

# 红豆杉组织培养中防褐变措施的研究概述

侯巨梅<sup>①</sup> 叶水英<sup>1</sup> 程仁根<sup>2</sup> 章慧芳<sup>1</sup>

(1、景德镇高专生物与化学工程系,江西 景德镇 333000;2、景德镇良种场,江西 景德镇 333000)

摘要:本文概述了国内外防止红豆杉细胞褐变的研究方法,为今后相关工作提供些借鉴与帮助。

关键词:红豆杉;褐化;措施

中图分类号:S 791.4

文献标识码:B

文章编号:1008-8458(2008)04-0009-02

红豆杉(*Taxus*)是一种生长缓慢的木本植物,由于它的次生代谢物紫杉醇(*Taxo*)具有很好的抗肿瘤活性,目前国际市场对紫杉醇的需求持续增加而红豆杉自然资源很有限,因此通过植物细胞培养生产抗癌新药紫杉醇已是公认的解决紫杉醇药源问题的最佳途径之一<sup>[1]</sup>。但由于红豆杉属植物本身特殊的生物学特性,在培养过程中组织和细胞常发生褐化,进一步发展会导致细胞死亡<sup>[2-4]</sup>。对此,许多研究者均有涉及,但目前尚无简便有效的解决方法,本文对目前国内外防止红豆杉细胞褐变的研究作了比较全面、系统和深入的概述,为更好的防止褐变提供了理论依据。

## 1 选择适当的培养基和培养条件

### 1.1 基本培养基类型

适宜的培养基对减轻褐变的伤害是很有利的。有报道,在TA培养基诱导的愈伤组织状态明显优于B<sub>3</sub>,表现为生长疏松、褐化程度轻<sup>[5]</sup>。用于愈伤组织继代的培养基多采用B<sub>3</sub>、SH、SSS、RW和SHN<sup>[6]</sup>。这几种培养基均可以保持愈伤组织的良好生长,其中以B<sub>3</sub>最好,其他培养基培养一段时间愈伤组织褐化死亡<sup>[7-9]</sup>。但也有研究表明MS作为继代培养基也较好<sup>[10,11]</sup>。而东北矮紫杉则以WPM更适宜<sup>[12]</sup>。

### 1.2 培养基的组成

从对褐变的影响角度来看,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。综合三者的作用可以看出无机盐的浓度越低,褐变强度越低,降低盐浓度可以减少酚类外溢,从而减轻褐变<sup>[1]</sup>。

果糖和葡萄糖能明显抑制PPO的活性,减轻愈伤组织和培养基褐化程度,促进愈伤组织生长。而糖类的浓度一般认为以30g/L较佳<sup>[4]</sup>。

培养基中激素(生长调节物质)的种类、浓度及其组合对褐变起着重要的作用。甘烦远等<sup>[13]</sup>认为,提高生长调节物质浓度(2,4-D提高到1.0-2.5mg/L),能有效促进细胞生长、缓解褐化。在细胞分裂素类中,一般认为6-BA或激动素有刺激多酚

氧化酶(PPO)活性提高、加重褐变的作用。但在红豆杉组培中并非如此,有实验证明:附加激动素KT的组合并未表现褐变,如在南方红豆杉芽愈伤组织诱导和增殖、驯化中添加0.5-1.0mg/L KT对生长更佳<sup>[14]</sup>。6-BA的作用则表现出两重性:一方面,6-BA不适合矮紫杉芽的诱导,明显引起外植体的褐化;另一方面,在南方红豆杉培养中附加0.1-0.5mg/L的6-BA,对愈伤组织生长量的增加、保持质地,尤其是抑制褐化效果明显。赵芳等<sup>[10]</sup>的实验则认为,南方红豆杉愈伤组织继代时,添加GA比使用IAA和NAA褐化严重。ABA在南方红豆杉愈伤组织继代和中国红豆杉细胞培养中都有抑制PPO活性、减轻褐化的作用<sup>[15]</sup>。

培养基pH值影响细胞质膜的渗透性,进而影响细胞对内源物质的运输及多种酶活性和底物的利用率,对细胞褐变有较大的影响,降低pH值可以减轻褐变。

### 1.3 不同培养方式

在红豆杉细胞培养中,几种培养方式褐变程度从小到大的顺序为:纸桥培养 < 液体培养 < 半固体培养 < 固体培养,生长速率与褐变程度成反比<sup>[16,17]</sup>。另外,使用Gellan Gum代替琼脂作为凝固剂,也可以达到抑制愈伤组织发生褐变和促进细胞生长的目的。

### 1.4 培养条件

从培养条件来看,初期的暗培养(两周左右)可在一定程度上减轻褐变程度<sup>[18]</sup>,同时培养温度不宜过高。温度过高可提高PPO活性,加速褐化<sup>[19]</sup>。所以,红豆杉的组织 and 细胞培养的温度不能过高,一般为20-25℃。

## 2 抗氧化剂的应用

抗氧化剂的应用可在一定的程度上减轻褐变<sup>[20]</sup>,在不同的处理中,添加有DTT和CA的培养细胞褐变明显减轻,而且生长速率也很高;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抗褐变的效果最差,细胞的褐变强度几乎与对照(CK)相近;Vc和Cys有一定的抗褐变效果,但不如CA

① 收稿日期:2008-09-15

作者简介:侯巨梅(1979-),女,黑龙江齐齐哈尔人,植物病理学研究生,讲师。

明显。

使用抗氧化剂一般只能在一定时间内抑制褐变,因为一旦抗氧化剂全部被氧化后,褐变可能再度发生,所以在使用中应注意用量不能过小,并应分次持续使用。

### 3 吸附剂的应用

AC 作为吸附剂可以吸附细胞的有毒代谢产物,AC 除了吸附作用外,还能在一定的程度上降低光照强度,从而减轻褐变但 AC 抑制褐变有一个副作用,即在吸附有毒物质的同时,也要吸附培养基中的生长调节剂<sup>[21]</sup>。因此,在加入 1.5% 的活性炭的同时,要提高培养基中激素的水平。作为良好的酚类专一吸附剂,PVP 在对数生长期及以前加入时防褐变和生长情况均比较好,也是良好的吸附剂<sup>[20]</sup>。

### 4 金属离子的应用

金属离子  $Cu^{2+}$  是酚类合成及氧化酶类的组成成分,金属螯合剂为抑制剂,可以把  $Cu^{2+}$  从酶中螯合出来,形成稳定的螯合物,使多酚氧化酶失去活性,  $Cu^{2+}$  的细微增加便可加重褐变<sup>[22]</sup>。金属离子  $Mn^{2+}$  是氧化酶类的辅助因子,  $Mn^{2+}$  对褐变的影响不如  $Cu^{2+}$  明显。植物细胞内源乙烯水平的升高也会加深褐变,  $Ag^+$  可抑制乙烯的增加,  $Ag^+$  在适当的水平可显著抑制褐变<sup>[17]</sup>。

### 5 多酚氧化酶的热激处理

采用 45℃ 热激处理多酚氧化酶 45min,对克服褐变也是有效的,因该酶不耐热,在 45 ~ 50℃ 以上活性迅速下降,40℃ 以下则保持稳定活性<sup>[23]</sup>,但是对组织的活力有较大的损伤。因此使用热激处理方法抑制褐变时,应谨慎选择温度和处理时间,以保证既可减轻褐变,又不造成过重的伤害。

综上所述,有关防止褐变的问题,尽管业内人士作了大量的工作,但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生产紫杉醇的瓶颈问题。我们认为防止褐变应同时综合采用各种方法,从多方面减少褐变的发生或减轻褐变造成的损伤。值得说明的一点是,对红豆杉细胞培养而言,无论采取那种防止褐变的处理措施,都既要考虑到方法的经济实用,又要不能与红豆杉细胞培养目的相矛盾,更不能影响其进一步的增殖和分化,否则防褐变就很难达到既定的目标。

### 参考文献:

[1] 梅兴国,董妍玲,潘学武. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究

[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(4):8~11.

[2] 夏铭,吴锋云,张丽梅等. 红豆杉组织培养中褐变问题的研究[J]. 生物技术,1996,6(3):18~20.

[3] Wickremesinha ERM, ArtecaRN TaXUS callus cultures initiation, growth optimization, characterization and taxoproduction. Plant Cell Tiss Org Cult,1993. 35:181~193.

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

[5] 张宗勤,杨建英,吴耀武. 南方红豆杉组织培养及紫杉醇的产生[J]. 西北植物学报,1998,18(4):488~492.

[6] 庄晓蕾,张秀清,于树宏等. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇的研究进展[J]. 中草药,2000,31(10):794~798.

[7] 罗建平,牛炳福,贾敬芬等. 云南红豆杉培养细胞系的建立[J]. 生物工程学报,1997,13(3):326~330.

[8] 朱红,王吴. 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.

[9] 胡凤庆,任娟. 东北红豆杉细胞悬浮培养研究[J]. 辽宁大学学报,2002,29(3):279~282.

[10] 赵芳,倪良,耿征等. 愈伤组织诱导和培养条件优化[J]. 中草药,1999. 30(3):213~215.

[11] 李景原,王太霞,张晋豫等. 红豆杉愈伤组织诱导及细胞培养的研究[J]. 河南师范大学学报,1997,25(1):104~105.

[12] 王关琳,方宏筠,胡凤庆等. 东北矮紫杉组织、细胞培养及其紫杉醇生成的研究[J]. 中国农业科学,2001,34(4):373~378.

[13] 甘烦远,郑光植,彭丽萍. 云南红豆杉细胞的悬浮培养[J]. 植物生理学报,1997. 23(1):43~45.

[14] 苏有娟,王艇,杨礼香等. 南方红豆杉芽愈伤组织诱导和培养[J]. 中草药,2001. 32(7):637~639.

[15] 黄浩,鲁明波. 红豆杉细胞培养中抗褐变剂的筛选[J]. 华中理工大学学报,1999,4(2):107~108.

[16] 林岚,鲁明波,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):14~15.

[17] Y Kohayashi, H. Fukui, & M. Tabata. Effect of carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures. Plant Cell Reports, 1991, 9(9):496~499.

[18] 盛长忠,王淑芳,王宁宁等. 红豆杉愈伤组织培养的研究[J]. 中草药,2000,31(2):130~132.

[19] 曹孜义,刘国民,王蒂等. 实用植物组织培养技术教程[J]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996. 48~49.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 李冬杰等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J]. 植物生理通讯,2005,2(41):95~98.