

红豆杉属植物组织培养方法及其影响因素研究进展

师春娟, 韩云花, 于永明, 李平英, 董菊兰, 高淑琴

(甘肃省小陇山林业科学研究所, 甘肃 天水 741022)

摘要: 概述了近年来红豆杉属植物组织培养的主要方法及其影响因素的研究成果, 从而为红豆杉属植物组织培养及其它相关研究提供相对系统的参考。

关键词: 红豆杉属植物; 组织培养; 影响因素; 研究进展

中图分类号: S791.226; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2007)12-0038-04

红豆杉 [*Taxus Wallichiana* var. *Chinesis* (Chinese Yew)] 因其具有极高的医用价值而存在巨大的市场需求。红豆杉生长缓慢, 自然更新困难, 加上长期以来对其资源的开发利用, 现存资源量非常有限。利用组织培养技术生产次生代谢物质, 或利用愈伤组织再分化苗木是解决这一供需矛盾的有效途径。但由于红豆杉本身的生物学特性以及植物组织培养研究与方法应用难有普通的规律可循, 因而在组织快繁上存在一定的困难。我们对近年来有关红豆杉植物组织培养方法及其影响因素等方面的文献资料进行归纳总结, 以期对红豆杉属植物组织培养及其相关研究提供相对系统的参考。

1 红豆杉属植物组织培养方法

红豆杉组织培养试验研究已开展了 30 多年, 其方法主要分为四大类, 即离体胚培养法、嫩芽增殖

法、愈伤组织再生植株法及体细胞胚发生法。

1.1 离体胚培养法

人们很早就用红豆杉休眠种子中未成熟胚在培养基培养, 使其萌发而形成新的植株, 并且从试验方法上证实, 离体胚中内源 ABA 对红豆杉离体胚萌发的抑制作用可以通过在培养基中添加赤霉素解除^[1~2]。Flores 等报道, 从杂种紫杉、短叶红豆杉绿色种子中剥取的未成熟胚接种在 White 或 MS 培养基上, 其萌发率最高可达 70%, 而种子越成熟, 其培养胚萌发率则越低^[3]。Hu C-Y 等对 4 种红豆杉离体胚在不同培养基上生长与萌发的试验表明, B₅ 培养基上培养 14 d 的欧洲红豆杉与东北红豆杉未成熟胚生长很好, 短叶红豆杉未成熟胚在 MS 培养基上生长较快; 短叶红豆杉与东北红豆杉成熟种子中的离体胚生长时出现轻度休眠现象, 而杂种紫杉成熟

收稿日期: 2007-08-06

基金项目: 甘肃省天水市科技攻关项目“小陇山林区珍稀濒危树种保护与繁育技术研究”(2005-13)的部分研究内容

作者简介: 师春娟(1978—), 女, 甘肃临洮人, 助理工程师, 主要从事林木、花卉苗木的组培研究工作。联系电话: (0)13893851132。

有一个大的发展, 很大程度上取决于科技投入和科技创新力度^[1,3]。一是强化技术培训, 提高中药材产业从业人员的整体素质, 尤其要加大 GAP 规范化种植技术培训, 提高广大药农的种植技术水平和 GAP 意识, 从药源上保证全省中药材的品质; 二是逐步建立以企业为主体, 产学研有机结合的新、特药研发体系, 鼓励制药企业和科研院所研发具有自主知识产权的国家级中成药, 支持传统中药二次开发和中药新剂型、新工艺、新技术的研究, 经过努力, 力争使甘肃省传统中药制剂水平有大幅度的提高, 为重点企业和重点产品的现代化夯实基础; 三是完善中药现代化研究与中药生产衔接的中间环节, 有计划、有步骤的建设中药制剂工程技术中心、中药指纹图谱和质量标准研究中心等机构, 搭建技术创新、重

点技术设施和新药制造技术平台; 四是政府部门要千方百计加大对中药科技的投入, 尽快建立中药研究机构, 加强对品种种植栽培的研究, 对中药新产品的研究, 延伸产业链, 将资源优势转化为产品优势, 以全方位提升中药材产业的核心竞争力。

参考文献:

- [1] 杨世林, 张 昭, 张本刚, 等. 珍稀濒危药用植物的保护现状及保护对策[J]. 中草药, 2000, 31(6): 401-403; 426.
- [2] 方子森, 陈小莉, 张恩和, 等. 野生羌活的生态环境与驯化栽培[J]. 中草药, 2004, 35(9): 1 701-1 703.
- [3] 张恩和, 黄高宝, 张旺锋. 北方特用经济作物栽培学[M]. 北京: 中国科学文化出版社. 2002: 277-279.

(本文责编: 张雪琴)

种子离体胚则由于深度休眠始终未见胚生长^[4~5]。

1.2 嫩芽增殖法

Amos、McCown 等研究表明,用红豆杉属植物的茎尖作为外植体可以诱导出不定芽,且低质量浓度 BA 有利于嫩芽产生,高质量浓度 BA 则抑制嫩芽伸长^[6]。Barnes 和 Chee 等皆有相似的报道^[7~8]。杨振国等利用东北红豆杉幼枝顶芽作外植体,以 MS 为基本培养基,通过芽体组织培养诱导出丛生芽之后,又发现东北红豆杉茎尖能诱导出不定芽与不定根。不定芽的形成与 BA/IBA 比值和母树树龄有关,不定根的形成主要取决于 IBA 的质量浓度与母树树龄^[9]。

1.3 愈伤组织再生植株法

目前,南方红豆杉愈伤组织的诱导报道大多是利用愈伤组织生产紫杉醇。孙小霞等研究南方红豆杉愈伤组织的诱导发现,用秋季茎段的愈伤组织诱导率可达 100%^[10]。苏应娟等在南方红豆杉芽愈伤组织的诱导中发现,最适培养基是 MS 添加 2,4-D 0.50 mg/L 和 NAA 0.50 mg/L^[11]。何康等采用南方红豆杉春、夏两季当年生嫩茎和嫩叶,在 B₅ 培养基上添加不同浓度的 NAA 和 6-BA,成功地诱导了其愈伤组织的形成^[12]。王水等用云南红豆杉嫩枝外植体做了这方面的研究,结果显示,其外植体在含有 2,4-D、NAA 和 KT 的 6,7-V 培养基上产生了愈伤组织,进一步分化出芽,芽长成嫩枝后转移到含 IBA 或 IBA 和 6-BA 的 White 培养基上分化出根,形成再生小植株^[13]。

1.4 体细胞胚发生法

近年来,南方红豆杉组织培养体细胞胚胎发生途径的研究取得了较大进展,邱德有等把福建南方红豆杉的成熟胚放在 mB+2,4-D 0.50 mg/L+NAA 2.00 mg/L+KT 0.55 mg/L 培养基上,45 d 后愈伤组织的诱导频率可达 95%以上,再将上述材料转移到 mB 培养基上继续培养,42 d 后平均每 100 块愈伤组织最多产生了 91 个体细胞胚。还有早期研究的如 Salandy 等,将佛罗里达红豆杉针叶外植体诱导出的愈伤组织,在含 1.00 mg/L 2,4-D 和 1 g/L 谷氨酰胺的 MS 培养基中进行细胞悬浮培养,结果愈伤组织细胞群中出现了胚性结构细胞^[14]。Wann 和 Goldner 以红豆杉属植物未成熟胚为外植体,结合 2,4-D 与 BA,经过 2 个阶段(180 d)的培养,诱导出了体细胞胚^[15]。Lee 和 Son 也以东北红豆杉未成熟胚为外植体,先在含 NAA 的改良 B₅ 培养基上培养,或者在含 2,4-D 与 KT 的 MS 或 WPM 培养基上培养,后再转至无激素培养基中诱

导,结果均出现了体胚^[16]。

2 影响红豆杉属植物组织培养的因素

大量研究表明,红豆杉属植物组织培养与培养基的种类和培养材料关系很大。即使是同一种红豆杉,由于培养基和培养材料的不同,也会得到不同的结果。

2.1 培养材料(外植体)

目前,在关于红豆杉属植物组织和细胞培养的文献中,被用来作为诱导红豆杉愈伤组织外植体的有针叶、幼茎、树皮、形成层、种子及假种皮等,大多都是采用 1~2 年生枝条、叶和幼嫩茎段^[17]。以幼茎、形成层或树皮诱导愈伤组织的效果最好,诱导率亦高,其它的外植体诱导能力较差,或根本诱导不出愈伤组织。杨礼香等发现,以芽作为外植体,可以解决由于茎段外植体污染率高的困难,而且由芽诱导的愈伤组织生长速度较快^[18]。Fett-Neto 等、Christen 等的研究表明,不同种属应优选不同的组织作为外植体^[19~20]。

2.2 培养基

对于红豆杉属植物的组织培养,由于其本身的生物学特性及培养材料的不同,适宜于其生长的培养基也各不相同。一些研究表明,许多培养基添加蔗糖及外源激素均可诱导外植体形成愈伤组织^[21]。其中以 B₅、SH 及 6,7-V 培养基较佳,诱导率较高,培养基中激素组成及其浓度和组合对愈伤组织的诱导起着重要的作用。培养基中含 1.00~2.00 mg/L 2,4-D 或含有 2,4-D 激素的组合对愈伤组织的诱导极为有利^[22]。孙小霞等研究南方红豆杉愈伤组织的诱导发现,用秋季茎段的愈伤组织诱导率可达 100%,可继代的愈伤组织率为 53%~75%。诱导愈伤组织产生较好的培养基为 MS、B₅、SHT 和 6,7-V,继代增殖培养多使用 B₅、SHT。另外用 1/2 MS 添加 PVP 可以得到最好的胚生长和苗木发育^[10]。刘佳佳等研究结果表明,在红豆杉愈伤组织的诱导方面,MS 培养基优于 B₅、N6、SHN (Schenk & Hildebrandt New) 等培养基,以当年生嫩茎为外植体,愈伤组织诱导率可达 100%;继代培养时以 B₅ 培养基为好;愈伤组织的生长以 B₅ 和 SHN 培养基为好;而紫杉醇的生产以 MS 培养基为好^[23]。苏应娟等在南方红豆杉芽愈伤组织的诱导中发现,最适培养基是 MS 添加 2,4-D 0.50 mg/L 和 NAA 0.50 mg/L。由此可知,适宜红豆杉属植物的组织培养的培养基不同^[11]。

杜亚填等采用南方红豆杉幼茎、较成熟幼茎皮作为外植体,对南方红豆杉愈伤组织诱导的结果表

明,诱导培养初期,以无植物生长调节剂的 MS 为基本培养基,在附加不同植物生长调节剂组合作用下,愈伤组织产生的时间和生长与在相同植物生长调节剂组合作用下不同外植体愈伤组织的产生时间和生长均表现出较显著差异,2,4-D/NAA 高于 0.40 mg/L 时,不利于南方红豆杉愈伤组织的诱导^[24]。甘烦远等研究发现,在 MS 培养基中附加 NAA 1.00 mg/L+KT 1.00 mg/L 的植物激素,红豆杉嫩枝条的愈伤组织诱导率达到 100%,针叶的诱导率达到 84%^[25]。刘铁燕等利用东北红豆杉扦插幼苗茎作为外植体,对东北红豆杉愈伤组织诱导的结果表明,愈伤组织的诱导率 B₅-B 组培养基较高(86.7%),其次为 MS-A 组(60.2%),MS-B 组较差(37.0%)^[26]。MS 培养基中 2,4-D 和 NAA 同时存在时,愈伤组织诱导效果比不含 NAA 的要好 1.5~2.0 倍。但 B₅ 培养基对愈伤组织的诱导效果明显好于 MS 培养基,而后者对愈伤组织的生长比较适宜。梅兴国等采用 B₅ 与 MS 相结合的 BM 培养基以及适宜质量浓度的激素(2,4-D,6-BA+GA₃)解除南方红豆杉离体胚的休眠,使其胚萌发率达 81%^[27]。陈亮中等以茎尖为材料,经过附加 NAA 0.20 mg/L 和 6-BA 1.50 mg/L 的怀特培养基,在 24℃ 条件下,每日光照 12 h、光强 1 000 Lx 条件下培养即可获得小植株,再经过基质移栽、炼苗,检查防疫后成为生产用苗。陈永勤、李志良等分别采用 B₅ 与 MS 培养基相结合的 BM 培养基及加入适量的 2,4-D、6-BA、GA₃ 等激素以解除红豆杉离体胚休眠及用 McCown 培养基等进行组织培养研究,筛选出 6-BA 1.00 mg/L+2,4-D 0.10 mg/L+AC 4 g/L,萌发率达 81% 的最佳组合,并证明 1/4 的 McCown 更有利于幼苗的生根、发芽、成苗^[28~29]。故表明不同培养基对红豆杉属植物愈伤组织诱导的结果也不同。

杨礼香等研究发现,茎段诱导的最适培养基为 MS 和 2,4-D 的组合,与 MS 和 NAA 的组合对茎段愈伤组织的诱导时间和诱导率的效应相似,均可在 14 d 内产生愈伤组织^[18]。茎段愈伤组织的产生先是茎两端膨大,叶柄处产生愈伤组织,然后整个茎膨大,叶片也愈伤组织化,最后整个外植体可以全部转为愈伤组织,与其它报道一致^[30]。芽诱导的最适培养基为 MS2,茎段和芽相比,芽产生愈伤组织的时间早,诱导率高,愈伤组织生长速度快。这可能是由于芽的组织分化程度低,细胞分裂旺盛的原因。芽和茎段对 KT 的反应不同,可能是两者内源激素水平不同所致。如 Flores 等在 White 培养基上培养短叶红豆杉离体胚时,发现胚萌发率随着成熟度的增加

而显著降低^[3],而 Chee 在 B₅ 培养基上培养短叶红豆杉离体胚的结果正好相反。从以上分析可以看出,不同培养材料(外植体)对培养基的要求也有差异^[31]。

总之,红豆杉属植物组织培养不同于其它木本植物,在培养方法上有很大的差别。不同的种类、培养材料、甚至同一品种的不同部位材料之间,所采用的培养基也不相同。因此,对于红豆杉的组织培养,没有统一标准的培养条件,需要根据不同的材料、方法、目的相应地采取不同的培养措施。在这方面还需不断的探索研究。

参考文献

- [1] Le Page-Degivry M T. Physiologie vegetale. Acide abscissique et dormance chez les embryons de *Taxus baccata* L C R Acad[J]. Sc Paris, 1970(271):482-484.
- [2] Le Page-Degivry M T. Etude en culture in vitro de la dormance embryonnaire chez *Taxus baccata* L Bio[J]. Plant, 1973 (15):264-269.
- [3] Flores H E, Sgrignoli P J. In vitro culture and precocious germination of *Taxus* embryos[J]. In vitro Cell Dev Biol, 1991 (27):139-142.
- [4] Hu C-Y, Wang L, Wu B. In vitro culture of immature *Taxus* embryos[J]. HorstScience, 1992(27):698.
- [5] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Expt Cell Res, 1968(50):151-158.
- [6] Amos R R, Mc Cown B H. Micropropagation of members of the coniferae [J]. HortScience, 1981 (16):453.
- [7] Barnes L. Micropropagation of endangered native conifers, *Torreya taxifolia* and *Taxus floridana* [J]. HortScience, 1983 (18):617.
- [8] Chee, P P. Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures[J]. PlantCell Rep, 1995(14):560-565.
- [9] 杨振国,王明启,彭立新. 紫杉芽体组织培养研究[J]. 吉林林学院学报, 1997, 13(1):20-22.
- [10] 孙小霞,梁一池. 南方红豆杉繁殖育苗技术的研究进展[J]. 林业科技, 2002, 27(4):9-12.
- [11] 苏应娟,王 艇,杨礼香,等. 南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养[J]. 中草药, 2001, 32 (7):637-639.
- [12] 何 康,樊正球,张涇帆,等. 复旦南方红豆杉愈伤组织培养及褐化抑制[J]. 中国林业产业, 2005(12):53-55.
- [13] 王 水,贾勇炯,魏 峰,等. 云南红豆杉的组织培养及植株再生[J]. 云南植物研究, 1997, 19(4):407-410.
- [14] 邱德有,李如玉,李 铃. 红豆杉及南方红豆杉体细胞胚胎发生的研究[J]. 林业科学, 1998, 34(6):

半干旱二阴区双垄全膜覆盖马铃薯套种蚕豆栽培技术

王有毅¹, 岳淑兰¹, 丁书川², 刘世海², 丁世成²

(1. 甘肃省榆中县气象局, 甘肃 榆中 730100; 2. 甘肃省榆中县农业技术推广中心, 甘肃 榆中 730100)

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1001-1463(2007)12-0041-02

榆中县地处青藏高原和黄土高原的交汇地带, 属中部干旱半干旱地区。耕地面积 7.07 万 hm^2 , 旱地 5.15 万 hm^2 , 占耕地面积的 72.8%。全县海拔 1 430~3 670 m, 年平均降水量 350 mm 左右, 蒸发量高达 1 450 mm, 无霜期 90~120 d, 年均气温 6.7 $^{\circ}\text{C}$, $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的有效积温 1 400~3 000 $^{\circ}\text{C}$, 属典型的一年一熟区。为了提高半干旱地区单位面积的经济效益, 我们经过多年探索和实践, 总结出了半干旱区双垄全膜覆盖马铃薯套种蚕豆高效栽培技术, 经在南部二阴地区试验, 2005 年马铃薯平均产量为 24 384 kg/hm^2 , 产值 13 167 元/ hm^2 ; 蚕豆平均产量

为 4 890 kg/hm^2 , 产值 5 868 元/ hm^2 , 总产值 19 035 元/ hm^2 。2006 年马铃薯平均产量为 22 800 kg/hm^2 , 产值 14 502 元/ hm^2 ; 蚕豆平均产量为 4 162.5 kg/hm^2 , 产值 4 995 元/ hm^2 , 总产值 19 497 元/ hm^2 。

1 地块选择

在海拔 2 000 m 以上的干旱半干旱区, 选择土壤肥沃、前茬为非茄科类作物的地块种植, 忌连作。

2 整地施肥

结合秋耕施农家肥 7.5 万~12.0 万 kg/hm^2 , 在覆膜前结合整地施入尿素 300 kg/hm^2 、磷酸二铵 225~375 kg/hm^2 、硫酸钾 375~450 kg/hm^2 。整

收稿日期: 2007-05-10

作者简介: 王有毅(1968—), 男, 甘肃榆中人, 工程师, 主要从事气象地面测报工作。联系电话: (0931) 5221263; (0) 13893144645。

50-54.

- [15] Wann S R, Goldner W R. Induction of somatic embryogenesis in *Taxus*, and the production of taxonering containing alkaloids therefrom[J]. WO Patent N°, 1994 (93): 19 585.
- [16] Lee B S, Son S H. A method for producing taxol and taxanes from embryo cultures of *Taxus species*[J]. WO Patent N°, 1995 (95): 02 063.
- [17] 盛长忠, 王淑芳, 王宁宁, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养的研究[J]. 中草药, 2000, 31 (2): 130-132.
- [18] 杨礼香, 周诗毅. 南方红豆杉组织培养和紫杉醇含量测定[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2001, 34 (4): 453-455.
- [19] Fett-Neto, A G. Taxol Content Of Stored Fresh And Dried *Taxus* Clippings[J]. Bio/Technology, 1992, 10 (2): 1 572.
- [20] Christen, A A. Abstract presented at the second National Cancer Institute Workshop on Taxol and *Taxus*[J]. Alexandria VA, 1992(9): 23-24.
- [21] 朱红, 王昊. 红豆杉资源的生物工程研究新进展[J]. 福建医药杂志, 2002, 24(1): 95-97.
- [22] 韩金玉. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展[J]. 中草药, 1996, 27(7): 433.
- [23] 刘佳佳, 郭勇. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究进展[J]. 经济林研究, 1999, 17 (2): 46-48.
- [24] 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): 569-576.
- [25] 甘炳远, 郑光植, 彭丽萍. 红豆杉细胞培养的研究[J]. 云南植物研究, 1996, 18 (2): 134-138.
- [26] 刘铁燕, 刘均, 赵彩凤, 等. 东北红豆杉愈伤组织诱导及组织培养研究[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 2002, 34(2): 67-71.
- [27] 梅兴国, 温川蓉, 刘凌, 等. 红豆杉离体胚培养快速育苗研究[J]. 华中理工大学学报, 1998, 26(5): 5-7.
- [28] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 云南红豆杉细胞培养和紫杉醇生产[J]. 湖北大学学报, 2001, 23 (4): 366-369.
- [29] 李志良. 中国红豆杉和短叶红豆杉的腰胎培养[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10 (1): 62-63.
- [30] 李伯林, 赵群华, 卢山, 等. 红豆杉植物愈伤组织的培养及紫杉醇形成的初探[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1995, 31(3): 424-429.
- [31] Chee P P. In vitro culture of zygotic embryos of *Taxus species*[J]. HortScience, 1994(29): 695-697.

(本文责编: 杨杰)