

生长素对杜仲愈伤组织诱导及增殖的影响

袁云香

(渭南师范学院 环境与生命科学系, 陕西 渭南 714000)

摘要:以杜仲幼茎为外植体,采用正交实验设计,添加不同种类及不同浓度的 6-BA 和 NAA,组成 15 种不同的愈伤组织诱导培养基,对杜仲愈伤组织进行诱导增殖培养。结果表明:诱导培养基中添加 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 时,有利于杜仲愈伤组织形成,诱导率达 86.67%;增殖培养基中添加 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 4% 蔗糖,能明显提高杜仲愈伤组织增殖系数。

关键词:生长调节剂;杜仲;愈伤组织;诱导;增殖

中图分类号: S 567.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)11-0104-03

杜仲为杜仲科杜仲属植物,是我国特有的珍稀保护树种,其干燥树皮为传统名贵的中药材^[1]。杜仲含有丰富的生物活性成分,具有多种药理作用^[2-6]。杜仲药用成分的分离及相关基因克隆等方面的研究已成为当今研究的热点。用组织培养生产次生代谢产物,克服了杜仲生长周期长及剥皮对树生长的影响,已成为开发药用植物资源的重要途径^[7]。该研究在杜仲愈伤组织诱导、增殖过程中,添加不同种类及不同浓度的植物生长调节物质,筛选适于杜仲愈伤组织诱导、增殖的最佳配方,以期进一步提高杜仲愈伤组织诱导率及增殖系数,为实现有效成分的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以渭南师范学院栽培 1 a 生杜仲嫩枝条为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 杜仲愈伤组织的诱导 剪取 1 a 生杜仲幼茎,放入烧杯中加入适量洗衣粉,在自来水下冲洗 2 h 左右,再用蒸馏水冲洗 5 min,于超净工作台上,先用 75% 酒精处理 30 s,再用 0.1% 升汞处理 12 min,然后用无菌水冲洗 5~6 次,将幼茎段切成约 1~1.5 cm 长作为外植体,每瓶接种 3 个外植体于不同的诱导培养基上。以 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂 + 脯氨酸 500 mg/L + 水解酪蛋白

300 mg/L + 1% PVP 作为基本成分, pH 6.0, 分别添加 6-BA 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 和 NAA 0、0.1、0.2 mg/L, 组成 15 种诱导培养基,在 (22±1)℃ 光照强度 1 500~2 000 lx 条件下、每天光照时间 13 h,诱导愈伤组织形成,3 周后统计诱导率,并观察愈伤组织生长状态。

1.2.2 杜仲愈伤组织的增殖 诱导培养 3 周后,将质地相当的淡黄绿、较疏松、有光泽生长旺盛的愈伤组织块小心切下,分别接种于不同的增殖培养基上。每瓶接种 5 块愈伤组织,培养温度 (25±1)℃、光照强度为 1 500~2 000 lx、每天光照时间 13 h。增殖培养基的筛选采用正交设计 $L_9(3^4)$ ^[8],设置 3 个因素分别为 6-BA、NAA、蔗糖,每个因素设置 3 个水平数。6-BA 的浓度分别为 0.5、1.0、1.5 mg/L; NAA 的浓度分别为 0.1、0.5、1.0 mg/L; 蔗糖的浓度分别为 3%、4%、5%。20 d 后统计愈伤组织生长情况,以其相对生长量为增殖系数: (培养后重 - 培养前重) / 培养前重,确定最适继代培养基配方。愈伤组织增殖每 3 周继代 1 次。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 和 NAA 对杜仲愈伤组织诱导影响

幼嫩茎段在诱导培养基上培养 1 周左右就能在茎的下端开始看到愈伤组织,2 周左右茎段基部开始完全愈伤组织化,质地较疏松、颜色淡黄绿、有光泽,生长旺盛。从表 1 可看出,培养基中没有添加任何植物生长调节剂的培养组合,不能诱导出愈伤组织。在单独添加 6-BA 或 NAA 时,愈伤组织诱导率都不高。但同时附加 6-BA 和 NAA 时,诱导率有所提高,诱导率最高的培养组合是添加 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 培养基,诱导率达 86.67%。

作者简介:袁云香(1980-),女,硕士,讲师,研究方向为植物分子遗传学。E-mail: yuanyunxiang2006@126.com。

基金项目:陕西省教育厅 2009 年度科学研究计划资助项目(09JK434);渭南师范学院研究生科研基金资助项目(09YKZ002);国家自然科学基金资助项目(31000410)。

收稿日期:2011-03-25

表1 不同浓度 6-BA 和 NAA 组合对杜仲愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		外植体数	诱导率/%	愈伤组织质地
6-BA	NAA			
0.0	0.0	30	0.0	无
0.5	0.0	32	46.88	结构较致密,淡黄色
1.0	0.0	31	61.29	结构较疏松,淡黄绿色
1.5	0.0	30	60.0	结构较疏松,淡黄绿色
2.0	0.0	29	58.62	结构较疏松,淡黄绿色
0.0	0.1	28	35.71	结构较疏松,淡黄色
0.5	0.1	30	53.33	结构较疏松,淡黄色
1.0	0.1	30	86.67	结构疏松,淡黄绿色
1.5	0.1	30	83.33	结构疏松,淡黄绿色
2.0	0.1	29	75.86	结构疏松,淡黄绿色
0.0	0.2	28	42.86	结构较疏松,淡黄色
0.5	0.2	31	58.06	结构较疏松,淡黄色
1.0	0.2	32	68.75	结构疏松,淡黄绿色
1.5	0.2	30	70.0	结构较疏松,淡黄绿色
2.0	0.2	30	66.67	结构较疏松,淡黄绿色

注:诱导率=愈伤组织块数/接种的外植体数 $\times 100\%$ 。

2.2 不同浓度 6-BA 和 NAA 对杜仲愈伤组织增殖影响

杜仲愈伤组织在按照正交设计的 $L_9(3^4)$ 增殖培养基,其增殖系数见表2。直观分析可得出,适宜增殖的培养基为 $\text{MS}+0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.5 \text{ mg/L NAA}+4\%$ 蔗糖,影响因素最大为 6-BA,其次为 NAA,最小为蔗糖。通过方差分析可以看出,6-BA 和 NAA 各水平间的差异有统计学意义且差异极显著,而蔗糖各水平间的差异不显著,无统计学意义(表3)。在杜仲愈伤组织增殖过程中,不添加 NAA 和蔗糖对增殖系数影响不大。用增殖培养基 $\text{MS}+0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.5 \text{ mg/L NAA}+4\%$ 蔗糖进行杜仲愈伤组织增殖培养确认试验,在增殖培养 21 d 后进行统计,增殖系数可达到 7.84 左右,杜仲愈伤组织生长正常。因此,可确定杜仲愈伤组织增殖培养基为 $\text{MS}+0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.5 \text{ mg/L NAA}+4\%$ 蔗糖。

表2 增殖培养的试验结果

试验号	6-BA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	蔗糖 /%	增殖系数
1	0.5	0.1	3	7.16
2	0.5	0.5	4	7.84
3	0.5	1.0	5	6.58
4	1.0	0.1	4	5.87
5	1.0	0.5	5	5.98
6	1.0	1.0	3	5.16
7	1.5	0.1	5	4.46
8	1.5	0.5	3	4.85
9	1.5	1.0	4	3.75
K1	21.58	17.49	17.17	
K2	17.01	18.67	17.46	
K3	13.06	15.49	17.02	
k1	7.193 3	5.83	5.723 3	
k2	5.67	6.223 3	5.82	
k3	4.353 3	5.163 3	5.673 3	
R	2.84	1.06	0.1467	

表3 增殖培养的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
6-BA	2	12.119 8	6.059 9	210.331 3	0.004 732
NAA	2	1.722 8	0.861 4	29.897 4	0.032 365
蔗糖	2	0.033 4	0.016 7	0.5789	0.633 366
误差	2	0.057 6	0.028 8		
总和	8	13.933 6			

3 讨论与结论

在杜仲愈伤组织诱导及增殖时,植物生长调节剂是影响愈伤组织诱导率及增殖系数的关键性因素之一。在组织培养过程中,不同种类植物生长调节剂以及同一种植物生长调节剂的不同浓度都会影响杜仲愈伤组织植株的诱导。KT、2,4-D、NAA 和 6-BA 都是诱导杜仲愈伤组织再生植株时常用的植物生长调节剂素,它们在愈伤组织诱导中作用不同。虽然单独使用 6-BA 和 NAA 都可诱导出愈伤组织,但同时加入有 6-BA 和 NAA 时诱导率明显提高,愈伤组织质地也表现为生长旺盛,富有光泽。因此 6-BA 和 NAA 配合使用优于单独使用,这与李琰等的研究结果一致^[9]。其中最适 6-BA 和 NAA 的诱导组合为 $\text{MS}+1 \text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.1 \text{ mg/L NAA}$,最适增殖培养基为 $\text{MS}+0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.5 \text{ mg/L NAA}+4\%$ 蔗糖。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 唐建军,张祿源,何鸣静. 杜仲的研究与应用进展[J]. 植物学通报,1998,15(6):47-51.
- [3] 朱丽青,张黎明,贡瑞生. 杜仲叶与杜仲皮的药理研究[J]. 中草药,1986,17(2):15-17.
- [4] Yen G C, Hsieh C L. Reactive oxygen species scavenging activity of *Dorzhong* (*Eucommia ulmoides* Olive) and its active compounds[J]. J Agric Food Chem,2000,48(8):3431-3436.
- [5] Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effect of *Eucommia* and *Siberian ginseng*[J]. Acta. Pharmacol sin.,2001,22(12):1057-1070.
- [6] Li Y, Metori K, Koike K, et al. Granuloma maturation in the rat is advanced by the oral administration of *Eucommia ulmoides* Olive leaf [J]. Bio. Pharm Bull,2000,32(1):60-65.
- [7] 李琰,董娟娥,姜在民,等. 杜仲愈伤组织中次生代谢产物积累动态研究[J]. 西北植物学报,2004,24(11):2033-2037.
- [8] 方开泰,马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京: 科学出版社,2001.
- [9] 李琰,姜在民,唐锐. 杜仲叶片愈伤组织诱导的激素优化研究[J]. 植物研究,2006,26(2):182-186.

毛棉杜鹃嫩枝扦插繁殖研究

熊友华¹, 吴志¹, 王定跃², 刘念¹, 刘永金², 徐涛²

(1. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广东 广州 510225; 2. 深圳市梧桐山风景区管理处, 广东 深圳 518004)

摘要:运用正交实验方法,研究了毛棉杜鹃(*Rhododendron moultmainense*)嫩枝扦插繁殖技术。结果表明:对生根率和根毛长度影响最大的是激素,其中以 IBA 效果最好;对单株根毛数影响最大的是取材部位,其中以母株北部最好。综合考虑总生根量后,最佳处理方式取母株北部的插穗,用 400 mg/L IBA 处理 30 min 后进行扦插,其生根率可达 60%,单株根毛数 5.07 根,平均根毛长度 2.44 cm。

关键词:毛棉杜鹃;嫩枝扦插;正交实验

中图分类号: S 685.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)11-0106-03

中国野生杜鹃花种类繁多,色彩缤纷,但除了映山红(*Rhododendron simsii*)以外,能成功开发应用的却很少。究其原因主要是繁殖手段得不到提高。当前,野生杜鹃花的繁殖主要是通过种子繁殖,其幼苗生长十分缓慢,从播种到开花至少需要 3 a,部分种类多达 8 a^[1]。但其它繁殖手段又不太适用于野生杜鹃花,嫁接繁殖工作量大,成活率较低,技术水平要求高;组培繁殖成本过高,练苗的成活率较低。只有扦插繁殖具有成本低廉、操作简便和繁殖量大等特点,而且扦插繁殖也可以极大地缩短营养生长期,部分种类 1 a 即可开花^[1]。但对野生杜鹃花扦插繁殖研究的不是很多,见报道的只有薄叶

马银花(*R. leptothrium*)、粗柄杜鹃(*R. pachypodum*)、硬叶杜鹃(*R. tatsienense*)、基毛杜鹃(*R. rigidum*)、云南杜鹃(*R. yunnanense*)、陇蜀杜鹃(*R. przewalskii*)、天目杜鹃(*R. fortunei*)和马缨杜鹃(*R. delavayi*)等几个种^[1-4]。毛棉杜鹃(*R. moultmainense*)分布在广东、广西和云南等 8 各省份^[5],生于海拔 700~1 500 m 的灌丛或疏林中,目前在深圳梧桐山形成难得一见的亚热带中低海拔杜鹃花海景观,若能成功开发应用,则对我国的野生杜鹃花产业形成良好的推动作用。该研究对毛棉杜鹃当年生嫩枝的扦插繁殖进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

扦插材料:扦插材料采自深圳市梧桐山风景区小梧桐山顶阴坡的常绿阔叶林中,海拔 590 m。选择 10 a 生毛棉杜鹃作为母株,插条选择生长健壮、无病虫害、机械损伤的当年萌发的半木质化嫩枝作试验材料。插条早上或阴天采取。长度为 8~10 cm,带 1~2 片叶,穗条

第一作者简介:熊友华(1979-),男,博士,现主要从事园林植物育种与应用研究工作。E-mail: youhuachina@126.com。

责任作者:王定跃(1963-),男,博士,研究员,现主要从事园林植物研究工作。E-mail: wangdy63@126.com

基金项目:深圳市科技局资助项目(SY200609080013A)。

收稿日期:2011-03-18

Influence of Concentration on Callus Induction and Proliferation of *Eucommia ulmoides* Olive

YUAN Yun-xiang

(Department of Environment and Life Sciences, Weinan Teachers University, Weinan, Shaanxi 714000)

Abstract: The stems of *Eucommia ulmoides* Olive were used as explants to add different concentration 6-BA and NAA to the medium composed of 15 different induction medium by the methods of orthogonal design $L_9(3^4)$ were investigated. The results showed that the induction medium added 1 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA was beneficial to the callus induction. The suitable proliferation medium was MS containing 0.5 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA and 4% (W/V) sucrose. It could improve obviously the frequency of proliferation. This method obtained more callus and make it was possible to large scale product secondary metabolites.

Key words: concentration; *Eucommia ulmoides* Olive; callus; induction; proliferation