

文章编号 : 0427-7104 (2006) 06-0702-06

两种红豆杉植物的愈伤组织培养及褐化抑制

李 丽,张湮帆,何 康,樊正球,王祥荣

(复旦大学 环境科学与工程系,上海 200433)

摘 要: 在 DPS 系统均匀设计的基础上,对曼地亚红豆杉 (*Taxus media*) 和南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var *mairei*) 的茎和叶进行愈伤组织培养,并探讨愈伤组织褐化的抑制. 结果表明:两种植物茎形成愈伤组织能力均强于叶;同一种红豆杉植物愈伤组织诱导率与其直径存在一元线性回归关系; B₅ 培养基添加 0.3 mg/L 6-BA 和 2.9 mg/L NAA (曼地亚红豆杉)、0.1 mg/L 6-BA 和 1.7 mg/L NAA (南方红豆杉) 为最适合愈伤组织诱导和生长的培养基;南方红豆杉茎和叶产生愈伤组织平均时间分别少于曼地亚红豆杉茎和叶,其茎和叶愈伤组织平均直径显著大于曼地亚红豆杉;培养基添加 0.01~0.2 mg/L 抗坏血酸 (Vc) 能较为有效抑制愈伤组织褐化.

关键词: 曼地亚红豆杉;南方红豆杉;组织培养;愈伤组织;褐化

中图分类号: Q 946 文献标识码: A

红豆杉属植物含能治疗多种癌症的紫杉醇 (paclitaxel) 及其类似物^[1],近年来受到广泛重视. 紫杉醇全球需求量很大,然而各种红豆杉野生资源极为匮乏,已成为紫杉醇药源开发瓶颈. 南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var *mairei*) 又名美丽红豆杉,为国家一级保护植物,主要产于我国长江流域、南岭山脉地区及台湾省等地^[2]. 曼地亚红豆杉 (*T. media*) 是母本为东北红豆杉父本为欧洲红豆杉的天然杂交种,目前在北美洲和欧洲有野生和人工种植分布. 这两种红豆杉都含有紫杉醇.

近年来,国内外学者对南方红豆杉开展的研究主要集中在扦插繁殖和悬浮细胞培养等方面,对愈伤组织培养及褐化控制研究不深^[3-7]. 曼地亚红豆杉的组织培养研究更是不足,国外一些公开发表的论文很少涉及愈伤组织褐化控制,国内对其研究则刚刚起步,近几年才有一些初步探讨性成果公开发表^[8]. 本文通过均匀实验设计,对曼地亚红豆杉和南方红豆杉愈伤组织诱导的重点环节特别是褐化抑制进行了探讨和比较,为进一步利用组培快繁和悬浮培养生产紫杉醇类物质提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

供试植物材料品种分别为 4 年生曼地亚红豆杉 (产自四川省) 和 2 年生南方红豆杉 (产自浙江省),于 6 月份取其茎叶进行实验; B₅ 为基础培养基,购自美国 Sigma-Aldrich 公司;植物生长素 NAA (naphthalene acetic acid,萘乙酸) 和细胞分裂素 6-BA (6-苄基氨基嘌呤),购自美国 Phytochemistry Laboratories 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 均匀实验设计

为对 6-BA 和 NAA 进行多组浓度搭配以寻求最佳实验效果,同时合理减少实验次数,利用 DPS 数据处理系统进行实验方案均匀设计^[9]. 6-BA 浓度取 0.1~1.9 mg/L, NAA 浓度取 0.5~3.2 mg/L,均分 10 级. 经 DPS 软件运算得出均匀设计结果 (见表 1).

1.2.2 愈伤组织诱导和培养

剪取两种红豆杉植物嫩茎,流水冲洗 30 min 后加入少量洗洁精摇动洗涤 10 min;流水冲洗 10 min 无

收稿日期: 2006-04-18
基金项目: “十五” 211 工程 重点建设项目 (生物多样性与区域生态安全)
作者简介: 李 丽 (1981—),女,硕士研究生;联系人王祥荣教授,博士生导师.

菌条件下,将茎叶用 $w(\text{乙醇})=75\%$ 浸泡 30 s,无菌水洗涤 3 次;置于 $w(\text{氯化汞})=0.1\%$ 溶液中摇动浸泡 10 min,无菌水洗涤 5 次。

愈伤组织诱导培养基: B_5 +蔗糖 20 g/L +植物凝胶 2.9 g/L +各浓度 NAA 和 6-BA, pH 5.9~5.95。121 °C 高温高压灭菌 20 min 后冷却凝固。吸去茎叶上水分,将茎和叶切成 1 cm 小段,接种于不同培养基,每培养基接种 5~6 个外植体。将接种好的培养基于 25 °C 暗培养。每日记录外植体发育情况,统计初愈时间(初始愈伤组织产生时间);40 d 后统计愈伤组织块数,计算愈伤组织诱导率(产生愈伤组织外植体数/接种外植体总数);记录愈伤组织颜色;初愈 20 d 后测量愈伤组织平均直径(愈伤组织对角长度最大值和最小值的平均值);观察并记录褐化程度。

1.2.3 愈伤组织褐化抑制

在筛选最佳外植体和 NAA、6-BA 配比的基础上,利用愈伤组织培养效果最好的培养基加入不同浓度抗坏血酸(Vc)继代培养,对其褐化抑制效果进行研究。

2 结果与分析

两种红豆杉茎和叶外植体在 B_5 培养基上培养均能形成愈伤组织。愈伤组织在各组培养基上的接种数、初愈时间、诱导率和愈伤组织平均直径见表 2 和图 1(见第 704 页)。

表 2 两种红豆杉植物愈伤组织诱导的接种数及初愈时间

Tab 2 Inoculating numbers and cicatrized days of callus induction of *T. media* and *T. chinensis* var. *mairei*

培养基	接种数/个				初愈时间/d			
	M. C.	M. L.	N. C.	N. L.	M. C.	M. L.	N. C.	N. L.
	35	40	30	30	15	31	12	25
	40	40	39	25	15	30	12	26
	32	45	35	25	15	29	12	23
	36	38	32	35	16	29	13	24
	31	37	32	35	16	31	11	25
	34	35	34	35	14	30	12	25
	36	45	29	20	15	30	12	22
	35	45	25	20	15	32	11	25
	35	40	35	30	16	31	13	24
	38	45	30	35	14	30	12	23
平均值	35.2	41.0	32.1	29.0	15.1	30.3	12.0	24.2

注:M. 为曼地亚红豆杉;N. 为南方红豆杉;C. 为茎;L. 为叶

2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

两种植物茎形成愈伤组织的能力均高于叶(见表 2 和图 1,见第 704 页)。

(1) 茎的诱导率高。在 N. 的十种培养基和 M. 的 9 种培养基上,茎的愈伤组织诱导率都高于叶;M. C., M. L., N. C. 和 N. L. 在 10 种培养基上愈伤组织诱导率平均值分别为 77.5%, 56.5%, 71.6% 和 36.0%, 利用 DPS 软件对诱导率进行 Fisher 小样本非参数随机化配对测验,结果显示嫩茎与嫩叶在诱导率上存在极显著差异(M: $p=0.007$, N: $p=0.001$)。

(2) 茎启动诱导时间早。经检验, M. C. 和 M. L., N. C. 和 N. L. 平均初愈时间存在极显著差异(p 均为 0.001), M. C. 和 N. C. 平均初愈时间分别为 15.1 和 12.0 d, 而 M. L. 和 N. L. 平均初愈时间分别为 30.3 和 24.2 d 这可能是因为茎较叶的组织分化程度低, 细胞分裂更加旺盛。

表 1 基于 DPS 统计软件建立的均匀设计实验方案

Tab 1 Experiment uniform design based on DPS

培养基	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	
	6-BA	NAA
	0.9	1.1
	0.1	1.7
	1.5	2.0
	1.9	2.6
	1.7	0.8
	0.7	2.3
	0.3	2.9
	0.5	0.5
	1.1	3.2
	1.3	1.4

注:以“中心化偏差 CD”作为指标优化结果。本设计中心化偏差为 0.054 34

(3) N. C 愈伤组织生长 40 d 后的平均直径大于 N. L 诱导的愈伤组织. 经检验, N. C 和 N. L 愈伤组织平均直径之间存在显著性差异 ($p=0.001$); 虽然 M. C 和 M. L 愈伤组织平均直径之间不存在显著差异 ($p=0.092$), 但测量结果表明前者有比后者大的趋势.

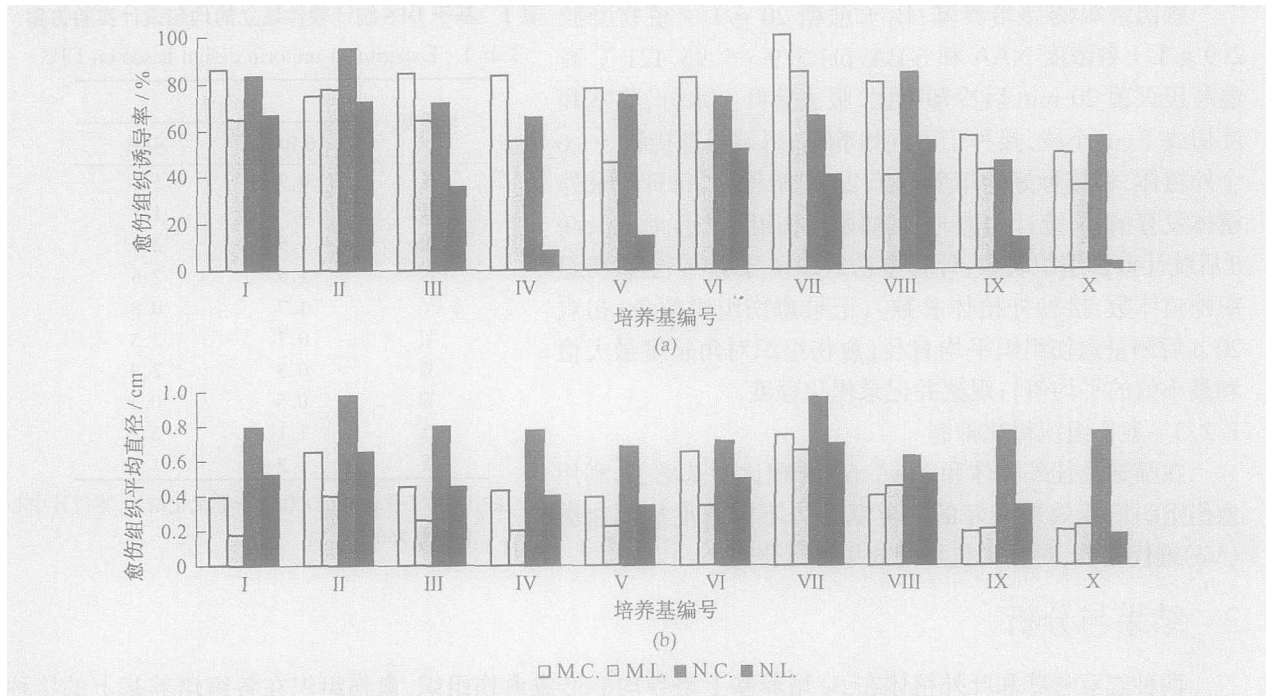


图 1 两种红豆杉植物茎和叶愈伤组织诱导率 (a) 及其平均直径 (b)

Fig 1 Induction ratios(a) and callus average diameters(b) of *T. media* and *T. chinensis* var. *mairei*

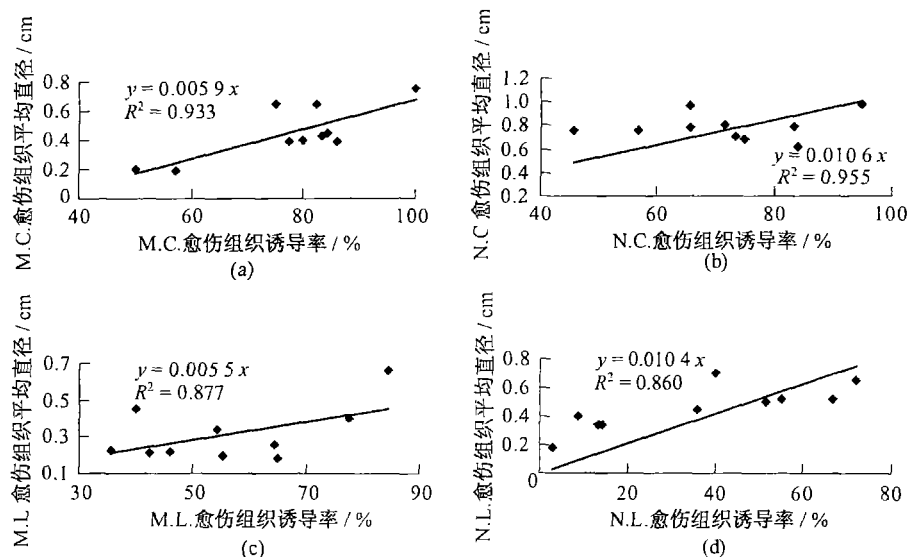


图 2 两种红豆杉植物茎 (a) (b) 和叶 (c) (d) 愈伤组织诱导率与其平均直径的相关回归

Fig 2 Regression of callus induction ration and average diameter of *T. media* and *T. chinensis* var. *mairei*

2.2 愈伤组织诱导率和其直径之间的关系

一般对同一种红豆杉来说,愈伤组织诱导率越大,其平均直径也越大. 经相关性检验, M. C, M. L, N. C 以及 N. L 的愈伤组织诱导率与其平均直径均存在一元线性回归关系, 经 F 显著性检验, 差异有显著性意义 (p 均为 0.000), 因此 4 个回归方程均有意义.

2.3 植物生长素和细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

植物组织培养效果受到外界各种因素影响, 而植物生长素和细胞分裂素的浓度和配比是最为关键的

因素. 实验结果表明, 当培养基中 NAA 和 6-BA 浓度配比不同时, 愈伤组织诱导率和生长情况差异显著. 图 1 显示 M. VII 号和 N. II 号培养基效果最好, M. C, M. L, N. C 和 N. L 愈伤组织诱导率分别达 100%, 84.4%, 94.9% 和 72%; 同时, 在 M. V II 号和 N. II 号培养基上愈伤组织平均直径也较大. 这表明, 培养基添加 0.3 mg/L 6-BA 和 2.9 mg/L NAA (M.), 0.1 mg/L 6-BA 和 1.7 mg/L NAA (N.) 对启动红豆杉外植体愈伤组织诱导效率最高, 同时最有利于愈伤组织生长.

此外, 6-BA 浓度对南方红豆杉愈伤组织诱导和生长的影响可能存在一个阈值. 从图 2 和图 3 可知, 当培养基中 6-BA 浓度低于 1.0 mg/L 时 (、 、 、 、 号培养基), 愈伤组织诱导率高、体积大; 而当 6-BA 浓度高于 1.0 mg/L 时 (、 、 、 、 号培养基), 愈伤组织诱导率低、体积小, 相比之下叶比茎对此阈值反应更强烈. 这可能说明, 当 6-BA 浓度低于 1.0 mg/L 时有利于南方红豆杉愈伤组织诱导和生长, 而其浓度高于 1.0 mg/L 时会抑制愈伤组织诱导和生长. 对于曼地亚红豆杉则不存在这种明显现象.

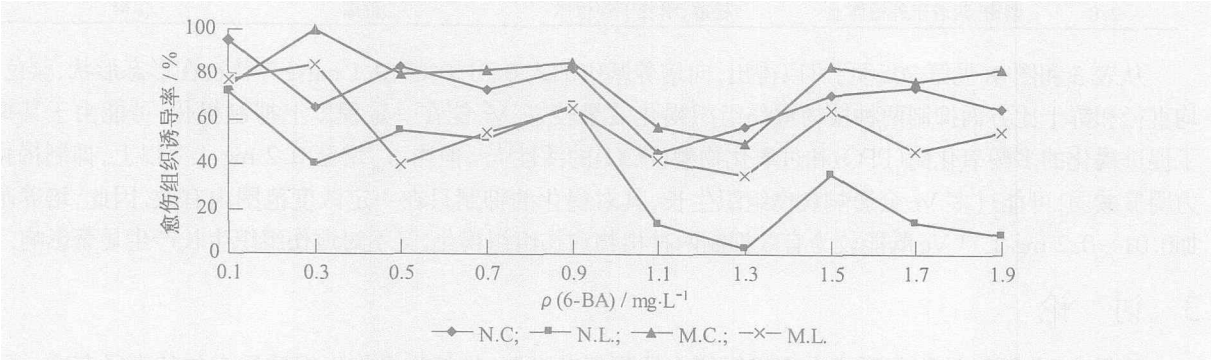


图 3 不同 6-BA 浓度下两种红豆杉植物茎和叶愈伤组织的诱导率
Fig 3 Different results of callus induction under different 6-BA concentrations

2.4 两种红豆杉愈伤组织诱导能力对比

综合表 2 和图 1, 2, 经检验两种植物在愈伤组织诱导方面存在一定差异, 表现为: 1) M. C. 和 N. C, M. L 和 N. L 之间愈伤诱导率无显著性差异; 2) N. C 和 N. L 产生愈伤组织平均时间分别少于 M. C 和 M. L, 且具有极显著差异 (p 均为 0.001); 3) N. C. 和 N. L 愈伤组织平均直径分别大于 M. C 和 M. L (p 分别为 0.001 和 0.048).

2.5 Vc 对愈伤组织褐化的抑制作用

褐化是指植物材料在进行组织培养时, 外植体、愈伤组织细胞或培养基颜色变深, 呈现褐色, 一般认为这是由于外植体或愈伤组织细胞分泌的酚类物质被氧化成有色有害物质 (主要是醌类) 所致^[10]. 褐化会导致细胞活力降低、增殖生长缓慢甚至死亡, 严重影响和阻碍组织培养正常进行. 李冬杰等^[11]曾报道, 红豆杉属植物在进行组织培养时, 常发生褐化现象, 且难以消除. 本文发现两种红豆杉植物愈伤组织在培养中极易发生褐化现象, 这与已有报道基本相同. 在前文筛选最佳外植体和 NAA、6-BA 配比的基础上, 利用 M. V II 号培养基和 N. II 号培养基, 研究不同浓度 Vc 对 M. C 和 N. C 愈伤组织褐化抑制的效果.

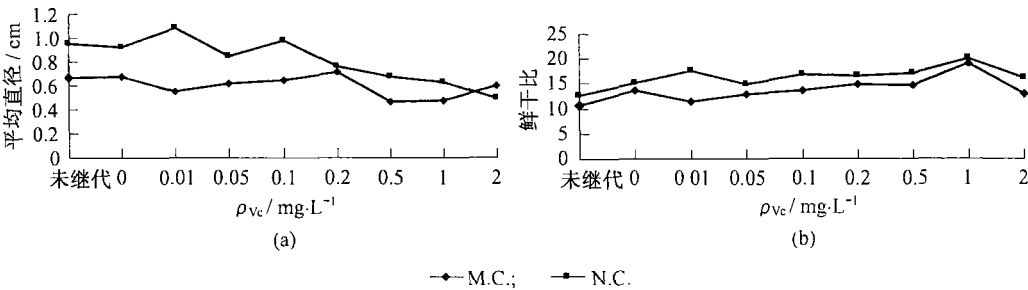


图 4 不同 Vc 浓度作用下两种红豆杉植物愈伤组织平均直径 (a) 及鲜干比 (b)

Fig 4 Average diameters (a) and weight ratios (b) of callus under different Vc concentrations

表 3 不同 Vc 浓度对两种红豆杉植物愈伤组织褐化抑制的效果
Tab 3 Different results of darkening inhibition under different Vc concentrations

$\rho_{Vc}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	形态和形状		颜色	
	M. C	N. C	M. C	N. C
未继代	松散、团状	致密、团状	黄棕	棕褐
0	较致密、块状	较致密、团状	黄绿	黄棕
0.01	较致密、团状	松散、团状	黄白、黄绿	白绿、黄绿
0.05	较致密、块状	松散、团状、表面有多白点	黄白、黄绿	黄白、黄绿
0.1	较致密、块状	致密、团状	黄绿	黄绿
0.2	紧密、附着于外植体上	较致密、块状	黄棕	黄棕
0.5	紧密、附着于外植体上	致密、块状	黄棕	棕褐
1.0	紧密、附着于外植体上	松散、附着于外植体	棕褐	黄棕
2.0	紧密、附着于外植体上	松散、附着于外植体	黄棕	棕褐

从表 3和图 4(见第 705页)可以得出,向培养基中加入 0.01,0.05,0.1 mg · L⁻¹ Vc,在形态形状、颜色、平均直径和鲜干比方面抑制两种植物愈伤组织褐化效果较好. Vc能在一定程度上抑制褐化,可能由于其抑制了促进褐化的多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)的活性^[12].但当 ρ_{Vc} 增至 0.2 mg · L⁻¹以上,抑制褐化能力明显减弱,可能过多 Vc会影响愈伤组织生长,其对褐化的抑制只在一定浓度范围内有效.因此,培养基添加 0.01~0.2 mg · L⁻¹ Vc既能较为有效抑制两种植物愈伤组织褐化,又不对愈伤组织生长产生显著影响.

3 讨 论

结果表明,两种植物茎形成愈伤组织能力均强于叶;同一种植物愈伤组织诱导率与其直径存在一元线性回归关系;B₅培养基添加 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA和 2.9 mg · L⁻¹ NAA(M.),0.1 mg · L⁻¹ 6-BA和 1.7 mg · L⁻¹ NAA(N.)为最适合愈伤组织诱导和生长的培养基;N. C和 N. L产生愈伤组织平均时间分别少于 M. C和 M. L, N. C和 N. L愈伤组织平均直径分别大于 M. C和 M. L;培养基添加 0.01~0.2 mg · L⁻¹ Vc能较为有效抑制两种植物愈伤组织褐化.

本文以初愈时间、诱导率、平均直径和褐化程度为标准来评价愈伤组织生长情况,发现不同浓度 NAA和 6-BA配比的培养基上收获的同种外植体愈伤组织还存在松软程度不同,特别是 ρ_{NAA} 较高(≥ 1.0 mg · L⁻¹)而 ρ_{6-BA} 较低(≤ 0.5 mg · L⁻¹)时,愈伤组织细胞松软,在继代培养转移时很容易被破坏.这可能是由于高浓度生长素和低浓度分裂素同时存在导致愈伤组织细胞中含水量过高或细胞壁硬度降低.愈伤组织松软程度和 NAA,6-BA配比之间的关系及其对后续分化和脱分化产生的影响有待进一步研究.

参考文献:

[1] Singla A K, Garg A, Aggarwal D, et al Paclitaxe and its fomulation[J]. Intemational J ouma l of Pha m aceu-
tics, 2002, 235(1-2): 179

[2] 梅兴国. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2003

[3] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, et al A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of Taxus
chinensis var mairei induced by oligosaccharide from Fusarium oxysprum [J]. Enzyme and Microbial Technol-
ogy, 2002, 30: 774-778.

[4] Yuan Y J, Li C, Hu Z D, et al Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of Taxus chinensis
var mairei for taxol production[J]. Process Biochemistry, 2002, 38: 193-198

[5] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in
suspension cultures of Taxus chinensis var mairei[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19: 259-265

[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] 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

[8] 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

[9] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 1998

[10] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35 (6): 501~506

[11] 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

[12] 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), 2001, 34 (4): 120~122

Callus Induction and Darkening Inhibition in Tissue Culture of
Taxus chinensis var. *mairei* and *Taxus media*

L I L i, ZHANG Yan-fan, HE Kang, FAN Zheng-qiu, WANG Xiang-rong
(Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Callus induction and darkening inhibition were studied in tissue culture of *Taxus chinensis* var *mairei* and *Taxus media* based on Uniform Design. Results indicated that caudex is more effective in callus induction than leaf and a linear regression relationship exists between callus induction ratio and its diameter for a certain plant. Culture medium B₅ with the addition of 6-BA 0.3 mg · L⁻¹ and NAA 2.9 mg · L⁻¹ (*T. media*), 6-BA 0.1 mg · L⁻¹ and NAA 1.7 mg · L⁻¹ (*T. chinensis* var *mairei*) gave optimum cell induction and growth. The caudex and leaf of *T. chinensis* var *mairei* induced callus earlier than that of *T. media* on the average. The average callus diameter of caudex and leaf of *T. chinensis* var *mairei* was bigger than that of *T. media*. An addition of vitamin C 0.01—0.2 mg · L⁻¹ in culture medium was effective in callus darkening inhibition without significant influence on cell growth.

Keywords: *Taxus media*; *Taxus chinensis* var *mairei*; tissue culture; callus induction; darkening inhibition