

文章编号:1006-0960(2007)04-0019-04

红豆杉愈伤组织诱导试验初探

师春娟,李平英,于永明,董菊兰,韩云花,高淑琴

(甘肃省小陇山林业科学研究所,甘肃 天水 741022)

摘要:以 1 年生红豆杉的茎段、芽尖及种子作为外植体,以 MS 和 B₅ 培养基添加 2,4-D、NAA、KT 进行愈伤组织诱导试验。结果表明:最适宜红豆杉愈伤组织诱导的条件为以茎段为外植体,消毒时间 6 min;B₅+NAA1.0 mg/L+KT0.2 mg/L+GA0.75 mg/L 培养基;25 ℃左右培养;接种后外植体暗处理 1~2 周效果更佳,诱导率高,且诱导出的愈伤组织质量好。

关键词:红豆杉;愈伤组织;诱导;组织培养

中图分类号:S 791.490.5 **文献标识码:**A

Preliminary Report on Callus Induction Experiment of *Taxus chinensis*

SHI Chun-juan, LI Ping-ying, YU Yong-ming, DONG Ju-lan, HAN Yun-hua, GAO Shu-qing

(Xiaolongshan Forestry Science and Technology Research Institute, Tianshui Gansu 741020, China)

Abstract: Calli were induced from young stem, shoot and seed of *Taxus chinensis*, callus induction were studied on MS, B₅ basal medium added with 2,4-D, NAA, KT. The result indicated that young stem was more effective as explants, which sterilized for 6 minutes and cultured on medium B₅+NAA1.0 mg/L + KT0.2 mg/L+GA0.75 mg/L under 25 ℃. It is most effective for callus cultured under unillumination condition 1~2 weeks and had best quality of induced callus.

Key words: *Taxus chinensis*; callus induction; preliminary report; tissue cultivation

小陇山林区位于亚热带向暖温带的过渡地带,自然条件优越,气候湿润,物种丰富,区内有许多珍稀濒危树种。红豆杉 *Taxus chinensis* 国内分布稀少,此树种不仅对维持该地区生物多样性具有重要的意义,而且还具有特别的用途,如红豆杉属 *Taxus* 植物因含有抗肿瘤特效药紫杉醇(taxol)而成为当今国内外科学工作者研究的热点之一。但由于受其本身生物学特性的影响,适应的生态环境独特,数量稀少,而且具有竞争性能弱、繁殖能力差、自然更新困难的特点限制了红豆杉的发展。

利用种子繁殖是一条最直接的再生途径。如南

方红豆杉种子因胚后熟引起休眠现象^[1],通常当年采收播种要到第 2 年春天才萌发,且萌发率极低,几乎为零。顶芽和腋芽培养也是获取种苗的另一重要途径,长期以来,红豆杉顶芽和腋芽培养技术未取得实质性进展。李伯林等^[2]以中国红豆杉、云南红豆杉、东北红豆杉的茎段为外植体,分别诱导出愈伤组织,并证明有紫杉醇产生;朱蔚华等^[3]也对几种红豆杉植物进行了愈伤组织的诱导培养;王水等^[4]以云南红豆杉当年生嫩枝为外植体,诱导出愈伤组织,进而获得完整植株,但成苗率较低。

本试验从 2005 年至 2007 年历经 3 年,应用组

收稿日期:2007-10-10

资助项目: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)。

作者简介:师春娟(1978—),女,甘肃临洮人,林业助理工程师,长期从事花卉苗木的组织培养试验工作。

培技术,试图以红豆杉顶芽和茎段为材料,经愈伤组织诱导芽的萌发,再诱导地下部分发育,形成实生苗,旨在为小陇山林区红豆杉的栽培提供苗木,也为进一步研究快速繁殖红豆杉等的优稀品种(系)提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验材料以小陇山林科所院内红豆杉的营养体及种子作为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的选取

红豆杉采取本所院内所栽植苗木为母本,选取 1 年生的茎段、顶芽和种子作为外植体。

1.2.2 诱导培养基

分别选用 MS、1/4MS、B₅ 作为诱导培养基及继代生长培养基。培养基(表 1)所加激素种类为 NAA(0.2~2.0)、GA(1.0)、KT(0.1~1.0),附加 1 g/L 的活性炭,7~8 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液及 0.1 mol/L 的 HCl 溶液将 pH 值调至 5.4~5.8。培养基在 121 °C 高压蒸气灭菌 25~30 min。

表 1 愈伤组织诱导试验所用的培养基

培养基	激素的种类和浓度
1 号	MS(B ₅)+NAA1.0 mg/L+KT0.1 mg/L
2 号	1/4MS(B ₅)+NAA1.0 mg/L+KT0.1 mg/L+GA1.0 mg/L
3 号	1/4MS(B ₅)+NAA0.2 mg/L+KT1.0 mg/L+GA1.0 mg/L
4 号	1/2MS(B ₅)+NAA1.0 mg/L+KT0.2 mg/L+GA0.75 mg/L
5 号	1/2MS(B ₅)+NAA0.2 mg/L+KT0.2 mg/L+GA0.75 mg/L

1.2.3 接种

对带芽茎段和顶芽,先用洗洁精清洗,自来水流水冲洗 1~2 h 后,再用 10 g/L 的升汞溶液浸泡 4~10 min,消毒时间根据外植体而定(红豆杉茎尖及茎段消毒 8~10 min,种子消毒 8~10 min),后用无菌水冲洗 4~6 次。超净工作台上将灭菌后的幼茎切成 0.5 cm 长的茎段,横向接种于装有 25~30 ml 培养基的三角瓶中。

对种子,先将种子浸泡在 30 °C 温水中,作催芽处理(隔 6 h 换 1 次水,浸泡约 48 h)。然后将种子分剥皮与不剥皮 2 种处理,泡在 30 °C 温水中。用洗衣粉水冲洗,然后用洗洁精清洗,自来水流水冲洗 1~2 h。再用 1 g/L 的升汞溶液浸泡 8~10 min,最后用

无菌水冲洗 6~8 次直至干净。在无菌条件下接种到相应的培养基上。35 d 左右统计生长、愈伤组织形成情况。

1.2.4 培养

将接种好的瓶苗置于培养箱中培养,培养温度为 15~30 °C,湿度 50%~80%。光照条件:每天光照时间 12 h,光强 2 000~3 000lx;暗处理,即接种后放置在黑暗中 1~2 周后,再进行正常光照。

2 结果及分析

2.1 消毒时间对红豆杉外植体生长的影响

分别以红豆杉 1 年生枝条茎段、顶芽和种子作为外植体进行培养,分别对各外植体消毒 4、6、8、10 min,从表 2 可看出,不同的消毒时间对红豆杉外植体的生长有很大的影响。一般而言,消毒时间越长,外植体污染率越低,但成活率则各不相同。茎段在消毒 8 min 时外植体的成活率相对最高,成活率达到 36.67%;而顶芽和种子则在消毒 6 min 时,成活率相对最高,分别达到 20.00%和 26.67%。

表 2 消毒时间对红豆杉外植体生长的影响

外植体	消毒时间/min	接种数 /个	污染数 /个	污染率 /%	成活数 /个	成活率 /%
茎段	4	30	27	90.00	1	3.33
	6	30	17	56.67	10	33.33
	8	30	11	36.67	11	36.67
	10	30	10	33.33	6	20.00
顶芽	4	30	24	80.00	1	3.33
	6	30	22	73.33	6	20.00
	8	30	20	66.67	4	13.33
	10	30	19	63.33	4	13.33
种子	4	30	22	73.33	2	6.67
	6	30	19	63.33	8	26.67
	8	30	16	53.33	6	20.00
	10	30	14	46.67	4	13.33

2.2 培养基对红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响

分别将不同红豆杉外植体接种在 2 种不同的培养基上,试验表明,以红豆杉茎段为外植体在 MS 和 B₅ 培养基上都能诱导出愈伤组织,但无论从数量还是愈伤组织形成速度上,B₅ 培养基明显优于 MS 培养基(表 3)。在 2 种培养基上,4 号培养基的激素组合的诱导率明显高于其它各培养基,在 MS 和 B₅ 培养基上的诱导率分别达 50.00%和 63.33%。其次是 2

表3 培养基对红豆杉愈伤组织诱导的影响

培养基	MS			B ₅		
	接种数 /个	萌动数 /个	百分比 /%	接种数 /个	萌动数 /个	百分比 /%
1号	30	2	6.67	30	4	13.33
2号	30	11	36.67	30	17	56.67
3号	30	7	23.33	30	8	26.67
4号	30	15	50.00	30	19	63.33
5号	30	12	40.00	30	13	43.33

号培养基,诱导率分别达到 36.67%和 56.67%。与其它几种培养基相比,1号培养基相对最差,诱导率分

别为 6.67%和 13.33%。从中可以看出,对以红豆杉茎段为外植体的愈伤组织诱导,宜采用 B₅ 培养基,以 B₅+NAA1.0mg/L+KTO.2mg/L+GA0.75mg/L 的激素组合诱导率高,愈伤组织生长良好。

温度影响植物细胞的生长发育速度,是决定细胞生长快慢的主要因素之一。从表 4 可以看出,温度对红豆杉愈伤组织诱导有很大的影响。分别培养在 15、20、25、30℃下的外植体,在 25℃下培养的愈伤组织诱导的萌动数最多,在接种后 30 d、40 d 和 50 d 诱导率分别达 26.6%、36.67%和 40.00%。其次是在 30℃下培养,愈伤组织萌动的速度明显快于 20℃时

表4 温度对红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响

培养温度 /℃	接种数/个	接种后 30 d		接种后 40 d		接种后 50 d	
		萌动数/个	诱导率/%	萌动数/个	诱导率/%	萌动数/个	诱导率/%
15	30	0	0	2	6.67	7	23.33
20	30	2	6.67	6	20.00	10	33.33
25	30	8	26.67	11	36.67	12	40.00
30	30	6	20.00	7	23.33	7	23.33

的培养,在接种后 30 d 基本达到最大值,但由于温度高,培养基易干燥,且污染程度较高。在 15℃下培养,愈伤组织萌动的速度很慢,至接种 50 d 愈伤组织诱导率才能达到 23.33%,从而表明在 15℃下培养,不利于愈伤组织的诱导。

2.4 光照条件对红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响

从表 5 可以看出,光照条件对红豆杉愈伤组织诱导的影响很大。在同一培养基上,经暗处理 2 周的诱导率明显大于光照处理下的诱导率,如在 4 号培养基上,光照处理下和暗处理下的愈伤组织诱导率分别为 23.33%和 63.33%,暗处理下的诱导率几乎是光照处理下诱导率的 3 倍,从而说明在初培的过程中,暗处理(2 周)有利于红豆杉愈伤组织诱导的萌动,暗处理能够促进红豆杉愈伤组织的形成。

表5 光照条件对红豆杉外植体愈伤组织诱导的影响

培养基	接种数/个	光照		暗处理 2 周	
		萌动数/个	百分比/%	萌动数/个	百分比/%
1号	30	2	6.67	4	13.33
2号	30	12	40.00	17	56.67
3号	30	5	16.67	8	26.67
4号	30	7	23.33	19	63.33
5号	30	2	6.67	13	43.33

3 结论与讨论

在植物组培中褐变是常遇到的问题,目前已在很多植物组培中发现有褐变现象,尤以木本植物组培中的褐变最为严重。褐变产物不仅使外植体、细胞、培养基等变褐,而且对许多酶有抑制作用,从而影响培养材料的生长与分化,严重时甚至导致死亡^[9]。究其原因可能是细胞分泌的酚类化合物氧化成醌类物质,对细胞正常生理产生毒害^[8-9]造成的。红豆杉细胞培养时,细胞在脱分化或分化过程中,经常会分泌一些红褐色色素或酚类物质到培养基中去,这是造成红豆杉褐变的主要原因^[8-12]。红豆杉属木本裸子植物,由于其特殊的生物学特性,发生褐变的几率较高,而且即使培养出优良的愈伤组织进行继代或细胞悬浮培养时,不久即继发褐变,细胞随即停止生长,甚至死亡,所以解决褐化问题已是用细胞培养法进行木本植物组培快繁的“瓶颈”问题。本试验在组织诱导愈伤组织过程中同样出现了褐化现象,但不同浓度的激素及种类不同,褐化程度也不同。本试验表明以茎段外植体的污染率很低,产生愈伤组织的时间早,诱导率高,愈伤组织生长速度快,这可能是由于茎段消毒较彻底,营养充足,细胞分裂旺盛的原因。而顶芽污染率也较低,但不易产生愈伤组织,诱导率低,容易长出新叶。茎段与顶芽诱导的最适培养

基为 B₅、NAA、KT 和 GA 激素的组合,均可产生愈伤组织,但茎段和芽相比,茎段的愈伤组织诱导要比顶芽快得多。另外有一部分外植体,从接种后一直不发生变化,还有部分直接死亡,这可能是由于在外植体消毒处理过程中,处理时间太长,破坏组织结构的缘故。从激素调控方面看,生长素与细胞分裂素的比例在 10:1 左右时,能有效促进愈伤组织的形成、生长和缓解褐化。这与甘烦远等^[6]研究的结果基本一致。本试验虽从红豆杉愈伤组织诱导方面得到初步的成果,但从苗木繁育的角度出发,通过组织培养进行快繁的方法还有待于进一步的试验研究。

参考文献:

- [1] 谭一凡. 南方红豆杉种子后熟生理的研究[J]. 中南林学院学报, 1991, 11(12): 200-206.
- [2] 李伯林, 赵群华, 卢山, 等. 红豆杉植物愈伤组织的培养及其紫杉醇形成的初探 [J]. 南京大学学报, 1995, 31(3): 424-429.
- [3] 朱蔚华, 陆俭, 李新胜, 等. 几种红豆杉植物愈伤组织诱导培养的观察[J]. 中药材, 1991, 14(9): 5-7.
- [4] 王水, 贾勇炯, 魏峰. 南方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.
- [5] 郭志刚, 冯莹, 刘瑞芝. 无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调控作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 23-27.
- [6] 甘烦远, 郑光植, 彭丽萍, 等. 云南红豆杉细胞的悬浮培养 [J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 43-46.
- [7] 曹孜义, 刘国民, 王蒂, 等. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 48-49.
- [8] 胡萍, 李淑颖, 元英进, 等. 南方红豆杉细胞悬浮培养条件优化研究[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(4): 30-35.
- [9] 夏铭, 吴绛云, 张丽梅. 红豆杉组织培养中褐变的研究 [J]. 生物技术, 1996, 6(3): 18-20.
- [10] 林岚, 鲁明滤, 洪琦, 等. 植酸对红豆杉细胞悬浮培养影响作用的研究[J]. 生物技术, 1996, 9(6): 11-15.
- [11] 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.
- [12] 罗晓芳, 田硕亭, 姚洪军. 组织培养过程中 PPO 活性和总酚含量的研究[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(1): 92-95.

(上接第 12 页)

- [4] 周纪伦, 郑师章, 杨持. 植物种群生态学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992.
- [5] 董鸣. 缙云山马尾松种群年龄结构动态初步研究[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1987, 11(1): 50-58.
- [6] 胡玉佳, 王寿松. 海南岛热带雨林优势种——青梅种群增长的矩阵模型[J]. 生态学报, 1988, 8(2): 104-110.
- [7] 江洪. 云杉种群生态学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [8] 方炎明, 曹航南, 尤录祥. 鹅掌楸苗期动态生命表[J]. 应用生态学报, 1999, 10(1): 7-10.
- [9] 李先琨, 向悟生, 唐润琴. 濒危植物元宝山冷杉种群生命表分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 9-14.
- [10] 吴承祯, 洪伟. 珍稀濒危植物青钩栲种群数量特征研究[J]. 应用生态学报, 2000, 11(2): 173-176.
- [11] 刘智慧. 四川省缙云山栲树种群结构和动态的初步研究 [J]. 植物生态学与地植物学学报, 1990, 14(2): 120-128.
- [12] 梁士楚. 贵阳喀斯特山地云贵鹅耳枥种群动态研究[J]. 生态学报, 1992, 12(1): 53-60.
- [13] 蔡飞, 宋永昌. 武夷山木荷种群结构和动态的研究[J]. 植物生态学报, 1997, 21(2): 138-148.
- [14] 赵学农, 刘伦辉, 高圣义, 等. 版纳青梅种群结构动态与分布格局[J]. 植物学报, 1993, 35(7): 552-560.
- [15] 王伯荪, 李鸣光, 彭少麟. 植物种群学[M]. 广东: 广州高等教育出版社, 1995.
- [16] 吴承祯, 洪伟, 谢金寿, 等. 珍稀濒危植物长苞铁杉种群生命表分析[J]. 应用生态学报, 2000, 11(3): 333-336.
- [17] 李先琨, 向悟生, 唐润琴. 濒危植物元宝山冷杉种群生命表分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 9-14.
- [18] Bi X L(毕晓丽), Hong W(洪伟), Wu C Z(吴承祯), et al. Life table analysis of *Castanopsis carlesii* population in Wuyishan [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2001, 9(3): 243-247.
- [19] Wu C Z(吴承祯), Hong W(洪伟), Xie J S(谢金寿), et al. Life table analysis of *Tsuga longibracteata* population [J]. Chin J Appl Ecol(应用生态学报), 2000, 11(3): 333-336.