

南方红豆杉的愈伤组织培养研究

叶添谋

(韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005)

摘要:以南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu)的营养器官嫩茎、叶和叶柄等为外植体进行愈伤组织诱导研究,试验结果表明:(1)各外植体中诱导愈伤组织的难易程度为叶柄处>叶片>茎段;(2)2,4-D比NAA更有利于愈伤组织的形成;(3)B5比MS培养基更有利于愈伤组织的形成,因此诱导南方红豆杉产生愈伤组织的最佳培养基配方是:B5+2,4-D $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +ABT生根粉 $0.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,愈伤组织的诱导率达93%;(4)继代增殖培养的配方 B5+2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +ABT生根粉 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,增殖系数可达3.6.

关键词:南方红豆杉;外植体;组织培养;愈伤组织

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1007-5348(2008)03-0069-04

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L. K. Fu)是国家一级保护植物,天然条件下繁殖速度和生长速度相当缓慢,种子很难萌发,在我国南方所剩无几.红豆杉是目前世界上最有前途的抗癌药物紫杉醇的原材料,为了保护和开发南方红豆杉,首要任务是解决繁殖难的问题,为了探讨用现代生物技术快速繁殖南方红豆杉,本实验对南方红豆杉进行了较为深入的研究.

1 材料和方法

供试材料采自广东省韶关市乳源县红云镇的天然南方红豆杉自然保护区.选择生长健壮、无病虫害的幼嫩茎段、叶片作外植体.采摘当天即用自来水冲洗15 min,然后在清水中浸泡2 h.在无菌条件下,用75%酒精消毒约30 s,再用0.1%的升汞溶液消毒10 min,无菌水冲洗5次.在超净工作台上将消毒后的茎段分茎中部、近叶柄、叶柄处带一点叶子三部分分别切成0.5 cm左右的小段进行接种.

根据预备实验和前人的经验^[1-3],设计了18种诱导愈伤组织的培养基(表1,2),在预备试验中把ABT生根粉用无菌水溶解后与2,4-D分别加入到培养基中,ABT生根粉浓度范围为 $0.1\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,2,4-D的浓度范围为 $0.1\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.蔗糖2%,琼脂0.7%,pH5.6.每个配方每部分茎段接种10瓶.接种后暗培养2 d后转入光培养,培养温度为 $28\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照1500 lx,光照时间12 h/d,每天进行观察.7 d后计算每个瓶中愈伤组织的生长情况.各个处理重复3次实验,取平均数.

2 结果与分析

2.1 不同外植体的选择

为了确定诱导南方红豆杉产生愈伤组织的最合适的外植体,借鉴前人的配方分别以叶柄、叶片和幼嫩茎段为目标物,采用MS+2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为诱导愈伤培养基进行预备实验^[3-5].结果表明,各个部位的愈伤组织诱导率以叶柄处(带一段叶片)的部分最高,为50%;叶片(折断或者完整)次之,为40%,幼嫩茎段最低,为17%.因此外植体诱导愈伤组织的难易程度为叶柄(带一点叶片)>叶片>幼嫩茎段.

2.2 不同激素配比的选择

在确定了合适的外植体之后,需选择合适的激素配比,试图找出比别人配方更好的效果.以叶柄(有叶片

收稿日期:2007-12-04

作者简介:叶添谋(1972-),男,广东汕尾人,韶关学院英东生物工程学院讲师,在读博士研究生,主要从事植物组织培养、植物天然化学产物工程研究.

残留约 0.2~0.5 mm)为外植体,以前人研究的配方 MS + 2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为对照,设计不同的激素配比,结果如表 1 和表 2,对比这两个表的数据可以看出:表 2 以 B5 作为基本培养基,愈伤组织诱导率平均 41.1%,最高 93%,叶柄和叶片处的愈伤组织见图 2-1、图 2-2.而表 1 以 MS 为基本培养基,最高只有 44.3%,平均只有 20.5%,由此说明南方红豆杉愈伤组织的诱导中 B5 培养基要比 MS 培养基更适合.而且在 B5 培养基中 B5 + 2,4-D $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT 生根粉 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 配方比较适合,其愈伤组织诱导率为 93%.



图 2-1 南方红豆杉叶柄处愈伤组织

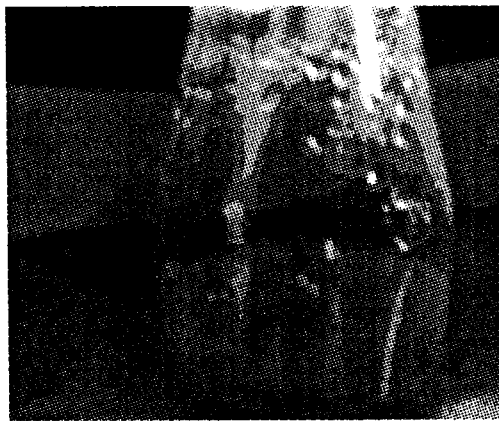


图 2-2 南方红豆杉叶片处的愈伤组织

表 1 以 MS 为培养基不同激素对比对茎段愈伤组织的诱导情况

外植体种类	激素配比		调查茎段/块	愈伤组织/块	愈伤组织诱导率/%
	2,4-D/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	ABT 生根粉/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			
1	对照		30	14.0	47
2	2	0.3	30	6.1	20.3
3	2	0.5	30	4.0	13.3
4	4	0.1	30	5.2	17.3
5	3	0.5	30	13.3	44.3
6		0.5	30	11.3	37.6
7	1		30	6.6	22.0
8	3	0.3	30	8.0	26.6
9	1	0.3	30	4.0	13.3
平均数			30	6.2	20.5

注:“对照”为“MS + 2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ”,以上为重复 3 次的平均数.

实验中观察到在污染培养基的愈伤组织周围普遍出现无菌区域,这很可能与紫杉醇的存在有关,即愈伤组织中的紫杉醇分泌到培养基中从而有效抑制微生物的生长繁殖.愈伤组织在正常生长时是浅黄色较为紧密的结构,生长缓慢,在继代培养时会出现褐化甚至凋亡现象,如果在继代接种时连带少量原培养基,或者继代接种时不切割愈伤组织并且带着原来绿色叶片的外植体转瓶,则继代后愈伤组织不会出现褐化.

研究发现叶柄(带点叶片)最容易诱导出愈伤组织,出现部位是在和培养基接触的表面,少数出现在远离培养基的顶部,但是,叶片折断以后接种,在横断面会出现少量的愈伤组织,其他外植体则不产生愈伤组织,而且很容易褐化.

表2 以B5培养基为不同激素对比对茎段愈伤组织的诱导情况

外植体种类	激素配比		调查茎段/块	愈伤组织/块	愈伤组织诱导率/%
	2,4-D/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	ABT生根粉/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			
1	(对照)		30	15.0	50.0
2	1		30	11.4	38.0
3		0.3	30	8.0	26.6
4		0.4	30	13.8	46.0
5	1	0.5	30	28.0	93.0
6		0.5	30	16.0	53.3
7	2	0.1	30	11.0	36.6
8	1	0.6	30	14.0	46.6
9	3		30	7.0	23.3
平均数			30	11.2	41.1

注:“对照”为“MS + 2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ”,以上为重复3次的平均数。

2.3 南方红豆杉愈伤组织的继代培养(见表3)

表3 南方红豆杉愈伤组织的继代培养情况

继代培养基	用于继代的愈伤组织质量/g	继代一次后成活的愈伤组织的质量/g	愈伤组织增殖系数/倍
B5 + 2,4-D $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.0	2.6	2.6
B5 + 2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT生根粉 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.8	2.9	3.6
B5 + 2,4-D $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.2	2.0	1.7
B5 + 2,4-D $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.1	1.7	1.5
B5 + NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.3	0.5	0.38
B5 + NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.0	0.6	0.6

注:以上为重复三次的平均数。

从表3可以看出,MS + 2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT生根粉 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最高,增殖系数为3.6,凡是加入2,4-D的愈伤的增殖系数均较高,而凡是加入NAA的愈伤的增殖系数较低.把从外植体诱导得到的愈伤组织接种到增殖培养基B5 + 2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT生根粉 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中,大约一个月后愈伤组织继续生长.增殖系数的计算方法是:在接种前先称量整个培养瓶的质量,接入愈伤后再称量,两者之差就是接种的愈伤的质量,增殖一个月后,取出各个培养瓶的愈伤在电子天平进行称量,除以原来的质量就可以得到增殖系数。

3 结论和讨论

3.1 结论

从实验结果中可以得出:(1)南方红豆杉外植体诱导愈伤组织的难易程度为叶柄 > 叶片 > 茎段;(2)诱导南方红豆杉产生愈伤组织的最佳培养基配方是:B5 + 2,4-D $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT生根粉 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 附加物1 ml,诱导率可达93%;(3)B5 + 2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + ABT生根粉 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 适用于红豆杉的继代增殖,为3.6。(4)在诱导南方红豆杉的茎段产生愈伤组织的配方中发现,2,4-D是最有效的。

3.2 讨论

相对于前人的研究,我们的实验取得了新的进展,体现在出愈伤的速度快,诱导率高,已见报道分别是 20~30 d,最高 85%^[3],而本实验结果是出现愈伤 7~10 d,诱导率最高达 93%,找到了快速产生愈伤组织和增值系数比较高的方法.在国内的红豆杉培养中愈伤组织的诱导一般需要二十到三十天^[4,5],用本方法第七天就可以长出愈伤组织,十五天左右愈伤组织的体积就可达 1 cm³,基本上没有褐化,愈伤组织块的结构紧凑,生长状态良好,而且愈伤组织的诱导率大大增加,因此本实验在南方红豆杉的愈伤组织诱导上取得了比较大的突破.至于如何令愈伤组织在短时间内体积有较大的增殖系数和诱导不定芽的问题还有待于进一步研究.

叶柄之所以容易诱导出愈伤组织,这可能与该部位的细胞相对生命力比较强,存在着居间分生组织,细胞显年轻化有关.根据细胞的全能性学说,所有的活细胞都可以脱分化,但是实际上在实践中,幼嫩的生命力强的分生组织,包括居间分生组织比较容易诱导,而较老的组织则较难诱导出愈伤. B5 之所以比 MS 容易诱导出愈伤,可能与大量元素中的氮素和钾盐有关,在 MS 中,这两者的比例都很高,可能不利于愈伤的诱导. 2,4-D 比 NAA 有效,本实验中除了 2,4-D 以外,起着重要作用的还有 ABT 生根粉,本来它是用来生根的,但是我们在预备实验中发现它能够大大促进南方红豆杉愈伤的快速出现,至于其中的机理有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] 刘铁燕,刘昀,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.
- [2] 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:自然科学版,2001,34(4):25-26.
- [3] 何康,樊正球. 南方红豆杉组织培养研究进展[J]. 中国生态农业学报,2007,15(5):215-218.
- [4] 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.
- [5] 李健,宋晓平. 正交试验优选南方红豆杉外植体的消毒方案[J]. 林业实用技术,2006,9:14-15.

Research on the tissue culture of *Taxus (chinensis var. mairei)*

YE Tian-mou

(Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong, China)

Abstract: In this experiment, various explants - tender shoots, leaves and stalk derived from the *Taxus (chinensis var. mairei)* Cheng et L. K. Fu) had been used to induce the callus. The result showed that: (1) for inducing the callus, the optimized tissue were the leaves stalks, secondly were the leaves, finally the egments of tender shoots; (2) the optimum forum for inducing callus was: B5 + 2,4-D 4.0 mg·L⁻¹ + ABT 0.3 mg·L⁻¹. (3) B5 cultural medium was more effective than MS; (4) for subculture, B5 + 2,4-D 0.1 + ABT 0.1 mg·L⁻¹ could increase the propagational coefficient by 3.6.

Key words: *Taxus chinensis var. mairei* Cheng et L. K. Fu; explants; tissue culture; callus

(ED.: X, J)