

南方红豆杉愈伤组织诱导及褐化防治研究

袁云香^{1,2}, 朱丽君¹, 王建鹏¹, 张 鹏¹

(1. 渭南师范学院 化学与生命科学学院, 陕西 渭南 714099; 2. 陕西省多河流湿地生态环境重点实验室, 陕西 渭南 714099)

摘 要:以南方红豆杉幼茎和叶片为试材, 采用正交实验设计研究了不同浓度 6-BA、NAA 和 AgNO₃ 对南方红豆杉愈伤组织诱导率及褐化的影响。结果表明:最适南方红豆杉愈伤组织诱导的激素组合为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L, 其诱导率达 94%, 适量的 AgNO₃ 能降低南方红豆杉愈伤组织的褐化现象。

关键词:南方红豆杉; 愈伤组织; 诱导; 褐化

中图分类号:S 791.49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0090-03

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairer*)属红豆杉科红豆杉属植物, 是红豆杉的 1 个变种。主要生长在我国南方, 其含有的紫杉醇是一种抗癌成分, 是高档珍贵的药材, 已成为国家一级重点保护植物, 是紫杉醇生产的主要原料植物。由于红豆杉是雌雄异株、异花授粉植

物, 天然资源十分有限, 加之其繁殖能力低、生长缓慢, 紫杉醇含量低, 因此常规栽培方法无法满足市场对紫杉醇的需求。目前, 主要利用组织培养技术诱导愈伤组织来生产紫杉醇。关于南方红豆杉组织培养的研究较多, 但在培养过程中经常出现褐化现象, 影响了愈伤组织的诱导和生长。关于红豆杉的褐化研究较多^[1-8], 但关于 AgNO₃ 对南方红豆杉愈伤组织诱导及褐化影响的研究尚鲜见报道。该试验在南方红豆杉愈伤组织诱导过程中, 附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 AgNO₃, 研究其对愈伤组织诱导率和褐化现象的影响, 以期生产出高质量、褐化少的可供继代或悬浮培养的愈伤组织以及紫杉醇的工业化生产提供试验依据。

第一作者简介:袁云香(1980-), 女, 江西抚州人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物分子遗传学。E-mail: yuanyunxiang2006@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000410); 渭南市基础研究计划资助项目(2012JCYJ-8); 渭南师范学院教育教学改革资助项目(JG201357); 渭南师范院校级理工类科研资助项目(14YKS003)。

收稿日期:2014-04-17

[21] 朱立, 孙超. 贵州重要药用蕨类植物的资源现状及保护性建议[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(6): 336-341.

[22] 蒋盛军, 宋希强, 王胜培, 等. 蕨类植物组织培养研究进展[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 651-656.

Research and Protection on Rare and Endangered Species of Lycophytes and Ferns in Guizhou

LI Li-xia¹, ZHAO Hou-tao^{1,2}, SONG Pei-lang^{1,2}, HAN Guo-ying³, HOU Xiao-qi^{1,2}, YU Zi-wen¹

(1. Guiyang Medicinal Botanical Garden, Guiyang, Guizhou 550002; 2. Guiyang Museum of Medicinal Resources, Guiyang, Guizhou 550002; 3. Guiyang Training Centre of Science and Technology Cadre, Guiyang, Guizhou 550002)

Abstract: Based on field investigation, documents, expertise and new classification system, IUCN standard was applied to evaluate and analyze the rare and endangered species of Lycophytes and Fern plants in Guizhou. Geographical distribution, reasons, protection measures, changes of classification and protection level are described. And suggests protecting other species not included in the list of national protected plants species. There are 108 genera, 888 species, 50 varieties, 12 forms and 3 hybrids of 37 families, 12 subfamilies in Guizhou. And 61 species of 23 genera, 15 families are rare and endangered. 11 species of 9 genera and 8 families are included in the national protection list, 50 species of 17 genera and 12 families are not included.

Keywords: Guizhou; rare and endangered; Lycophytes; Ferns; research and protection

1 材料与方法

1.1 试验材料

以南方红豆杉当年生嫩枝为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的灭菌及接种 剪取南方红豆杉当年生嫩茎,置于烧杯内,加入适量洗洁精在自来水下冲洗 1~2 h。在超净工作台内,取出放于无菌培养皿中,先用 75%酒精消毒 25 s,再用 0.1%升汞浸泡 15 min,然后用无菌蒸馏水冲洗 5~6 次,将嫩茎剪成 1~2 cm 长的外植体,接种于正交设计的诱导培养基上(图 1)。每瓶接种 3 个外植体,共接种 10 瓶。在温度(22±1)℃、光照强度 1 500~2 000 lx、每天光照时间 13 h 条件下,诱导愈伤组织的形成。20 d 后统计诱导率,并密切观察愈伤组织生长状态。3 次重复。

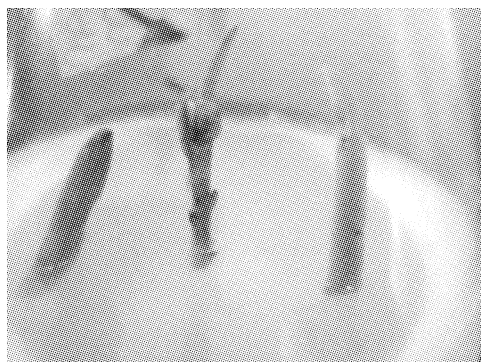


图 1 南方红豆杉外植体接种

Fig. 1 Explants inoculation of *Taxus chinensis* var. *maireri*

1.2.2 正交实验设计 以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)1.0 g/L 及水解酪蛋白 300 mg/L, pH 6.5。愈伤组织诱导培养基植物生长调节剂及附加物质浓度采用 3 因素 3 水平正交设计 $L_9(3^4)$, 筛选出适合南方红豆杉的愈伤组织诱导的培养基。具体因素与水平见表 1。

表 1 正交设计因素与水平

Table 1 Factor and level of using orthogonal design				mg/L
水平	因素 Factor			
Level	6-BA(A)	NAA(B)	AgNO ₃ (C)	
1	0.2	0.5	0.5	
2	0.5	1.0	1.0	
3	1.0	1.5	1.5	

2 结果与分析

南方红豆杉外植体在不同的诱导培养基上培养 3 d, 在叶片及幼茎接触培养基处, 开始膨大, 1 周左右就能看到淡黄绿、结构致密的愈伤组织, 随着培养时间的延长, 愈伤组织不断生长, 15 d 左右整个外植体基部都愈伤组织化, 并且发现愈伤组织处的培养基开始出现红褐色, 愈伤组织开始出现褐化现象(图 2)。

对比不同浓度的 AgNO₃ 处理, 发现适量浓度的 AgNO₃ 对愈伤组织褐化有明显的抑制作用。附加

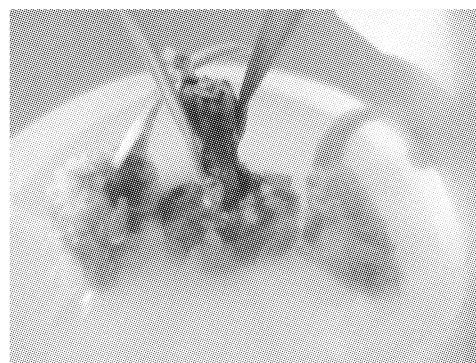


图 2 南方红豆杉愈伤组织诱导

Fig. 2 Callus induction of *Taxus chinensis* var. *maireri*

1.0 mg/L AgNO₃ 的组合中, 诱导培养基变红褐色程度较轻, 且愈伤组织生长状态较好。可能是由于 AgNO₃ 抑制了褐化, 从而促进了愈伤组织的生长。由表 2 正交设计实验结果可知, 各处理的外植体都能诱导出愈伤组织, 最佳的南方红豆杉愈伤组织诱导组合为 A₂B₂C₂, 即 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L, 其诱导率最高为 94%。极差分析结果表明, 6-BA 是影响愈伤组织诱导的主要因素, 其次是 AgNO₃, NAA 对南方红豆杉愈伤组织诱导影响最小。由表 3 可知, 各因素不同处理水平间愈伤组织诱导率差异显著, 6-BA 在 1% 水平上差异极显著, AgNO₃ 在 5% 水平上差异显著, 而 NAA 各水平间差异不显著。

表 2 不同因素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different factors on callus regeneration

编号	6-BA	NAA	AgNO ₃	诱导率
No.	/(mg · L ⁻¹)	/(mg · L ⁻¹)	/(mg · L ⁻¹)	/%
1	0.2	0.5	0.5	42
2	0.2	1.0	1.0	57
3	0.2	1.5	1.5	45
4	0.5	0.5	1.0	94
5	0.5	1.0	1.5	85
6	0.5	1.5	0.5	80
7	1.0	0.5	1.5	55
8	1.0	1.0	0.5	51
9	1.0	1.5	1.0	60
K1	144	191	173	
K2	259	193	211	
K3	166	185	185	
k1	48.00	63.67	57.67	
k2	86.33	64.33	70.33	
k3	55.33	61.67	61.67	
R	38.33	2.66	12.66	

3 讨论

紫杉醇是制备抗癌药物的主要原料, 临床上对乳腺癌、卵巢癌、肺癌、白血病、结肠癌等疗效显著。紫杉醇主要存在于树皮、枝叶和须根中, 由于天然红豆杉资源有限, 近年来研究者发现利用植物细胞培养法诱导愈伤

表 3 诱导培养试验结果的方差分析

Table 3 Analysis of variance for callus regeneration

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
Sources of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean squares	F value	P value
6-BA	2	2 484.222	1 242.111	5 888.3684	0.001697
NAA	2	11.5556	5.7778	2.7368	0.267606
AgNO ₃	2	251.5556	125.7778	59.5789	0.016507
误差	2	4.2222	2.1111		
总和	8	2 751.5556			

组织,进行细胞培养能有效地提取紫杉醇,成为目前极具潜力的规模化生产紫杉醇的途径^[9-11]。赵冬等^[12]对南方红豆杉进行了愈伤组织诱导研究,发现嫩茎作为外植体好于针叶,B5 培养基优于 MS 培养基,最适的激素浓度为附加 2,4-D 2.0 mg/L、6-BA 0.5 mg/L。杜亚填等^[13]研究了不同种类和浓度的激素对南方红豆杉愈伤组织培养及紫杉醇合成的影响,发现愈伤组织生长的激素组合没有唯一性,但紫杉醇合成的含量差异明显,2,4-D 单用或与细胞分裂素合用有利于紫杉醇的合成。在愈伤组织诱导过程中常增加一些抗褐化剂如维生素 C、赤霉素(GA₃)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、二硫苏糖醇(DTT)、活性炭(AC)、椰汁及硫酸铜等^[5,14]。盛长忠等^[1]研究发现适量的维生素 C、活性炭、CA、GA₃ 和 ABA 等物质能有效减轻南方红豆杉愈伤组织的褐化。李斌连等^[15]研究发现侧芽是南方红豆杉愈伤组织诱导的最佳外植体,添加 3 种抗褐化剂 AC、水解乳蛋白(LH)和 GA₃ 效果较好。该研究在南方红豆杉愈伤组织诱导过程中,附加不同浓度 6-BA、NAA 和 AgNO₃,结果发现最适南方红豆杉愈伤组织诱导的激素组合为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+AgNO₃ 1.0 mg/L,其诱导率达 94%。AgNO₃ 是一种乙烯合成的抑制剂,能有效防止外植体褐化,促进器官发生、体细胞胚胎形成和离体植株的再生^[16]。吕宗友等^[17]研究苏丹草愈伤诱导时发现 AgNO₃ 能提高诱导率并降低褐化率。李干雄等^[18]研究不同促进剂对中国红豆杉紫杉醇合成的影响,发现在适时添加适量的 AgNO₃,可以促进对紫杉醇的合成。该研究发现 AgNO₃ 能有效地抑制南方红豆杉愈伤组织的褐化现象,初步筛选了南方红豆杉愈伤组织

诱导的最适激素组合,为今后紫杉醇的工业化的生产提供借鉴。

参考文献

- [1] 盛长忠,王淑芳,王宁宁,等. 红豆杉愈伤组织培养中褐变现象的初探[J]. 南开大学学报(自然科学版),2001,34(4):120-122.
- [2] 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):8-11.
- [3] 李冬杰,魏景芳,张进献,等. 红豆杉细胞培养过程中抗褐变剂研究进展[J]. 中草药,2004,35(7):834-836.
- [4] 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):659-663.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 李丽,张涇帆,何康,等. 两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 复旦学报(自然科学版),2006,45(6):702-707.
- [8] 王培忠,赵欣,张宗申. 东北矮紫杉细胞悬浮培养中褐化问题的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5760-5762.
- [9] 凡利,王义强,王启业. 南方红豆杉细胞培养中生产紫杉醇的研究进展[J]. 经济林研究,2012,30(2):134-139.
- [10] 张翔宇,杜亚填,龚雪元. 南方红豆杉试管微芽诱导培养及其紫杉醇类化合物的积累[J]. 植物生理学报,2012,48(9):864-868.
- [11] 张翔宇,杜亚填,龚雪元. 南方红豆杉愈伤组织生长动力学及紫杉醇代谢动力学研究[J]. 中草药,2012,43(5):990-994.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 李冬杰,魏景芳,张进献,等. 红豆杉细胞培养过程中抗褐变剂研究进展[J]. 中草药,2004,35(7):834-836.
- [15] 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.
- [16] 秦永华,张上隆,胡桂兵,等. AgNO₃ 对草莓试管苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 果树学报,2006,23(5):715-719.
- [17] 吕宗友,苏衍菁,赵国琦,等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报,2011,20(3):174-181.
- [18] 李干雄,李志良,曾腾锋,等. 几种促进剂的添加时间对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响[J]. 天然产物研究与开发,2008(20):876-879.

Study on Callus Induction and Browning Prevention of *Taxus chinensis* var. *maireri*YUAN Yun-xiang^{1,2}, ZHU Li-jun¹, WANG Jian-peng¹, ZHANG Peng¹

(1. College of Chemistry and Life Science, Weinan Teachers University, Weinan, Shaanxi 714099; 2. Key Laboratory for Eco-environment of Multi-River Wetlands in Shaanxi Province, Weinan, Shaanxi 714099)

Abstract: Taking the stems and leaves of *Taxus chinensis* var. *maireri* as the test materials, the influences of the 6-BA, NAA and AgNO₃ concentration on induction rate and browning were studied by using orthogonal test. The results showed that the best suitable induction medium was MS containing 0.5 mg/L 6-BA, 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L AgNO₃, its induction rate was 94%, appropriate concentration of AgNO₃ could reduce the browning rate.

Keywords: *Taxus chinensis* var. *maireri*; callus; induction; browning