

## 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养研究\*

### Callus Induction and Subculture of *Taxus media* var. *hickss*

黄宁珍, 付传明, 何成新, 唐凤鸾, 李 锋

HUANG Ning-zhen, FU Chuan-ming, HE Cheng-xin, TANG Feng-luan, LI Feng

(广西植物研究所, 广西桂林 541006)

(Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China)

**摘要:**以曼地亚红豆杉(*Taxus media* var. *hickss*)嫩茎和嫩叶为外植体,进行愈伤组织诱导和继代培养研究。愈伤组织诱导以MS为基本培养基,继代培养以MS和B<sub>5</sub>为基本培养基,分别添加不同浓度和组合的细胞分裂素(6-BA、TDZ、KT、2-ip)、生长素类激素(NAA、2,4-D),和水解乳蛋白、活性炭等抗褐化试剂,考察其对愈伤组织诱导和继代培养的影响。结果表明,曼地亚红豆杉嫩茎有很强的分生能力,比嫩叶更易于诱导愈伤;在培养基MS+TDZ0.002mg/L+NAA1.0mg/L、MS+TDZ0.002mg/L+2,4-D1.0mg/L、MS+TDZ0.002mg/L+NAA1.0mg/L+2,4-D1.0mg/L和MS+KT1.0mg/L+2,4-D1.0mg/L+NAA1.0mg/L上,嫩茎愈伤的诱导率达100%,生长迅速,品质良好,利于继代培养;培养基B<sub>5</sub>+KT1.0mg/L+2,4-D2.0mg/L+NAA1.0mg/L适用于愈伤继代,每30d增殖倍数5.2倍;培养基中添加活性炭500mg/L、维生素C1000mg/L或水解乳蛋白1000mg/L对抑制材料褐化有一定的效果。

**关键词:**愈伤组织 诱导 继代 褐化 曼地亚红豆杉

中图分类号:Q943.1 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2007)03-0306-06

**Abstract:** The tender stems and leaves of *Taxus media* var. *hickss* were used as explants. The basic medium MS was used for callus induction, MS and B<sub>5</sub> for callus subculture respectively. Different concentrations and combinations of cytokinin (6-BA, TDZ, KT, 2-ip), auxin (NAA and 2,4-D) and darkening inhibitors (activated charcoal, vitamin C and lactalbumin hydrolysate) were added to the basic media. The results indicated that the tender stems had strong merisic ability, and more effective than leaf in inducing callus. The rate of callus induction was 100% when the tender stems were cultured in MS+TDZ0.002 mg/L+NAA1.0 mg/L, MS+TDZ0.002 mg/L+2,4-D1.0 mg/L, MS+TDZ0.002 mg/L+NAA1.0 mg/L+2,4-D1.0 mg/L and MS+KT1.0 mg/L+2,4-D1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L. These callus grew rapidly and had a fine quality which was good for next subculture. The medium B<sub>5</sub>+KT1.0 mg/L+2,4-D2.0 mg/L+NAA1.0 mg/L was optimum for callus subculture, and the proliferation coefficient was 5.2 every 30d. Subculture media with activated charcoal 500 mg/L, vitamin C 1000 mg/L or lactalbumin hydrolysate 1000 mg/L could inhibit the darkening of callus to some extent.

**Key words:** callus, induction, subculture, darkening, *Taxus media* var. *hickss*

红豆杉(*Taxus media*)是天然抗癌化合物紫杉醇的唯一来源,具有极高的医疗价值,对卵巢癌、乳腺癌等多种癌症有明显疗效<sup>[1]</sup>。由于人为大量采伐,目前红豆杉已濒临灭绝<sup>[2]</sup>。普通红豆杉属植物中的紫杉醇含量很低、积累慢,含量最高的树皮也仅有

0.01%,一般5棵60a生大树的树皮仅可提取到1g紫杉醇<sup>[3,4]</sup>。红豆杉的树皮一旦被剥取,整株树的生命也将终结,因此,利用生物技术通过细胞培养生产紫杉醇是一个利于物种保护并且经济快捷的方法,而且具有重大的应用价值和良好的生态效应。

自Christen<sup>[5]</sup>获得红豆杉细胞培养的第一个专利以来,科学家通过外植体的选择、调整培养基的成分和培养条件等方式来改善红豆杉愈伤或细胞培养方法<sup>[6~9]</sup>,从提高愈伤诱导率、完善继代培养条件、降低褐化及提高培养物有效成分等不同方面进行研究,

收稿日期:2007-02-09

修回日期:2007-04-11

作者简介:黄宁珍(1968-),女,副研究员,主要从事药用植物生物技术研究工作。

\*广西科技攻关项目(桂科攻0235017-4)和(桂科攻0537017-11)资助。

以获得稳定高产的培养体系。虽然所用的材料类同,实验方法也类似,但是多数实验都有不同的侧重点,实验结果也从不同的侧面补充和完善了红豆杉的组织培养技术体系,而且,在分析细胞培养产物时,陆续发现了一系列高效低毒的新的抗癌化合物<sup>[10~12]</sup>。

曼地亚红豆杉 (*Taxus media* var. *hickss*) 是欧洲红豆杉 (*T. baccata*) 和日本红豆杉 (*T. cuspidata*) 的一个杂交种,4~5年生植株的枝叶中紫杉醇的含量较高,为0.04~0.06%,相当于70~80年生普通红豆杉树皮的含量,是一个用于生产和提取紫杉醇的理想品种<sup>[13]</sup>。为此,我们以曼地亚红豆杉不同的外植体为材料,从愈伤组织诱导、继代培养以及继代培养中的防褐化等技术环节入手,对曼地亚红豆杉愈伤组织培养的整个过程进行系统研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其处理

1.1.1 以嫩茎为外植体 选择晴好天气,剪下曼地亚红豆杉新生的嫩枝(长2~5cm),用1%~2%的洗衣粉水漂洗3~5min,自来水冲洗干净,移至超净工作台上,先用70%的乙醇处理50s,再用0.1% $\text{HgCl}_2$ 消毒3~5min,无菌水漂洗5~7次,切成1~2cm的小段,保留半叶,接种在诱导培养基上。

1.1.2 以嫩叶为外植体 选择晴好天气,剪下新枝中顶部的嫩叶,用1%~2%的洗衣粉水漂洗5min,自来水冲洗干净,移至超净工作台上,先用70%的乙醇处理50s,再用0.1% $\text{HgCl}_2$ 消毒5~8min,无菌水漂洗5~7次,每张叶剪成2~3段,接种在诱导培养基上。

### 1.2 培养基

愈伤组织诱导以MS为基本培养基,继代培养以MS和 $\text{B}_5$ 为基本培养基,加入0.6%~0.7%的琼脂、2%~3%的蔗糖,同时添加不同浓度和组合的TDZ(Thidiazuron)、KT(6-Furfurylaminopurine or kinetin)、6-BA(6-Benzyl-aminopurine)、2-ip[(6-r, r-Dimethylallyl amino)-purine]、2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)、NAA(Naphthalene acetic acid),并根据需要添加水解乳蛋白、活性碳等抗褐化试剂,分装,在压力 $10^5\text{Pa}$ 、温度 $121^\circ\text{C}$ 下灭菌25min。

### 1.3 培养条件

1.3.1 愈伤组织诱导 材料接种后,在温度 $28^\circ\text{C}$ 、日光灯2000lx、12h/d的条件下培养。

1.3.2 愈伤组织继代 (1)在温度 $28^\circ\text{C}$ 、遮光条件

下培养;(2)在温度 $28^\circ\text{C}$ ,分别在红、蓝、黄光(2000lx)下培养;(3)先在温度 $4^\circ\text{C}$ 下培养24~72h,再转移到条件(1)下培养。

### 1.4 观测和分析

(1)愈伤组织诱导效率以诱导率表示,诱导率=产生愈伤的外植体数/总的外植体数 $\times 100\%$ ;(2)愈伤组织的生长速度以单位时间内组织的增殖倍数表示,增殖倍数=1个培养周期内愈伤组织的产量/接种量(可用重量或体积表示);(3)愈伤组织的质量分三级:好(颗粒状、淡黄绿色)、较好(颗粒状、浅黄或黄白色)、差(颗粒状、褐色,或者白色絮状);(4)褐化程度分为4个等级:严重(++)、中度(+)、轻微(0)、不褐化(-)。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导

#### 2.1.1 不同类型外植体愈伤组织的诱导效果

在相同的培养基中,嫩茎愈伤组织的诱导效果优于嫩叶(表1)。首先,以茎为外植体,愈伤组织的诱导效率高,达100%,而以叶为外植体,愈伤的最高诱导率仅为42%。其次,茎产生的愈伤组织分生能力强、生长速度较快,在30d的培养周期内可长成0.5~1.2cm的愈伤组织团,而叶产生的愈伤组织分生能力差、生长速度慢,在相同的培养周期内仅长成0.2cm左右的组织团。再次,嫩茎产生的愈伤组织质量较好,一般为颗粒状,浅绿色或褐色,有较强的分生能力,利于再次继代,而由叶产生的愈伤组织多为白色絮状或褐黑色,分生能力差或无分生能力,不利于继代培养。因此,曼地亚红豆杉愈伤组织诱导的外植体以嫩茎为好。

#### 2.1.2 不同类型细胞分裂素对愈伤组织的诱导效果

通过一系列的预备实验得知,几种细胞分裂素诱导愈伤的适合浓度为:6-BA 0.2mg/L、TDZ 0.002mg/L、KT 1.0mg/L、2-ip 1.0mg/L,嫩茎为外植体一般在接种2周后长出愈伤组织,30~35d长成,继续培养生长速度缓慢或停止生长。其中,6-BA对愈伤组织的诱导效果较差,其诱导率较低,长成的愈伤块小,颜色为褐色或暗褐色,质量较差。TDZ、KT和2-ip对愈伤组织诱导效果较好,其诱导率高,生长速度较快,颜色为浅绿色,质量较好。综合表1的结果,曼地亚红豆杉愈伤组织诱导的细胞分裂素种类以TDZ和KT效果最好。

#### 2.1.3 生长素类激素对愈伤组织诱导的影响

在本实验所用的两种生长激素中,NAA和2,4-

表 1 不同激素组合对曼地亚红豆愈伤组织诱导的影响\*

Table 1 Effect of hormone composing on callus induction in *Taxus media* var. *hickss*

编号 No.	培养基组成 Components of medium(mg/L)	外植体数(块) Number of explants (Piece)		愈伤块直径 Diameter of callus (cm)**		愈伤组织颜色 Color of callus		诱导率 Induced rate(%)	
		嫩茎 Tender stem	嫩叶 Tender leaf	嫩茎 Tender stem	嫩叶 Tender leaf	嫩茎 Tender stem	嫩叶 Tender leaf	嫩茎 Tender stem	嫩叶 Tender leaf
1	MS+6-BA0.2+2,4-D0.5+NAA0.5	18	8	0.5	—	褐色 Brown	—	67	0
2	MS+6-BA0.2+2,4-D1.0+NAA0.5	15	6	0.4	—	褐色 Brown	—	67	0
3	MS+6-BA0.2+2,4-D2.0+NAA0.5	17	7	0.4	—	深褐 Puce	—	71	0
4	MS+6-BA0.2+2,4-D0.5+NAA1.0	17	8	0.3	—	浅褐 Fawn	—	53	0
5	MS+6-BA0.2+2,4-D1.0+NAA1.0	14	7	0.5	—	褐色 Brown	—	64	0
6	MS+6-BA0.2+2,4-D2.0+NAA1.0	16	5	0.5	—	褐色 Brown	—	69	0
7	MS+6-BA0.2+2,4-D0.5+NAA2.0	16	9	0.4	—	褐色 Brown	—	69	0
8	MS+6-BA0.2+2,4-D1.0+NAA2.0	18	6	0.3	—	浅褐 Fawn	—	61	0
9	MS+6-BA0.2+2,4-D2.0+NAA2.0	19	7	0.5	—	深褐 Puce	—	68	0
10	MS+TDZ0.002+NAA0.5	12	6	0.3	—	浅褐或浅绿 Fawn or aqua	—	75	0
11	MS+TDZ0.002+2,4-D0.5	15	7	0.4	—	褐色 Brown	—	80	0
12	MS+TDZ0.002+NAA0.5+2,4-D0.5	17	8	0.8	0.2	浅绿 Aqua	白 White	94	13
13	MS+TDZ0.002+NAA1.0	13	7	1.1	0.2	浅绿 Aqua	白 White	100	43
14	MS+TDZ0.002+2,4-D1.0	14	9	1.2	0.2	浅绿 Aqua	白 White	100	44
15	MS+TDZ0.002+NAA1.0+2,4-D1.0	16	6	1.0	0.2	浅绿 Aqua	白 White	100	33
16	MS+TDZ0.002+NAA2.0	12	5	0.6	0.2	浅绿 Aqua	白 White	92	20
17	MS+TDZ0.002+2,4-D2.0	14	7	0.6	0.2	浅绿 Aqua	白 White	83	14
18	MS+TDZ0.002+NAA2.0+2,4-D2.0	13	8	0.5	—	浅绿 Aqua	—	92	0
19	MS+TDZ0.002+NAA4.0	16	9	0.5	0.2	浅绿 Aqua	白 White	88	11
20	MS+TDZ0.002+2,4-D4.0	15	6	0.8	0.2	浅绿 Aqua	白 White	93	12
21	MS+TDZ0.002+NAA4.0+2,4-D4.0	14	7	0.6	0.2	浅绿 Aqua	白 White	93	10
22	MS+6-BA1.0+NAA1.0+2,4-D1.0	20	8	0.3	—	浅褐 Fawn	—	30	0
23	MS+KT1.0+NAA1.0+2,4-D1.0	18	9	1.2	0.2	浅绿 Aqua	白 White	100	44
24	MS+2-ip1.0+NAA1.0+2,4-D1.0	22	7	1.0	—	浅绿 Aqua	—	91	0

\* 材料均在 2000lx 的日光灯下培养; \*\* 为培养 30~35d 的愈伤块直径。

\* Materials were cultured under daylight lamp at 2000 lx. \*\* Diameter of callus after cultivating 30~35d.

D 的最适使用浓度均为 1.0mg/L(见表 1 中编号 13、14、15、23、24 的培养基中),两者对愈伤的诱导率都很高,达到 100%,生长迅速,愈伤块都比较大,质量也比较好。培养基中只添加 NAA 或 2,4-D 和同时添加两者对愈伤的诱导效果相差不大。因此,在曼地亚红豆杉愈伤组织诱导中,NAA 和 2,4-D 可单独或配合使用,最适使用浓度均为 1.0mg/L。

## 2.2 愈伤组织继代培养

### 2.2.1 不同培养基成分对愈伤组织继代培养的影响

比较不同激素组合培养基上愈伤组织的生长情

况(表 2)发现,所有培养基上的培养材料都出现不同程度的褐化,愈伤组织的生长速度与褐化程度有一定的相关性:褐化程度轻,愈伤组织的生长速度较快;褐化程度重,愈伤组织的生长速度慢。用 Bonferroni 法<sup>[14]</sup>对不同培养基组合上材料的增殖倍数进行多重比较,结果表明,在愈伤继代培养中,KT 浓度不变,培养基中单独添加 NAA 或 2,4-D 时,生长速度显著低于同时使用这两种激素的综合效果。而且,单独使用 NAA 或 2,4-D 时,新长出的愈伤组织容易褐变,特别是单独使用 2,4-D 时,褐化程度尤为严重。比较

不同基本培养基上材料的生长效果发现, B<sub>5</sub> 为基本培养基略优于 MS。综合结果是, 以 B<sub>5</sub>+KT 1.0 mg/L+NAA1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 培养基上材料的生长速度最快, 每 30d 的增殖倍数达 5.2 倍, 褐化程度较轻, 因此可用于曼地亚红豆杉愈伤组织的继代培养。

### 2.2.2 抗褐化剂对愈伤组织继代培养的影响

为了最大限度地避免或减轻曼地亚红豆杉愈伤组织褐变, 在继代培养基中添加不同的抗氧化剂和吸附剂(表 3), 培养 35d 后, 用 Bonferroni 法<sup>[14]</sup>对愈伤组织的生长量、繁殖倍数进行统计分析的结果表明: 在培养基中添加活性炭、聚乙烯吡咯烷酮、维生素 C、

表 2 激素组合对曼地亚红豆杉愈伤组织继代生长的影响

Table 2 Effect of hormone composing on growth of callus of *Taxus media* var. *hickss* in subculture

编号 No.	培养基成分 Components of medium(mg/L)	数量(瓶) Amount (Bottle)	接种量 Weight of callus when inoculating (g)	培养 30d 后愈 伤的重量 Weight of callus after cultivating 30d (g)	增殖系数及各处 理间的差异 Proliferation coefficient and the difference between every treatments *	褐化程度 Darkening grade
1	MS+KT1.0+NAA1.0	10	0.384	1.883	2.9 <sup>a</sup>	+
2	MS+KT1.0+NAA2.0	10	0.423	2.014	2.8 <sup>a</sup>	++
3	MS+KT1.0+2,4-D1.0	10	0.412	2.023	2.8 <sup>a</sup>	++
4	MS+KT1.0+2,4-D2.0	10	0.445	1.786	2.3 <sup>a</sup>	++
5	MS+KT1.0+NAA1.0+2,4-D1.0	10	0.512	2.342	4.2 <sup>b</sup>	+
6	MS+KT1.0+NAA2.0+2,4-D1.0	10	0.440	2.321	4.3 <sup>bc</sup>	+
7	MS+KT1.0+NAA1.0+2,4-D2.0	10	0.480	2.488	4.6 <sup>bcd</sup>	+
8	MS+KT1.0+NAA2.0+2,4-D2.0	10	0.505	2.117	4.6 <sup>bcd</sup>	+
9	B <sub>5</sub> +KT1.0+NAA1.0+2,4-D1.0	10	0.465	2.423	4.8 <sup>bcd</sup>	+
10	B <sub>5</sub> +KT1.0+NAA2.0+2,4-D1.0	10	0.398	2.426	5.0 <sup>cd</sup>	+
11	B <sub>5</sub> +KT1.0+NAA1.0+2,4-D2.0	10	0.404	2.507	5.2 <sup>e</sup>	+
12	B <sub>5</sub> +KT1.0+NAA2.0+2,4-D2.0	10	0.511	2.312	5.0 <sup>cd</sup>	+

\* 显著性水平  $P < 0.05$ , 不同字母间表示差异显著, 相同字母间表示差异不显著。

\* Significance level  $P < 0.05$ , different alphabets showed significance of difference; and same alphabets showed no difference.

表 3 抗褐变试剂对曼地亚红豆杉愈伤继代培养的影响\*

Table 3 Effect of anti-browning reagents on growth of callus of *Taxus media* var. *hickss* in subculture

处理 Treatment	抗褐变剂浓度 Concentration of darkening inhibitor (mg/L)	数量 (瓶) Amount (Bottle)	接种量 Weight of callus when inoculating (g)	培养 35d 后 愈伤的重量 Weight of callus after cultivating 35d(g)	增殖倍数及与 对照间的差异 Proliferation coefficient and the difference between every treatments	褐化程度 Darkening grade
CK	0	5	0.216	1.046	4.8 <sup>a</sup>	+
加活性炭 Adding activated charcoal	200	5	0.223	1.099	4.9 <sup>a</sup>	+
	500	5	0.235	1.264	5.4 <sup>a</sup>	0
	1000	5	0.314	1.268	4.0 <sup>a</sup>	+
加聚乙烯吡咯烷酮 Adding polyvinyl pyrrolidone	500	5	0.225	1.044	4.6 <sup>a</sup>	+
	1000	5	0.307	1.198	3.9 <sup>a</sup>	++
	2000	5	0.322	1.264	3.9 <sup>a</sup>	++
加维生素 Adding vitamin C	200	5	0.298	1.398	4.7 <sup>a</sup>	+
	500	5	0.276	1.296	4.7 <sup>a</sup>	+
	1000	5	0.269	1.437	5.3 <sup>a</sup>	0
加水解乳蛋白 Adding lactalbumin hydrolysate	500	5	0.342	1.684	4.9 <sup>a</sup>	+
	1000	5	0.217	1.125	5.2 <sup>a</sup>	0
	2000	5	0.327	1.409	4.3 <sup>a</sup>	+

\* CK 为 B<sub>5</sub>+KT1.0mg/L+NAA1.0mg/L+2,4-D2.0mg/L; 显著性水平  $P < 0.05$ , 不同的字母表示差异显著, 相同的字母表示差异不显著。

\* The medium of CK was B<sub>5</sub>+KT1.0mg/L+NAA1.0mg/L+2,4-D2.0mg/L. Significance level  $P < 0.05$ , different alphabets showed significance of difference; and same alphabets showed no difference.

水解乳蛋白等吸附剂或抗氧化剂, 并不能显著地提高愈伤的生长量和繁殖系数; 聚乙烯吡咯烷酮非但不能减轻褐化, 浓度过高反而使材料的褐化程度加重; 活性炭、维生素 C 和水解乳蛋白在特定浓度下可以减轻材料的褐变程度。因此, 我们综合表 3 结果认为, 在培养基中添加抗褐化试剂, 有利于曼地亚红豆杉愈伤的继代培养, 其合适的种类和浓度分别为: 活性炭 500mg/L, 维生素 C 1000 mg/L, 水解乳蛋白 1000 mg/L。

### 2.2.3 不同培养条件对愈伤组织褐化的影响

表 4 结果表明, 进行不同时间的低温(4℃)预处理, 材料的生长速度及褐变情况与对照比没有明显差

表 4 不同培养条件对曼地亚红豆杉愈伤褐化的影响\*

Table 4 Effect of different culture conditions on browning of callus of *Taxus media* var. *hickss*

培养条件 Culture condition	数量(瓶) Amount (Bottle)	接种量 Weight of callus when inoculating (g)	培养 25d 愈 伤的重量 Weight of callus after cultivating 25d(g)	增殖倍数及与 对照间差异 Proliferation coefficient and the difference between every treatments	褐化程度 Darkening grade
CK (暗, 28℃) CK (Cultivated in dark at 28℃)	6	0.236	1.046	4.4 <sup>a</sup>	+
暗, 4℃ 24h 后, 转入 28℃ Cultivated in dark at 28℃ after 24h at 4℃	5	0.243	1.099	4.5 <sup>a</sup>	+
暗, 4℃ 48h 后, 转入 28℃ Cultivated in dark at 28℃ after 48h at 4℃	5	0.514	2.332	4.5 <sup>a</sup>	+
暗, 4℃ 72h 后, 转入 28℃ Cultivated in dark at 28℃ after 72h at 4℃	7	0.440	2.041	4.6 <sup>a</sup>	+
28℃, 红光, 2000lx, 12h/d 28℃, Red light, 2000lx, 12h/d	5	0.488	2.109	4.3 <sup>a</sup>	+
28℃, 黄光, 2000lx, 12h/d 28℃, Yellow light, 2000lx, 12h/d	6	0.505	2.127	4.2 <sup>a</sup>	+
28℃, 蓝光, 2000lx, 12h/d 28℃, Blue light, 2000lx, 12h/d	6	0.314	1.258	4.0 <sup>a</sup>	++
28℃, 白光, 2000lx, 12h/d 28℃, White light, 2000lx, 12h/d	7	0.245	1.034	4.2 <sup>a</sup>	+

\* 培养基为 B<sub>5</sub>+KT1.0mg/L+NAA1.0mg/L+2,4-D2.0mg/L; 显著性水平 P<0.05, 不同字母间表示差异显著, 相同字母间表示差异不显著。  
\* The medium was B<sub>5</sub>+KT1.0mg/L+NAA1.0mg/L+2,4-D2.0mg/L. Significance level P<0.05, different alphabets showed significance of difference; and same alphabets showed no difference.

别(P<0.05)。在不同的光照条件下,除了蓝光下的材料褐变加重、生长速度有所下降外,其它处理与对照比没有明显差异。这说明低温预处理和不同的光照处理不能减轻褐化和组织增殖速度。

### 3 讨论

#### 3.1 愈伤组织诱导

细胞的胚性和分生能力是曼地亚红豆杉愈伤组织培养成功的关键因素,具有良好胚性和分生能力的组织生长迅速、细胞分裂活跃,是进行愈伤组织培养的良好材料。影响愈伤组织生长有两大因素,一是材料本身的性质,二是培养环境。材料的性质在诱导阶段对愈伤块的形成非常重要,影响到愈伤质量和诱导效率。我们通过本次实验,确认嫩茎是曼地亚红豆杉愈伤诱导的良好材料,并筛选出 4 种不同成分的诱导培养基配方,其诱导效率高达 100%,所形成的愈伤块色泽淡绿、质量较好,利于进行继代培养。

红豆杉属植物如南方红豆杉和东北红豆杉的愈伤组织培养研究已有多篇论文报道<sup>[15~22]</sup>,我们本次实验所得的结果与其存在较大的差异,这可能是同属不同种植物,甚至不同品种,以及培养基成分和培养条件不同所致。文献<sup>[15~19,22~24]</sup>对南方红豆杉和曼地亚红豆杉两种植物愈伤组织诱导和继代培养的培养成分、培养条件都不相同,所得的结果也不相同。即使是对同一种植物进行研究,不同的研究者所得的结果也不相同,例如在曼地亚红豆杉愈伤组织培

养方面,马均<sup>[23]</sup>以嫩茎段为外植体,获得的最高愈伤诱导率为 58.9%;胡凯<sup>[24]</sup>以茎尖为外植体,获得的最高愈伤诱导率为 95.2%;而我们同样以嫩茎段为外植体,在不同于马均和胡凯的培养基和培养条件下,获得了高达 100%愈伤诱导率,而且,所形成的愈伤组织质量良好。

#### 3.2 愈伤组织继代和褐化抑制

继代培养是愈伤组织培养成功与否的关键。在愈伤组织继代中培养中,培养基成分、培养条件和褐变直接影响材料的生长速度。在本次试验中,我们通过比较不同的基本培养基、不同的激素种类和浓度组合、不同的抗褐化剂以及不同的培养条件对继代培养的影响,结果表明:(1)B<sub>5</sub>比 MS 更适合作为曼地亚红豆杉继代培养的基本培养基;(2)2,4-D 和 NAA 组合比单独使用更利于曼地亚红豆杉愈伤组织生长;(3)KT 为愈伤继代较好的细胞分裂素类激素,在合适的培养基成分和培养条件下,每 30d 的增殖系数达 5.2 倍。在曼地亚红豆杉愈伤组织培养的同类研究中,马均<sup>[23]</sup>仅对愈伤组织的诱导阶段进行研究,没有涉及到继代培养;而胡凯<sup>[24]</sup>的研究结果则表明:(1)B<sub>5</sub>为基本培养基,愈伤的增殖倍数最大为 4.7;(2)2,4-D 比 NAA 对愈伤组织生长的促进作用显著;(3)6-BA 对愈伤组织生长的促进作用极显著。我们与胡凯研究结果差异的根本原因在于我们实验的内容、方法和侧重点不同,如在细胞分裂素的使用方面,我们对 6-BA、KT、2-ip 和 TDZ 等 4 种激素进行了研究,而胡

凯<sup>[19]</sup>仅就 6-BA 进行研究;在活性碳的使用上,我们设置了 3 个不同的浓度,而胡凯<sup>[24]</sup>仅设一个浓度进行测试。

另外,红豆杉愈伤组织培养褐变的产生与材料的基因型、生理状态、培养基成分、培养条件等因素有关。梅兴国<sup>[25]</sup>的研究结果表明:低 pH 值、液体培养、低无机盐浓度、抗氧化剂和吸附剂等均能明显抑制或减轻褐变。胡凯<sup>[24]</sup>在曼地亚红豆杉愈伤培养中发现:缩短继代周期、提高愈伤组织与培养基接触面的氧气供给能够较好克服褐化。在本实验中,我们发现在培养基中添加一定浓度的抗氧化剂(维生素 C 1000mg/L,水解乳蛋白 1000mg/L)和吸附剂(活性碳 500mg/L),可以在一定程度上抑制褐变的产生及提高愈伤组织的生长速度。

#### 参考文献:

[1] 孙启时,戴振复,于庆海,等.抗癌新药紫杉醇的资源[J].沈阳药学院学报,1993,10(4):305-307.

[2] 马明东,刘跃进.红豆杉资源及开发利用综述[J].四川林业科技,2004,25(1):21-25.

[3] GRAGG GM, SCHEPARTZ SA, SUFFNESS M, et al. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents [J]. Journal of Natural Products, 1993, 56(10):1657-1668.

[4] 刘涤,章国瑛,王晓,等.红豆杉资源与紫杉醇生产概况[J].植物资源与环境,1997,6(1):48-53.

[5] CHRISTEN A A, GIBSON D M, BLAND J. Production of taxol or taxollike compounds in cell cultures[P]. US Patent, 5019504, 1991.

[6] KHOSROUSHAHI A Y, VALIZADEH M, GHASEMPOUR A, et al. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata* [J]. Cell Biology International, 2006, 30(3):262-269.

[7] BRUNDKOV D K, BABINCOVA Z, TAKDC M, et al. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L as a potential source of paclitaxel production[J]. Engineering in Life Sciences, 2004, 4(5):465-469.

[8] CHEN Y Q, YI F, CAI M, et al. Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell culture of *Taxus yunnanensis* [J]. Plant Growth Regulation, 2003, 41(3):265-268.

[9] MIHALJEVIC S, BJEDOV I, KOVAC M, et al. Effect of explants source and growth regulators on in vitro callus

growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonii* [J]. Food Technology and Biotechnology, 2002, 40(4):299-303.

[10] DAI J, BAI J, HASEGAWA T, et al. A new taxoid from a callus culture of *Taxus cuspidata* as an MDR reversal agent [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 54(3):306-309.

[11] ANDO M. Taxoids and abietanes from callus cultures of *Taxus cuspidata* [J]. The Journal of Natural Products, 2005, 68(4):497-501.

[12] VEERESHAM C, MAMATHA R, PRASAD BABU C H, et al. Production of taxol and its analogues from cell cultures of *Taxus wallichiana* [J]. Pharmaceutical Biology, 2003, 41(6):426-430.

[13] 谢志远,方起程,钟晶.曼地亚红豆杉的引种栽培和速生刺激剂的研究[J].中草药,1999,30(2):143.

[14] 杨善朝,张军舰.SPSS 统计软件应用基础[M].桂林:广西师范大学出版社,2001:63.

[15] 陈惠,王文科,卢英梅,等.南方红豆杉外植体母株来源与培养基成分对愈伤组织生长和紫杉醇的影响[J].中草药,2005,36(5):747-751.

[16] 苏应娟,王艇,杨礼香,等.南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养[J].中草药,2001,32(7):637-639.

[17] 赵冬,肖颖,刘占荣,等.南方红豆杉愈伤组织诱导的研究[J].河北农业大学学报,2005,28(6):40-43.

[18] 李斌连,邱萃,刘金仙,等.南方红豆杉愈伤组织诱导和继代培养体系的建立[J].福建农林大学学报:自然科学版,2006,35(5):515-518.

[19] 王德强,王晓玲.南方红豆杉愈伤组织诱导研究[J].合肥工业大学学报:自然科学版,2005,28(4):394-397.

[20] 司徒琳莉,李振山.培养基成分对东北红豆杉细胞生长和紫杉醇产量的影响[J].遗传,2001,23(4):325-328.

[21] 李冬杰,张进献,魏景芳,等.培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J].植物生理学通讯,2005,41(1):95-98.

[22] 杜亚填,陈建华,许建宇,等.植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织培养和紫杉醇合成的影响[J].天然产物研究与开发,2006,18(4):569-576.

[23] 马均,马明东,周宇燊.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导试验[J].林业科技,2006,31(1):12-14.

[24] 胡凯,祝顺琴,谈锋,等.曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2004,29(4):599.

[25] 梅兴国,董妍玲,潘学武.红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J].天然产物研究与开发,2001,13(4):8.

(责任编辑:邓大玉)