

不同因子对杜仲愈伤组织继代培养的研究

李 琰¹, 王冬梅², 崔宏安¹, 张康健²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:实验进行 NAA, NAA 与 BA 及 KT 的组合, 光照条件, 培养基 pH 和糖种类对杜仲愈伤组织继代培养的影响。结果表明, 单独使用 NAA 时, 以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 愈伤组织继代生长率最高。NAA 与细胞分裂素配合使用时, 以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 最好, 其愈伤组织生长量明显大于单独使用 NAA, KT 的加入不利于愈伤组织的生长。光照条件以 12 h 光照 12 h 暗培养最好, pH 以 6.3 最为适宜, 糖以分析纯的蔗糖比葡萄糖和市售普通白糖生长量大。
关键词:杜仲; 愈伤组织; 继代培养

中图分类号: S722.37 文献标识码: A 文章编号: 1001-7461(2004)01-0061-03

Influence of Different Factors on Callus Subculture of *Eucommia ulmoides*

LI Yan¹, WANG Dong-mei², CUI Hong-an¹, ZHANG Kang-jian²

(1. College of Life Science, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Forestry, NW Sci-Tech Univ. of Agr. And For., Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Callus subculture of *Eucommia ulmoides* was studied by different concentrations of NAA, combination of NAA and BA or KT, condition of light, pH of medium and carbon sources. The result showed that, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA was best for callus subculture when it was used singly. The best combination was $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA when both NAA and cytokinins were used. The callus yield was significantly higher than using NAA singly. KT was not suitable for callus subculture. 12 hour light and 12 hour dark was benefit to callus growth. The best pH value of the medium for the callus growth was 6.3. Sucrose as carbon source was better than glucose and refined sugar.

Key words: *Eucommia ulmoides*; callus; subculture

利用植物细胞培养生产药用成分是近年发展起来的新领域, 它已成为开发药用植物资源的重要途径^[1,2]。据不完全统计, 应用于植物组织培养生产次生代谢产物的植物已达百种以上, 近半数的次生代谢产物含量超过原植物。人参根的培养在日本已商业化, 长春藤、毛地黄组织培养已逐步走向中试和工业化规模^[3]。杜仲(*Eucommia ulmoides*)为我国特有的经济树种, 国家二类重点保护植物^[4~7]。杜仲的有效成分木脂素类、桃叶珊瑚甙、木酚素二葡萄糖甙等为次生代谢产物, 植株内含量很低, 在其它植物中的含量也很低, 虽然可以通过提取获得产品, 但受原料、季节等条件的限制, 提取量很有限, 利用微生物或化学方法至今不能合成, 杜仲这些药用成分

药物至今难以满足市场需要。利用组织培养生产有用的次生代谢产物可以在人工控制的条件下改变培养条件, 进行特定的生物转化反应, 得到超越整株植物产量的代谢产物及节省土地资源, 但迄今为止国内外对杜仲组织培养研究的报导并不多^[8~13]。本实验为组织培养的初期工作。旨在比较不同的理化因子对杜仲愈伤组织继代培养的影响, 筛选出杜仲愈伤组织生长的最佳条件, 为下一步工作的顺利进行奠定基础。

1 材料与方 法

供试材料为杜仲茎段在 MS + NAA 1.0 mg/L + BA 0.3 mg/L 上诱导的愈伤组织, 置于不同因子处

收稿日期: 2002-11-12

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2001BAS02B0403)及西北农林科技大学青年科研专项部分内容

作者简介: 李琰(1971-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 主要从事植物学及药用植物组织培养教学和科研工作。

理的 B₅ 培养基上,进行愈伤组织继代培养的研究,每个处理接种 20 瓶,每瓶接种愈伤组织 2~3 块、鲜重控制在 0.30~0.40 g 之间,每处理接种 20 瓶,培养 20 d 后收获,计算愈伤组织增长量和增长率。

愈伤组织增长量 = 收获量/瓶 - 接种量/瓶

愈伤组织增长率 = 愈伤组织增长量 × 100/接种量

以上培养基除实验处理外,加入蔗糖 30 g · L⁻¹,用琼脂 6 g · L⁻¹ 固化,50 mL 三角瓶内装 20 mL 培养基,高压灭菌前将 pH 调至 6.3。pH 对愈伤组织生长影响的培养基 pH 用 PHS-2C 型酸度计测量。培养室温度为 25℃ ± 2℃,光照 12 h/d,光照强度为 1 000~1 500 lx。

2 结果与分析

2.1 激素对杜仲愈伤组织继代培养的影响

2.1.1 NAA 对愈伤组织继代培养的影响 由表 1 可知,NAA 不同浓度,对杜仲愈伤组织生长差异较大(表 1),NAA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时,愈伤组织生长最旺盛,呈奶油色,结构疏松、富有光泽,仅 20 d,鲜重即达 4 g 左右。其它浓度 NAA 对愈伤组织生长均有一定的促进作用,但均不如 0.5 mg · L⁻¹。

表 1 NAA 对愈伤组织继代培养的影响

Table 1 Effects of different concentration of NAA on callus subculture

NAA 浓度 /mg · L ⁻¹	愈伤组织增长量 /g · 瓶 ⁻¹	愈伤组织增长率 /%
对照	0.99 ± 0.03	302
0.1	1.27 ± 1.10	401
0.3	3.09 ± 0.21	883
0.5	4.07 ± 0.17	1 201
1.0	3.82 ± 0.33	1 611
2.0	2.83 ± 0.41	832

2.1.2 NAA 与细胞分裂素交互作用对愈伤组织继代培养的影响 以 NAA 最佳的 0.5 mg · L⁻¹ 为基础,分别加入 BA 和 KT,其对愈伤组织生长明显不同(表 2),加入 BA 在 1.0 mg · L⁻¹ 以下,有促进愈伤组织生长的作用,以 0.5 mg · L⁻¹ 效果最好。BA 浓度在 2.0 mg · L⁻¹ 对愈伤组织生长有轻微抑制作用。含 NAA 0.5 mg · L⁻¹ 培养基中加入 KT,明显抑制愈伤组织的生长,随 KT 浓度的增大愈伤组织生长越差。0.1 mg · L⁻¹ KT 与对照相近,2.0 mg · L⁻¹ KT 时,愈伤组织生长量很少,仅为对照的 1/5。

试验还进行 2.4-D 单独及 BA 和 KT 的配合对愈伤组织生长的影响,凡含 2.4-D 的培养基,不管单独使用浓度高低,还是加入细胞分裂素均逐渐变褐死亡。

表 2 NAA 和细胞分裂素组合对愈伤组织继代培养的影响

Table 2 Effects of the combination of NAA and cytokinins on callus subculture

激素组合 /mg · L ⁻¹	愈伤组织增长量 /g · 瓶 ⁻¹	愈伤组织增长率 /%
0.5NAA	4.07 ± 0.17	1 201
0.5NAA + 0.1BA	4.17 ± 0.25	1 191
0.5 NAA + 0.3BA	4.92 ± 0.44	1 447
0.5 NAA + 0.5BA	5.98 ± 0.39	1 708
0.5 NAA + 1.0BA	5.13 ± 0.08	1 554
0.5 NAA + 2.0BA	4.01 ± 0.39	1 114
0.5 NAA + 0.1KT	4.19 ± 0.35	1 197
0.5 NAA + 0.3 KT	3.03 ± 0.04	842
0.5 NAA + 0.5 KT	2.41 ± 0.15	634
0.5 NAA + 1.0 KT	1.30 ± 0.09	367
0.5 NAA + 2.0 KT	0.84 ± 0.05	240

2.2 光照对愈伤组织继代培养的影响

试验表明,在连续光照条件下,愈伤组织生长速度缓慢,逐渐失去光泽;暗光培养的愈伤组织和 12 h 光照培养的愈伤组织相比,虽然生长量差异不明显,但暗光培养的愈伤组织在生长的同时逐渐变成乳白色,失去光泽,继续继代培养时,生长缓慢;12 h 光照处理愈伤组织呈奶油色生长旺盛,富有光泽,继代后生长旺盛(表 3)。

表 3 光照条件对愈伤组织继代培养的影响

Table 3 Effects of light on callus subculture

培养条件	连续 24 h 光照	12 h 光照	连续 24 h 暗光
愈伤组织增长量 (鲜重)/g · 瓶 ⁻¹	2.17 ± 0.13	5.95 ± 0.34	5.83 ± 0.21
愈伤组织增长率/%	603	1 700	1 619
愈伤组织颜色	淡黄色,无光泽	奶油色,有光泽	乳白色,无光泽
继代后生长情况	继代后干枯	继代后生长旺盛	继代后生长缓慢

2.3 培养基 pH 值对愈伤组织继代培养的影响

5 种 pH 值的培养基对愈伤组织生长影响不同(表 4),当 pH 值为 6.3 时,愈伤组织生长速度最快,20 d 的增长率达 1 700%。pH 值 5.8 时也较好。当 pH 值为 4.8 和 6.8 时,随着培养时间的延长,愈伤组织逐渐失去光泽,生长缓慢。故培养基的 pH 值以 6.3 为好。

表 4 不同 pH 值对愈伤组织继代培养的影响

Table 4 Effects of pH value of the medium on callus subculture

pH	4.8	5.3	5.8	6.3	6.8
愈伤组织增长量(鲜重) /g · 瓶 ⁻¹	1.27 ± 0.06	4.41 ± 0.11	5.29 ± 0.21	5.95 ± 0.33	2.97 ± 0.27
愈伤组织增长率/%	374	1 260	1 556	1 700	874

2.4 碳源对杜仲愈伤组织继代培养的影响

组织中糖不仅起碳源的作用,而且还调节渗透

压的作用,因而对愈伤组织的生长有明显的影响。实验选用 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 分析纯蔗糖,市售食用白糖,分析纯葡萄糖作为碳源,3 种糖中以分析纯的蔗糖最好,葡萄糖最差(表 5)。

表 5 不同碳源对愈伤组织继代培养的影响

Table 5 Effects of different carbon sources on callus subculture

糖种类	葡萄糖	蔗糖(分析纯)	白糖(市售)
愈伤组织增长量 (鲜重)/ $\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$	1.95 ± 0.09	5.97 ± 0.40	5.52 ± 0.37
愈伤组织增长率/%	557	1 756	1 577

3 讨论

试验表明,在没有添加植物激素的培养基上,杜仲愈伤组织继代生长很差,单独使用 NAA 的生长速度不如 NAA 与 BA 配合使用,以 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 组合使用愈伤组织生长最好。KT 与 NAA 配合明显抑制愈伤组织的生长。2.4-D 单独使用或与 BA 或 KT 配合使用,愈伤组织转接后很快变褐干枯,明显抑制愈伤组织生长。杜仲愈伤组织对不同激素组合的这些反应,说明同一类激素内不同种类间的效应差异和植物物种或品种对激素反应的特异性,进一步说明了激素作用的复杂性。

光对愈伤组织的生长既有促进作用也有抑制作用,有些植物可以在黑暗条件下培养,例如乌饭树的愈伤组织在黑暗中比在光下生长好,而 Robusta 咖啡的愈伤组织仅仅在黑暗中才能生长^[14]。在杜仲的愈伤组织培养中发现,黑暗中和 12 h 光照条件下愈伤组织的生长量相似,但颜色差异较大。这些形态不同的愈伤组织的生理生化特征和分化能力上均有很大的差异^[15],其在次生代谢产物的含量方面是否有差异还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Stockigt J, Obitz P, Falkenhagen H, et al. Natural products and enzymes from plant cell culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 97-109.
- [2] 韩迎山. 植物细胞培养中次生代谢物的生产[J]. 植物生理学通讯, 1998, (4): 11-17.
- [3] 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩. 植物组织培养生产有用次生代谢物的研究进展[J]. 生物技术通报, 1997, (5): 1-3.
- [4] 周政贤. 中国杜仲[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1993. 1-3.
- [5] 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.
- [6] 李家实, 阎玉凝. 杜仲皮与叶化学成分初步研究[J]. 中药通报, 1986, 11(8): 41-42.
- [7] 张康健. 中国杜仲研究[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992. 1-2.
- [8] 左春芬, 侯玉华, 韩薇拉. 杜仲组织培养初报[J]. 中草药, 1981, 11(10): 473-474.
- [9] 陈丕铃, 王俊丽. 杜仲组织培养植株再生研究初报[A]. 张康健主编. 中国杜仲研究[C]. 西安: 陕西科技出版社, 1992. 65-68.
- [10] 王秀松, 胡东波, 詹庆才. 杜仲愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北林学院学报, 1994, 9(4): 32-35.
- [11] 藏增, 杨振堂, 胡桂珍, 等. 培养基与外植体对杜仲愈伤组织诱导率的影响[J]. 特产研究, 1998, (2): 11-14.
- [12] 王俊丽, 李会肖, 陈丕玲. 杜仲悬浮细胞系的建立及其生长特性研究[A]. 首届国际杜仲学术会议论文集[C]. 北京: 中国林业出版社, 1999. 133-135.
- [13] 唐建军, 陈欣. 培养条件对杜仲愈伤组织形成及次生代谢过程的影响[J]. 浙江大学学报(I 学版), 2002, 36(2): 193-198.
- [14] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 54-56.
- [15] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 67-69.
- [5] 王百田. 干旱半干旱地区集流造林工程设计[J]. 水土保持学报, 1993, 7(4): 60-66.
- [6] 孙长忠. 黄土高原荒坡径流生产潜力研究[J]. 林业科学, 2000, 36(5): 12-16.
- [7] 常磊, 杨志让, 高主, 等. 彭阳县集流造林整地工程设计[J]. 西北林学院学报, 2001, 17(2): 47-51.
- [8] 苏人琼. 黄土高原地区水资源问题及其对策[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- [9] 黄占斌, 山仑, 张岁岐. 雨水利用与水土保持和农业持续发展[J]. 水土保持通报, 1997, 17(1): 54-57.
- [10] 王斌瑞, 王百田, 张府娥. 黄土高原径流林业技术研究[J]. 林业技术通讯, 1996, (9): 13-15.
- [11] 余新晓, 张建军, 朱金兆. 黄土地区防护林生态系统水分条件的分析与评价[J]. 林业科学, 1996, 32(4): 289-296.
- [12] 周国逸, 潘淮寿. 林地土壤的降雨入渗规律[J]. 水土保持通报, 1990, 4(2): 79-83.
- [13] 吴钦孝, 刘向东, 苏虎宁, 等. 山杨次生林枯枝落叶蓄积量及作用[J]. 水土保持学报, 1992, 6(1): 71-76.

(上接第 38 页)