的相关性,但又有区别。采用 3 种不同检验方法,结果是一致的,得到 3 种不同方法之间的相互认证,3 种方法各有优势,且针对点不同,结合使用效果更好,为指纹图谱的分析提供了强有力的依据。

3.5 本研究方法建立的指纹图谱可快速鉴别区分不同来源的黄芩药材,通过指纹图谱对黄芩药材进行综合宏观分析,有利于全面控制药材质量,促进黄芩药材及其制剂研制水平和质量控制的全面提高。

References:

- [1] Li X B, Tu P F. Fingerprint system of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (5): 385-387.
- [2] Xiao R, Zhang L T. Actuality and future of studies on fingerprints of TCM [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2003, 24 (5): 310-313.
- [3] *Technical Requirement of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* [中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)] [S]. 2001.
- [4] Zhang K R, Bi K S. Study on fingerprint of *Radix Paeoniae Rubra* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (11): 1048-1051.

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

陈 惠, 王文科*, 卢英梅, 白新生

(山西师范大学生命科学院, 山西 临汾 041004)

摘要:目的 建立和优化获得量大而高紫杉醇愈伤组织的培养技术和方法。方法 以山西陵川县野生和在西安栽培的南方红豆杉为材料,就最佳母株、外植体种类、基本培养基、植物激素种类及浓度对愈伤组织诱导、生长和紫杉醇的影响等因素进行了系统研究。结果 幼茎外植体因诱导的愈伤组织时间早、频率高而最佳;培养基 Y5: MS+2,4-D 4.0 mg/L+KIN 1.0 mg/L 或 B5 III; B5+2,4-D 3.0 mg/L+KIN 0.1 mg/L+Phe 0.1 mol/L 为最佳诱导愈伤培养基,其诱导频率高达 100%。继代培养基中质量浓度 2,4-D (0.5~3 mg/L)促进愈伤组织增殖,高质量浓度 (8 mg/L)则有抑制作用。当 2,4-D 质量浓度适宜时,愈伤组织在 B5 培养基上较在 MS 培养基上褐化轻、生长快。HPLC 分析表明紫杉醇最高的继代培养基为 MS III,其紫杉醇质量分数高达干重的 0.004%;野生母株幼芽来源的愈伤组织,其紫杉醇普遍高于栽培母株幼茎来源的愈伤组织。结论 以 5 月份野生红豆杉幼茎为外植体,以 Y5 或 B5 III 为诱导培养基和继代培养基,继代 8~10 代,每代培养 30~35 d;用 MS III 培养基再培养 1~2 代,收获愈伤组织或细胞培养物,并从中提取紫杉醇是获得大量高紫杉醇愈伤组织的较佳培养程序。

关键词:南方红豆杉;野生母株;栽培母株;外植体;愈伤组织诱导;继代培养;紫杉醇

中图分类号:R282.13

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0747-05

Effect of explant source from different maternal tree and medium composition on callus growth and paclitaxel yield of *Taxus chinensis* var. *mairei*

CHEN Hui, WANG Wen-ke, LU Ying-mei, BAI Xin-sheng

(College of Life Science, Shanxi Teacher's University, Linfen 041004, China)

Abstract: **Objective** To establish and optimize the technology and method of producing large quantity and high-paclitaxel yield callus of *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Methods** Wild maternal tree grown in Lingchuan County of Shanxi Province and cultivated tree grown in Xi'an were used as explant source. And the optimum maternal tree for explant cutting, optimum explant type, basic medium, composition and concentration of growth regulators in medium and so on, which were factors of affecting on callus induction, growth and paclitaxel yield, were examined in a series order. **Results** The juvenile stem segments were the optimum explants because of their earlier and higher rate callus induction than that of other explants. Medium Y5: MS+2,4-D 4.0 mg/L+KIN 1.0 mg/L or medium B5 III; B5+2,4-D 3.0 mg/L+KIN 0.1 mg/L+Phe 0.1 mol/L was confirmed optimum callus induction medium in which callus

收稿日期:2004-11-09

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(951030)

作者简介:陈 惠(1964—),女,山西临汾人,山西师范大学生命科学院副教授,硕士,中国农业大学在读博士,多年来主要从事多种经济植物、中草药、珍稀濒危植物的组织培养和快速繁殖工作,成功再生的植物有:栝楼、翅果油树、梨枣、山茱萸等,研究方向为水稻和早稻的遗传转化及抗逆分子生物学研究。

* 通讯作者 E-mail: sxsdwwk@sohu.com

induction rate had reached to 100%. In callus subculture medium, lower concentration of 2,4-D (0.5—3 mg/L) always increased callus growth, but higher concentration of 2,4-D (8 mg/L) reduced callus growth. When 2,4-D concentration was suitable, callus grown on B5 medium displayed lighter browning and faster tissue growth than that on MS medium. Further more, HPLC analysis confirmed that the paclitaxel yield in callus grown on medium MS III was highest and had reached 0.004% of callus dry weight. In a general condition, the level of paclitaxel in calli derived from juvenile stems of wild maternal tree was higher than that in calli initiated from cultivated maternal tree's juvenile stems. **Conclusion** The optimization sequence of obtaining a large quantity and high-paclitaxel yield callus of *T. chinensis* var. *mairei* are dividing juvenile stem segments from wild maternal tree in May and culturing on medium Y5 or B5 III for callus induction. After the calli having been subcultured on the same medium for 8—10 generations, one or two generations are recultured on medium MS III. Finally, the calli with more paclitaxel are obtained by extracting paclitaxel out of it.

Key words: *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu; wild maternal tree; cultivated maternal tree; explants; callus induction; subculture; paclitaxel (Taxol)

红豆杉科、红豆杉属植物的细胞和组织培养方法,为抗癌药物紫杉醇(paclitaxel)提供了新的来源,被认为有希望替代砍伐天然红豆植株^[1~3],从而避免从树皮中提取紫杉醇,为这类生长缓慢树种的资源保护提供了有力的保护。所以,近十几年来很多国内外研究小组积极从事这方面研究,并取得了很大进展^[1~7]。全球红豆杉属共有11个种,均已成功地进行过组织培养和细胞培养研究,其中对短叶红豆杉(又称太平洋紫杉, *pacific yew*) *Taxus brevifolia* Nutt.、东北红豆杉(又称日本紫杉, *Japanese yew*) *T. cuspidate* Sieb. et Zucc. 等的细胞组织培养研究较深入。我国红豆杉资源有4个种和1个变种,近年来不少实验室也开展了这方面的研究,且4种1变种都有报道^[4~12]。由于南方红豆杉 *T. chinensis* var. *mairei* (Lemee et Lévl.) Cheng et L. K. Fu 在山西省太行山区的陵川县、中条山区的沁水县,海拔约500~1500 m的阳坡、半阳坡有成片天然林分布^[13],所以,虽然已有学者从事南方红豆杉的愈伤组织培养^[7,10,11],但大多取材始于人工栽培植株,未见有野生植株的报道,而且对不同产地材料诱导的愈伤组织中紫杉醇量缺乏比较研究。

本研究主要以5月上旬取材的山西天然野生南方红豆杉枝条为材料,将幼茎切段,老茎切段、针叶切段、培养在2,4-D 0.5~0.8 mg/L及与KIN 0~2.0 mg/L或其他激素相配合的MS、B5培养基中诱导愈伤组织及继代培养,并与取材于西安两个地方人工栽培的南方红豆杉诱导的愈伤组织中紫杉醇进行比较,以寻找高产紫杉醇愈伤组织的最佳材料、外植体来源、最佳培养基、培养条件、培养程序等。一般细胞悬浮培养物中的紫杉醇质量分数较相同培养

基成分的固体培养基中生长的愈伤组织中的高很多^[8],所以,本研究为进一步通过细胞培养获得更高产的紫杉醇愈伤组织细胞系,最终取代从天然植株中获取紫杉醇打下了良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料:材料分3次从不同的地方采集。1998年5月7日,从山西太行山陵川县一棵60年树龄的野生南方红豆杉植株上,折取含幼嫩茎和二年生茎的枝条,带回山西师范大学,放置-4℃冷藏2 d备用。1999年4月5日和5月15日,分别从西安植物园一棵人工栽培的20多年生乔木植株和陕西师范大学校园内生物园中3年生灌木状栽培植株上剪取1~2年生枝条。

1.2 外植体消毒:先用肥皂水洗去枝叶表面灰尘,清水冲洗3次,70% EtOH浸泡30 s,0.1% HgCl₂常规消毒8~10 min,无菌蒸馏水冲洗4~6次并用无菌纸吸干。去掉叶片的茎段(分老茎段和幼嫩茎段)和针叶均切割成0.5~1 cm的小段接种于不同培养基上。5~6 cm幼嫩小枝或去年生小枝切割2刀,成上、中、下3段,垂直插入培养基。

1.3 培养条件:基本培养基有MS、B5;激素:2,4-D 0~8 mg/L、KIN 0~2 mg/L、NAA 0.5~1 mg/L;附加有机物Phe(苯丙氨酸)0.1 mol/L等,具体培养基组成成分见结果部分。MS培养基加蔗糖3%、琼脂7%;B5培养基加蔗糖2.5%、琼脂8%。培养温度(25±2)℃。

1.4 愈伤组织的干燥处理:愈伤组织培养周期为30 d,继代不同次数后,分别从不同培养基中收集愈伤组织,冰冻干燥法干燥。

1.5 紫杉醇的测定:按甘烦远^[6]HPLC法测定愈伤

组织中的紫杉醇。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 质量浓度对野生母株南方红豆杉不同外植体、愈伤组织诱导率的影响:以取材于山西陵川的野生南方红豆杉的幼嫩茎段、老的茎切段和针叶切段为外植体,分别培养在附加不同质量浓度 2,4-D 和其他物质的 MS 培养基中,观察发现茎段产生的愈伤组织较早,15 d 时最高诱导率可达 80%,而针叶此时均为零。30 d 后,针叶愈伤组织诱导率也能达到很高水平,但因产生时间晚,所以量比较少。此外,随着培养基中 2,4-D 质量浓度的升高,两种外植体的愈伤组织诱导率也逐渐升高,以 2,4-D 2 mg/L 和 2,4-D 2 mg/L 附加 BAP 0.5 mg/L 的培养基以及 6 号培养基为好,愈伤组织诱导率可达 92.5% 以上。幼嫩茎段和老的茎段培养在相同培养基上,嫩茎的愈伤组织诱导率总是高于老茎的(表 1)。

表 1 2,4-D 不同质量浓度对南方红豆杉茎段、针叶切段愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of different 2,4-D concentration on callus induction rate of stem segments and needle leaf segments from *T. chinensis* var. *mairei*

培养基 编号	激素/(mg·L ⁻¹)		幼茎段/%		老茎段/%		针叶/%	
	2,4-D	BAP	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d
1	0.1	0	0	10	—	—	0	0
2	0.5	0	25	50	—	—	0	45
3	1.0	0	52.2(23/44)	90.9	9.5(2/21)	66.7	0	60
4	2.0	0	67.5	92.5	—	—	0	95
5	2.0	0.5	80	100	—	—	0	90
6	8.0	0	58.8(20/35)	94.1	16(4/25)	40.0	—	—

未表明的每种培养基中接种 40 个外植体,“—”表示未接种。6 号培养基附加了 0.1 mol/L 的苯丙氨酸

Number of explants per medium that had not to be indicated is 40, “—” means not to be inoculated. No. 6 medium is added with 0.1 mol/L Phe

2.2 2,4-D、KIN 不同质量浓度及组合对栽培母株来源的幼茎愈伤组织诱导率的影响:1999 年 5 月从西安植物园和陕西师范大学生物园栽培的南方红豆杉母株上截取嫩茎,接种在 MS 附不同质量浓度 2,4-D、KIN 及组合的 9 种培养基 Y1~Y9 中,结果见表 2。

研究发现,2,4-D 是愈伤组织诱导必不可少的成分,KIN 在 2,4-D 存在时对愈伤组织的产生有促进作用,以 1 mg/L 为佳,当升高到 2 mg/L 时,又对愈伤组织的诱导有抑制作用。诱导愈伤组织最佳激素组合有 2 个分别为 Y5 和 Y8。从树龄较老的南方红豆杉取材的嫩茎与从树龄较小的红豆杉取材的嫩

表 2 2,4-D、KIN 不同质量浓度及组合对人工栽培母株南方红豆杉幼茎切段愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effect of different 2,4-D/KIN concentration and ratio on callus induction of juvenile stem segments from artificial cultivated maternal tree of *T. chinensis* var. *mairei*

培养基 名称	激素/(mg·L ⁻¹)		愈伤组织诱导率/%	
	2,4-D	KIN	西安植物园	生物园
Y1	0	0	0 (0/21)	0 (0/18)
Y2	0	1	0 (0/18)	0 (0/20)
Y3	0	2	0 (0/15)	0 (0/14)
Y4	4	0	91.3 (21/23)	72.2 (13/18)
Y5	4	1	100 (20/20)	100 (19/19)
Y6	4	2	70.0 (14/20)	85.7 (12/14)
Y7	8	0	66.7 (14/21)	62.5 (10/16)
Y8	8	1	100 (19/19)	71.5 (12/16)
Y9	8	2	75.0 (15/20)	43.7 (9/22)
B5 Ⅲ	3	0.1	100 (17/17)	100 (13/13)

茎愈伤组织诱导率相差不多。以 B5 为基本培养基的 B5 Ⅲ 诱导率也很高,不论南方红豆杉产地如何,诱导率均能达到 100%。

2.3 取材时间对愈伤组织诱导率的影响:分别于 1999 年 4 月和 5 月中旬从西安植物园取材,将嫩茎培养在同一种培养基上,结果 5 月份取材诱导率很高可达 100%。4 月份取材嫩茎所产生的愈伤组织其诱导率仅有 40% 左右。

2.4 南方红豆杉愈伤组织的生长状态:各外植体在诱导培养基(表 2)上培养期间,每 3 d 观察一次,发现最早出现愈伤组织(嫩梢或小枝)需要 7 d(培养数据未列),幼嫩茎段需 10 d,老茎段需 12 d。茎段愈伤组织有的出现在切口,有的是外植体膨大后,皮层裂开,自裂缝处形成愈伤组织,初生愈伤组织多为淡黄绿色,半透明小球形或不规则块状,以后随培养时间的延长,有的外植体基部或是接触培养基处的愈伤组织分泌有棕色物质,并使附近的愈伤组织呈棕红色。当愈伤组织培养超过 30 d 时愈伤组织表面更易褐化。愈伤组织最易在茎段的两端形成,小枝易在基部及其基部叶腋处形成,有腋芽萌动,顶部伸长的现象,叶片形成愈伤的能力差。

2.5 愈伤组织的继代培养:从表 1 中 6 号培养基上诱导产生的愈伤组织,继代培养 7 代后,再转移到表 3 和 4 所列的 9 种培养基中,每代培养 30~35 d,刚开始培养的几代愈伤组织量较少,以后越来越多。表 5 为继代第 8 代的结果。

从上表数据可知,激素相同但基本培养基不同时如:MS Ⅲ 与 B5 Ⅰ、B5 培养基对愈伤组织的增殖有促进作用,且其愈伤组织的颜色较浅为淡黄色、乳

表 3 以 B5 为基本培养基的继代培养基
Table 3 Subculture medium based on B5

培养基	激素/(mg · L ⁻¹)		
	2,4-D	KIN	Phe
B5 I	1.0	0.1	0.1
B5 II	2.0	0.1	0.1
B5 III	3.0	0.1	0.1
B5 IV	8.0	0.1	0.1

B5 为基本培养基, I ~ IV 代表培养基编号
Basic medium is B5, I - IV indicated medium number

表 4 以 MS 为基本培养基的继代培养基
Table 4 Subculture medium based on MS

培养基	激素/(mg · L ⁻¹)			
	2,4-D	KIN	NAA	Phe
MS I	0.5	0.1	0.5	0.1
MS II	1.0	0.1	0.5	0.1
MS III	2.0	0.1	0.5	0.1
MS IV	4.0	0.1	0.5	0.1
MS V	8.0	0.1	0.5	0.1

MS 为基本培养基, I ~ V 代表培养基编号
Basic medium is MS, I - V indicates medium number

表 5 基本培养基和 2,4-D 质量浓度对愈伤组织生长的影响
Table 5 Effect of basic medium and 2,4-D concentration on callus growth of *T. chinensis* var. *mairei*

培养基	愈伤块数	愈伤增殖/%	平均直径/cm
MS I	33	91	1.14 ± 0.15
MS II	30	100	0.75 ± 0.16
MS III	42	100	0.78 ± 0.15
MS IV	33	81.8	0.65 ± 0.14
MS V	36	100	0.70 ± 0.13
B5 I	18	100	1.30 ± 0.17
B5 II	14	100	1.28 ± 0.11
B5 III	18	100	1.27 ± 0.14
B5 IV	24	100	0.72 ± 0.17

愈伤组织起始直径平均为 0.5 cm
Initial average diameter of callus is about 0.5 cm

白色或浅褐色;而 MS 培养基中的愈伤组织质地较致密,颜色较深为棕褐色。每种培养基又以低质量浓度 2,4-D 0.5~2 mg/L 为好,表现为愈伤组织生长量大,即每块愈伤直径大。8 mg/L 并不能显著促进愈伤组织的增殖。

2.6 不同南方红豆杉母株来源的愈伤组织中紫杉醇的差异:将 2.5 培养所得的愈伤组织一部分干燥后直接测定紫杉醇质量分数,一部分转接到表 3、4 所列培养基中继续继代培养(1~5 次),最后 1~2 次的培养基个别有变动,如表 6 所示。2.2 中产生的愈伤组织及经继代多次后冰冻干燥,一同做紫杉醇测定,结果见表 6。

结果表明,从山西陵川取材的野生母株南方红豆杉诱导的愈伤组织中,紫杉醇普遍高于另两个地

表 6 不同母株来源的南方红豆杉愈伤组织中紫杉醇的差异

Table 6 Paclitaxel yield of calli derived from different maternal tree of *T. chinensis* var. *nairei*

母株来源	愈伤组织继代次数	培养基	干重/鲜重	紫杉醇/%
山西陵川	8	MS II → B5 III	0.080 4	0.003 1
山西陵川	9	B5 III 12 °C	—	0.002 8
山西陵川	9	B5 III	0.077 7	0.003 7
山西陵川	8	B5 III	0.072 2	0.003 3
山西陵川	8	B5 II	0.072 2	0.002 9
山西陵川	8	MS III	0.113 6	0.004 0
山西陵川	13	MS III	0.096 7	0.003 5
山西陵川(针叶愈伤)	2	MS + 2,4-D 8 mg/L + KIN 0.5 mg/L	0.121 7	0.002 0
西安植物园	2	B5 III	0.088 2	0.001 7
西安植物园	2	B5 III	0.080 0	0.001 8
生物园	2	Y5 → MS I	0.074 4	0.001 2
生物园	1	Y5 → B5 III	0.071 0	0.002 2
生物园	3	Y5 → B5 III	0.095 9	0.002 0
生物园	6	Y5 → MS IV	0.076 4	0.003 0

方人工栽培母株取材诱导的愈伤组织,也即野生植株取材所诱导的愈伤组织比栽培植株诱导的愈伤组织中抗癌成分—紫杉醇质量分数高。愈伤组织的继代培养基和培养条件也影响紫杉醇质量分数,如:同是从野生植株诱导的愈伤,MS III 培养基上培养 1 个月,不仅愈伤组织干鲜比大,而且紫杉醇质量分数最高可达 0.004%;培养在 B5 III 培养基上的愈伤组织,低温条件下紫杉醇略低,原因可能是,紫杉醇在低温下有一部分分泌到培养基中之故。3 种材料总的来说,符合其他研究者总结的一般规律^[1,5],即生长快的愈伤组织,紫杉醇低(如生物园取材的幼茎愈伤培养在 MS I 上),生长慢的愈伤组织紫杉醇质量分数高(如生物园取材的幼茎愈伤组织培养在 MS IV 上)。

3 讨论

3.1 外植体的选择:3 种外植体如幼茎、老茎、针叶切段中,幼茎的愈伤组织产生的时间最早、诱导率最高,为最佳诱导愈伤组织的外植体。这与 Fott-Neto 等 1992 年,以比较了东北红豆杉不同组织的诱导能力,即红、绿假种皮、种子、幼茎及针叶时所得的结论:“幼茎是最佳的外植体”是一致的。

3.2 培养基的选择:2,4-D 是南方红豆杉愈伤组织诱导不可缺少的成分,0.5~8.0 mg/L 均能诱导愈伤组织产生,以 2.0~3.0 mg/L 为宜。在以 2,4-D 与 KIN 相组合的培养基中,以 Y₅: MS + 2,4-D 4.0 mg/L + KIN 1.0 mg/L、B5 III; B5 + 2,4-D 4.0 mg/L + KIN 0.1 mg/L + Phe 0.1 mol/L 及表 1 中 5 号

培养基诱导率最高达 100%。

在继代培养阶段, B5 基本培养基能促进愈伤组织增殖的结果与杨永华^[5]等在东北红豆杉和云南红豆杉嫩叶外植体培养中的结果是一致的。此外, 高质量浓度的 2, 4-D (8.0 mg/L), 抑制愈伤组织增殖, 低质量浓度的 2, 4-D (1.0~3.0 mg/L) 适于愈伤组织的快速增殖, 这一结果与 Fott-Neto^[1]、Liu 等^[4]的结果, 即 2, 4-D 8.0 mg/L 最能促进愈伤组织增长有差异。

3.3 适于生产紫杉醇的材料来源、细胞系和培养程序: 获得高产紫杉醇的红豆杉细胞系, 需要长时间的培养和筛选工作。实验结果表明, 紫杉醇较高的继代培养基为 MS Ⅲ 和 B5 Ⅲ, 最高达干重的 0.004% 和 0.0037%。从这两种培养基上所得的愈伤组织, 可作为两个高产细胞系, 转入含相同成分的液体培养基中继续培养, 进一步提高紫杉醇质量分数。需说明的是 MS Ⅲ 和 B5 Ⅲ 中添加 Phe 0.1 mol/L 是参考 Fett-Neto 等^[1]1993 年的实验结果: 培养基中附加 Phe 0.1 mol/L 可提高东北红豆杉愈伤组织中紫杉醇的质量分数近一倍。

从实验结果可知, 继代培养 8~13 次的从山西野生植株茎段诱导产生的愈伤组织, 其紫杉醇质量分数普遍比人工栽培植株诱导、继代 1~3 次的愈伤组织中高。所以, 以野生植株的南方红豆杉的幼茎为外植体, 以 Y₅ 或 B5 Ⅲ 为诱导培养基, 以 MS Ⅲ (MS+2, 4-D 2.0 mg/L+KIN 1.0 mg/L+Phe 0.1 mol/L+NAA 0.5 mg/L) 或 B5 Ⅲ (B5+2, 4-D 3.0 mg/L+KIN 0.1 mg/L+Phe 0.1 mol/L) 为继代培养基继代培养 8~13 代, 每代 30~35 d 是生产紫杉醇较好的愈伤组织培养程序。

由于生长快的愈伤组织中紫杉醇质量分数低, 而生长慢的愈伤组织中紫杉醇质量分数高^[1, 8], 以及愈伤组织生长在 MS 培养基中比生长在 B5 培养基中紫杉醇质量分数高。不妨将愈伤组织的培养分为 3 个阶段, 即 1~2 阶段以诱导并获得大量愈伤组织为目的, 第 3 阶段以获得高含量紫杉醇为目的。所以, 第 1~2 阶段可以 Y₅ 或 B5 Ⅲ 为诱导培养基和继代培养基, 或以改良的能促进愈伤组织增殖的, 附加了 0.5 mg/L 根皮苷的 B5 Ⅲ^[12] 培养基为继代培养

基, 进行愈伤组织的大规模培养或细胞悬浮培养, 待愈伤组织或细胞悬浮培养物达到一定的量时, 转入第 3 阶段, 即将这些愈伤组织转接到生长相对慢的 MS Ⅲ 培养基中, 培养一代或两代, 收获得愈伤组织或细胞培养物, 并从中提取紫杉醇。

致谢: 陕西师范大学研究生常岩林、卢荣胜两位同事在取材方面给予的帮助。

References:

- [1] Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, et al. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification [J]. *Biotechnology*, 1993, 11: 731-734.
- [2] Fett-Neto A G, Melanson S J, Nicholson S A, et al. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 967-971.
- [3] Snje'ana M, Ivana B, Maja K, et al. Callus growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonii* [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2002, 40 (4): 299-303.
- [4] Liu Q G, Huang L J, Wang Z Z, et al. Effects of 2, 4-D, BA, GA, and PHE on the callus induction and growth of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 1995, 15 (7): 67-70.
- [5] Yang Y H, Xiao F H, Liu Y Z. Callus induction and tissue culture of *Taxus yunnanensis* [J]. *Biotechnology*, 1995, 5 (1): 24-26.
- [6] Gan F Y, Zheng G Z, Peng L P, et al. Study on cell suspension culture of *Taxus yunnanensis* [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1997, 23 (1): 43-46.
- [7] Sheng C Z, Wang S F, Wang N N, et al. Studies on callus culture of maire yew (*Taxus chinensis* var. *mairei*) leaves [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草藥), 2000, 31 (2): 130-131.
- [8] Gan F Y, Zheng G Z, Peng L P. Study on cell culture in *Taxus chinensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1996, 18 (2): 134-138.
- [9] Hu Y M, Gan F Y, Lu C H, et al. Production of Taxol and related Taxanes by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2003, 45 (3): 373-378.
- [10] Zhao F, Ni L, Geng Z, et al. Studies on the tissue culture of maire yew (*Taxus chinensis* var. *mairei*) I. Callus induction and optimization of the culturing method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草藥), 1999, 30 (3): 213-215.
- [11] Chen Y Y, Zhu W H, Wu Y Q, et al. Differences in callus induction and Taxol contents of several yew (*Taxus* L.) species [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草藥), 2000, 31 (3): 216-218.
- [12] Chen H, Wang W K, Zhao J H, et al. Effect of phloridzin and GA₃ on callus and cell suspension culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* [J]. *J Shanxi Teachers Univ - Nat Sci* (山西师范大学学报·自然科学版), 2000, 14 (4): 59-63.
- [13] Song C S. *Shanxi Province Xylophyta Map* (山西树木图志) [M]. Beijing: Science Press, 1991.