

# 杜仲叶片愈伤组织诱导研究

张 颖<sup>1,2</sup>, 杨 炯<sup>3</sup>, 谢 海<sup>1,2</sup>

(1. 攀枝花学院 生物与化学工程学院 四川 攀枝花 617000; 2. 攀枝花学院 生物与化工研究所 四川 攀枝花 617000;  
3. 攀枝花市食品与药品检验所, 四川 攀枝花 617000)

**摘 要:**以杜仲幼嫩叶片为试材,在 MS 为基本培养基上添加不同浓度的生长素和细胞分裂素,对愈伤组织诱导的优化条件进行了研究。结果表明:2,4-D 和 6-BA 对诱导杜仲叶片愈伤组织诱导均有影响,最优培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L,诱导率达 87.5%,且愈伤组织生长较好。培养基中添加 5 g/L 活性炭能有效地抑制外植体褐化。

**关键词:**杜仲;愈伤组织;培养基;诱导  
**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2011)05—0173—02

杜仲(*Eucommia ulmoides* Olive),为我国特有的单科、单属、单种植物<sup>[1]</sup>。杜仲中含有内脂、香豆精及其甙、生物碱、多糖及其甙、酸性物质和杜仲胶等多种物质,具有利胆、消炎、清热解毒、降血压、增强细胞免疫等功能<sup>[2]</sup>。杜仲除为珍贵药材和优良的园林绿化树种外,还可以研制药酒、茶叶等保健品,杜仲胶可制作优良的电缆材料<sup>[3]</sup>。杜仲繁殖主要采用播种育苗方法,但其是雌雄异株,定植 10 a 以上才能开花结果<sup>[4]</sup>,种子结实有限,靠种子繁殖难以满足发展需要。采用组培的方法繁殖杜仲,生产周期短,繁殖系数高,成本低,经济效益高。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料来源于攀枝花学院生物与化学研究所植物基地的植株。取初生 2 周左右的杜仲叶片为试验材料,4℃的冰箱中保持 2 d。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体灭菌** 将采集好的叶片用 1%洗洁精水浸泡 5 min 后于自来水中清洗,放入盛有 75%的酒精的广口瓶中摇动杀菌 40 s,无菌水冲洗 3 次,浸入 1%浓度的次氯酸钠溶液中灭菌 10 min,无菌水冲洗 4 次。在无菌操作台上取叶片中部及以下的部位,将叶片切成规整的 0.5 cm×0.5 cm 小叶块(不含粗大叶脉<sup>[5]</sup>)。

**1.2.2 诱导方法** 诱导培养基采用含 30 g/L 蔗糖+5 g/L 活性炭的 MS 基本培养基 附加 2,4-D 和 6-BA,采用 16 组不同配比组合(表 1),琼脂浓度为 7 g/L, pH 5.8, 121℃消毒 15 min。将叶片小块正面朝上、背面朝

下接种于不同激素配比处理的 MS 培养基上。每处理接种 4 瓶,每瓶含 4 个平行样,共 64 瓶,256 个外植体。暗培养 24 h 后,再以光暗条件交替培养(12 h 光照,12 h 黑暗),光照强度 1 500 lx,温度(25±1)℃。该研究使用 GC-H 型人工气候培养箱控制培养条件。

**1.2.3 观察指标** 试验的指标有愈伤组织诱导率、愈伤组织生长状态。愈伤组织诱导率= $\frac{\text{形成愈伤组织的外植体数}}{\text{接种外植体数}} \times 100\%$ 。

表 1 不同激素配比的培养基

序号	培养基/mg·L <sup>-1</sup>	序号	培养基/mg·L <sup>-1</sup>
1	MS+0.1 2 4-D+0.1 BA	9	MS+0.5 2 4-D+0.1 BA
2	MS+0.1 2 4-D+0.3 BA	10	MS+0.5 2 4-D+0.3 BA
3	MS+0.1 2 4-D+0.5 BA	11	MS+0.5 2 4-D+0.5 BA
4	MS+0.1 2 4-D+1.0 BA	12	MS+0.5 2 4-D+1.0 BA
5	MS+0.3 2 4-D+0.1 BA	13	MS+1.0 2 4-D+0.1 BA
6	MS+0.3 2 4-D+0.3 BA	14	MS+1.0 2 4-D+0.3 BA
7	MS+0.3 2 4-D+0.5 BA	15	MS+1.0 2 4-D+0.5 BA
8	MS+0.3 2 4-D+1.0 BA	16	MS+1.0 2 4-D+1.0 BA

## 2 结果与分析

叶片外植体接种于 16 种不同类型的培养基中,7 d 叶片开始增厚膨大,16 d 在叶片切口处开始形成浅绿色的愈伤组织。随后愈伤组织增多,多由切口处形成,颜色浅绿或黄绿,部分愈伤组织由叶片表面形成,颜色为浅绿色或白色,疏松或湿润。愈伤组织生长状态见表 2。30 d 后,愈伤组织逐渐干燥,颜色变为灰白色。

试验中接种外植体总数为 256 块,共诱导愈伤组织 159 块,愈伤组织总诱导率为 62%。由表 2 和图 1 可以看出,16 种不同激素配比的培养基对杜仲叶片愈伤组织的诱导效果存在较大的差异。由诱导率来看,2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 诱导效果较好,浓度为 1.0 mg/L 诱导效果差,0.3 mg/L 和 0.1 mg/L 诱导效果居中。6-BA 浓度为 0.3 mg/L 时诱导率较高。相关研究中 6-BA 的诱导浓度可高达 2~3 mg/L<sup>[6]</sup>。对于愈伤组织诱导而言,2,4-D 是效果最佳的激素,单独使用即得到愈伤组织的

第一作者简介:张颖(1981-),女,重庆永川人,硕士,讲师,现从事生物制药研究工作。E-mail: zemn@sina.com。  
基金项目:攀枝花市市级应用技术与开发资金资助项目(2009TX-3(5))。  
收稿日期:2010-12-28

高诱导率,但多数情况下愈伤组织的生长质量不佳。生长素与细胞分裂素合理配合使用可改善愈伤组织的生长状态<sup>[7]</sup>。该研究中 1、2、10、11 的 4 种培养基类型诱导出的愈伤组织生长势最好。提高 2,4-D 的浓度有利于得到疏松的愈伤组织,但不是越高越好。综合出愈率和愈伤组织质量可得,MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L(10 号培养基)得到的愈伤组织诱导率最高,为 87.5%,且愈伤组织生长较好。

试验中受污染的外植体数为 19,污染率为 7%,因试验材料的灭菌方法采用酒精和次氯酸钠,灭菌时间合适,污染控制较好。该研究为控制褐变采用在培养基中加入 0.5%活性炭<sup>[8]</sup>和培养初期暗启动 24 h 两项措施。褐化外植体数为 71,褐化率达 27%。对出愈率的结果统计具有一定影响。影响外植体褐化的因素包括材料自身、培养基成分、培养条件等,如何更有效的控制褐变有待进一步探讨。

表2 激素水平对愈伤组织诱导的影响

培养基类型	外植体数 /个	出愈数 /个	生长状态	生长势	出愈率 /%
1	16	10	浅绿色疏松	*****	62.5
2	16	12	浅绿色疏松	*****	75.0
3	16	9	浅绿色疏松	***	56.3
4	16	8	浅绿色湿润	**	50.0
5	16	10	浅绿色湿润	*	62.5
6	16	11	黄绿色疏松	*	68.8
7	16	9	黄绿色疏松	**	56.3
8	16	10	黄绿色疏松	**	62.5
9	16	11	浅绿色湿润	*	68.8
10	16	14	浅绿色疏松	*****	87.5
11	16	10	黄绿色疏松	*****	62.5
12	16	9	浅绿色疏松	**	56.3
13	16	11	浅绿色疏松	***	68.8
14	16	9	浅绿色疏松	***	56.3
15	16	9	浅绿色湿润	*	56.3
16	16	7	浅绿色疏松	**	43.8

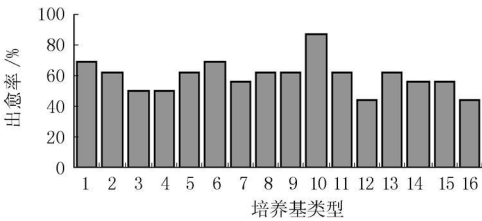


图1 培养基类型与出愈率

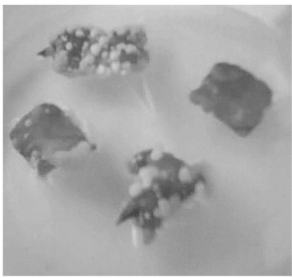


图2 愈伤组织1

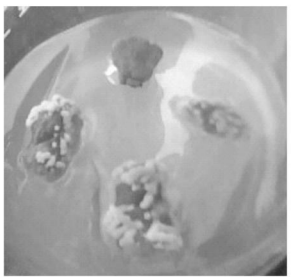


图3 愈伤组织2

3 结论

杜仲系木本植物,其生物学特性导致愈伤组织诱导过程较草本植物难且易发生褐变,因此选用幼嫩叶片为外植体,在适当的激素诱导下易脱分化形成愈伤组织,运用活性炭和一定时间的暗培养在一定程度上有利于抑制褐变现象。该试验以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 2,4-D 和 6-BA,研究不同的培养基对诱导杜仲叶片愈伤组织的影响。结果表明,最优培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L,诱导率为 87.5%。可为进一步控制褐变和愈伤组织增殖条件研究提供一定的参考依据。

参考文献

[1] 王丽楠,杨美华.中药杜仲的研究进展[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):146-155.  
[2] 高志勇.杜仲的应用价值及繁殖方法[J].广东农业科学,2008(9):152-153.  
[3] 杨丹,黄慧珍.杜仲胶的研究与发展[J].世界橡胶工业,2009,36(7):13-17.  
[4] 张健康,张檀.中国神树-杜仲[M].北京:经济管理出版社,1997:149-151.  
[5] 唐建军,陈欣,志水胜好.培养条件对杜仲愈伤组织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.  
[6] 李俊红,张焕玲,李周岐.杜仲组织培养再生体系的优化[J].西北林学院学报,2008,23(4):97-100.  
[7] 李俊明.植物组织培养教程[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2004:58-60.  
[8] 陈红,张绿萍.不同处理对刺梨花药愈伤组织诱导及褐变的影响[J].北方园艺,2008(7):215-217.

Study on Leaf Callus Induction of *Eucommia ulmoides*

ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, YANG Ge<sup>3</sup>, XIE Hai<sup>1,2</sup>

(1. College of Biological and Chemistry Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000; 2 Institute of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000; 3 Panzhihua Institution for Food and Drug Control, Panzhihua, Sichuan 617000)

**Abstract:** To study the optimum conditions of callus induction by using the leaves of *Eucommia ulmoides* Olive as explants, and MS being the basic medium supplemented with different concentrations of auxin and cytokinin. The results showed that both 2,4-D and 6-BA had impact on callus induction. The optimum medium type was MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L, which could lead a high inducing rate of 87.5% and was good for the growth of callus. 5 g/L activated charcoal(AC)could effectively inhabit the explants browning.

**Key words:** *Eucommia ulmoides*; callus; medium; induction