杜仲组织培养的研究

何 泼 申 延 秦俊哲 董文宾

(陕西科技大学生命科学与工程学院)

摘 要:以杜仲无菌苗的幼茎为外植体接种于 MS 培养基上,并附加相应的植物生长调节剂进行杜仲愈伤组织的诱导和增殖的研究;另外,对不同培养基、光照条件、pH 值等理化因子对杜仲愈伤组织增殖的影响进行了研究。结果表明,MS 培养基(0.8%琼脂+3%蔗糖)附加 2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 有利于杜仲愈伤组织的诱导。B₅ 培养基(0.8%琼脂+3%蔗糖)附加 1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,并控制 pH 值为 6.5,12 h/d 光照有利于愈伤组织的增殖。

关键词:杜仲;愈伤组织;诱导;增殖

A Study on tissue culture of *Eucommia ulmoides* // HE Po, SHEN Yan, QIN Jun-zhe, DONG Wen-bin

Abstract: With the young shoots of *Eucommia ulmoides* axenic as explants, the effects of basic media, types of hormone and their proportions, illumination time and pH on callus induction and proliferation of *E. ulmoides* were studied in this paper. The results showed that MS medium (0.8% agar + 3% sucrose) supplementing with 2.0mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA was most suitable for the induction of *Eucommia ulmoides* callus, and the B₅ medium (0.8% agar + 3% sucrose) supplementing with 1.0 mg/L NAA + 1.5mg/L 6-BA under the condition of pH 6.5 and 12h/d illumination was optimized for the proliferation of callus.

Key words: *Eucommia ulmoides*; Callus; Induction; Proliferation

First author's address: College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, 712081, Xi'an, Shaanxi, China

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)属杜仲科植物,其药用价值和经济价值均高,既是名贵药用植物,又是重要经济树种^[1]。杜仲皮是传统中药,具有补肝肾、强筋骨、安胎、降压、久服轻身耐老等功效^[2]。其全株(除木质部外)都含有的杜仲胶以其独有的“橡(胶)-塑(料)二重性”的特点,在航空航天以及医疗器械等许多高科技领域具有巨大的应用价值^[1]。杜仲的主要药用有效成分京尼平甙、京尼平甙酸、桃叶珊瑚甙、绿原酸以及功能成分杜仲胶等均为次生代谢产物^[3-5],虽然这些有效成分可以通过从植物中提取来获得,但受到原料、季节、成分含量低等条件的限制,提取量不高,难以实现工业化大规模生产。采用人工组织和细胞培养繁殖速度快、繁殖系数高,且不受地理环境及气候等自然条件影响,是解决原料资源不足的最佳途径^[1,6]。本试验以组织培养技术为基础,较为详细地研究了影响杜仲愈伤组织的诱导和增殖的条件与因素,目的在于为杜仲的组织培养和细胞培养提供资料,并为从愈伤组织中提取杜仲胶及其他中药有效成分奠定基础。

收稿日期:2006-01-08

修回日期:2006-01-10

基金项目:陕西科技大学博士基金(编号:BJ04-03)。

第一作者简介:何泼(1970-),女,博士,主要从事杜仲组织培养与次生代谢物生产的研究。

1 材料与方法

1.1 材 料

本实验室培养获得的杜仲无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导

取无菌苗的幼茎切成 0.5~0.7 cm 的小段,接种于附加有不同植物生长调节剂的 MS 培养基上,蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L,于 26±2℃、光照 12 h/d 下培养。接种采用 2 种方式:茎段横放于培养基上或者竖插于培养基上。同时作对照试验,对照试验的培养基上不加植物激素,其他相同。每瓶接种量为 4~6 个,每组接种 5~8 瓶。培养 20 d 后收获,并按下式计算诱导率:

$$\text{诱导率} = \frac{\text{形成愈伤组织的外植体块数}}{\text{接种的外植体块数}} \times 100\%$$

1.2.2 愈伤组织的增殖

挑选生长旺盛和颜色质地及形态都相同的愈伤组织,切成均匀一致的小块,接种于附加有不同植物生长调节物质的 B₅ 培养基上进行继代培养,20 d 后收获并测量其生长量。进行生长量测定时每处理随机取 5 瓶培养基编号,用电子天平称重,接种愈伤组织后再称重 1 次,二者相减即愈伤组织的初始重量(W₁),培养 20 d 后将每瓶愈伤组织取出称重,得收获重量(W₂)。愈伤组织的增长率按下式计算:

应用研究

$$\text{增长率} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100\%$$

1.2.3 不同理化因子对杜仲愈伤组织的增殖效应

在 B₅ 培养基(不同培养基的增殖效应使用对应培养基)上,蔗糖 30 g/L,琼脂 8 g/L,附加 1.0 mg/L NAA + 1.5 mg/L 6-BA,同时附加对应的因子,愈伤增长率计算方法同上。

2 结果与讨论

2.1 杜仲愈伤组织的诱导效应

2.1.1 NAA 的诱导效应

将杜仲幼茎分别接种在含有不同浓度 NAA 的 MS 培养基上进行茎段的诱导试验。试验发现,幼茎在接种后 3 d 开始膨大变白,6 d 时大多数幼茎开始有愈伤组织长出,横放的茎段从两端开始长出,竖插的茎段从接触培养基的一端开始长出,对照一直无变化,有的开始变褐枯死。20 d 时不同组愈伤组织的生长情况已有明显的差别(见表 1),此时完成诱导试验。

萘乙酸(NAA)浓度在小于 3.0 mg/L 时,诱导效果均较好,出愈率均大于 90%,各处理间无明显差异,但出愈时间、愈伤颜色、生长量以及继代后的生长情况等均有明显差别。NAA 在 0~1.0 mg/L 时,出愈时间较长,黄绿色无光泽,质地紧密,且生长慢,生长量小。NAA 浓度在 1.0~2.5 mg/L 时,出愈时间较前者早 3~5 d,奶油色,质地疏松,生长量大,继代后生长旺盛。当 NAA 浓度达到 2.5 mg/L 时,虽然愈伤组织长势、颜色等方面都较好,但 20 d 时,愈伤组织已停止生长,并有发褐现象,继代后生长一般很容易褐化死亡。

表 1 NAA 的诱导效应

NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	接种外植体数/块	诱导数/块	诱导率/%	愈伤组织颜色	生长势
0	30	0	0	—	—
0.3	45	40	88.9	黄绿色,无光泽,质地致密	*
0.5	50	48	96.0	黄绿色,无光泽,质地紧密	**
1.0	50	50	100	黄绿色,质地稍紧密	***
1.5	56	56	100	奶油色,有光泽,疏松	*****
2.0	60	60	100	奶油色,有光泽,疏松	*****
2.5	50	50	100	奶油色,有光泽,疏松	****
3.0	35	14	40.0	灰白色,无光泽	***

注: * 生长差; ** 生长一般; *** 生长较好; **** 生长好; ***** 生长最好; — 不生长或有抑制作用。以下相同。

2.1.2 NAA 与 6-BA 交互作用的诱导效应

将 NAA 的最佳浓度分别和不同浓度的 6-BA 同时附加于 MS 培养基上进行诱导试验(见表 2)。在 NAA 浓度为 2.0 mg/L 时,低浓度 6-BA 的加入虽然对诱导率影响不大,但有利于愈伤组织的生长。6-BA

的浓度在 0.1~0.5 mg/L 时,愈伤组织生长旺盛,奶油色,有光泽,生活力强,且随着 6-BA 浓度的升高,愈伤组织的生长势越好。当 6-BA 浓度达到 1.0 mg/L 时,其对愈伤组织的生长开始产生抑止作用。6-BA 浓度到 2.0 mg/L 时,出愈率已经受到影响,且愈伤长势差,也不利于继代。

表 2 NAA 与 6-BA 交互作用的诱导效应

NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	接种外植体数/块	诱导数/块	诱导率/%	生长势
2.0	0.1	28	26	100	**
2.0	0.3	40	39	100	****
2.0	0.5	42	42	100	*****
2.0	1.0	50	50	100	****
2.0	1.5	50	50	97.8	****
2.0	2.0	55	55	81.3	***
2.0	2.5	40	40	75.2	**

通过诱导试验发现单独使用 NAA 即可 100% 诱导出愈伤组织,而适量 6-BA 的加入可以促进愈伤的生长。这说明杜仲幼茎中含有一定量的细胞分裂素,在诱导愈伤时可不再加入,但加入少量的分裂素有利于愈伤的生长。

2.2 杜仲愈伤组织的增殖

2.2.1 NAA 的增殖效应

愈伤组织接入附加不同浓度 NAA 的 B₅ 培养基上做继代试验,结果见表 3。NAA 浓度在 1.0 mg/L 时,增殖效应最好,愈伤组织的生长势最好,颜色为奶油色,质地疏松,且富有光泽。20 d 后,增长率达 1 708%。当 NAA 的浓度到 1.5 mg/L 以上时,愈伤组织的生长率开始下降。到 4.0 mg/L 时以完全抑止愈伤组织的生长。

表 3 NAA 的增殖效应

NAA 浓度/mg·L ⁻¹	增长率/%	生长势
0	0	—
0.5	922	****
1.0	1 708	*****
1.5	1 346	***
2.0	852	**
3.0	240	*
4.0	—	—

2.2.2 NAA 与 6-BA 交互作用的增殖效应

B₅ 培养基上附加 1.0 mg/L NAA 和不同浓度的 6-BA 进行继代培养试验,其对愈伤组织生长的影响明显不同(见表 4)。6-BA 的浓度小于 1.5 mg/L 时有促进愈伤组织生长的作用,且随着 6-BA 浓度的增大,愈伤的生长势越好。6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时,愈伤的生长最好,增长率达到 2 305%。当 6-BA 浓度

大于 1.5 mg/L 时开始抑制愈伤的生长,到 4.0 mg/L 时已经完全抑制愈伤组织的生长。

表 4 NAA 与 6-BA 交互作用的增殖效应

6-BA 浓度/mg·L ⁻¹	增长率/%	生长势
0.5	1 042	***
1.0	1 708	****
1.5	2 305	*****
2.0	842	**
3.0	231	*
4.0	—	—

试验结果表明, B₅ 培养基并附加 NAA 1.0 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 适合于愈伤组织的继代培养,且增长率可高达 2 305%,愈伤组织为奶油色生长旺盛,继代后生长良好。据李琰等^[7]报道,采用 B₅ 培养基作杜仲愈伤组织继代培养时(愈伤组织最高增长率 1 708%),6-BA 的加量大于 1.0 mg/L 时就会产生抑制作用,本试验结果与此结论有所不同。

表 5 不同培养基对杜仲愈伤组织增殖的影响

项目	MS	B ₅	LS	White	1/2MS	N ₆
增长率/%	764	2 305	542	563	942	1 650
愈伤质地	黄绿色,无光泽,致密	奶油色,有光泽,疏松	灰白色,无光泽,部分褐化	灰白色,无光泽,部分褐化	黄绿色,无光泽,致密	奶油色,有光泽,疏松
生长势	***	*****	*	*	***	*****

2.3.2 光照条件对杜仲愈伤组织增殖的影响

本试验分别采取 24 h/d 黑暗、12 h/d 光照、自然光 3 种不同光照方法进行光照对愈伤组织增长的影响试验,结果见表 6。3 种不同光照方式下愈伤组织的生长率并无太大差异,只是连续 24 h/d 黑暗培养时的增长率略低,但 12 h/d 的光照条件下培养的愈伤组织容易做进一步继代培养。另外光照对杜仲愈伤中次级代谢物的积累有明显影响,杨振堂等报道,光照有利于愈伤中杜仲胶的积累^[8]。故我们在研究

2.3 其他理化因子对愈伤组织增殖的影响

2.3.1 不同培养基对杜仲愈伤组织增殖的影响

以 MS 培养基上诱导的愈伤组织为材料,挑选其中颜色质地均匀一致的分别接种到 MS、B₅、LS、White、1/2MS、N₆ 培养基上进行继代培养,试验结果见表 5。B₅ 培养基最适合于愈伤组织的继代培养,继代后愈伤生长旺盛,奶油色,质地疏松,增长率最高;其次 N₆ 培养基效果也较好。MS 培养基虽然在诱导时效果很好,但它不适于愈伤组织的继代培养,愈伤在接种到该培养基上后生长缓慢,20 d 时增长率较低,有的接种后不久会褐化死亡。其他培养基继代后均生长不良,甚至褐化死亡。但据黄勇等^[10]报道,MS 培养基(NAA 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + KT 1.0 mg/L)更适合杜仲愈伤组织的继代培养,这可能是由于培养基上所加生长调节物有所不同,或者与外植体种类也有一定关系。

提高愈伤组织含胶量的途径时,决定采用光照培养。

表 6 光照条件对杜仲愈伤组织增殖的影响

光照条件	24 h/d 黑暗	12 h/d 光照	自然光
增长率/%	1 823	2 305	2 102
愈伤质地	奶油色,无光泽	奶油色,有光泽	奶油色,有光泽
继代后生长情况	生长较慢	生长旺盛	生长旺盛

2.3.3 培养基 pH 值对杜仲愈伤组织增殖的影响

表 7 显示了 6 种 pH 值的培养基对杜仲愈伤组织生长的影响。

表 7 培养基 pH 值对杜仲愈伤组织增殖的影响

项目	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0
增长率/%	373	952	1 102	1 963	2 305	875
愈伤质地	灰白色,大部分褐化	灰白色,部分褐化	奶油色,无光泽	奶油色,有光泽	奶油色,有光泽	淡黄色,无光泽
生长势	*	**	***	****	*****	***

培养基的 pH 值是影响愈伤组织生长的一个重要因素,它可通过影响细胞质膜的通透性、植物激素在胞内的作用、培养物的代谢以及生长分化等直接或间接地影响到愈伤组织的生长^[9]。由表 7 看出,pH 值 5.5 以下时不利于愈伤组织的生长,pH 值 5.5 ~ 6.5 具有一定缓冲力,对愈伤组织的生长有促进作用。当 pH 值为 6.5 时,愈伤组织增长量最大,20 d 时

增长率达到 2 305%;pH 值为 7.0 时,随着培养时间的延长,愈伤组织逐渐失去光泽,生长缓慢。

3 结 语

(1)NAA 对杜仲愈伤组织的诱导效果明显,NAA 的浓度范围在 1.0 ~ 2.5 mg/L 时,诱导率最高,愈伤组织呈奶油色,质地疏松,生长量大,并且继代后生长旺盛。而 NAA 的浓度达到 2.0 mg/L 时,诱导情况最

应用研究

好。6-BA 在愈伤组织诱导率方面表现并不明显,但在附加有 2.0 mg/L NAA 的 MS 培养基上添加少量的 6-BA 有利于愈伤组织的生长,且 6-BA 的浓度在 0.1 ~ 0.5 mg/L 时,效果最好。

(2) 杜仲愈伤组织的增殖培养试验发现,单独使用 NAA 时以 1.0 mg/L 的增殖效果最好,增长率为 1 708%。NAA 与细胞分裂素配合使用时,以 1.0 mg/L NAA + 1.5 mg/L 6-BA 的组合最有利于愈伤组织的生长,增长率为 2 305%,其愈伤组织生长量明显大于单独使用 NAA 时的生长量。

(3) 在 MS、B₅、LS、White、1/2MS、N₆ 等 6 种培养基中,MS 培养基最有利于愈伤组织的诱导,而 B₅ 培养基则最适合于愈伤组织的继代培养。另外在愈伤组织的诱导和继代培养时,培养条件控制为 pH 值 6.5,光照时间 12 h/d 最为适宜。

参考文献

[1] 冉懋雄. 杜仲[M]. 北京:科学技术文献出版社,2002.

[2] 管淑玉,苏薇薇. 杜仲化学成分与药理研究进展[J]. 中药材,

2003,26(2):124-129.

[3] Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effect of *Eucommia* and *Siberian ginseng*[J]. *Acta Pharm acol sin*, 2001, 22(12): 1 057-1 070.

[4] Luo X, Ma M, Chen B, Yao S. Analysis of nine Bioactive Compounds in *Eucommia Ulmoides Oliv.* And their Preparation by HPLC - photodiode Array detection and Mass spectrometry[J]. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 2004, 27(1): 63-81.

[5] 华会明,尹宏权,李宝强,等. 杜仲化学成分的研究[J]. 分子植物育种,2003,1(5/6):801-803.

[6] 张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养研究进展[J]. 河南科技大学学报,2003,23(3),96-100.

[7] 李琰,张朝红,崔宏安. 激素对杜仲愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报,2004,32(1):102-106.

[8] 杨振堂,臧埔,马淑琴,等. 杜仲组织培养中培养条件与含胶量关系的研究[J]. 特产研究,1999(2):6-9.

[9] 曹心祥,韩小云. 植物组织培养中的 pH 值[J]. 杭州师范学院学报,2003,2(1):60-61.

[10] 黄勇,周吉源. 杜仲愈伤增殖的诱导及增殖效应[J]. 华中师范大学学报,2003,3(1):102-106.

(通讯地址:712081,陕西省咸阳市)

秃叶黄皮树和黄檗种子萌发习性的比较

向 丽 叶 萌 胡莹莹 唐艳梅 赵 敏

(四川农业大学)

摘 要:对秃叶黄皮树和黄檗种子进行了种子形态、种皮透水性、发芽率等方面的比较研究。结果表明:种皮对秃叶黄皮树和黄檗种子的透水性有较大影响,前者透水性较后者好;秃叶黄皮树种子的田间发芽率为 68.7%,极显著高于黄檗的 36.3%;秃叶黄皮树种子和黄檗种子具有休眠特性,且秃叶黄皮树种子的休眠较黄檗浅,经过低温层积后两种种子的萌发率都有所提高。

关键词:秃叶黄皮树;黄檗;种子萌发;种子休眠

A Comparison on Characteristics of Seed Germination Between *Phellodendron chinense* Schoneid var *Glabriusculum* Schoneid. and *P. amurense* Rupr. // XIANG Li, YE Meng, HU Ying-ying, TANG Yan-mei, ZHAO Min

Abstract: The characteristics of seed germination, such as seed morphology, water permeability of seed capsule and germination ratio, were compared between *Phellodendron chinense* Schoneid. var. *glabriusculum* Schoneid and *P. amurense* Rupr. in this paper. The results indicated that the seed capsule has obvious effect on water permeability for both species, and the former had better water permeability. Similarly, The field germination rate of former specie was 68.7%, significantly higher than latter specie (36.3%). The seed of both species has the characteristic of dormancy, with deeper dormancy in *P. amurense* Rupr. However, seed dormancy of both species could be broken by low temperature stratification.

Key words: *Phellodendron chinense* Schoneid var *glabriusculum* Schoneid; *P. amurense* Rupr; Seed germination; Seed dormancy

First author's address: Department of Forest of Sichuan Agriculture University, 625014, Ya'an, Sichuan, China

收稿日期:2006-01-19

修回日期:2006-03-05

基金项目:国家科技部“十五”攻关项目“中药现代化与医药创新”子课题“黄柏规范化种植(GAP)研究”(编号 2001BA701A60-02)。

第一作者简介:向丽(1982-),女,硕士生,专业方向经济林的研究开发。

我国芸香科(Rutaceae)黄柏属(*Phellodendron* Rupr.)植物有 2 种 1 变种,即黄檗(*P. amurense* Rupr.)、黄皮树(*P. chinense* Schoneid.)及其变种秃叶黄