

不同植物生长调节物质处理对吴茱萸组织培养的影响

徐涌¹, 孙骏威², 陈珍³

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 临安 311300; 2. 中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018;
3. 台州学院 生命科学学院, 浙江 临海 317000)

摘要: 以吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* 雌株再生苗叶片为材料, 研究了不同植物生长调节物质处理对其组织培养过程的影响。结果表明: 添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA) 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ α -萘乙酸(NAA)等2种处理均可诱导叶片叶柄端形成愈合组织, 随后分化出不定芽。而其余处理只能诱导愈合组织而未见不定芽的分化, 其中以添加2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)诱导的愈合组织最佳。单独添加NAA不能诱导不定芽分化, 但与6-BA同时添加时可增强6-BA的诱导效果; 随着6-BA质量浓度的提高, 不定芽分化率表现出先升高后下降的趋势; 类似的现象也发生在不定芽的增殖和壮苗过程中, 适当质量浓度的6-BA有助于增殖和壮苗, 但质量浓度过高容易导致玻璃化。随着NAA质量浓度的升高, 吴茱萸再生植株生根速度加快, 根变粗, 侧根增多, 生根率和移栽成活率均提高, 但NAA质量浓度过高不利于侧根生长和移栽。获得的吴茱萸再生植株移栽到大田1.5 a后即可成熟开花。图1表4参10

关键词: 植物学; 吴茱萸; 植物生长调节物质; 组织培养; 诱导

中图分类号: S718.3; Q813.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2011)03-0500-05

Plant growth regulator treatments for a tissue culture of *Euodia rutaecarpa*

XU Yong¹, SUN Jun-wei², CHEN Zhen³

(1. School of Environmental Sciences and Resources, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;
2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 3. School of Life Sciences, Taizhou University, Linhai 317000, Zhejiang, China)

Abstract: To determine the effects of different plant growth regulator treatments, including 6-benzylaminopurine (6-BA), 1-naphthylacetic acid (NAA), 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), and N-phenyl-N'-1, 2, 3-thidiazol-5-yl-urea (TDZ), on various processes of tissue culture in female plants of *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth, leaves of regenerated shoots were used. Results showed that $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA alone or with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA induced both callus and adventitious buds. The other plant growth regulator treatments induced the formation of callus, but failed to induce adventitious buds. NAA by itself did not induce adventitious buds, but it did promote the effects of 6-BA. As the concentration of 6-BA increased, the rate of bud differentiation first increased and then declined, a similar trend happened with 6-BA on morphogenesis of adventitious buds. With an optimal concentration, 6-BA promoted proliferation, whereas a high concentration led to vitrification. Also, $0 - 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA promoted rooting and roots appeared faster and stouter as NAA increased. Moreover, the survival rate after transplanting increased. However, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA inhibited the growth of lateral roots and the transplanting procedure. After transplanting in the field for 1.5 years, the regenerated plants bloomed. [Ch, 1 fig. 4 tab. 10 ref.]

Key words: botany; *Euodia rutaecarpa*; plant growth regulators; tissue culture; induction

收稿日期: 2010-09-10; 修回日期: 2010-11-29

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(3080166); 浙江省台州市科技局资助项目(071KY07); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2005FR003)

作者简介: 徐涌, 讲师, 从事土壤农化与植物营养研究。E-mail: xuyong@zafu.edu.cn。通信作者: 孙骏威, 讲师, 从事植物生物技术研究。E-mail: juville@cjlu.edu.cn

吴茱萸 *Euodia rutaecarpa*，雌雄异株，果实含吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸碱、羟基吴茱萸碱、安伏卡 A, B, C；树皮和树梢含吴茱萸内酯，叶含去氢吴茱萸碱。以其干燥近成熟果实入药，名吴茱萸，性辛、热，味苦，有小毒，归肝、脾、胃、肾经，具温中、散寒、燥湿、疏肝、止呕和止痛之功效，主治胃腹冷痛、恶心呕吐、泛酸暖气、腹泻、蛔虫病，外用可治高血压和湿疹^[1]，为较名贵的中药。过去吴茱萸主要以扦插和种子繁殖为主，但是扦插成活率和种子萌发率均不高，而通过组织培养技术可以获得大量的雌性植株，从而提高中药吴茱萸的产量。卢萍等^[2]曾以叶片为材料，对吴茱萸进行过组织培养的研究，但组培苗分化能力差，且不易生根。笔者通过修改培养基配方，并对比研究不同植物生长调节物质处理对外植体丛生芽诱导、增殖和生根的影响，发现以组培苗叶片为外植体，可以直接获得丛生芽，经增殖、壮苗、生根阶段，可用于大田移栽，缩短栽培时间。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选取新萌发的雌性吴茱萸叶片，加适量洗涤剂漂洗后流水冲洗 0.5 ~ 1.0 h，以 2.0 g·L⁻¹ 升汞灭菌 5 min，无菌水冲洗 4 ~ 5 次，切成 1 ~ 3 cm² 的小块，接种到 1/2MS (Murashige and Skoog) + 2.0 mg·L⁻¹ 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D) + 0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)培养基中，培养 12 ~ 15 d 后叶片切口开始出现白色愈合组织，并逐渐增多。4 周继代 1 次，共继代 2 次后将愈合组织转入 1/2MS + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基中，再继代 1 次后有近 7% 的愈合组织分化形成不定芽。将新形成的芽转入 1/2MS + 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ α-萘乙酸(NAA)壮苗培养基中培养，待苗高 3 cm 时切下，转移至 1/4MS + 0.1 mg·L⁻¹ NAA 培养基中，20 d 时生根率近 60%。继续培养至苗高接近瓶盖，备用。所有培养基均添加 10.5 g 琼脂和 30.0 g 蔗糖，调节酸碱度至 pH 5.8 ~ 6.0。

1.2 不定芽诱导

切取 1.1 节中组培苗叶片，分别接种于含不同植物生长调节物质[2, 4-D, 6-BA, 噻苯隆(TDZ), NAA]组合的 1/2MS 培养基中(表 1)。叶片 3 枚·瓶⁻¹，各 40 瓶·处理⁻¹，3 次重复，至 35 d 时统计愈合和芽分化情况，用于筛选能有效诱导不定芽分化的植物生长调节物质处理。根据该试验结果，将组培苗叶片接种于含不同质量浓度 6-BA 和 NAA 的 1/2MS 培养基中(表 2)，叶片 3 枚·瓶⁻¹，各 40 瓶·处理⁻¹，3 次重复，观察并记录生长状况，至 35 d 时统计不定芽分化率。

1.3 增殖与壮苗

将诱导获得的不定芽接种于含不同质量浓度 6-BA 的 1/2MS 培养基中(表 3)，进行增殖与壮苗，观察并记录，28 d 时统计增殖倍数。

1.4 生根培养

经过增殖与壮苗的吴茱萸无菌苗切成单株，接种到含不同质量浓度 NAA 的 1/4MS 培养基中(表 4)，观察并记录生长状况，25 d 时统计生根率。

1.5 移栽

吴茱萸幼苗生根后，待根长超过 5 cm 时，练苗，2 d 后取出并洗净根部附着的培养基，移栽，在苗上方罩一烧杯以保持湿度，3 d 后移去烧杯，15 d 后带土移栽入大田，移入大田后日常管理即可。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节物质处理对叶片愈合组织和不定芽诱导的影响

根据前期试验，设计了不同植物生长调节物质处理，以研究其对吴茱萸叶片愈合组织和不定芽诱导的影响。各处理均能诱导产生愈合组织，但只有在添加 6-BA 或 6-BA + NAA 的 2 种培养基中可以诱导外植体产生不定芽(表 1)。不定芽分化出现在愈合组织形成之后，部位是叶片叶柄端切口处。由于不经过外植体消毒的过程，愈合组织生长迅速，最快 5 d 可见。比较愈合组织大小后发现，添加了 2, 4-D 的各处理中产生的愈合组织最大，而添加 NAA 和 TDZ 的较小。愈合组织的紧实度和颜色在各处理中也不同，其中接种于添加 6-BA 或 6-BA + NAA 等 2 种培养基中的愈合最紧实，颜色开始为乳白色，随后转为黄绿色，不断生长后颜色变深，并分化出不定芽，而其余处理诱导的愈合呈乳白色，生长缓慢，愈

表1 不同植物生长调节物质处理对吴茱萸外植体愈合组织和不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different hormone treatments on induction of calli and adventitious buds in *Euodia rutaecarpa*

序号	植物生长调节物质	不定芽诱导率/%	愈合大小	愈合紧实度	愈合颜色
1	1.00 mg·L ⁻¹ 2,4-D	0	大	较紧实	乳白
2	1.00 mg·L ⁻¹ 2,4-D + 1.00 mg·L ⁻¹ 6-BA	0	大	较紧实	乳白
3	1.00 mg·L ⁻¹ 2,4-D + 0.50 mg·L ⁻¹ TDZ	0	大	较紧实	乳白
4	1.00 mg·L ⁻¹ 6-BA	60.8 ± 3.8 b	较小	紧实	黄绿转部分深绿
5	1.00 mg·L ⁻¹ 6-BA + 0.10 mg·L ⁻¹ NAA	69.2 ± 1.4 a	较小	紧实	黄绿转部分深绿
6	0.10 mg·L ⁻¹ NAA	0	小	疏松	乳白
7	0.10 mg·L ⁻¹ NAA + 0.50 mg·L ⁻¹ TDZ	0	小	疏松	乳白
8	0.50 mg·L ⁻¹ TDZ	0	小	疏松	乳白

说明：不同小写字母表示在 0.05 水平达到显著差异；表中数据为 3 次重复的平均值与标准误。

合组织表面不平整。

2.2 外植体不定芽诱导的最优化选择

根据表 1 结果，设计不同 6-BA 和 NAA 质量浓度处理(表 2)，用以筛选对不定芽诱导效果最佳的植物生长调节物质组合。随着 6-BA 质量浓度的增加，不定芽生长速度也加快，但分化率在添加高质量浓度的 6-BA (5.0 mg·L⁻¹) 处理中有所下降；在添加 0.2 和 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的处理中，加入 NAA 能增强 6-BA 对不定芽的诱导效果，且随着 NAA 质量浓度的升高，不定芽分化率也升高。高质量浓度的 6-BA 虽能快速诱导不定芽，但是叶片易出现水渍化、玻璃化现象。不定芽分化率在添加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA 和 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA 等 2 种处理中最高。

表 2 不定芽诱导最优植物生长调节物质组合的筛选

Table 2 Screening of the best hormone combination in induction of adventitious buds

序号	植物生长调节物质/(mg·L ⁻¹)		不定芽分化率/%	不定芽生长状况
	6-BA	NAA		
1	0.20	0	26.7 ± 2.9 e	生长慢，叶绿色
2	0.20	0.02	27.5 ± 2.5 e	生长慢，叶绿色
3	0.20	0.10	30.8 ± 1.4 de	生长慢，叶绿色
4	0.20	0.50	33.3 ± 1.4 d	生长慢，叶绿色
5	1.00	0	62.5 ± 2.5 b	生长较快，叶绿色
6	1.00	0.02	65.8 ± 1.4 ab	生长较快，叶绿色
7	1.00	0.10	70.8 ± 1.4 a	生长较快，叶绿色
8	1.00	0.50	68.3 ± 1.4 a	生长较快，叶绿色
9	5.00	0	62.5 ± 2.5 b	生长快，叶深绿色，水渍化
10	5.00	0.02	64.2 ± 1.4 b	生长快，叶深绿色，水渍化
11	5.00	0.10	60.8 ± 1.4 b	生长快，叶深绿色，水渍化
12	5.00	0.50	56.7 ± 1.4 c	生长快，叶深绿色，水渍化

说明：不同小写字母表示在 0.05 水平达到显著差异；表中数据为 3 次重复的平均值与标准误。

2.3 不同 6-BA 质量浓度对不定芽增殖和壮苗的影响

表 3 显示：随着 6-BA 质量浓度的升高，增殖倍数升高，茎伸长加速，叶色变浓。当 6-BA 质量浓度为 5.0 mg·L⁻¹ 时，叶变小，叶色变浓绿，有玻璃化现象出现，因此，不宜用该不定芽作为生根材料。而 6-BA 质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 和 2.0 mg·L⁻¹ 时不定芽增殖倍数和苗生长状况无显著差异，可作为生根材料选用。综合成本等因素考虑，以选用 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 质量浓度为宜。

表 3 不同 6-BA 质量浓度对不定芽的增殖和壮苗的影响

Table 3 Effects of different 6-BA concentration on propagation of adventitious buds

序号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	增殖倍数	苗生长状况
1	0.5	3.2 ± 0.3 c	叶色黄绿, 生长正常
2	1.0	4.3 ± 0.2 b	叶色绿, 生长正常
3	2.0	4.5 ± 0.3 b	叶色绿, 生长正常
4	5.0	5.7 ± 0.4 a	茎长而叶小, 叶色浓绿, 水渍化

说明：不同小写字母表示在 0.05 水平达到显著差异；表中数据为 3 次重复的平均值与标准误。

2.4 不同 NAA 质量浓度对吴茱萸不定芽生根和移栽的影响

当添加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基中吴茱萸不定芽高度达到 3 cm 以上时，选择叶大、叶色浓且茎粗壮的不定芽，切下接种于含不同质量浓度 NAA 的 1/4MS 培养基中(表 4)，25 d 时统计生根率，随后经练苗移栽到大田，统计成活率。在不添加 NAA 的处理中，平均生根率为 85.0%，随着 NAA 质量浓度的升高，生根率也提高，出根速度加快，侧根数量变多，根长度和粗度增加，移栽后成活率不断提高。当 NAA 质量浓度升至 0.5 mg·L⁻¹ 时，根长反而变短，侧根变少且变粗，不利于吸水和吸肥，移栽后成活率显著降低。

表 4 不同 NAA 质量浓度对生根和移栽成活率的影响

Table 4 Effects of different NAA concentration on rooting and transplanting

序号	NAA/(mg·L ⁻¹)	生根率/%	生根状况	移栽成活率(%)
1	0	85.0 ± 2.5 b	生根慢, 最早 14 d 可见, 平均 17 d, 主根细长, 侧根多而短	95.0 ± 2.5 b
2	0.02	87.5 ± 2.5 b	出根较慢, 最早 13 d 可见, 平均 16 d, 主根细长, 侧根多而长	95.8 ± 1.4 b
3	0.10	97.5 ± 0 a	出根快, 最早 8 d 可见, 平均 13 d, 主根粗而长, 侧根多而长	100.0 ± 0 a
4	0.50	95.0 ± 2.5 a	出根快, 最早 8 d 可见, 平均 14 d, 主根粗短, 侧根少而粗	65.0 ± 5.0 c

说明：不同小写字母表示在 0.05 水平达到显著差异；表中数据为 3 次重复的平均值与标准误。

3 讨论

研究中添加 1.0 mg·L⁻¹6-BA 和 1.0 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹NAA 的 2 种处理均能诱导不定芽分化，但是同样添加了 6-BA 的 1.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 处理却无法诱导不定芽分化，说明 2, 4-D 对以吴茱萸叶片为材料的不定芽诱导有抑制作用。TDZ 是近 20 ~ 30 a 被逐渐应用到组织培养中的一种新型植物生长调节剂，具有很强的细胞分裂素活性^[3-5]。有报道，TDZ 活性是 6-BA 的 50 倍、异戊烯腺嘌呤(Zip)的 1 000 倍^[6]。笔者曾用 0.5 mg·L⁻¹TDZ + 0.1 mg·L⁻¹NAA 成功诱导出蓬蘽 *Rubus hirsutus* 芽丛^[7]。本研究中，TDZ 诱导不定芽的效果不及 6-BA，原因可能与植物品种间的差异性及 TDZ 质量浓度过高有关。

不定芽的增殖与壮苗试验中，提高外源 6-BA 质量浓度能有效提升不定芽的增殖倍数，但高质量浓度的 6-BA 常会导致组培苗出现玻璃化，该试验中当 6-BA 质量浓度提升至 5.0 mg·L⁻¹ 时即出现明显的玻璃化现象。高洪兵等^[8]在对酸樱桃 *Prunus cerasus* 组培苗的研究中发现高质量浓度 6-BA 会导致组培苗内激素比例失调，引起其快速生长，并认为组培苗芽和愈合组织的徒长是产生玻璃化现象的一个重要原因。

试管苗生根，是从异养状态进入自养状态的一个过程，该过程中常通过降低培养基的营养元素、糖质量浓度来提高生根率。MS 基本培养基中无机盐离子质量浓度较高，通过将其大量元素质量浓度减半后，发现诱导效果优于 MS 基本培养基。此外，由于肌醇对生根影响不大，某些条件下甚至起抑制作用^[9]，因此，在培养基中去除肌醇。使用 NAA 有助于吴茱萸组培苗生根，在 0 ~ 0.1 mg·L⁻¹ 范围内，生根率随 NAA 质量浓度升高而升高，该结果与吴晓玲等^[10]的报道相一致。当 NAA 质量浓度达 0.5 mg·L⁻¹ 时，尽管吴茱萸组培苗的生根率未显著下降，但根长变短，侧根变少，组培苗的移栽成活率显著降低。

研究表明：以吴茱萸组培苗叶片为外植体，选用 1.0 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹NAA 和 1.0 mg·L⁻¹6-BA +

0.5 mg·L⁻¹NAA 等 2 种处理对外植体不定芽的诱导效果最佳; 采用 1.0 mg·L⁻¹6-BA 处理最利于不定芽增殖与壮苗; 而采用 0.1 mg·L⁻¹NAA 处理最利于生根和移栽(图 1)。经过 1.5 a 大田培养后, 该研究中获得的再生植株即成熟开花, 而吴茱萸正常栽培至开花所需时间为 5.0 a。

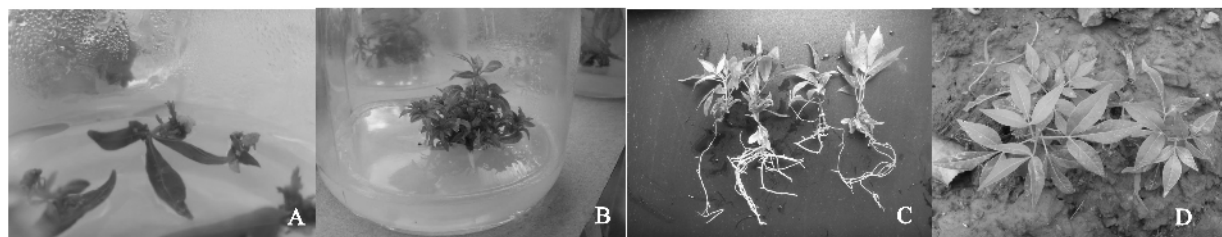


图 1 吴茱萸组培苗叶片不定芽的诱导(A)增殖与壮苗(B)生根(C)和移栽(D)

Figure 1 Induction of adventitious buds from leaves (A), propagation (B), rooting (C) and transplanting (D) during tissue culture of *Euodia rutaecarpa*

参考文献:

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] 卢萍, 郑显明, 白昌平. 吴茱萸的组织培养与植物再生[J]. 贵州农业科学, 1989 (2): 38 - 39, 42.
LU Ping, ZHENG Xianming, BAI Changping. Tissue culture and plant regeneration of *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. [J]. *Guizhou Agricu Sci*, 1989 (2): 38 - 39, 42.
- [3] ZHANG Chunlai, CHEN Dongfang, ELLIOTT M C, *et al.* Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2001, **37** (2): 305 - 310.
- [4] 裘珍飞, 曾炳山, 李湘阳, 等. TDZ 对巨尾桉(GL9)胚性愈伤组织诱导和再生的影响[J]. 林业科学研究, 2009, **22** (5): 740 - 743.
QIU Zhenfei, ZENG Bingshan, LI Xiangyang, *et al.* Embryogenic callus induction and plant regeneration of clones GL9 of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* [J]. *For Res*, 2009, **22** (5): 740 - 743.
- [5] 马光, 郭继平. TDZ 和 6-BA 对茺菁离体再生过程中内源激素水平的不同影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, **36** (3): 237 - 245.
MA Guang, GUO Jiping. Effects of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on endogenous hormone levels during regeneration of *Brassica campestris* ssp. *rapifera* [J]. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci*, 2010, **36** (3): 237 - 245.
- [6] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报, 2003, **20** (2): 227 - 237.
XU Xiaofeng, HUANG Xuelin. TDZ: an efficacious plant growth regulator [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, **20** (2): 227 - 237.
- [7] 刘卫平, 孙骏威, 李素芳. 蓬蘽的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, **45** (10): 1013 - 1014.
LIU Weiping, SUN Junwei, LI Sufang. Tissue culture and rapid propagation of *Rubus hirsutus* Thunb. [J]. *Plant Physiol Commun*, 2009, **45** (10): 1013 - 1014.
- [8] 高红兵, 王鹏飞, 刁绍启, 等. 6-BA 对酸樱桃组培苗 4 种内源激素质量分数动态变化的影响[J]. 东北林业大学学报, 2007, **35** (7): 46 - 48.
GAO Hongbing, WANG Pengfei, DIAO Shaoqi, *et al.* Effect of 6-BA on dynamic changes of four endogenous hormones concentrations of *Prunus cerasus* tissue culture seedlings [J]. *J Northeast For Univ*, 2007, **35** (7): 46 - 48.
- [9] 王玉英, 高新一. 植物组织培养技术手册[M]. 北京: 金盾出版社, 2006.
- [10] 吴晓玲, 姚新灵, 柳金凤. 不同激素对马铃薯组培苗生长特性及酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2007 (1): 85 - 87.
WU Xiaoling, YAO Xinling, LIU Jinfeng. Effects of different hormone on growth characteristics and enzyme activity in tissue culture seedlings of *Solanum tuberosum* [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2007 (1): 85 - 87.