

## 土沉香愈伤组织培养及植株再生(简报)

叶勤法 戚树源 林立东

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

### PLANT REGENERATION FROM STEM AND LEAF CALLUSES OF *AQUILARIA SINENSIS*

Ye Qinfa Qi Shuyuan Lin Lidong

(South China Institute of Botany, Academic Sinica, Guangzhou 510650)

分类号 Q945.39

土沉香(*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg), 又称白木香, 为瑞香科(Thymelaceae)植物, 是一种热带亚热带常绿乔木, 也是我国生产沉香的唯一植物资源<sup>[1]</sup>, 现列为国家保护三级濒危植物<sup>[2]</sup>。沉香是我国、日本、印度以及其他东南亚国家的传统名贵药材和名贵的天然香料。其药理研究证明, 沉香具有镇静、镇痛、止痛、抑制结核杆菌生长等多种功能<sup>[3]</sup>。

我国的土沉香资源十分丰富, 曾有“交干连枝, 岗岭相接, 千里不绝”的记载, 而且国产沉香品质优良, 有“冠绝天下”的美称<sup>[4]</sup>。七十年代土沉香植物在海南、广东、广西、云南等地均有分布, 资源也较丰富。但近年来, 由于自然和人为的原因, 土沉香林遭到严重的破坏, 现仅有零星散生的残存植物。本文研究土沉香愈伤组织培养及其植株再生, 并获得成功, 这对土沉香野生资源保护、种质资源保存和研究均有重要的意义。

## 1 材料与方方法

**材料及处理** 供试材料为在中国科学院华南植物研究所栽培的土沉香当年生嫩枝。将嫩枝放在盛有洗洁精溶液的烧杯中, 搅拌 5 min, 接着置于自来水下冲洗干净。然后在无菌的条件下, 用 70% 酒精消毒 30 s, 再用 0.2% 的升汞溶液灭菌 8 min, 用无菌水冲洗 5-6 次, 取嫩枝的叶片(约  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ) 和茎段(约 0.5 cm) 诱导愈伤组织。

**培养基** MS<sup>[5]</sup> 为基本培养基, 附加  $30 \text{ g L}^{-1}$  的蔗糖,  $8 \text{ g L}^{-1}$  的琼脂和  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  肌醇, pH 为 5.8-6.0, 在培养物的不同发育阶段分别添加不同种类和浓度的植物激素。培养基分装后, 经  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $1.1 \text{ kg cm}^{-2}$  压力) 灭菌 15 min 后备用。

**培养条件** 培养室温度为  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在诱导愈伤组织阶段采用暗培养, 其它阶段均在光下培养, 以日光灯为光源, 每天连续光照 12 h, 光照强度为  $15-25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 愈伤组织产生

以 MS 为基本培养基, 配置一组含生长素 2,4-D、NAA 和 BAP 的培养基。每处理接种两

瓶, 每瓶接入茎段或叶片 7-9 个, 重复三次。接种后 10 d, 一些外植体开始从伤端产生愈伤组织(图版 I: 1,2); 30 d 后, 外植体完全脱分化形成愈伤组织。

从表 1 中可以看出, 外植体在仅含激动素 BAP 的培养基上不能形成愈伤组织, 在含生长素 2,4-D 或 NAA 的培养基中愈伤组织诱导率低, 在含 2,4-D+BAP 或 NAA+BAP 激素组合的培养基中愈伤组织诱导率均为 100%, 对于土沉香愈伤组织诱导, NAA 比 2,4-D 好, 激素组合比单独某种激素好。不同外植体来源(茎段和叶片)对愈伤组织诱导率和生长速度影响不明显, 但茎段外植体脱分化形成愈伤组织较叶片外植体快, 而且叶片外植体产生的愈伤组织较硬密, 茎段外植体产生的愈伤组织较疏松。

表 1 不同生长调节剂对茎段和叶片外植体愈伤组织产生及芽分化的影响

Table 1 Effects of different growth regulators on callus production from stems and leaves and on bud differentiation

激素 Auxin (mg L <sup>-1</sup> )	外植体 Explants	愈伤组织 Callus			芽分化 Bud differentiation	
		诱导率 (%) Induction rate	色泽 Colour	生长速度 Growth	愈伤褐化程度 Callus browning	分化率 (%) Frequency
NAA 2.0	茎段 Stem	92.6	淡绿 Light green	快 Fast	+	0
	叶片 Leaf	90.5	淡绿 Light green	快 Fast	+	0
2,4-D 2.0	茎段 Stem	57.1	白色 White	一般 Normal	++	0
	叶片 Leaf	52.4	白色 White	一般 Normal	++	0
BAP 2.0	茎段 Stem	0				
	叶片 Leaf	0				
BAP 0.5+NAA 2.0	茎段 Stem	100	淡黄 Light yellow	很快 Faster	+	0
	叶片 Leaf	100	淡黄 Light yellow	很快 Faster	+	0
BAP 0.5+2,4-D 2.0	茎段 Stem	100	黄白 White yellow	很快 Faster	+	0
	叶片 Leaf	100	黄白 White yellow	很快 Faster	+	0
BAP 1.0+NAA 0.01	茎段 Stem	100	绿色 Green	很慢 Slower	-	28.6
	叶片 Leaf	100	绿色 Green	很慢 Slower	-	23.8
BAP 1.0+NAA 0.05	茎段 Stem	100	浅绿 Light green	慢 Slow	-	69.2
	叶片 Leaf	100	浅绿 Light green	慢 Slow	-	47.6
BAP 1.0+NAA 0.5	茎段 Stem	100	黄绿 Yellow green	快 Fast	+	0
	叶片 Leaf	100	黄绿 Yellow green	快 Fast	+	0
BAP 0.5+NAA 0.05	茎段 Stem	100	淡绿 Light green	一般 Normal	+	25.0
	叶片 Leaf	94.4	淡绿 Light green	一般 Normal	+	15.0
BAP 2.0+NAA 0.05	茎段 Stem	100	绿色 Green	慢 Slow	-	57.1
	叶片 Leaf	100	绿色 Green	慢 Slow	-	42.9

外植体在不同愈伤组织诱导培养基上培养 40 d 后转入同一分化培养基上继代培养。

Explants were cultured on callus induction medium for 40 days and then transferred to the bud differentiation medium on which the calli were subcultured.

-: 无褐 No browning; +: 褐化轻 Slightly browning; ++: 褐化重 Seriously browning.

## 2.2 不定芽分化

茎段或叶片外植体产生的淡绿色愈伤组织转入含 BAP 0.05 mg L<sup>-1</sup> 的分化培养基中培养, 30 d 后, 愈伤组织大量褐化坏死, 部分愈伤组织呈深绿色, 继续培养 30 d, 深绿色愈伤组织产生两种类型的不定芽: I. 叶片愈伤组织分化产生绿色丛生片状的不定芽, 这是一种叶原基 (shoot primordia<sup>[6]</sup>) 组织(图版 I: 3), 质地较脆, 容易分离, 但很难抽芽成苗。II. 茎段愈伤

组织分化产生绿色不定芽(图版 I: 4), 能生长发育形成丛生苗(图版 I: 6)。

从表 1 中还可看出, 在仅含生长素 NAA 或 2,4-D 的培养基中诱导产生的愈伤组织不能分化产生不定芽, 只有含生长素 NAA 与激动素 BAP 组合的培养基中诱导产生的愈伤组织才能分化产生不定芽, 能分化产生不定芽的愈伤组织生长较慢, 含 NAA  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  BAP  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  的 MS 培养基上诱导产生的愈伤组织不定芽分化最好, 不定芽分化率为 69.2%。土沉香愈伤组织容易诱导, 但不定芽分化较难, 可能与木本植物难分化<sup>[7]</sup>和土沉香本身的生理特性有关。

### 2.3 不同激素对芽增殖的影响

将愈伤组织分化产生的不定芽(II型不定芽)丛切成单株接种到含不同浓度 BAP 与 NAA 配比的 MS 基本培养基中培养, 7 d 后不定芽基部节间膨胀, 20 d 后整个不定芽均膨胀, 并从膨胀的上表面长出小芽(图版 I: 5)。50 d 后统计不定芽的增殖系数, 结果见表 2。

当培养基中不含激动素时, 芽的增殖系数很低(接近 1), 当培养基中 BAP 浓度为  $0.05-0.5 \text{ mg L}^{-1}$

时, 增殖系数较高, 其中 BAP 浓度为  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  时, 增殖系数最高, 为 4.93, 但当 BAP 浓度较高时( $>0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), 增殖系数反而下降。当培养基中含有生长素 NAA 时, 芽的增殖系数明显下降, 外植体基部脱分化产生愈伤组织, 愈伤化程度随着 NAA 浓度增高而加剧, 芽的增殖也随之受抑制。芽的增殖系数与细胞分裂素对生长素比例的关系十分密切, 在一定范围内提高细胞分裂素对生长素的比例, 可以提高芽的增殖系数<sup>[8]</sup>。

### 2.4 生根诱导及完整植株的形成

当土沉香丛生芽长至  $1.5-2.5 \text{ cm}$  高, 具有 3-4 片小叶时, 可将其分成单株, 移入含低浓度 NAA 或 IBA 的培养基中直接诱导生根; 或接入含高浓度 NAA 或 IBA 的 1/2MS 培养基中 2-4 d, 再转入无激素的 1/2MS 培养基间接诱根产生, 30 d 后统计生根率。在含 NAA  $0.01-0.1 \text{ mg L}^{-1}$  的生根培养基中能直接诱导外植体生根(图版 I: 8), 但生根率较低, 在 40% 以下(如表 3), 产生的根数较少, 且生根外植体基部伴有疏松愈伤组织发生, 影响再生植株移栽成活。

表 2 不同激素对芽增殖的影响

Table 2 Effect of Auxins on bud proliferation

激素 Auxin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	接种的不定芽数(个) No. of buds inoculated	产生的芽数(个) No. of buds produced	增殖系数 Propagation coefficient
BAP 0	14	15	1.07
BAP 0.05	14	69	4.93
BAP 0.1	14	53	3.79
BAP 0.5	14	45	3.21
BAP 1.0	14	36	2.57
BAP 0.1+NAA 0.05	14	32	2.29
BAP 0.1+NAA 0.5	16	16	1.0
BAP 0.5+NAA 0.5	14	18	1.29

增殖系数是指接入的每单株不定芽或单个茎段(带有一个腋芽)增殖生长产生的芽数。即增殖系数 = 芽数/不定芽数

表 3 IBA 和 NAA 对生根影响

Table 3 Effects of IBA and NAA on rooting

激素 Auxin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	接种苗数(株) No. of shoots inoculated	生根苗数(株) No. of shoots rooted	生根率(%) Rooting percentage
NAA 0	18	0	0
NAA 0.01	20	8	40
NAA 0.02	20	10	50
NAA 0.05	20	6	30
NAA 0.1	20	4	20
NAA 0.2	20	0	0
NAA 0.5	20	0	0
IBA 0.01	20	0	0
IBA 0.05	20	0	0
IBA 0.1	20	0	0
IBA 0.2	20	0	0
IBA 0.5	20	0	0

但采用间接诱导生根效果较好, 生根率大幅度提高, 均在 60% 以上, 其中以无根苗在含  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 的 1/2MS 培养基中培养 2 d 后转入无生长素的 1/2MS 培养基中培养, 生根率最高达 94.4% (如表 4), 而且试管苗基部无愈伤组织, 根系生长良好, 平均根数为 2-3 条, 最长达 8 条, 根生长整齐, 具细小的侧根 (图版 I: 7)。间接诱导生根的效果远优于直接生根, 原因可能是直接生根中, 对生根的合适的生长素浓度对根的生长常会起抑制作用, 而间接生根的第一步是无根苗在生长素作用下形成较多的根原基, 第二步是在无生长素的抑制作用下让根伸长并正常生长, 从而解决了根原基的发生与根伸长之间的矛盾, 并减少了愈伤组织的形成。这种分阶段间接诱导生根的方法在一些温带果树<sup>[9]</sup>和油料木本植物浩浩巴<sup>[10]</sup>的组织培养中已有采用, 可能是木本植物生根的一种合适途径。

此外, 本实验用间接法还诱导了土沉香叶片外植体生根 (图版 I: 9), 其生根率为 100%, 比无根苗的生根率高, 但根的生长很慢。

## 2.5 土沉香试管苗移栽

当生根的试管苗长至 3-5 cm 高时, 先把试管苗从培养室中取出, 置窗前散射光处 3-5 d, 再打开封口膜炼苗 2-3 d, 接着从瓶中取出试管苗, 用清水洗净粘附根系的培养基, 转入到珍珠岩的基质中, 淋足定根水, 套上带小孔的塑料袋保湿防风, 25 d 后移去塑料套, 以后每隔 2 d 喷水一次。结果发现, 65 棵组培苗在花钵中经过 55 d 生长后仍有 61 棵成活, 成活率为 93.8%。成活的小苗 (图版 I: 10) 叶子葱绿, 生长旺盛, 与种子实生苗相同。

## 参考文献

- 1 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴, 第二册. 北京: 科学出版社, 1972, 948
- 2 中国科学院植物研究所主编. 中国植物红皮书—稀有濒危植物. 北京: 科学出版社, 1992, 670-671
- 3 戚树源, 陆碧瑶, 朱亮峰等. 白木香愈伤组织的化学成分. 中草药, 1993, 24(2):59-74
- 4 广东省植物研究所. 初步揭示沉香结香的秘密. 植物学报, 1976, 18(4):287-291
- 5 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497
- 6 Tanaka R, Ikeda H. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* ( $2n=4$ ) by shoot tip cloning. *Jpn J Genet*, 1983, 58, 65-70

表 4 不同处理时间对根诱导的影响

Table 4 The influence of time treated with auxins on root induction

激素 Auxin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	处理天数* Treatment days	接种苗数(株) No. of shoots inoculated	生根苗数(株) No. of shoots rooted	生根率(%) Rooting percentage
NAA 1	2	89	84	94.4
	3	29	27	93.1
	4	21	16	76.2
IBA 1	2	20	14	70.0
	3	21	13	61.9
	4	21	12	57.1

\* 将诱根的无根苗先在含 NAA  $1 \text{ mg L}^{-1}$  或 IBA  $1 \text{ mg L}^{-1}$  的 1/2MS 培养液中处理 2、3、4 d, 再转入无激素的 1/2MS 培养基中培养。Shoots were treated in 1/2MS liquid medium with NAA or IBA for 2, 3 or 4 days, respectively, and then transferred to 1/2MS medium without auxin for rooting.

- 7 许智宏. 植物的细胞分化. 植物生理学通讯, 1979, (3):66-75
- 8 李蔚任, 杨峻芸, 曹安飞等. 粉叶小檗愈伤组织的培养及小檗碱的含量. 云南植物研究, 1995, 17(3):325-330
- 9 John H Dodds. Tissue culture of trees. American edition. The Avipublishing Company, Inc Westport, Connecticut. 1983, 71-74
- 10 姚军, 张燕玲, 林荣. 浩浩巴组织培养和快速繁殖. 广西植物, 1996, 16(1):73-76

### 图版说明

1. 叶片外植体产生的愈伤组织; 2. 茎段外植体产生的愈伤组织; 3. 从叶片愈伤组织上产生的不定芽; 4. 从茎段愈伤组织上产生的不定芽; 5. 不定芽膨胀部分及其上增生的小芽; 6. 丛生苗; 7. 间接生根法诱导产生的生根小苗; 8. 直接生根法诱导产生的生根小苗; 9. 间接生根法诱导叶片生根; 10. 移栽成活的试管苗.

### Explanation of plate

1. Calli from leaf explants; 2. Calli from stem explants; 3. Fascicularly and sheetly adventitious buds from leaf calli; 4. Singly adventitious buds from stem calli; 5. The swelled part of adventitious buds and small buds produced from the swell; 6. Fascicular shoots; 7. In indirect way rooting from rootless shoots; 8. In direct way rooting from rootless shoots; 9. In indirect way rooting from leaves; 10. The survival plantlets.