

# 黄皮愈伤组织诱导及其对不同激素的响应

潘小平, 李美茹, 杨 谦\*

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

**摘要:** 通过对黄皮不同外植体进行离体培养, 初步获得了愈伤组织。结果表明: 腋芽、花芽容易诱导绿色愈伤组织, 且愈伤组织较细密。叶柄的愈伤组织诱导率很低, 时间长, 生长缓慢。愈伤组织的增殖继代培养的初步研究表明: 花芽愈伤组织在继代培养基上形成白色、较松散的愈伤组织, 质地较差; 而腋芽及叶柄产生的愈伤组织生长极缓慢, 难以继代。

**关键词:** 黄皮; 外植体; 愈伤组织; 诱导

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0144-02

## Callus induction and respond to different phytohormone of *Clausena lansium*

PAN Xiao-ping, LI Mei-ru, YANG Qian\*

(South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** Different explants of Wampee (*Clausena lansium*) were used to induce callus. The preliminary results showed that the explant axillary bud and flower bud could be induced green, tighten callus in short time while the callus obtained from the explant petiole had lower induction rate, longer induction time, and grew much slowly. Subculture result indicated that white, friable callus could be obtained by subcultured callus from the explant of flower bud. However, the callus induced from the explant axillary bud and petiole grew much slow and it was difficult to subculture them.

**Key words:** *Clausena lansium*; explants; callus; induction

我国南方资源丰富的芸香科黄皮属植物黄皮 (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) 是一种果树。不仅能食用, 其根、叶、果、核还能入药, 能解表行气、健胃止痛。民间用其叶煮水、洗浴, 治疗疥癬、消风肿等。黄皮叶的水浸膏治疗急性黄疸型病毒性肝炎有一定疗效(杨明河等, 1987)。黄皮叶中的黄皮酰胺类似脑复康对脑起保护作用, 改善脑血液循环和抑制脂质过氧化反应(刘云等, 1991)。目前关于黄皮的组织培养报道较少(宁正祥等, 1987), 其愈伤组织诱导形成的研究未见报道。本工作对黄皮进行了愈伤组织诱导和继代培养的研究, 并考察了植物激素

对黄皮不同外植体愈伤组织形成的影响, 为进一步筛选合适的愈伤诱导培养基及继代培养奠定基础。

### 1 材料和方法

黄皮果树购买于广州市果树研究所, 以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA(苄基腺嘌呤)、2,4-D(二氯苯氧已乙酸)、NAA(萘乙酸)、IAA(吲哚乙酸)。琼脂 0.7%, 蔗糖 3%, pH5.8~6.0, 121℃灭菌 15~20 min。黄皮幼茎、叶柄及刚刚萌出的花蕾(圆球形)。将材料用自来水洗净, 置于 70% 酒

收稿日期: 2003-01-27 修订日期: 2003-07-14

基金项目: 中科院留学经费择优支持回国工作基金; 国家自然科学基金资助项目(30270158)。

作者简介: 潘小平(1969-), 女, 湖北通城县人, 助理研究员, 主要从事植物次生代谢研究。\* 为通讯作者

精中浸泡 30 s, 吸干。转入 0.1% 升汞溶液中浸泡 4~5 min, 最后用无菌水冲洗 5 次。在无菌条件下接种于不同培养基上进行愈伤组织的诱导, 在  $27 \pm 3$  °C, 暗培养。

形成愈伤组织的外植体是指形成了肉眼可见的愈伤组织的外植体, 愈伤组织形成频率 = 形成愈伤组织的外植体数 / 接种的未污染的外植体数 ×

100%, 所有数据均于外植体接种 1 个月后统计。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织形成的观察

以 MS 为基本培养基, 配置一组含激素 2,4-D、NAA、6-BA、IAA 的培养基。各种外植体分别接种

表 1 植物激素对黄皮不同外植体愈伤组织形成的影响

Table 1 Effects of phytohormone on callus production from different explants of *Clausena lansium*

激素 Auxin(mg · L <sup>-1</sup> )	外植体 Explants	产生愈伤组织时间 Time of callus formation(d)	诱导频率(%) Frequencies of callus formation	愈伤组织的特征(生长状态) Growth state of callus formation
2,4-D <sub>1</sub>	幼茎 Stem	12	50	绿色, 颗粒状, 较细密, 质地好
	叶柄 Leaf	—	—	—
2,4-D <sub>2</sub>	幼茎 Stem	12	30	绿色, 颗粒状, 较细密, 质地好
	叶柄 Leaf	40	33.3	白色, 较松散, 质地一般
6-BA <sub>0.5</sub>	叶柄 Leaf	20	15	白色
	花芽 Flower	11	20	白色, 透明
6-BA <sub>1.0</sub> + NAA <sub>0.5</sub> + IAA <sub>0.5</sub>	叶柄 Leaf	20	14	—
	花芽 Flower	11	21	白色, 透明
6-BA <sub>1.5</sub> + NAA <sub>1.0</sub> + IAA <sub>1.0</sub>	叶柄 Leaf	20	15	—
	花芽 Flower	11	25	白色, 透明
2,4-D <sub>1</sub> + 6-BA <sub>1.0</sub> + NAA <sub>0.5</sub> + IAA <sub>1.0</sub>	叶柄 Leaf	20	20%	白色, 较松散, 质地一般
	花芽 Flower	11	70	浅绿色(花基部膨大成球状)较细密, 颗粒状, 质地好
2,4-D <sub>1</sub> + 6-BA <sub>1.5</sub> + NAA <sub>1.0</sub>	叶柄 Leaf	—	—	—
	花芽 Flower	11	80	浅绿色(花基部膨大成球状)较细密, 颗粒状, 质地好
2,4-D <sub>1</sub> + 6-BA <sub>0.5</sub> + IAA <sub>0.5</sub>	叶柄 Leaf	—	—	—
	花芽 Flower	11	50	浅绿色, 质地一般

在表 1 所示的八种不同培养基上观察脱分化时间, 并计算愈伤组织的诱导率。从表 1 可见黄皮各种外植体中, 愈伤组织出现的时间, 以花芽脱分化较容易, 腋芽可诱导出愈伤组织, 而叶柄较难产生愈伤组织; 外植体在各种培养基上的诱导率, 相对以花芽诱导率较高, 其次为腋芽, 最后为叶柄。愈伤组织生长, 以花芽、腋芽等的愈伤组织为绿色、较细密, 质地较好; 而叶柄的愈伤组织为白色、较松散, 质地较差。

### 2.2 愈伤组织的继代培养

待愈伤组织长到一定大小, 从外植体上移出进行继代培养。花芽愈伤组织生长较好, 以 MS + 2,4-D<sub>1</sub> + 6-BA<sub>1</sub> + NAA<sub>1</sub> 和 MS + 2,4-D<sub>0.5</sub> + 6-BA<sub>0.5</sub> + NAA<sub>1</sub> 作为继代培养基, 其愈伤组织在继代培养基上培养了 10 d 后形成白色、较松散的愈伤组织, 质地较差。而腋芽及叶柄产生的愈伤组织生长极缓慢, 难以继代。可见适合于愈伤形成的激素配比并不适合于愈伤组织的生长。

## 3 讨论

从黄皮外植体诱导产生愈伤组织, 可以进一步以组织培养手段生产和提高黄皮中活性成分黄皮酰胺, 通过次生代谢途径诱导其活性成分增加, 本文首次报道黄皮愈伤组织的诱导。

在利用植物细胞培养技术生产有用次生代谢产物的研究中, 诱导愈伤组织的形成是其重要的一步, 诱发的愈伤组织质量的好坏直接影响着其后的培养与筛选、悬浮细胞系的建立、大规模生物反应器的培养。虽然从黄皮花芽、腋芽、叶柄中都能诱导愈伤形成, 但目前其生长量很低, 花芽略高, 腋芽、叶柄的愈伤生长量很低, 生长非常缓慢; 而且生长质地不同, 花芽、腋芽生长质地较好, 而叶柄的较差。同时, 花芽继代培养产生的愈伤组织质地不好, 腋芽和叶柄 (下转第 151 页 Continue on page 151)

- Morgan PW, Drew MC, Jordan WR, *et al.* 1997. Ethylene signal transduction and programmed cell death during aerenchyma formation in maize roots[J]. *Plant Physiol*, **114**: 31 003.
- Orzaez D, Granell A. 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*[J]. *Plant*, **11**: 137-144.
- Pan JW, Chen H, Gu Q, *et al.* 2002. Environmental stress-induced programmed cell death in higher plants[J]. *Genetics*, **24**(3): 385-383.
- Raz V, Fluhr R. 1993. Ethylene signal is transduced via proteins phosphorylation events in plant[J]. *Plant cell*, **5**(5): 523-530.
- Roberts AW, Haigler CH. 1989. Rise in chlorotetracycline fluorescence accompanies tracheary element differentiation in suspension cultures of zinnia[J]. *Protoplasma*, **152**(1): 37-45.
- Rosl F. 1992. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells[J]. *Nucleic Acid Res*, **20**: 5 243-5 244.
- Sun YL(孙英丽), Zhao Y(赵允), Liu CX(刘春香), *et al.* 1999. Cytochrome c can induce programmed cell death in plant cells(细胞色素 C 能诱导植物 PCD)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **41**(4): 379-383.
- Wacker PR, Sikorska M. 1997. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis[J]. *Biol*, **75**: 287-299.
- Wang H, Li J, Bostock RM, *et al.* 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development[J]. *Plant Cell*, **8**: 375-391.
- Wang YQ(王雅清), Cui KM(崔克明). 1998. Programmed cell death during the vessel element differentiation of the secondary xylem in *Eucommia ulmoides* shoots(杜仲次生木质部导管分子分化中的程序性死亡)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **40**(12): 1 102-1 107.
- Yeung EC, Meinke DW. 1993. Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor[J]. *Plant Cell*, **5**: 1 371-1 381.
- You RL(尤瑞麟). 1985. Ultrastructural studies on the degeneration processes in wheat nucellar cells(小麦珠心细胞衰退过程的超微结构观察)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **27**(4): 345-353.
- Zhou J(周军), Zhu HZ(朱海珍), Jiang XF(姜晓芳), *et al.* 1999. Ethylene induction of apoptosis in carrot protoplasts(乙烯诱导胡萝卜原生质体凋亡)[J]. *Acta Bot Sin(植物学报)*, **41**(7): 747-750.

(上接第 145 页 Continue from page 145)

继代培养仍然很困难。因此,选择培养愈伤组织的激素配方不能仅依据愈伤组织诱导率来确定,还要对愈伤组织生长量进行统计分析。这方面的工作正在进行。

#### 参考文献:

宁正祥,黄昌贤. 1987. 黄皮的茎段培养与试管繁殖[J]. 植

物生理学通讯, **6**: 41-48.

刘云,石成璋,张均田. 1991. 黄皮酰胺的抑制脂质过氧化和脑保护作用[J]. 药学学报, **26**(3): 166-170.

杨明河,曹延怀,李伟勋,等. 1987. 黄皮叶中黄皮酰胺的分离和结构测定[J]. 药学学报, **22**(1): 33-40.