

• 药材与资源 •

杜仲胚轴、子叶直接诱导不定芽及再生体系的建立

李 岩^{1,3}, 罗 丽^{**}, 赵德刚^{1,2,3*}

(1. 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 教育部绿色农药与农业生物工程省部共建重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘 要:目的 探索杜仲胚轴、子叶不定芽诱导条件, 建立杜仲再生体系。方法 分别以杜仲种胚、胚轴切段、子叶切段、芽为外植体, 将它们接种到一系列含有不同激素质量浓度的培养基中。结果 在外植体的选择上, 胚轴优于子叶。对于杜仲胚轴的伸长生长, 以 MS 培养基附加 2.0 mg/L GA 效果最好。在含有 0.1 mg/L NAA 及 0.8 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中, 杜仲胚轴可直接诱导产生不定芽, 诱导率达到 47%。在壮芽及生根培养中, 分别采用附加 1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基及附加 1.5 mg/L IBA、20 mg/L 蔗糖的 1/2 MS 培养基效果最好, 经 28、14 d, 芽苗生长系数及生根率分别达到 2.48 和 91.7%。结论 建立了稳定高效的杜仲再生体系, 为外源基因导入杜仲奠定了基础。

关键词:杜仲; 胚轴; 子叶; 再生体系

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0101-05

Direct inducement of adventitious bud by hypocotyl and cotyledon and establishment of regeneration system of *Eucommia ulmoides*

LI Yan^{1,3}, LUO Li, ZHAO De-gang^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Agricultural Bioengineering of Guizhou Province, Guiyang 550025, China; 2. College of Life Science in Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Biological Engineering Coestablished by Province and Ministry of Education, Guiyang 550025, China)

Abstract: Objective To explore the buds inducement condition of hypocotyls and cotyledons and establish the regeneration system of *Eucommia ulmoides*. **Methods** Taking embryos and hypocotyl slices, cotyledon pieces and shoots from *E. ulmoides* as explants, to inoculate them in a series of media with hormone at various concentrations. **Results** In selection of explants, hypocotyls were better than cotyledons. The MS medium containing 2.0 mg/L GA was the most favourable for hypocotyl elongation. Being cultured in MS medium containing 0.1 mg/L NAA and 0.8 mg/L 6-BA, hypocotyl slices could be induced to produce adventitious buds directly and the inducement ratio was up to 47%. The optimum media for shoot strengthening and root inducing were MS+1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA, and 1/2 MS+1.5 mg/L IBA and 20 mg/L sucrose. Bud growth coefficient and root inducing ratio reached 2.48 and 91.7% in 28 d and 14 d, respectively. **Conclusion** A stable regeneration system for *E. ulmoides* with higher efficient has been established, so as to lay a way for transferring the exogenous gene into *E. ulmoides*.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; hypocotyl; cotyledon; regeneration system

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 系杜仲科杜仲属 (*Eucommia* Oliv.) 植物, 是我国特有的珍稀保护树种, 其干燥树皮为传统名贵中药材。据《神农本草

经》记载: “杜仲性味甘、微辛、温, 无毒, 有补肝肾、强筋骨、益腰膝、除酸痛之效能”。现代药理证明杜仲具有抗癌、抗衰老、降血压、降血脂、抗疲劳、抗菌、抗

收稿日期: 2006-03-09

基金项目: 科技部国家重大基础研究前期专项 (2003CCA02600); 贵州省基金项目 (黔科合字 [2003] IN012); 教育部“春晖计划”项目
作者简介: 李 岩 (1980—), 男, 山东泰安人, 贵州大学农业生物工程重点实验室教师, 从事植物基因工程及其次生代谢产物方面的研究。 Tel: 13984860032

* 通讯作者 赵德刚 Tel: (0851) 3863615 E-mail: degangzhao@Yahoo.com

** 罗 丽 贵州大学 2000 届硕士研究生, 现在江苏连云港市师专工作。

炎、抗病毒、愈伤和增强机体免疫功能等多种药理作用,引起国内外医药界广泛关注。杜仲主要含木脂素及其苷类、环烯醚萜类、有机酸类及氨基酸、微量元素等,其中绿原酸是杜仲重要有效成分之一^[1]。同时杜仲也是温带最有开发利用前景的胶源植物。杜仲胶合成过程中的几个关键酶已被克隆;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热点。如何将上述基因遗传转化杜仲,从而进一步研究它们的功能、合成机制以及通过遗传转化技术改良杜仲品质已成为重要课题。

杜仲是组织培养较为困难的一种木本植物。目前对杜仲愈伤组织的诱导,芽苗继代、增殖方面的研究已有一些报道,但有关其再生体系的研究较少,且多为体细胞胚发生途径,直接器官发生的正式报道国内未见。左春芬等^[2]最早涉及杜仲组培方面的研究,他们以杜仲幼嫩树枝为外植体诱导出愈伤组织。Chen 等^[3]建立了杜仲一月龄籽苗的苗尖培养物快速无性繁殖方法。朱登云等^[4,5]以杜仲成熟干胚乳、叶片、叶柄诱导愈伤组织并再生植株,诱导效率在 15% 以上,但正常苗频率较低。笔者曾以杜仲叶圆片为外植体,MB(MS 无机元素、B5 有机元素)培养基为基本培养基,配合细胞分裂素 TDZ 等激素,诱导叶圆片直接分化得到了不定芽,但畸形芽所占的比例很大^[6]。本实验采用杜仲种胚的子叶及胚轴为外植体,直接诱导不定芽发生;建立了较为稳定、高效的杜仲不定芽诱导再生体系,为外源基因遗传转化杜仲奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

1.1.1 材料处理:杜仲种子取自贵州大学校园。将杜仲种子剥去外皮,用自来水冲洗 30 min,在超净工作台中,用无菌水浸泡 15 min,再用 75% 酒精消毒 60 s 后转入 0.1% 升汞水中浸泡 30 min,无菌水漂洗 5 次,浸泡过夜。将消毒后的种子接种到 MS 培养基中。实验中所用基本培养基为 MS 培养基附加 30 g/L 蔗糖,7 g/L 琼脂,pH 5.8,121 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.2 培养条件:光照强度为 2 000 lx,每日光照 16 h,培养温度(26±2) ℃。

1.2 方法

1.2.1 杜仲种胚胚轴、子叶生长最佳培养基的确定:待接种的杜仲种胚突破种皮 0.5 cm 左右时,取长势较好的材料将胚剥出,接种到培养基 1~11 中,14 d 后比较不同培养基中杜仲胚轴及子叶的伸长情况,并计算伸长系数(伸长系数=统计时种胚长

度/初始种胚长度)。所用培养基见表 1。

表 1 不同的 6-BA 及 GA 质量浓度对杜仲种胚伸长的影响

Table 1 Influence of 6-BA and GA at various concentrations on hypocotyls elongation of *E. ulmoides*

培养基	6-BA/(mg·L ⁻¹)	GA/(mg·L ⁻¹)	外植体数	种胚伸长系数
1	0	0	23	1.38
2	0.5	0	22	1.46
3	1.0	0	24	1.61
4	2.0	0	23	1.78
5	3.0	0	23	1.56
6	0	0.5	24	1.52
7	0	1.0	22	1.71
8	0	2.0	21	1.90
9	0	3.0	23	1.73
10	1.0	1.0	22	1.67
11	2.0	2.0	23	1.51

1.2.2 杜仲不定芽诱导培养基的筛选:为诱导胚轴及子叶产生不定芽,分别设计含有 5 种不同细胞分裂素和生长素浓度比值,及 3 个激素浓度梯度相组合的 15 种培养基作为杜仲胚轴及子叶的不定芽诱导培养基(表 2)。将 0.5 cm 左右的胚轴及子叶切段,分别接种到培养基 12~26 中,28 d 后统计不定芽诱导率。不定芽诱导率=诱导出不定芽的外植体数/外植体总数×100%。每 14 天为材料更换一次培养基。实验进行 3 次,每种培养基接种 24 个外植体。

1.2.3 芽苗增殖及壮苗培养:不同质量浓度的细胞分裂素与生长素相配合在杜仲丛生芽诱导及芽苗的壮芽培养中起着重要的作用。本研究采用 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L 4 个质量浓度的 6-BA,及 0.05、0.1、0.2 mg/L 3 个质量浓度的 NAA 交叉组合,组成 12 种培养基,从中筛选适合杜仲不定芽增殖及壮芽的最佳激素组合(表 3)。将株高为 1.5 cm 左右的不定芽分成单芽,转接到培养基 27~38 中,28 d 后统计芽苗总数及平均株高并计算增殖系数和生长系数(生长系数=统计时芽高度/接种时芽高度,增殖系数=经增殖后不定芽数/接种芽数)。每 14 天更换一次培养基。

1.2.4 芽苗生根培养:芽苗生长及其增殖需要较高质量浓度的细胞分裂素和低质量浓度的生长素,而生根则是需要低质量浓度细胞分裂素和较高质量浓度的生长素。为了确定适合杜仲不定芽生根的培养基配方,在实验室所做工作的基础上,采用 1/2 MS 和 1/4 MS 并附加 20 mg/L 的蔗糖作为基本培养基,将株高约 3 cm 左右的芽转接到生根培养基(表 4)中。14 d 后统计材料的生根情况(生根率=生根外植体数/接种外植体数×100%)。实验重复 3 次,每种培养基接种 16 个外植体。

表 2 含有不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 组合的培基中杜仲胚轴和子叶不定芽诱导率
Table 2 Adventitious buds inducing ratio of hypocotys and cotyledon in *E. ulmoides* with 6-BA and NAA media at various concentrations

培养基	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	胚 轴		子 叶		
			不定芽诱导率/%	不定芽总数	外植体个数	不定芽诱导率/%	不定芽总数
12	0.6	0.1	36.1 b BC	17 cd CD	69	20.8 b B	6 b BC
13	1.2	0.2	13.9 fg FG	8 gh EF	67	8.3 def CDE	2 cdef DEF
14	2.4	0.4	2.8 h H	1 G	71	2.8 gh EF	1 efg EF
15	0.7	0.1	40.3 ab AB	20 b B	68	20.8 b B	6 b BC
16	1.4	0.2	19.4 ef EF	11 f E	72	12.5 cd C	3 cd BCDE
17	2.8	0.4	5.6 h GH	2 G	72	1.4 gh F	0 fg EF
18	0.8	0.1	47.2 a A	25 a A	67	30.6 a A	9 a A
19	1.6	0.2	26.4 de DE	15 de CD	71	13.9 c C	4 bc BCD
20	3.2	0.4	5.6 h GE	2 G	71	4.2 fgh DEF	1 defg DEF
21	0.9	0.1	33.8 bc BCD	18 c BC	72	23.6 b B	6 b BC
22	1.8	0.2	13.9 fg FG	8 g EF	69	9.7 cde CD	3 cde CDEF
23	2.7	0.4	4.2 h H	2 G	69	1.4 gh F	1 efg EF
24	1.0	0.1	27.8 cd CDE	15 e D	72	22.2 b B	6 b B
25	2.0	0.2	9.7 gh GH	6 h F	72	5.6 efg DEF	2 defg DEF
26	4.0	0.4	1.4 H	0 G	67	0 h F	0 g F

表 3 不同培养基中杜仲不定芽的增殖系数和生长系数

Table 3 Multiplication coefficient and growth coefficient of adventitious buds in *E. ulmoides* with various media

培养基	激素		外植体数	生长系数	经增殖后不定芽总数	增殖系数
	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)				
27	0.5	0.05	23	1.81	47	2.04
28	0.5	0.1	24	2.01	38	1.58
29	0.5	0.2	24	1.73	31	1.29
30	1.0	0.05	24	2.29	63	2.63
31	1.0	0.1	23	2.48	41	1.78
32	1.0	0.2	24	2.21	37	1.54
33	2.0	0.05	22	1.33	80	3.64
34	2.0	0.1	23	1.42	64	2.78
35	2.0	0.2	21	1.30	49	2.34
36	4.0	0.05	24	1.03	51	2.13
37	4.0	0.1	22	1.05	40	1.82
38	4.0	0.2	19	1.02	32	1.68

表 4 不同培养基中杜仲不定芽生根率比较

Table 4 Root inducing ratio of adventitious buds in *E. ulmoides* with various media

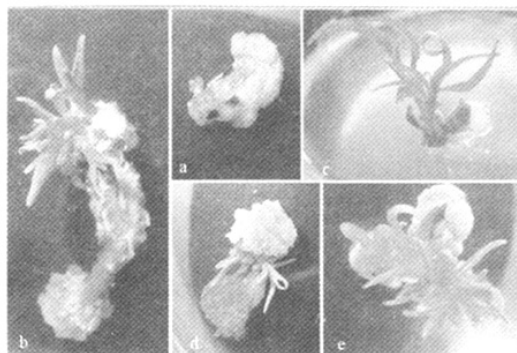
培养基编号	培养基组成	外植体总数	生根外植体数	生根率/%
39	1/4MS+IBA1.5 mg/L+蔗糖 20 mg/L	46	26	54.1 c C
40	1/4MS+IBA1.5 mg/L+蔗糖 20 mg/L	43	19	39.6 d D
41	1/2MS+IBA1.5 mg/L+蔗糖 20 mg/L	46	43	91.7 a A
42	1/2MS+NAA0.5 mg/L+蔗糖 20 mg/L	44	33	68.7 b B

2 结果与分析

2.1 杜仲种胚生长最佳培养基的确定:结果表明,6-BA 及 GA 质量浓度对种胚的伸长有很大影响(表 1)。据观察在 6-BA 低于 2 mg/L 时,其对杜仲种胚子叶的生长有明显的促进作用,但对胚轴的伸长影响不大。较高的 6-BA 不利于杜仲种胚的生长,当 6-BA 达到 3 mg/L 时,杜仲种胚的伸长系数迅速下

降,个别材料甚至出现玻璃化现象。在一定质量浓度范围内,GA 对杜仲胚轴及子叶的生长均有明显的促进作用。在 GA 低于 2 mg/L 的情况下随着其质量浓度的增加,杜仲种胚的伸长系数随之迅速增加。当 GA 达到 3 mg/L 时,杜仲种胚的伸长系数有所下降。在 MS 附加 2.0 mg/L GA 的培养基中(8 号培养基)杜仲胚轴、子叶生长效果最佳。

2.2 杜仲不定芽诱导培养基最佳激素组合的筛选: 在本实验中, 杜仲胚轴的不定芽诱导效果明显优于子叶, 见表 2(采用单因素 LSD 法, 进行方差分析, 同一列后标记相同字母者, 表示无差异; 大小写字母不同表示差异显著, 分别表示达到 5% 和 1% 显著性差异水平)。6-BA、NAA 质量浓度的比值对杜仲的不定芽诱导率有着显著的影响, 当两者为 8:1 时, 6-BA 0.8 mg/L, NAA 0.1 mg/L, 杜仲的胚轴和子叶的不定芽诱导率最高。与蒋祥娥、陈品良、陈丕铃等人的研究结果一致^[7~9], 分别达到胚轴 47%, 子叶 33%, 胚轴及子叶诱导不定芽效果见图 1。较高质量浓度的 6-BA、NAA 对杜仲的不定芽诱导不利, 在相同的比例下, 两种激素的绝对质量浓度越高, 材料的不定芽诱导率越低; 当 6-BA 超过 3.0 mg/L 时, 诱导出的不定芽开始有畸形芽的出现, 形成的部分不定芽呈簇状, 芽丛较致密、短小, 无法正常发育成完整的植株。在材料接种到培养基上 14 d 左右时, 其近表皮、伤口处的组织渐形成芽的原始体, 21 d 左右开始形成不定芽(图 1)。这些不定芽起源于胚轴、子叶皮层特别是伤口处皮层部分的薄壁细胞, 未经愈伤组织的脱分化阶段, 属直接再生方式^[10], 这与先前的报道有所不同。



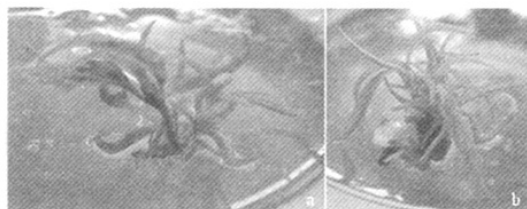
a-杜仲胚轴芽原始体的形成 b-胚轴诱导出的不定芽(8 d)
c-胚轴诱导出的不定芽(28 d) d-子叶诱导出的不定芽(8 d)
e-培养基中 6-BA 浓度过高时诱导出的畸形芽
a-formation of original hypocotyl buds in *E. ulmoides*
b-adventitious buds induced from hypocotyls(8 d)
c-adventitious buds induced from hypocotyls(28 d)
d-adventitious buds induced from cotyledons(8 d)
e-malformed buds with 6-BA at over high concentration

图 1 杜仲胚轴、子叶的不定芽诱导

Fig. 1 Adventitious buds inducement of hypocotyls and cotyledons in *E. ulmoides*

2.3 杜仲不定芽的增殖及壮芽培养: 不同 NAA 的质量浓度下, 增殖系数存在较明显差异(表 3)。随着

NAA 的逐渐升高, 增殖系数逐渐降低, 因此在进行芽苗增殖培养时应添加低质量浓度水平的 NAA。在 6-BA 的 4 个质量浓度下增殖系数间也存在较明显差异, 随着 6-BA 的增加, 增殖系数先升高再降低, 在 2.0 mg/L 左右时最佳。对芽苗生长来说, 6-BA 较 NAA 的作用更为明显。在 6-BA 的各浓度水平下生长系数的差异非常明显, 随着 6-BA 浓度的升高生长系数先升高后降低。高浓度的 6-BA 对芽苗生长不利, 其浓度在 1.0 mg/L 时最佳。总的来讲: 对于杜仲壮芽培养, 采用 31 号培养基效果最好, 而对于杜仲不定芽的增殖, 33 号培养基是最佳的选择, 在上述 2 种培养基中, 杜仲不定芽壮芽生长及增殖生长效果见图 2。



a-杜仲不定芽壮芽生长情况(14 d)

b-杜仲不定芽增殖生长情况(14 d)

a-adventitious buds growth of *E. ulmoides* (14 d)

b-adventitious buds multiplication of *E. ulmoides* (14 d)

图 2 杜仲不定芽的壮芽及增殖

Fig. 2 Strengthening and multiplication of adventitious buds in *E. ulmoides*

2.4 杜仲不定芽生根培养: 研究表明, 激素 IBA 诱导杜仲生根的效果优于 NAA, 采用 1/2 MS 培养基材料的生根率明显高于采用 1/4 MS 培养基材料的生根率, 见表 4。综合来讲, 对于杜仲生根 41 号培养基是较为合适的选择。接种 14 d 时不同培养基中杜仲不定芽生根情况见图 3。



图 3 杜仲不定芽生根

Fig. 3 Root inducing of adventitious buds in *E. ulmoides*

3 讨论

外植体的选择在组织培养中起关键作用, 一般

带薄壁细胞和分生细胞的组织容易诱导出愈伤组织,并分化不定芽。植物材料的种胚中含有较多的未分化及分化程度较浅的分生细胞,因而是诱导再生合适的外植体。

以MS培养基附加2.0 mg/L的GA,杜仲胚轴的伸长生长效果最好。杜仲种胚胚轴具有很强的再生活性,在含有0.1 mg/L的NAA及0.8 mg/L 6-BA的MS培养基中,胚龄20 d杜仲胚轴伤口处皮层,不经愈伤组织分化可直接形成芽原始体并高频再生不定芽,诱导率达到47%。与蒋祥娥、陈品良、陈丕铃等人的研究结果有所不同^[7~9]。在壮芽及增殖培养中,分别采用MS培养基附加1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA及MS培养基附加2.0 mg/L 6-BA、0.05 mg/L NAA的效果最好,经28 d芽苗生长系数及增殖系数分别达到2.48和3.64。生根培养基采用1/2MS培养基附加1.5 mg/L IBA及20 mg/L蔗糖,经14 d材料的生根率可达91.7%。本研究建立了稳定高效的杜仲再生体系,为外源基因导入杜仲奠定了基础。

在整个培养诱导过程中内源激素水平、组培材料各细胞所处的状态是在不断变化的;在选择了合

适外植体的前提下通过实验筛选出了适合杜仲组培各阶段生长的一系列培养基。目前采用农杆菌介导法对杜仲胚轴的遗传转化已获得转基因再生植株。

References:

- [1] Liu H L, Tang M L, An L Y, et al. Study on the optimum extraction technology of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14(6): 47-50.
- [2] Zuo C F, Hou Y H, Han W L, et al. Primary report on tissue culture of the medicinal tree *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1981, 11(10): 437-474.
- [3] Chen L J, Hu T W, Huang L H. A protocol toward multiplication of the medicinal tree *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *In Vitro Plant*, 1995, 31(4): 193-198.
- [4] Zhu D Y, Tian H Q, Jiang J H, et al. Callus induction and plant regeneration from mature dry albumen in *Eucommia ulmoides* [J]. *J Agric Biotechnol* (农业技术生物学报), 1998, 6(4): 307-312.
- [5] Zhu D Y, Tian H Q, Li J M, et al. Callus induction and plant regeneration from leaf and petiole in *Eucommia ulmoides* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2001, 21(2): 206-209.
- [6] Yang X, Zhao D G, Zhu D X, et al. Plant regeneration from leaf of *Eucommia ulmoides* [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2003(z1): 825-826.
- [7] Chen P L. Study on *E. ulmoides* Oliv. of China (中国杜仲研究) [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Publishing House, 1992.
- [8] Chen P L. Study on *E. ulmoides* Oliv. of China (中国杜仲研究) [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Publishing House, 1992.
- [9] Jiang X E, Wang J Y. Study on tissue culture of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *Technol Hubei Forest* (湖北林业科技), 2000(C00): 96-98.
- [10] Yan G H, Zhou Y. High regeneration of adventitious shoots from hypocotyl of peach (*Prunus persica* L.) [J]. *J Fruit Sci* (果树学报), 2002, 19(4): 231-234.

人参木质素量与生长年份关系的研究

李靖¹,程舟^{1*},杨晓伶¹,李珊¹,顾敏²,万树文²,张文驹³,陈家宽³

(1. 同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; 2. 上海雷允上药业有限公司,上海 200002; 3. 复旦大学生命科学学院生物多样性科学研究所 生物多样性与生态工程教育部重点实验室,上海 200433)

摘要:目的 研究不同生长年份人参中木质素量的变化规律,探讨木质素的量用于判断人参生长年份的可行性。方法 采用紫外分光光度法测定人参木质素的量。结果 人参不同部位和组织的木质素的量存在明显差异;人参根须部的木质素量与生长年份呈极显著负相关($r=0.986^{**}$),可作为判断人参生长年份的指标;根据人参根须部木质素的量估算的人参生长年份与实际生长年份的误差范围小于2.5年。结论 紫外分光光度法可快速、准确地测定人参根须的木质素的量,无需破坏人参的外形即可初步估算人参的生长年份,不仅可以作为人参生长年份的鉴定方法,同时也可供中药材年份鉴定借鉴。

关键词:人参;生长年份;木质素;紫外分光光度法

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)01-0105-04

Relationship between lignin contents and growth ages of *Panax ginseng*

LI Jing¹, CHENG Zhou¹, YANG Xiao-ling¹, LI Shan¹, GU Min², WAN Shu-wen², ZHANG Wen-ju³, CHEN Jia-kuan³

(1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Leiyunshang

收稿日期:2006-03-19

基金项目:上海市科委中药现代化专项(04DZ19834)

作者简介:李靖(1981—),湖北省荆州市人,同济大学生命科学与技术学院在读硕士,从事药用植物资源保护及利用研究。

*通讯作者 程舟 Tel:(021)65985185 E-mail:chengzhou@mail.tongji.edu.cn