

杜仲成熟胚离体培养研究

孙 宁¹, 刘玉芹², 赵新海³, 陈小强¹, 张 磊¹

(1. 天津农学院 农学系, 天津 300384; 2. 天津农学院 园艺系, 天津 300384; 3. 天津农学院 计算机科学与信息工程系, 天津 300384)

摘 要:以杜仲种子为外植体进行离体培养, 研究了胚培养方法、培养条件和影响因素。结果表明: 可采用种子 70%酒精处理 30 s, 0.1%升汞 4 min, 无菌条件下剖开种皮取胚接种, 可有效控制污染, 亦可保证胚的存活率; 通过控制 NAA、6-BA、2,4-D 浓度配比可获得杜仲胚苗或愈伤组织; MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L 蔗糖 20%培养基, 最适于不定芽的分化和增殖, 分化率达 90%; 1/2MS+IBA 1.5 mg/L+蔗糖 20%对不定芽生根的诱导效果最好, 生根率达 90.3%。

关键词: 杜仲; 成熟胚; 离体培养; 培养基

中图分类号: S 567.28⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)07-0244-03

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是我国特有树种, 经济价值很高, 资源稀少, 不仅是我国传统的贵重中药材, 具有补肾壮腰和抑制肿瘤生长等作用, 特别是对血压有双向调节功能¹⁻³; 它也是温带最有开发利用前景的胶原植物, 在它的叶片、树皮、根皮和果皮中都含有杜仲胶, 因而受到世人的普遍重视⁴。

近年来, 由于其价值的不断发现, 杜仲价格剧涨, 导致乱砍滥伐, 种子产量减少且破坏了原来就为数不多的杜仲资源。杜仲一般采用种子繁殖、扦插或通过伐桩来

产生萌蘖, 但发芽率不高, 使得杜仲的供应十分困难, 生产中种苗的缺口很大。组织培养是解决种苗快繁的有效方法之一。目前已有部分应用杜仲愈伤组织和植株再生的研究的报道⁵⁻⁹。试验利用杜仲的成熟胚为试材对其萌发、不定芽增殖和试管苗生根进行了探讨和试验, 旨在为杜仲的离体培养研究和种苗的快速繁殖提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取当年生饱满杜仲种子为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的灭菌和预培养 种胚灭菌采用 A. 带种皮和 B. 裸胚(剥去种皮)灭菌 2 种方法。分别经 70%酒精浸泡 30 s, 后用 0.1%HgCl₂ 处理 3、4、5、6 min, 然后用无菌水冲洗 3~4 次。培养基为无激素 MS 培养基。灭菌后裸胚直接接种, 带种皮种子在无菌条件下用解剖刀剥去种皮后将胚接种于无激素 MS 培养基中。

Screening Culture Medium of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils' s Induction and Differentiation.

WANG Yan-ling XI Guang-sheng

(College of Jilin Agriculture Science and Technology of Jilin, Jilin 132109, China)

Abstract: Adopting MS basic culture medium, adding different kinds and different concentration of the plant hormones, choosing non-pollution seeds of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils, cloing the random testing of tissue culture. Result Shoued The E treatment had the best survival rate of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils' s induction, also had the best effect on the seeds of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.

Key words: *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils; Tissue culture; Culture medium

1.2.2 成熟胚培养 将存活的胚接种于 6 种培养基中, 培养 30 d 后统计胚生长情况。培养基为 MS+蔗糖 20%+琼脂 0.65%, 附加激素为: ①NAA 0.5 mg/L; ②NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L; ③NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L; ④2,4-D 0.5 mg/L; ⑤2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L; ⑥2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

1.2.3 不定芽分化增殖培养 幼胚萌发生长到 3~5 cm 时, 切成带一个腋芽的小茎段, 接种在分化培养基中, 培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 20%+琼脂 0.65%, 附加不同浓度的 6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)。

1.2.4 生根培养 将诱导出的不定芽接种在生根培养基中, 培养基为 1/2MS+蔗糖 20%+琼脂 0.65%, 分别附加不同浓度的 NAA 和 IBA(0.5、1.0、1.5 mg/L)。

2 结果与分析

2.1 灭菌方法及时间对胚存活的影响

种子灭菌后在无菌条件下剥去种皮接种, 裸胚灭菌后直接接入培养基。部分成熟胚在培养 7~10 d 后子叶伸展变绿。灭菌效果及成活情况见表 1。

表 1 不同灭菌方法及时间处理对胚存活的影响

序号	处理 时间/ min	接种数 / 个	子叶受损 数/ 个	污染数 / 个	胚存活数 / 个	子叶褐变 程度
A1	4	40	4	0	40	+
A2	6	40	6	0	40	+
A3	8	40	9	0	40	+
A4	10	40	7	0	40	+
B1	3	40	0	0	24	++
B2	4	40	0	0	0	+++
B3	5	40	0	0	0	+++
B4	6	40	0	0	0	+++

由表 1 可以看出, 2 种灭菌方法及各处理时间均可达到较好的灭菌效果, 污染率为 0, 虽然用解剖刀剥去种皮时使部分子叶受损, 但胚仍然可正常存活。方法 B 裸胚由于失去了种皮的保护, 直接接触到 HgCl₂, 只有处理 3 min 时有 60% 的裸胚存活并萌发, 超过 3 min 胚芽组织易受毒害褐变死亡。而方法 A 经 HgCl₂ 处理 4~10 min 后无菌条件下剥去种皮接种, 胚萌发率可达到 100%。

表 2 杜仲胚萌发及生长情况

处理	激素浓度/ mg · L ⁻¹			接种数 / 个	萌发率 / %	生长状况
	NAA	6-BA	2,4-D			
C1	0.5	0	0	30/ 16	53.3	弱, 愈伤组织少
C2	0.5	1.0	0	30/ 25	83.3	健壮, 愈伤组织少
C3	1.0	1.0	0	30/ 21	70.0	健壮, 愈伤组织较多
C4	0	0	0.5	30/ 8	26.7	弱, 愈伤组织多
C5	0	1.0	0.5	30/ 12	40.0	弱, 愈伤组织多
C6	0	1.0	1.0	30/ 5	16.7	弱, 愈伤组织多

2.2 外源激素对胚萌发及生长的影响

将成活的杜仲胚接种在 6 个处理的培养基中, 萌发

及生长情况见表 2。

成熟胚在培养 7~10 d 后子叶伸展变绿; 培养 10~30 d 后, 部分胚芽能延伸并张开萌发成苗; 而部分胚未长出真叶或已长出真叶, 子叶膨胀增厚, 逐渐产生半透明、浅黄色、颗粒状的愈伤组织(图 1)。在 NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 时萌发率最高, 芽生长健壮愈伤组织较少, NAA 1.0 mg/L 时胚子叶及胚轴甚至整个胚芽产生愈伤组织较多。在含有 2,4-D 的培养基胚愈伤化较明显, 随着 2,4-D 浓度的增加, 萌发率呈下降趋势, 且萌发的胚长势畸形, 甚至停止生长, 出现愈伤化现象。

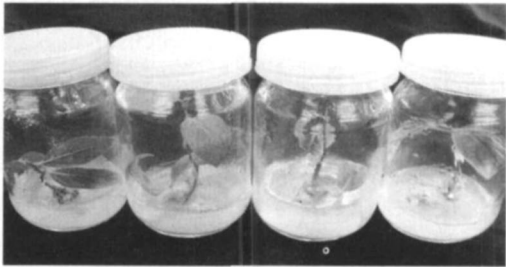


图 1 成熟胚的萌发培养

2.3 不同浓度激素对不定芽增殖的影响

胚萌发苗生长到 3~4 cm 时, 将萌发苗剪成带腋芽茎段接入增殖培养基中, 定时观察不定芽分化情况, 50 d 后统计试验结果(如表 3)。

表 3 不同浓度激素对不定芽增殖的影响

处理	激素浓度/ mg · L ⁻¹		接种数 / 个	分化率 / %	增殖率 / %	芽生长状况
	NAA	6-BA				
D1	0.2	0.5	30	63.3	2.20	芽少, 较健壮
D2	0.2	1.0	30	86.6	3.83	芽较多, 健壮
D3	0.2	1.5	30	90.0	4.20	芽多, 较健壮
D4	0.2	2.0	30	73.3	2.73	芽少, 细弱

一定浓度的 6-BA 对杜仲不定芽的诱导有一定效果, 分化率随着浓度的增加而提高, 在 6-BA 1.0~1.5 mg/L 时不定芽分化较多, 且芽生长较健壮, 其中处理 D3 分化率最高, 达 90.0%, 浓度达 2.0 mg/L 时分化率反而降低, 且芽生长细弱。

2.4 外源激素对生不定根诱导的影响

不定芽长至 3 cm 时, 将单芽剪下接入 6 种生根培养基中, 培养 20~30 d 后各处理均有不定根长出, 培养 60 d 后统计生根情况, 见表 4。

由表 4 可以看出, 试验中 NAA 和 IBA 2 种激素处理杜仲试管苗生根率均随浓度的升高而增加, 且同浓度下 IBA 处理诱导根的形成效果优于 NAA。其中 IBA 1.5 mg/L 对于不定根的诱导效果最好, 生根率达 90.3%, 且单株生根数较多, 不定根生长粗壮。

表 4 杜仲试管苗生根诱导情况

处理	激素种类和浓度 mg·L ⁻¹		接种芽数 / 个	生根率 / %	不定根生长情况
	NAA	IBA			
E1	0.5	0	30	46.7	根少, 细弱
E2	1.0	0	30	73.3	根较多, 较细弱
E3	1.5	0	30	86.7	根较多, 较粗壮
E4	0	0.5	30	70	根较少, 较粗壮
E5	0	1.0	30	83.3	根较多, 生长粗壮
E6	0	1.5	30	90.3	数量多, 生长粗壮

3 小结

该研究中利用杜仲成熟种子消毒后, 剥离出胚进行离体培养, 可直接获得杜仲无菌株。消毒时间短 操作简单, 萌发率达到 100%, 无污染 可有效解决采用茎段、叶片等外植体接种污染率高, 萌发率低的问题, 是建立杜仲无菌培养系的有效方法。通过对胚萌发生长过程中激素的调节, 可获得胚苗、愈伤组织 2 种无菌培养产物, 展现了杜仲成熟胚培养应用于生物技术领域的良好前景。还进行了杜仲不定芽增殖和生根诱导的试验。结果表明, 一定浓度的 6-BA 对杜仲不定芽的诱导有一定效果, 分化率随着浓度的增加而提高, MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+蔗糖 20%培养基, 最适于不定芽的分化和增殖, 分化率达 90%, 分化的不定芽生长健

壮, 叶色浓绿, 而 6-BA 达到 2.0 mg/L 时分化率反而有所下降。1/2MS+IBA 1.5 mg/L+蔗糖 20%对不定芽生根的诱导效果最好, 生根率达 90.3%。

参考文献

[1] 张康健 张檀. 中国神树——杜仲[M]. 北京: 经济管理出版社, 1997: 149-151.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Hayman E P, Yokoyama H, Bai K Z. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* Oliv. by 2-diethylaminoethyl-3, 4-dichlorophenyl ether[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78-82.
[5] 林静芬. 林木组织培养的现状与展望[J]. 林业科技通讯, 1998(4): 10-14.
[6] 李琰, 张靖 辛转霞, 等. 杜仲组培快繁的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(6): 79-82.
[7] 李琰, 张朝红, 崔宏安. 激素对杜仲幼茎愈伤组织诱导和生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(1): 57-60.
[8] 谷文英 裴德清, 朱登云, 等. 杜仲茎段培养的初步研究[J]. 莱阳农学院学报, 1999, 16(1): 6-9.
[9] 李岩, 罗丽 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.

In vitro Culture of Mature Embryo in Cortex Eucommia

SUN Ning¹, LIU Yu-qin², ZHAO Xin-hai³, CHEN Xiao-qiang¹, ZHANG Lei¹

(1. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 3. Department of Computer Science and Information Engineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: The mature embryo of *Cortex Eucommia* as the explant to study the culture methods, reaction and affecting factors. The results were as follow: The best treatment time of the seeds was 70% alcohol 30 s and 0.1% corrosive sublimate 4 min, could reduce the contamination rate, the survival rate was 100%. Through control the consistence of NAA, 6-BA and 2, 4-D could obtain asepsis plantlings and callus. And the optimal medium for multiplication was MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.5 mg/L, the differentiation rate was 90%. Rooting was induced on 1/2MS+IBA 1.5 mg/L, which rooting rate reached 90.3%.

Key words: *Cortex eucommia*; Mature embryo; *In vitro* culture; Culture medium.