

红豆杉组织培养的防褐变措施研究

杨文婷, 匡 倩

(武汉工商学院 环境与生物工程学院, 湖北 武汉 430065)

摘 要:以红豆杉腋芽为外植体, B_5 为基本培养基, 研究了不同激素、添加剂组合对红豆杉组织培养中褐变的影响。结果表明:添加激素 $2,4-D\ 2.0\ mg \cdot L^{-1} + 6-BA\ 0.5\ mg \cdot L^{-1}$, 愈伤组织生长情况最好, 染菌率为 11.11%, 愈伤组织出愈率最高达 88.89%, 褐化程度较低, 多酚氧化酶(PPO)活性为 $8.03\ U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$; 加入添加剂组合活性炭和柠檬酸, 可以降低红豆杉的褐变程度, PPO 活性为 $1.40\ U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。

关键词:红豆杉; 愈伤组织; 出愈率; 褐变

中图分类号:S 791.49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)17-0111-04

红豆杉(*Taxus chinensis*)属红豆杉属植物, 又名紫杉, 自然条件下生存能力较差, 生长缓慢, 1994 年开始被多个国家纳入一级珍稀植物之列, 其主要工业价值之一是提取紫杉醇。紫杉醇是 20 世纪末发现的最好的抗癌药之一, 可用于多种晚期癌症的治疗, 其它药用价值, 如用于心血管的药物洗脱支架等还在进一步开发, 市场上紫杉醇原料药总体呈现供不应求的情况。

传统获得紫杉醇的方法主要是从红豆杉的根、皮、茎、叶中来提取, 由于提取工艺较为复杂, 设备投资大, 原料缺乏而严重受限, 而采用植物细胞培养技术生产紫杉醇具有很大潜力。但由于红豆杉属植物本身特殊的生物学特性, 在培养过程中组织和细胞常发生褐化, 且诱导率较低, 轻则影响组织、细胞生长和繁殖, 重则导致组织、细胞死亡, 已成为制约这一技术推广的最大障碍^[1-6]。所以, 有效地防止和解决组织培养中的褐化、提高出愈率等是当今研究的热点。其褐变现象一般认为是由多酚氧化酶被氧化为醌所致, 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是植物组织内广泛存在的一种含铜氧化酶, 植物受到机械损伤和病菌侵染后, PPO 催化酶被 O_2 氧化形成醌, 使组织形成褐变, 以便损伤恢复, 防止或减少感染, 提高抗病能力^[7-9]。醌类物质对微生物有毒害作用, 植物伤口醌类物质的出现是植物防止伤口感染的愈伤反应, 受伤组织中多酚氧化酶的活性就会提高, 因此可根据 PPO 活性定量评价组织褐变情况。该试验

以染菌率、PPO 活性、愈伤组织生长情况等为指标, 考察了不同激素及不同添加剂组合对红豆杉愈伤组织生长的影响, 以期对红豆杉组织培养提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为江苏产南方红豆杉, B_5 培养基、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、萘乙酸(naphthylacetate, NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)、维生素 C(vitamin C)、柠檬酸(citrate acid, CA)、活性炭(activated carbon, AC)、75%乙醇、0.1%升汞、0.02%苯酚, pH 6.8 磷酸缓冲液。

供试仪器:SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州洁净尚田技术有限公司)、YXQ-LS-50S11 电热式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)、GTR16-2 型高速冷冻离心机(北京时代北利离心机有限公司)、SPS-50B-Z 光照培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 以南方红豆杉当年生的腋芽为外植体, 先用自来水冲洗 5 min, 然后用中性洗衣粉洗净腋芽, 最后再用自来水流水冲洗 30 min, 用滤纸吸干, 放在干净的玻璃烧杯中备用。

1.2.2 不同激素浓度组合的筛选 将洗净备用的带腋芽的幼茎切成 2~3 cm 的切段, 75%酒精中浸泡 5 min, 再用含吐温-20 的 0.1% $HgCl_2$ 浸泡 20 min。无菌水冲洗 5 次后, 将带腋芽的幼茎剪成约 1 cm 的小段, 用灭菌吸水纸吸干水分, 分别接入到含有不同激素浓度组合(表 1)的 B_5 培养基中, 每瓶接种 3 块, 每处理 6 次重复, 观察并统计 30 d 的诱导率和 60 d 的褐化情况, 期间每

第一作者简介:杨文婷(1983-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事药用资源的开发利用等研究工作。E-mail:47389578@qq.com.

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B2016337); 武汉工商学院校级学术团队“特色生物资源开发与利用”基金资助项目(XSTD2015003)。

收稿日期:2016-04-20

隔 2 d 观察其生长情况,及时清理染菌植株,并计算染菌率。染菌率(%)=(染菌外植体/接种外植体数)×100。诱导率(%)=(出愈数/接种外植体数)×100。褐变的深浅以“+”多少表示,“-”表示无褐变(即愈伤组织为颜色浅而透明淡黄色)。

表 1 不同激素浓度组合

Table 1 Combination of different hormone concentration

培养基编号 Medium number	激素浓度 Hormone concentration/(mg · L ⁻¹)
I	2,4-D 1.0+6-BA 0.5
II	2,4-D 2.0+6-BA 0.5
III	2,4-D 3.0+6-BA 0.5
IV	NAA 1.0+6-BA 0.5
V	NAA 2.0+6-BA 0.5
VI	NAA 3.0+6-BA 0.5

1.2.3 不同添加剂组合 选取上述试验诱导率较高、出愈时间较短、生长较好的试验组,分离结构疏松、颜色浅而透明的愈伤组织,在相同的条件下,分别考察不同添加剂维生素 C、柠檬酸、活性炭(表 2)对愈伤组织褐化程度的影响,30 d 后观察和记录其褐化情况并测定其 PPO 活性。

1.2.4 PPO 活性的测定 称取 1.0 g 愈伤组织放入研

表 2 不同添加剂组合

Table 2 Combination of different additive concentration g · L⁻¹

培养基种类 Type of medium	维生素 C Vitamin C	柠檬酸 CA	活性炭 AC
B ₅ -A	0	0.1	0.1
B ₅ -B	0	0	0
B ₅ -C	0.1	0	0.1
B ₅ -D	0.1	0.1	0
B ₅ -E	0.1	0.1	0.1

表 3 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different hormone concentration on the induce of callus

培养基编号 Medium number	接种数 Inoculated number	染菌数 Bacteria number	出愈块数 Callus induction number	染菌率 Infection rate /%	出愈天数 Days of callus formation /d	出愈率 Callus inductionrate /%	褐化程度 Degree of browning	PPO 活性 PPO activity /(U · g ⁻¹ · min ⁻¹)
I	18	4	14	22.22	8	77.78	++	8.60
II	18	2	16	11.11	6	88.89	++	8.03
III	18	3	12	16.67	10	66.67	+++	13.00
IV	18	7	6	38.89	12	33.33	++	8.20
V	18	6	8	33.33	11	44.44	+++	11.00
VI	18	4	9	22.22	10	50.00	+++	12.14

2.2 不同添加剂对愈伤组织褐变的影响

由表 4 可知,不同添加剂在一定程度上减轻了其愈伤组织的褐变程度,降低了其中 PPO 的活性。不同的添加剂组合对其褐化程度影响不同。其中 B₅-A 即加入了活性炭加柠檬酸组合的添加剂,褐变程度最低,PPO 活性大大减小。从不同添加剂组合可知,吸附剂活性炭较抗氧化剂维生素 C 和柠檬酸减轻褐变的效果更为显著。由 B₅-A(活性炭+柠檬酸)和 B₅-E(活性炭+柠檬酸+维生素 C)比较可知,添加剂组合并不是越多越好,当添加剂的浓度达到一定程度时,会加速其褐变,因此,

钵,分 3 次共加 5 mL pH 6.8 的磷酸缓冲液,冰浴下研磨成匀浆,全部转入离心管,4 ℃ 10 000 r · min⁻¹ 离心 15 min,取上清液用于 PPO 活性的测定^[10]。在装有上述样品的试管中加入 0.05 mol · L⁻¹ pH 6.8 的磷酸缓冲液 1.5 mL、0.02 mol · L⁻¹ 邻苯二酚溶液 1.5 mL、酶液 0.5 mL 组成反应体系,30 ℃ 反应 5 min,测定 OD_{398nm} 值。以每分钟变化 0.01 作为 1 个酶活力单位。以沸水浴 5 min 的酶液作为对照,每组 3 次重复,取其平均值^[11]。

PPO 活性(U · g⁻¹ · min⁻¹) = $\frac{\Delta A}{0.01 \times m \times T} \times D$ 。式中,

ΔA 为吸光值的变化; m 表示样品质量; T 表示反应时间; D 表示稀释倍数。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可知,不同激素浓度组合对愈伤组织染菌率、出愈率、褐化程度、PPO 活性影响各不相同。其中培养基编号 II(2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹)愈伤组织生长情况最好,染菌率为 11.11%,均较其它处理低,愈伤组织出愈率最高为 88.89%,褐化程度较好,PPO 活性为 8.03 U · g⁻¹ · min⁻¹,相对其它处理,其活性大大降低。从不同激素浓度组合可知,2,4-D 较 NAA 更适合愈伤组织的生长,但是随着激素浓度的增加,愈伤组织的褐化程度也逐渐增加,因此选择适宜的激素浓度组合更有利于愈伤组织生长。该试验诱导愈伤组织最佳浓度组合为 2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹。

选择适当的添加剂组合可以大大降低其褐变程度,该研究中对褐变程度影响最小的组合为活性炭加柠檬酸。

表 4 不同添加剂对愈伤组织褐变的影响

Table 4 Effect of different additives on the browning of callus

培养基种类 Type of medium	愈伤组织块数 Callus induction number	褐化程度 Degree of browning	PPO 活性 PPO activity /(U · g ⁻¹ · min ⁻¹)
B ₅ -A	24	—	1.40
B ₅ -B	24	++	7.66
B ₅ -C	24	++	5.46
B ₅ -D	24	++	5.94
B ₅ -E	24	+	3.56

3 结论与讨论

在不同激素浓度对愈伤组织影响的试验中,愈伤组织生长情况最好的是培养基Ⅱ(2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。有研究表明,含有 2,4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是愈伤组织生长所必需的^[12]。但是对 2,4-D 和 NAA 激素对愈伤组织影响的大小的研究结果不同,一般认为,单独添加 2,4-D($1.0 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)或 NAA($1.0 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)有提高愈伤组织出愈率、减少染菌率、降低褐化的作用。且 2,4-D 较 NAA 更利于愈伤组织的形成,出愈率高,褐变程度低。而 6-BA 有提高多酚氧化酶活性、加重褐变的作用^[13]。为了最大程度地减少褐化,探索愈伤组织的最适生长条件,将 6-BA 的浓度控制在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,满足其基本生长需求,进而探索 2,4-D 和 6-BA 不同浓度激素组合对愈伤组织的影响。结果表明,2,4-D 与 6-BA 组合为其最适生长条件,2,4-D 的浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织出愈率提高到 88.89%,而且出愈时间缩短到 7~10 d,较一般条件培养愈伤组织时间缩短了 8~10 d,褐化出现的时间推迟了 10~15 d,褐化程度也大大降低。同时可知,2,4-D 在 $1.0 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内,有提高细胞分生速度、降低褐变的效果,当超过这一浓度,其褐变程度加深,因此将 2,4-D 浓度维持在较低浓度范围内,更有利于愈伤组织的生长。

在探索不同添加剂对愈伤组织褐化影响的试验中,是在愈伤组织最适生长条件下(2,4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导出愈伤组织。B₅-A 即加入了活性炭和柠檬酸组合的添加剂,褐变程度最低,PPO 活性大大减小。活性炭是一种吸附剂,可以吸附有毒代谢产物,在一定程度上可以减轻褐化,但同时还会吸附培养基中的各种营养成分,因此在加入活性炭时,要提高其激素水平,而激素浓度的增加又会提高对愈伤组织的伤害,加重褐化。有研究表明,当活性炭浓度在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能最大程度的减少褐化^[14]。维生素 C 和柠檬酸都是抗氧化剂,适宜浓度的维生素 C 能较好的抑制 PPO 的活性,使愈伤组织褐变程度降低,其浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果最好,浓度过高会对其产生副作用^[15]。低浓度的柠檬酸($0.1 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)能参与细胞分裂和生长的代谢活动,促进愈伤组织的生长,有效的抑制 PPO 的活性,减少褐变,浓度过高就会适得其反,大量试验研究表明,其最适浓度的柠檬酸为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[16]。试验中通过将吸附剂活性炭与抗氧化剂柠檬酸、维生素 C 在单独使用

时的最适浓度进行组合,最大程度的减少了吸附剂对培养基营养成分的损失;同时缓解了高浓度的柠檬酸、维生素 C 对愈伤组织褐变的影响。结果表明,添加剂的最佳组合为 B₅-A(活性炭+柠檬酸),褐化程度基本得到控制,同时 PPO 活性降低至 $1.40 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,较单独使用各种添加剂,褐化程度缩小 2~3 倍,PPO 活性也降低了 3~5 倍。同时当抗氧化剂维生素 C 和柠檬酸同时添加时,其褐化程度明显加重,当有吸附剂活性炭存在时,其褐化程度降低,可能是 2 种氧化剂同时使用时,其合用浓度超过适用浓度范围,出现相反效果。

参考文献

- [1] 刘华,陈宇. 红豆杉组织细胞培养物紫杉醇快速检测[J]. 辽宁大学学报(自然科学版),2008,30(10):13-15.
- [2] 梅兴国,董妍玲,潘学武,等. 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,2011,13(4):8-11.
- [3] WICKREMESINHE E R M, ARTECA R N. Taxus callus cultures; initiation, growth optimization, characterization and taxol production[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2009, 43(35):181-185.
- [4] SRINIVASAN V, CIDD V, BRINGI V, et al. Metabolic inhibitors, elicitors, and precursors as tools for probing yield limitation in Taxane production by Taxus cell cultures[J]. Biotechnology Progress, 2009, 12(4):457-465.
- [5] 余秀武,杨先平,鄯西百亩红豆杉获有效庇护[J]. 中国林业,2012,17(3):275-285.
- [6] 周忠强,梅兴国. 代谢调节剂对紫杉醇和生物合成的调控作用[J]. 天然产物研究与开发,2012,17(4):401-403.
- [7] 罗先权,陈灵,彭信海,等. 红豆杉栽培技术研究[J]. 湖南林业科技, 2012,15(3):245-255.
- [8] 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,2007,34(4):120-122.
- [9] 梁珍海,刘根林,徐锋,等. 红豆杉属植物组织培养及其快速繁殖研究综述[J]. 江苏林业科技,2010,28(3):45-47.
- [10] 甘烦远,郑光植. 红豆杉细胞培养的研究[J]. 云南植物研究,2006,18(2):134-138.
- [11] 杨永华,萧凤迥,刘良舟. 云南红豆杉愈伤组织诱导和组织培养[J]. 生物工程学报,2012,5(1):24-26.
- [12] 陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等. 组培条件对云南红豆杉愈伤组织生长和形成紫杉醇的影响[J]. 中国中药杂志,2011,25(5):269-272.
- [13] 黄浩,鲁波. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. 华中理工大学学报,2009,4(2):107-108.
- [14] 梅兴国,董妍玲,潘学武. 活性炭对红豆杉细胞褐化的抑制[J]. 海峡药学,2010,13(2):51-53.
- [15] 陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等. 云南红豆杉细胞培养及紫杉醇生产[J]. 湖北大学学报,2009,23(4):366-369.
- [16] 周吉源,杨礼香. 稀土和氮源对南方红豆杉细胞生长及紫杉醇积累的影响[J]. 华中师范大学学报,2008,35(3):331-333.

Study on the Anti-browning Method in Tissue Culture of *Taxus chinensis*

YANG Wenting, KUANG Qian

(College of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan, Hubei 430065)

DOI:10.11937/bfyy.201617027

几种杀虫剂对两种常见樱桃果蝇室内毒力测定和田间药效试验

林清彩^{1,2}, 于毅¹, 尹园园¹, 郑礼¹, 来守国², 翟一凡¹

(1. 山东省农业科学院 植物保护研究所, 山东 济南 250000; 2. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要:以斑翅果蝇和黑腹果蝇为试虫,采用胃毒触杀联合毒力测定方法分别测定了5种类型共8种杀虫剂对黑腹果蝇及斑翅果蝇实验室种群幼虫和成虫的毒力,田间药效试验测定6种杀虫剂防治果蝇的效果。结果表明:杀虫剂对果蝇幼虫毒力比对成虫毒力强,且斑翅果蝇比黑腹果蝇对杀虫剂更敏感,氨基甲酸酯类杀虫剂茚虫威、烟碱类杀虫剂噻虫嗪、茚虫威和吡虫啉对果蝇的致死作用效果低下,烟碱类杀虫剂啉虫脒对黑腹果蝇致死效应高于斑翅果蝇;菊酯类杀虫剂高效氯氟氰菊酯致死毒力高于菊酯类杀虫剂联苯菊酯,生物制剂多杀霉素和甲维盐致死毒力最强。

关键词:果蝇;杀虫剂;室内毒力;田间药效

中图分类号:S 482.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)17-0114-06

危害樱桃的果蝇主要有3种,分别为黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster* Meigen)、斑翅果蝇(*Drosophila suzukii* Matsumura)和海德氏果蝇(*Drosophila hydei* Sturtevant),其中黑腹果蝇和斑翅果蝇为危害甜樱桃的优势种^[1]。斑翅果蝇喜为害将要成熟的樱桃^[2],其产卵器呈锯齿状且有一定硬度,可以轻易刺破果皮,将卵产于完好果实内部,外表上唯一可见的损害仅有微小产卵痕,卵孵化后幼虫蛀食为害,使果实完全软化、变褐以致腐烂。目前已在蓝莓、黑莓、樱桃、草莓、李子、桃子、葡萄、无花果、猕猴桃和梨等水果上发现有斑翅果蝇危害^[3]。在美国、德国、意大利和法国等国家斑翅果蝇对一些软皮水果造成的损失高达100%^[4]。随着杨梅、樱

桃等果树种植业的发展,黑腹果蝇开始在这些果树上严重为害。甘肃天水地区黑腹果蝇为害樱桃果实多以中晚熟品种为主,受害率一般在35%以上,个别品种达到80%以上^[1];四川阿坝地区斑翅果蝇危害造成的虫果率可高达60%^[5],贵阳地区果蝇对杨梅危害造成的虫果率达38%~57%^[6]。目前樱桃果蝇防治技术主要以清园、糖醋液诱杀、树体和果园杂草喷雾防治为主,在春季及果实膨大着色期,选用1%甲维盐 EC 3 000 倍液、25%噻嗪酮 WP 2 000 倍液、1%阿维菌素 RG 3 000 倍液均匀喷施果树并兼顾喷施果园地面^[7-8]。为了减少果品中农药残留量,更好地将现有农药品种应用于田间防治,该试验在室内条件下测定了5种类型8种杀虫剂的毒力,并对其中6种杀虫剂进行田间药效试验,以期合理使用农药防治该虫提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试斑翅果蝇和黑腹果蝇于2011年4月在山东省泰安市大佛寺樱桃园采集,用市场购置的葡萄进行饲

第一作者简介:林清彩(1989-),女,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为农业病虫害防治。E-mail:linqingcai@yeah.net.

责任作者:翟一凡(1984-),男,山东聊城人,博士,副研究员,研究方向为昆虫生理生化与分子生物学。E-mail:zyifan@saas.ac.cn.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2014CQ014)。

收稿日期:2016-04-18

Abstract: With the yew axillary buds as explants, B₅ as basic culture medium, the effect of different combinations of hormone and additives on browning rate in tissue culture of *Taxus* was studied. The results showed that under the hormone concentration of 2,4-D 2.0 mg · L⁻¹ and 6-BA 0.5 mg · L⁻¹, the callus grown well, whose contamination rate was 11.11%, the induction rate of callus was 88.89%, browning degree was lower, and PPO was 8.03 U · g⁻¹ · min⁻¹. Furthermore, by adding the combination of activated carbon and citric acid, the degree of browning reduced significantly, and PPO was 1.40 U · g⁻¹ · min⁻¹.

Keywords: *Taxus chinensis*; callus; induction rate of callus; browning