

杜仲组织培养再生体系的优化

李俊红, 张焕玲, 李周岐*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:以幼嫩叶片为外植体,对杜仲再生体系的优化进行了研究。结果表明:叶片诱导愈伤组织的最适宜培养基为 MS + NAA1.5 mg/L + BA2.0 mg/L,诱导率为 95%、愈伤组织增殖最适宜培养基为 MS + NAA1.0 mg/L + BA2.0 mg/L,良好率为 98.5%、诱导不定芽的最适宜培养基为 MS + NAA0.5 mg/L + BA2.0 mg/L,分化率为 40%、最适宜生根培养基 1/2MS + IBA1.5 mg/L,生根率为 92.5%。

关键词:杜仲;组织培养;再生体系;优化

中图分类号:S723.132 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2008)04-0097-04

Optimization of Tissue Culture Regeneration System of *Eucommia ulmoides*

LI Jun-hong, ZHANG Huan-ling, LI Zhou-qi*

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Optimization of regeneration system of *Eucommia ulmoides* was studied by using tender leaves as explants. The results showed that MS + NAA1.5 mg/L + BA2.0 mg/L had the best effects on inducing callus with a inducing rate of 95%, the best medium of callus growth was MS + NAA1.0 mg/L + BA2.0 mg/L with a conserve rate of 98.5%, the suitable medium for bud formation was MS medium added NAA0.5 mg/L, BA2.0 mg/L, with a differentiation rate of 40%, the optimum media for rooting is 1/2MS + IBA1.5 mg/L with 92.5% rooting ratio.

Key words: *Eucommia ulmoides*; tissue culture; regeneration syetem; optimization

杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 属杜仲科,是我国特有的一种以药用为主的多用途树种。现代医学研究证明杜仲是一种高效天然降压药物,同时具有镇痛、抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤等功能。此外,杜仲作为用材、水土保持、绿化的经济树种,集“一林、一胶、两材、三效益(即杜仲林,杜仲胶,木材、药材,社会效益、经济效益、生态效益)于一体,因而受到世人普遍重视,扩大种植的前景广阔。和其他所有栽培林木一样,良种选育是杜仲资源开发中极其重要的基础性工作。但杜仲树体高大,生长周期长,生长环境较难控制,采用常规方法进行育种很难实施^[1-5]。

转基因育种和离体下染色体加倍育种技术是林木改良育种的重要方法。这些方法均建立在高效的组培体系基础之上。虽然前人在杜仲组织培养方面

已经作了许多工作,但是仍存在一些问题,如生芽生根率不高成为制约杜仲再生工作的重要因素^[7]。而本试验在前人工作的基础上,详细地研究了以杜仲幼嫩叶片为外植体愈伤组织的诱导、增殖、分化及生根培养基,目的在于找出杜仲的愈伤组织诱导、增殖继代、分化及生根的最优培养基。既为杜仲育种探索出一条新路,又为离体诱导多倍体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

采样植株为西北农林科技大学西林校区内杜仲林优良植株。2007年3月到6月从生长健壮的杜仲树上采集幼嫩叶片作为试验材料。

收稿日期:2007-12-25 修回日期:2008-04-11

基金项目:陕西省农业科技攻关项目“高产优质杜仲多倍体新品种选育”(2005K01-G14-4);西安市科技计划项目(NC08009)。

作者简介:李俊红,男,西北农林科技大学林木遗传育种专业硕士研究生。

*通讯作者:李周岐,男,教授,博士生导师。Lzhoqi@yahoo.com.cn

1.2 方法

1.2.1 取材、消毒 取嫩叶剪除叶柄,把叶片切成2~3 cm宽的长条置于烧杯中(加有10 ml/L洗洁精水)洗涤浸泡10 min 流水冲洗15 min 放入烧杯中并加75%酒精摇动杀菌1.5 min 无菌水冲洗3~4次 加入0.1%氯化汞溶液浸泡8 min 无菌水冲洗3~4次 无菌滤纸吸干,切成0.5 cm ×0.5 cm左右的小块。

表1 不同激素配比的培养基

Table 1 Culture media of various concentration combination

序号	培养基	序号	培养基
1	MS+NAA0.5+BA0.5	14	MS+NAA1.5+BA2.0
2	MS+NAA0.5+BA1.0	15	MS+NAA1.5+BA3.0
3	MS+NAA0.5+BA1.5	16	MS+NAA2.0+BA0.5
4	MS+NAA0.5+BA2.0	17	MS+NAA2.0+BA1.0
5	MS+NAA0.5+BA3.0	18	MS+NAA2.0+BA1.5
6	MS+NAA1.0+BA0.5	19	MS+NAA2.0+BA2.0
7	MS+NAA1.0+BA1.0	20	MS+NAA2.0+BA3.0
8	MS+NAA1.0+BA1.5	21	MS+NAA0.5+BA2.5
9	MS+NAA1.0+BA2.0	22	MS+NAA0.1+BA1.0
10	MS+NAA1.0+BA3.0	23	1/2MS+IBA0.5
11	MS+NAA1.5+BA0.5	24	1/2MS+IBA1.0
12	MS+NAA1.5+BA1.0	25	1/2MS+IBA1.5
13	MS+NAA1.5+BA1.5	26	1/2MS+IBA2.0

注:激素浓度均为 mg/L

1.2.2 愈伤组织的诱导 将上述叶片小块接入附加不同浓度激素的MS培养基(1~20号培养基)上,30 d后统计愈伤组织诱导率。

1.2.3 愈伤组织的继代与增殖 挑选生长旺盛和颜色质地及形态都相似的愈伤组织,然后剔除愈伤组织粘着的原培养基,用镊子和小刀切成0.5 cm ×0.5 cm左右的小块后,接种于附加不同浓度植物生长调节物质的MS培养基(1~15号培养基)上。置于培养室进行继代培养,30 d后观察愈伤组织的长势。

1.2.4 不定芽的诱导 将增殖后的愈伤组织接入附加不同种类和浓度的MS培养基(2~4、21号培养基)中,进行不定芽的诱导,40 d后统计不定芽的分化率。

1.2.5 壮苗及生根 愈伤组织刚分化出的不定芽转移到壮苗培养基(22号)上培养30 d后将生长粗壮的芽切下接种至生根培养基(23~26号培养基)。30 d后统计生根率。

1.2.6 培养基与培养条件 试验采用2种基本培养基,一种为MS培养基^[8],一种为1/2MS培养基(MS培养基中的大量元素元素减半),在不同时期根据培养目的添加不同浓度的激素。各培养基均添加琼脂0.6%,MS培养基添加3%蔗糖,1/2MS培

培养基添加4%蔗糖。pH调整为6.3,分装后在121 ℃,1.1 kg/cm²的压力下灭菌25 min,培养室温度为25 ±1 ℃,光强1500~2000 lx,光照周期12 h/d。

1.2.7 观察指标 试验的指标有愈伤组织诱导率、愈伤组织增殖良好率、愈伤组织不定芽的分化率、生根率。

根据愈伤组织的体积变化划分出增殖良好,增殖一般,无明显变化的。增殖良好的是原接种材料体积的2倍以上。增殖一般的是原接种材料的1~2倍之间,计算出良好率。

愈伤组织诱导率 = 形成愈伤组织的外植体块数 / 接种外植体总块数 × 100 %

良好率 = 生长良好的愈伤组织块数 / 愈伤组织总块数 × 100 %

分化率 = 分化出不定芽的愈伤组织块数 / 愈伤组织总块数 × 100 %

生根率 = 生根的不定芽数 / 不定芽总数 × 100 %

1.2.8 数据统计与分析 试验重复两次,每处理60个材料。采用DPS6.55软件对试验结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 杜仲愈伤组织的诱导

外植体接种于附加不同浓度的NAA与BA组合的MS培养基上诱导愈伤组织,15 d后叶片开始增厚膨大,进而在叶片切口周围形成黄绿色的愈伤组织(图1)。



图1 叶片诱导的愈伤组织

Fig. 1 Primary callus produced by leaf of *E. ulmiodes*

从表2可看出,培养基中附加不同种类和浓度的激素,叶片愈伤组织的诱导效果存在一定差异。当NAA浓度在0.5~2.0 mg/L之间,BA浓度在1.5~3.0 mg/L之间均能诱导出愈伤组织;NAA浓度为1.5 mg/L,BA浓度为2.0 mg/L时诱导率最高,而且愈伤组织生长很快。方差分析表明:

NAA 对愈伤组织的诱导呈极显著差异 ($p = 0.0001$), BA 对愈伤组织的诱导呈显著差异 ($p = 0.0170$)。对诱导起主要作用的为 NAA, 其次为

BA, NAA 与 BA 存在交互作用并且对愈伤组织诱导有显著差异 ($p = 0.0338$)。

表 2 不同浓度的 NAA 与 BA 组合对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of various concentration combinations of NAA and BA on callus induction

培养基编号	诱导率/ %						
1	44	6	63	11	71	16	93
2	46	7	83	12	83	17	93
3	53	8	63	13	92	18	92
4	64	9	90	14	95	19	87
5	40	10	93	15	75	20	80

注:表中所列诱导率为实验平均值。

2.2 愈伤组织的继代增殖

由表 4 可知:当 BA 3.0 mg/L 时愈伤组织增殖缓慢,有的甚至死亡;当 BA 在 0.5 ~ 2.5 mg/L 时增殖效果最为理想,愈伤组织增殖的最优培养基为 9 号培养基(NAA1.0 + BA2.0),愈伤组织增殖良好率为 98.5%,且增殖后的愈伤组织颜色嫩黄,生长旺盛,继代增殖能力很强(图 2)。方差分析表明,BA 对愈伤组织的增殖有极其显著的影响 ($p = 0.0001$),NAA 和 BA 存在交互作用并且对愈伤组织增殖的影响次之($p = 0.0636$),NAA 对愈伤组织的增殖也有明显的影响($p = 0.0857$)。

~4 个芽突起。由表 4 可看出,愈伤组织不定芽的分化比较困难,分化率均在 50%以下,但较前人有了很大提高。其中当 NAA 浓度为 0.5 mg/L,BA 浓度为 2.0 mg/L 时对不定芽的分化效果相对较好,分化率为 40%,且分化出的不定芽大部分均可正常生长(图 3)。方差分析表明:BA 对于愈伤组织的不定芽分化有显著的影响($p = 0.0131$)。

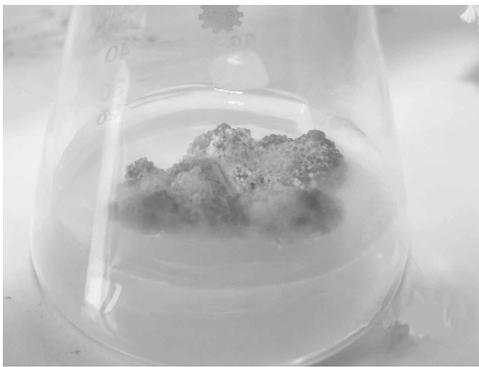


图 2 增殖后的愈伤组织

Fig.2 Callus after proliferation

表 3 不同浓度的 NAA 与 BA 组合对叶片愈伤组织增殖的影响

Table 3 Effect of various concentration combinations of NAA and BA on callus propagation %

培养基编号	良好率	培养基编号	良好率	培养基编号	良好率
1	87.5	6	96	11	65
2	96.5	7	91.5	12	78.5
3	93.5	8	78	13	96
4	96.5	9	98.5	14	69
5	7.5	10	11.5	15	10.5

注:表中所列良好率为实验平均值。

2.3 愈伤组织不定芽的诱导

将增殖后的绿色致密愈伤组织转入诱导丛生芽培养基,大约 40 d 后可观察到愈伤组织表面形成 1



图 3 愈伤组织诱导的不定芽

Fig.3 Normal bud dedifferentiated from callus

表 4 不同浓度的 BA 对愈伤组织诱导分化的影响

Table 4 The influence of difference concentration

BA to buds induced from the callus %

培养基编号	分化率	培养基编号	分化率
2	7.5	4	40
3	12.5	21	22.5

注:表中所列分化率为实验平均值。

2.4 生根

从愈伤组织刚分化的不定芽生长势弱,不适直接生根,需要把不定芽切割转入 22 号培养基中进行壮苗培养,不定芽叶色变绿,径向变粗。30 d 后将生长良好的复壮小苗转移到生根培养基中。在 2 周左右则可以观察到不定芽生出小根,一个月后根生长至 3 ~ 5 cm,有的还分化出若干侧根(见图 4)。由表 5 可看出,添加有 1.5 mg/L IBA + 1/2MS 的培养基为最佳生根培养基。方差分析表明:IBA 对于不定芽的生根有重要的影响($p = 0.0033$)。



图4 组培苗的生根

Fig.4 Rooting of plantlet

表5 不同浓度的 IBA 对生根的影响

Table 5 Effects of difference concentrations of IBA on roots induction

培养基编号	生根率	培养基编号	生根率
23	63.3	25	92.5
24	85.8	26	74.2

注:表中所列生根率为实验平均值。

3 结论

杜仲幼嫩叶片在合适激素配比下易脱分化形成愈伤组织以及愈伤组织增殖,这与前人的研究结果是基本一致的。本试验在前人研究的基础上,使不定芽分化率有很大提高,畸形苗玻璃化苗数量大大减少,进一步分析其原因,不定芽的分化率提高与适当浓度的BA和愈伤组织的本身生长状态有关系。畸形苗、玻璃化苗的减少可能与NAA浓度的适当提高有一定关系。实验表明,杜仲组织培养的不同培养阶段优化的最适培养基分别为:诱导愈伤组织

的最适培养基为MS + NAA1.5 mg/L + BA2.0 mg/L,诱导率为95%;愈伤组织继代增殖最适培养基为MS + NAA1.0 mg/L + BA2.0 mg/L,良好率为98.5%;不定芽分化的最适培养基为MS + NAA0.5 mg/L + BA2.0 mg/L,分化率为40%;最适生根培养基为1/2MS + BA1.5 mg/L,生根率为92.5%。

参考文献:

- [1] 张康健,杜仲[M].北京:中国林业出版社,1990.
- [2] 杜红岩,杜仲优质高产栽培[M].北京:中国林业出版社,1996.
- [3] 李琰,张存莉,严忠海等.不同培养基对杜仲愈伤组织诱导和生长的影响[J].西北林学院学报,2003,18(3):37-39.
- [4] 李琰,张朝红,崔宏安,等.杜仲愈伤组织诱导的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):153-157.
- [5] 朱翠英,张真,谢经霞,等.杜仲组培快繁技术的研究[J].宁夏农林科技,2005(6):32-33.
- [6] 李岩,罗莉,赵德刚.杜仲胚轴、子叶直接诱导不定芽及再生体系的建立[J].中草药,2007,38(1):101-105.
- [7] 朱登云,田慧琴,李浚明.杜仲叶片和叶柄愈伤组织的诱导和植株再生[J].植物研究,2001,21(2):206-209.
- [8] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1998.
- [9] 黄勇,周吉源.杜仲愈伤组织的诱导及其增殖效应[J].华中师范大学学报:自然科学版,2003,37(1):102-105.
- [10] 石进朝,陈兰芬.花叶毛白杨组织培养的研究[J].西北林学院学报,2007,22(4):90-94.
- [11] 刘松涛,郭军战,等.凤梨组织培养研究[J].西北林学院学报,2007,22(4):95-97.
- [12] 李琰,姜在民,唐瑞.杜仲叶片诱导的激素优化研究[J].植物研究,2006,26(2):182-186.

(上接第77页)

方法准确界定退化生态系统恢复的健康程度,以实施切实可行的恢复与重建的措施和政策导向,确保侵蚀环境生态系统健康和可持续发展目标的实现。该研究只是作了一些基础性的工作,而在以后的研究中应重点开展评价这方面的工作。

参考文献:

- [1] 包维楷,陈庆恒.生态系统退化的过程及其特点[J].生态学杂志,1999,18(2):36-42.
- [2] 蔡文,杨春燕,林伟初.可拓工程方法[M].北京:科学出版社,1999.
- [3] 蔡文.物元模型及其应用[M].北京:科学技术文献出版社,1994.
- [4] 张宝光.现代地理研究的方法论问题[J].天津师范大学学报:自然科学版,1996,16(2):55-60.
- [5] 章家恩,徐琪.退化生态系统的诊断特征及其评价指标体系[J].长江流域资源与环境,1999,8(2):215-220.
- [6] 黄和平,杨勃,宋炳煜,等.内蒙古黄土丘陵沟壑区生态系统健康评价[J].生态学报,2005,25(5):1048-1056.
- [7] 戴全厚,刘国彬,王跃邦,等.黑牛河小流域生态经济系统健康诊断方法探索[J].中国水土保持科学,2006,4(1):27-34.
- [8] 戴全厚,刘国彬,田均良,等.侵蚀环境小流域生态经济系统健康定量评价[J].生态学报,2006,26(7):2219-2228.
- [9] 陈巨龙,战学秋.可拓方法综述[J].吉林化工学院学报,2002,19(1):72-76.
- [10] 汪明武,金菊良,李丽.地图质量可拓综合评价模型[J].地理科学,2003,23(5):612-616.
- [11] 冯玉国,程锡良.地下水环境质量综合评价可拓集合方法及其应用[J].工程勘察,2002(3):23-25.
- [12] 胡宝清.可拓评价方法在围岩稳定性分类中的应用[J].水利学报,2000,31(2):66-70.