乳白色愈伤组织,第 15 d 叶缘已有米粒大乳白色愈伤组织长出,20 d 后 3 种生长素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别,其中 NAA、IBA 处理的比 2,4-D 处理的出愈时间早 2~3 d。

在不同浓度的 2,4-D 中,以 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 的出愈率最高,为 100%,愈伤组织生长也最好,呈淡绿色,有光泽。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<sup>-1</sup> 时,已完全抑制外植体产生愈伤组织(表 1)。

不同浓度的 NAA 处理中,0.3 mg · L<sup>-1</sup> 到 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 之间的几个处理出愈率均为 100%,各处理间无明显差异,但愈伤组织的颜色、大小差异较大(表 2)。NAA 浓度在 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时,愈伤组织虽为淡绿色,有光泽,但长势较差;NAA 浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 时,愈伤组织生长最好,呈淡绿色,有光泽。NAA 浓度在 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 以下时诱导愈伤组织的时间基本一致,为 14 d。NAA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 时,诱导率和长势均较好,但诱导愈伤组织所需要的时间较长,为 20 d。NAA 为 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 时,25 d 才开始出现愈伤组织,30 d 统计时,出愈率仅为 12.5%。

IBA 浓度在 0.5 ~ 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 时出愈率最高均为 100%,愈伤组织有光泽,生长较好(表 3)。当 IBA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 时,虽然出愈率和长势也较好,但出愈时间较长。

表 1 不同浓度 2,4-D 对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of 2,4-D on the leaves callus induction

2,4-D 浓度(mg · L <sup>-1</sup> ) 2,4-D Concentration	接种外植体数 Number of explants inoculation	愈伤组织块数 Number of callus induction	出愈率(%) Percentage of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长情况 Growth status of the callus
0	40	0	0.00		--
0.1	40	19	47.50	淡绿色,无光泽 Light-green, fading	++
0.3	40	35	87.50	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	+++
0.5	40	40	100.00	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	++++
1.0	39	24	61.54	黄绿色,无光泽 Yellow-green, fading	++
2.0	40	14	41.18	黄绿色,无光泽 Yellow-green, fading	+
4.0	38	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: -- Obvious contained growth; - Contained growth; + Worse growth; ++ Generally growth; +++ Good growth; ++++ Better growth; +++++ The best growth. The same as below.

表 2 不同浓度 NAA 对叶片愈伤组织诱导的影响  
Table 2 Effects of NAA on the leaves callus induction

NAA 浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) NAA Concentration	接种外植体数 Number of explants inoculation	愈伤组织块数 Number of callus induction	出愈率(%) Percentage of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长情况 Growth status of the callus
0	40	0	0.00		--
0.1	40	13	32.50	淡绿色,无光泽 Light-green, fading	+
0.3	37	37	100.00	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	++
0.5	40	40	100.00	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	++++
1.0	40	40	100.00	黄绿色,有光泽 Yellow-green, glossy	+++
2.0	39	34	81.18	黄绿色,无光泽 Yellow-green, fading	+++
4.0	40	5	12.50	黄绿色,无光泽 Yellow-green, fading	+

表 3 不同浓度 IBA 对叶片愈伤组织诱导的影响  
Table 3 Effects of IBA on the leaves callus induction

IBA 浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) IBA Concentration	接种外植体数 Number of explants inoculation	愈伤组织块数 Number of callus induction	出愈率(%) Percentage of callus induction	愈伤组织颜色 Appearance of the callus	生长情况 Growth status of the callus
0	39	0	0.00		--
0.1	36	3	8.33	淡绿色,无光泽 Light-green, fading	+
0.3	40	29	72.50	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	++
0.5	39	39	100.00	淡绿色,有光泽 Light-green, glossy	++++
1.0	40	40	100.00	黄绿色,有光泽 Yellow-green, glossy	+++
2.0	40	33	82.50	黄绿色,无光泽 Yellow-green, fading	++
4.0	40	7	17.50	黄绿色,无光泽 Yellow-green, 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

不同浓度 BA 和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 的培养基上,叶片培养 3 d 后开始膨胀并发皱,20 d 边缘有微量愈伤组织长出后,随后整个材料很快发褐、变干,30 d 时愈伤组织全部枯死。NAA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和不同浓度 BA 组合的培养基,BA 浓度  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤组织生长旺盛,呈淡绿色,富有光泽,生活力强;BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤组织的诱导和生长明显受到抑制,愈伤组织只有 50% 左右的出愈率,长势较差,继代后很快枯死。IBA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和不同浓度 BA 组合的培养基,BA 浓

度为  $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,出愈率均达到 100%,且愈伤组织块随着 BA 的增加而增大。BA 浓度高于  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后,明显抑制愈伤组织的产生和生长(表 4)。

在诱导愈伤组织最适宜的 2,4-D  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中加入 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(表 5)。当 KT 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,已完全抑制了含 NAA、IBA 的培养基幼叶愈伤组织的形成,对含 2,4-D 的培养基出愈率仅为 2.5%,KT  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时已经完全抑制愈伤组织的形成。

表 4 BA 与不同生长素组合对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of the combination of BA and three auxins on the leaves callus induction

生长素 Auxin	BA 浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) BA Concentration	接种外植体个数 Number of explants inoculation	愈伤组织块数 Number of callus induction	出愈率(%) Percentage of callus induction	生长情况 Growth status of the callus
2,4-D $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	++++
	0.1	38	23	60.53	++
	0.3	39	15	38.56	++
	0.5	40	9	22.50	+
	1.0	37	0	0.00	-
	2.0	40	0	0.00	--
NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	++++
	0.1	38	38	100.00	++++
	0.3	39	39	100.00	++++
	0.5	40	40	100.00	++++
	1.0	40	23	57.50	+++
	2.0	40	3	7.50	+
IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	+++
	0.1	39	39	100.00	+++
	0.3	34	34	100.00	++++
	0.5	40	40	100.00	++++
	1.0	38	19	50.00	++
	2.0	40	5	12.50	+

表 5 KT 与不同生长素组合对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of the combination of KT and three auxins on the leaves callus induction

生长素 Auxin	KT 浓度( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) KT Concentration	接种外植体个数 Number of explants inoculation	愈伤组织块数 Number of callus induction	出愈率(%) Percentage of callus induction	生长情况 Growth status of the callus
2,4-D $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	++++
	0.1	39	22	56.41	++
	0.3	40	17	42.50	+
	0.5	39	7	17.95	+
	1.0	40	1	2.50	-
	2.0	40	0	0.00	--
NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	++++
	0.1	38	32	84.21	++
	0.3	39	30	76.92	+
	0.5	40	19	47.50	+
	1.0	36	0	0.00	-
	2.0	37	0	0.00	--
IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	40	40	100.00	+++
	0.1	40	32	80.00	+++
	0.3	37	26	70.27	++
	0.5	40	17	42.50	+
	1.0	39	0	0.00	-
	2.0	40	0	0.00	--

### 3 讨论

试验结果表明,3种生长素均可诱导杜仲幼叶的愈伤组织形成。但所需的最佳浓度不同,这与以杜仲幼茎为外植体诱导愈伤组织的结论相一致<sup>[10]</sup>,均体现了不同生长素活性不同。 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA和 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA处理在30 d统计时,出愈率均很低,但叶片始终发绿,继续培养到40 d时,出愈率达100.00%,培养到50 d时,愈伤组织生长量已和NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的30 d统计时相当,且愈伤组织逐渐富有光泽,继代后仍能生长,低浓度( $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下)诱导的愈伤组织在40 d时已开始枯死。但幼茎为外植体诱导愈伤组织时, $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA和 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA处理的在20 d后逐渐枯死,未出现延迟形成愈伤组织的现象。茎、叶在高浓度生长素培养条件下的差异,尚需进一步研究。

虽然单独使用2,4-D、NAA、IBA可100%诱导愈伤组织,但加入BA后愈伤组织生长旺盛,富有光泽,生活力强,可见BA与生长素的配合使用优于单独使用生长素;KT的加入对愈伤组织的诱导及生长不利,这与李琰等人<sup>[10]</sup>、唐建军等人<sup>[11]</sup>在杜仲愈伤组织诱导中得出的结论相一致,同属于细胞分裂素的BA和KT在愈伤组织诱导中作用不同。

从3种生长素诱导出愈时间上看,NAA、IBA的出愈时间基本相近,以叶片为外植体时,2,4-D的出愈比NAA、IBA晚2~3 d,而以茎段为外植体时2,4-D比NAA、IBA早2~3 d<sup>[10]</sup>,可见,诱导愈伤组织是激素、外植体内源激素等共同作用的结果。

试验中发现,以叶为外植体时愈伤组织的出愈时间普遍比以茎为外植体时晚10 d左右<sup>[10]</sup>。这可能是因为叶中的薄壁组织大多都分化成了具有

光合作用的同化组织,而茎中的薄壁组织几乎还处于较原始的未分化状态,所以薄壁细胞在进行脱分化形成分生组织时茎所用的时间要比叶要短。体现了同一薄壁组织由于分化程度不同在脱分化成分生组织时所用的时间也是不一样的。

### 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. 张康健, 张檀. 中国神树一杜仲[M]. 北京: 经济管理出版社, 1997: 149-151.
3. 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.
4. 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.
5. Hayman E P, Yokoyama H, Bai K Z. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* Oliv. By 2-diethylaminoethyl 1-3,4-dichlorophenyl ether[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78-82.
6. 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.
7. Foulter M W, Stepan-Sarkissian G. Plant cell culture-future perspective[M]. // Neumann KH, Barz Wand Reinhara E. Primary and secondary tabolism. Heidelberg: Springer-verlag, 1985: 66-73.
8. 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.
9. Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzyme from plant cell culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 97-109.
10. 李琰, 张朝红, 崔宏安. 激素对杜仲幼茎愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(1): 57-60.
11. 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.