

南方红豆杉组织培养研究[△]

I. 愈伤组织诱导和培养条件优化

新疆石河子大学医学院(832000)

赵 芳*

新疆武警兵指五支队卫生队

倪 良 耿 征** 刘谦光**

摘 要 介绍了南方红豆杉植物愈伤组织诱导和继代培养条件,在 MS-培养基上,附加不同种类和浓度配比的激素,在光照条件下对植物愈伤组织的诱导率和生长量等进行了比较,其中当 2,4-D 1.2 mg/L+6-BA 2.8 mg/L+NAA 3 mg/L 或 4 mg/L 时,愈伤组织诱导率和生长量最高,结果表明,不同激素组合对愈伤组织诱导率、生长量和发生的性状有明显的影晌。为南方红豆杉植物细胞悬浮培养建立了基础,为解决红豆杉的资源贫乏提供了新途径。

关键词 南方红豆杉 组织培养 愈伤组织

紫杉醇(taxol)是从红豆杉属(*Taxus L.*)植物中分离出的一个具有独特抗肿瘤活性的二萜类化合物^[1],现已应用于临床治疗卵巢癌和乳腺癌,虽然紫杉醇的全合成已获成功^[2],但成本比天然提取药更高,就目前临床供药而言,主要依靠从红豆杉树皮中提取,已使红豆杉植物濒临灭绝的危险。组织培养生产紫杉醇成为解决红豆杉资源短缺的有效途径之一。有关红豆杉组织和细胞培养的文献较多,涉及红豆杉的种属也较多,但南方红豆杉的研究报道鲜见。综述文献在这方面的研究,主要采用 B₅ 培养基进行避光培养(暗培养)。我们发现,在适宜的条件下,MS 培养基上的愈伤组织在光照下诱导率和生长量均优于 B₅ 培养基。我们就 MS 和 B₅ 培养基,光培养与暗培养、激素种类和浓度配比、不同糖类等几方面进行了对比实验,用高效液相色谱对其中的紫杉醇进行了定性定量分析^[3],并分离获得纯品。现将组织培养的初步结果报道如下。

1 材料和方法

选择 1~2 年生具有绿皮处于阴暗位置的南方红豆杉嫩枝作为供试材料,采自陕西师范大学生物园引种体,供试材料采下后,按常规消毒灭菌,在无菌条件下截成长 0.5 cm 左右小段。

诱导培养基以 MS 为基本培养基,附加固定浓度的 2,4-D 1.2 mg/L,6-BA(6-苄氨基嘌呤)2.8 mg/L 后,再附加不同浓度的 GA₃(赤霉素),IAA(吲哚乙酸),CA(酪蛋白水解物),NAA(萘乙酸);在 6-BA 浓度不变时,改变 2,4-D 浓度,其浓度组合见表 1。糖类选用蔗糖、葡萄糖、果糖 2%,再附加琼脂 0.8%,pH 调至 5.4,高压灭菌。在温度(23±2)℃下,光强 1 000~1 200 lx,每日光照 12 h 培养。

2 结果

2.1 激素对愈伤组织、诱导率的影响:在 MS 培养基上,附加不同种类和浓度配比的激素,培养 6 d 个别腋芽出现愈伤组织,少部分嫩枝开始膨大,3 周左右大部分外植体发

* Address: Zhao Fang Medical College of Shihezi University, Shihezi

赵 芳 毕业于陕西师范大学化学系,硕士。现任新疆石河子大学医学院药理学系副教授,主要从事分析化学的教学工作和药物分析的科研工作。曾参与了南方红豆杉组织培养和有机物的化学发光的研究工作,并在《分析化学》上发表论文数篇。现主要从事天然药物的研究开发。

** 陕西师范大学化学系

△ 陕西省自然科学基金重点资助项目

生愈伤组织。试验结果见表 1。

2.2 激素对愈伤组织生长量的影响:外植体的愈伤化程度一般通过愈伤组织生长量来说明。愈伤组织生长量的计量方法有:通常采用称量鲜、干重来表示,还有细胞数目表示法^[4],愈伤指数表示法^[5]。本文采用愈伤指数来表示愈伤组织相对生长量,以此说明外植体的愈伤化程度,此表示法不破坏愈伤组织继续生长。愈伤指数概念为:

愈伤指数 = $\frac{\sum(\text{愈伤化级数} \times \text{该级块数})}{\text{各级块数总和} \times \text{最高级数}}$

愈伤化级数定义为:0 级:无愈伤组织

表 1 激素对愈伤组织发生的影响

编号	MS+附加物(mg/L) +蔗糖	外植体数 (块)	成愈数 (块)	诱导率 (%)
1	2,4-D 0+6-BA 2.8	60	0	0
2	2,4-D 5+6-BA 2.8	54	49	90
3	2,4-D 10+6-BA 2.8	50	44	81
4	2,4-D 15+6-BA 2.8	70	48	68
5	2,4-D 1.2+6-BA 2.8	66	60	91
6	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+GA ₃ 1.0	100	54	54
7	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+GA ₃ 2.0	59	45	77
8	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+GA ₃ 3.0	126	89	70
9	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+GA ₃ 4.0	85	62	73
10	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+GA ₃ 5.0	127	102	80
11	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+IAA 1.0	65	59	90
12	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+IAA 2.0	60	56	94
13	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+IAA 3.0	100	91	91
14	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+IAA 4.0	44	40	90
15	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+IAA 5.0	59	56	95
16	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+CA 1.0	56	50	89
17	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+CA 2.0	91	80	88
18	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+CA 3.0	82	70	85
19	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+CA 4.0	82	68	83
20	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+NAA 1.0	35	35	100
21	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+NAA 2.0	58	58	100
22	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+NAA 3.0	59	59	100
23	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+NAA 4.0	91	88	96
24	2,4-D 1.2+6-BA 2.8+NAA 5.0	58	57	98

表中为接种 20 d 统计的结果

表 2 培养基光线对愈伤组织诱导生长状况比较

培养基	光培养	暗培养	诱导率(%)	褐变发生率(%)	干鲜比(%)
MS	淡黄色→黄绿色→褐色	白色→淡褐色→深褐色	98	30	39
B ₅	暗白色→褐色→深褐色	白色→淡褐色→深褐色	76	85	8

表中诱导率为接种 20 d 统计结果

表 3 糖对愈伤组织诱导和生长状况比较

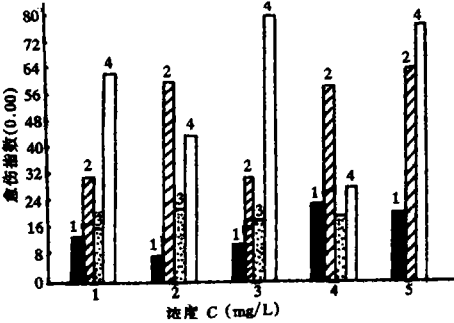
糖的种类	外植体数 (个)	成愈数 (个)	诱导率 (%)	鲜重 (g)	增重 (倍)	愈伤组织 状况	培养基 状况
蔗糖	66	66	100	124.5	124.7	黄绿色→褐色	白色→棕红
果糖	60	54	91	80	97.8	白色→褐色	深黄→浅黄
葡萄糖	103	75	73	36.5	31.4	淡黄色→褐色	白色→棕色

3 讨论

3.1 愈伤组织发生性状和继代培养:诱导愈

1 级: $A \leq 1/4$ 2 级: $1/4 < A \leq 1/2$ 3 级: $1/2 < A \leq 3/4$ 4 级: $A = 1$ 其中 A=愈伤面积/外植体表面积

根据上述概念计算,对 4 种物质在 MS 培养基上,愈伤组织培养 60 d 的愈伤指数见图 1。于 MS 培养基上,附加下列浓度的激素:2,4-D 1.2 mg/L+6-BA 2.8 mg/L+NAA 3 mg/L 或 4 mg/L,愈伤指数最高。表明愈伤组织在这两种组合条件下生长旺盛,相对生长量大,愈伤化程度高。



1-GA₃(1~5 mg/L) 2-IAA(1~5 mg/L)
3-CA(1~4 mg/L) 4-NAA(1~5 mg/L)

图 1 南方红豆杉愈伤指数图

2.3 培养基与光照条件对愈伤组织诱导和生长的影响:选择最佳激素配比组合,附加于 MS 和 B₅ 培养基上,不同光强。愈伤组织诱导培养 60 d 收获。试验结果见表 2。

2.4 糖类对愈伤组织诱导和生长的影响:在 MS 培养基最佳激素组合条件下,添加不同的糖,愈伤组织诱导培养 60 d 收获。试验结果见表 3。

伤组织因培养基中所附加生长调节剂的种类和浓度不同时其发生性状也不同。愈伤组织

常常在腋芽或叶基部首先发生。但是,当腋芽或叶基部脱离嫩枝诱导时,却很难发生愈伤组织。嫩枝愈伤组织首先出现在切口处,由两端向中间愈伤化。部分接触培养基处愈伤组织分泌有棕色物质,使其附近的愈伤组织及培养基呈棕红色,随着培养时间的延长,愈伤组织呈现淡褐色颗粒状,逐渐呈褐色光滑状态,停止生长,必须及时转移继代培养。在转移过程中,愈伤组织若脱离外植体,颜色逐渐变暗褐乃至深褐色。本实验继代5次,生长速度随继代次数的增加,先呈上升趋势,后逐渐下降。

3.2 褐变程度的影响:红豆杉属植物愈伤组织在生长过程中,常伴随有一些不利于生长的酚类物质,酚类渗出物的积累导致愈伤组织褐化,增殖缓慢。南方红豆杉愈伤组织也有褐变现象,激素种类不同,褐变程度不同。培养基中附加 GA_3 和 CA 激素,愈伤组织褐变程度比附加 IAA 和 NAA 严重,通过频繁继

代转移培养不能根除这一现象。我们曾在培养基上附加活性炭和抗坏血酸等,也未能彻底解决这一问题。

3.3 综上所述,培养基中含 2,4-D 对愈伤组织的诱导极为有利,2,4-D 和 NAA 的组合对愈伤组织的正常生长也是必须的。 GA_3 、IAA、CA 对愈伤组织的诱导或生长存在着不同程度的抑制作用。通过培养基、有光无光、糖的对比条件试验,发现南方红豆杉愈伤组织诱导和生长适于光照条件下的 MS 培养基,组织培养的生理碳源选用蔗糖比较好。

参考文献

- 1 Wani MC, et al. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325
- 2 俞培忠,等. 中国药学杂志, 1996, 31(7): 390
- 3 赵芳,等. 分析化学, 1997, 25(8): 941
- 4 中国科学院上海植物生理研究所细胞室. 植物组织和细胞培养. 上海: 科学技术出版社, 1978: 66
- 5 李湘串,等. 中草药, 1992, 23(12): 644

(1998-07-13 收稿)

Studies on the Tissue Culture of Maire Yew (*Taxus chinensis* var. *mairei*)

I. Callus Inducement and Optimization of the Culturing Methods

Zhao Fang, Ni Liang, Geng Zheng, et al. (Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Studies on tissue culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng L. K. Fu was carried out. Results indicated that the rate of callus inducement and yield of paclitaxel in medium MS plus 1.2 mg/L 2,4-D, 2.8 mg/L 6-BA and 3.0 mg/L or 4.0 mg/L NAA were higher than others. The experiments were conducted under light during a 60-day growth period, at temperature in the range of 23 ± 2 °C. The result provides the possibility of cell culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng L. K. Fu and also paves a new alternative way for the production of paclitaxel.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng L. K. Fu callus inducement

《国外医药·植物药分册》1999 年征订启事

《国外医药·植物药分册》杂志是由国家药品监督管理局主管,中草药信息中心站和天津药物研究院主办,国内外公开发行的医药科技专业期刊。

本刊以综述、编译、文摘、信息、题录等形式向读者提供植物药有效成分的分离提取、结构鉴定;生产工艺和质量控制;生化药理活性与临床研究;组织培养与生物技术工程;各国民间药物的开发与植物药专利;市场贸易与各国的药政管理。此外,与植物相关的保健食品、化妆品、兽药、农药、饲料、调料等亦属本刊的报道范围。信息来源涉及十几个国家出版发行的一百多种期刊,每年向读者提供约 50 万字新、特、快信息。

本刊为双月刊,全年 6 期;每期定价 9.50 元,全年 60 元(包括包装费与邮资)。自办发行,随时可以订阅。联系地址:天津市鞍山西道 308 号。邮编:300193 电话:(022)27423636。