

# 南方红豆杉的组织培养及植株再生研究

唐道方<sup>1</sup>,刘德华<sup>1</sup>,蒋立文<sup>1</sup>,王树芝<sup>1</sup>,刘黎<sup>1</sup>,向博文<sup>1</sup>,向勤钰<sup>2</sup>,张丽霞<sup>2</sup>

(1.湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128;

2.山东农业大学园艺学院,山东泰安 271018)

**摘要:**以带腋芽的茎段为外植体,研究了南方红豆杉组培增殖和植株再生的条件。结果表明:3月份采集的处于旺盛生长期的嫩枝最适宜腋芽的增殖培养;腋芽萌发及生长的最佳培养基为 DCR + 0.1 mg/L IBA + 0.05 mg/L BA;最佳的生根培养基为 White + 0.2 mg/L IBA。当根长约 0.5 cm 时,移栽至营养钵中,在温度 25 ℃,75%以上湿度下栽培 30 d 左右,逐渐加大光照强度,植株成活率可达 90.1%。

**关键词:**南方红豆杉;组织培养;快速繁殖

**中图分类号:**S188.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-060X(2008)02-0021-03

## Tissue Culture of *Taxus Chinensis* Var. *Mairei*

TANG Dao-fang<sup>1</sup>, LIU De-hua<sup>1</sup>, JIANG Li-wen<sup>1</sup>, WANG Shu-zhi<sup>1</sup>,

LIU Li<sup>1</sup>, XIANG Bo-wen<sup>1</sup>, XIANG Qin-zeng<sup>2</sup>, ZHANG Li-xia<sup>2</sup>

(1. College of Horticultural and Landscape, HNAU, Changsha 410128, PRC;

2. College of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018, PRC)

**Abstract:** The regeneration system of *Taxus chinensis* Var. *Mairei* was studied using stems with axillary buds as explants. The results showed that the optimal explants were young twigs in the growing state. The optimal medium of axillary buds germination and growth was DCR + IBA 0.1 mg/L + BA 0.05 mg/L. The optimal medium of roots was White + IBA 0.2 mg/L. Trans-plant seedlings into pan with nutrition when the length of root was 0.5 cm, temperature 25 ℃, humidity above 75%, gradually increased the intensity of illumination in 30 days, the plant survival rate reached to 90.1%.

**Key words:** *taxus chinensis* Var. *mairei*; tissue culture; rapid propagation

南方红豆杉又名美丽红豆杉,为国家一级保护植物,仅分布于我国西南、西北、华中、华东和华南地区海拔 600~1 200 m 的山地。南方红豆杉体内含有一种抗肿瘤特效成分—紫杉醇,紫杉醇具有抗白血病、黑色素瘤、肺癌、乳腺癌的活性,对卵巢癌、转移性乳腺癌、肺癌、头颈部肿瘤、恶性黑色素瘤、恶性淋巴瘤及食管癌均有良好的疗效<sup>[1-2]</sup>,目前世界上正在开发利用。南方红豆杉的紫杉醇含量在全世界 11 种红豆杉属植物中相对较高<sup>[3]</sup>,具有极高的经济价值。然而,野生南方红豆杉植物资源有限,远远不能满足当今市场的需求量,发展南方红豆杉产业可有效保护野生资源,解决紫杉醇原料短缺问题。利用组培微繁技术生产大量的组培苗可以满足人工栽

培的需求,对进一步研究、开发利用南方红豆杉资源具有重要意义,目前,对南方红豆杉的腋芽增殖培养、植株再生方面的研究不多,本文对南方红豆杉腋芽的快速增殖进行了较为系统的研究,为组培苗工业化生产提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及其处理

供试材料为从芷江侗族自治县引种的南方红豆杉扦插苗枝条。材料采回后,流水冲洗 2 h,每叶剪除 4/5 的叶片,置 75% 乙醇浸泡约 30 s,再用 0.2% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 12 min;无菌水冲洗 4 次,置无菌滤纸上吸去材料表面水分,切取长约 1.0~1.5 cm 带叶柄的茎段作为外植体。培养条件为光照 12 h/d,光照强度 1 500 lx,温度 25 ± 1 ℃。

### 1.2 试验设计

1.2.1 基本培养基的筛选 分别以 B<sub>5</sub>、MS、DCR 和 White 为基本培养基,添加 IBA 0.2 mg/L 和 BA 0.1

收稿日期:2007-11-12

基金项目:湖南省教育厅项目(63020152)

作者简介:唐道方(1981-),男,湖南邵阳人,在读硕士,主要从事药用植物资源开发与利用。

mg/L,筛选出最佳的基本培养基。

**1.2.2 不同激素对腋芽萌动及生长的影响** 在筛选出的基本培养基上,分别添加不同浓度的 IBA、BA 和 GA<sub>3</sub>,共设 21 种培养基(表 1),分析其对腋芽萌动和外植体生长的影响。外植体培养 25 d 后,以叶柄基部出现肉眼可见黄绿色芽头作为芽萌动标准(南方红豆杉腋芽未萌动时,肉眼观察仅有小突起)。

**1.2.3 季节及生理年龄对腋芽萌动的影响** 以处于正在生长的 3、6 月份嫩枝所切取的外植体分别标记为 3A、6A;6 月采集的 2 年生枝条切取的外植体标记为 6B;9 和 12 月停止生长的当年生枝条,切取的外植体分别为 9A 和 12A。

**1.2.4 IBA 对小苗生长的影响** 将试管苗切成长 1.0~1.5 cm 的茎段,分别置于培养基 D13、D14 和 D16 中,培养 35 d,测定小苗平均增长长度(平均增长长度=增长长度总和/培养小苗数),分析其对小苗生长的影响。

**1.2.5 生根培养基的筛选** 以 White 为基本培养基,分别添加 IBA 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L,筛选出适合的生根培养基。

表 1 诱导培养基配方

培养基				培养基			
激素(mg/L)				激素(mg/L)			
编号	IBA	BA	GA <sub>3</sub>	编号	IBA	BA	GA <sub>3</sub>
D1	0.05	-	-	D12	-	0.5	-
D2	0.1	-	-	D13	0.1	0.05	-
D3	0.15	-	-	D14	0.15	0.05	-
D4	0.2	-	-	D15	0.15	0.1	-
D5	0.25	-	-	D16	0.2	0.05	-
D6	0.5	-	-	D17	0.2	0.1	-
D7	-	0.05	-	D18	0.5	0.15	-
D8	-	0.1	-	D19	0.15	0.5	-
D9	-	0.15	-	D20	-	-	0.5
D10	-	0.2	-	D21	0.1	0.05	0.5
D11	-	0.25	-				

## 2 结果与分析

### 2.1 基本培养基对腋芽萌动及生长的影响

外植体 3A 在 B<sub>5</sub>、MS、DCR 和 White 4 种培养基上培养 25 d 的结果如表 2 所示。腋芽萌动率的由大到小顺序为 DCR、MS、B<sub>5</sub>、White; 出芽的时间先后次序为 DCR、MS、B<sub>5</sub>、White。培养 50 d 后,在外植体基部切口处均出现愈伤组织,其中 B<sub>5</sub> 培养基出现愈伤组织及其生长速度最快;MS 和 DCR 培养基次之;White 培养基最慢。在 B<sub>5</sub>、MS 和 DCR 培养基上培养的外植体,芽生长速度较快,但在 B<sub>5</sub> 和 MS 培养基长出的大部分新叶叶尖卷曲,小苗瘦弱。在 DCR 培

培养基上的外植体,展叶正常,枝条健壮。White 培养基上培养的外植体则芽头膨大,生长缓慢,展叶速度最慢。因此,选择 DCR 为最适基本培养基。

表 2 基本培养基对腋芽萌动的影响

基本培养基	无菌外植体数(个)	萌芽外植体数(个)	萌动时间(d)	萌动率(%)
B <sub>5</sub>	23	7	12	30.4
MS	20	15	8	75
DCR	24	19	8	79.2
White	23	5	16	21.7

注:萌动时间为 5 个外植体出现芽萌发时的天数;萌动率=(腋芽已萌发的外植体数/培养的外植体数)×100%

### 2.2 IBA 和 BA 对腋芽萌动及生长的影响

外植体 6A 置于表 1 所示的培养基上培养 25 d 的结果如表 3 所示。培养至第 8 天,腋芽均有萌动,随后外植体基部逐渐形成黄绿色愈伤组织。

表 3 IBA 和 BA 对腋芽萌动的影响

培养基编号	外植体个数	萌芽外植体个数	萌动率(%)	培养基编号	外植体个数	萌芽外植体个数	萌动率(%)
D1	25	18	72	D11	24	8	33.3
D2	25	20	80	D12	20	5	25
D3	25	19	76	D13	35	34	97.1
D4	33	30	90.9	D14	28	26	92.8
D5	26	23	88.5	D15	42	38	90.5
D6	28	25	89.3	D16	34	29	85.3
D7	24	15	62.5	D17	42	36	85.7
D8	25	14	56	D18	28	13	46.4
D9	28	13	46.4	D19	26	12	46.2
D10	25	12	48				

在单独添加 IBA 的培养基中,腋芽萌动率高低顺序是 D4 > D6 > D5 > D2 > D3 > D1,萌动的芽头都能正常伸长生长。单独添加 BA 的培养基,腋芽萌动率高低顺序为 D7 > D8 > D10 > D9 > D11 > D12,培养至第 45 天,只有 D7 和 D8 培养基上萌动的芽头能正常伸长生长,而在 D10、D9、D11、D12 培养基上培养的小苗节间很短,形似白菜状。在添加 BA、IBA 的培养基中,各处理的芽萌动率的高低顺序是 D13 > D14 > D15 > D16 > D17 > D18 > D19。以 D13 的芽萌动率最高,达 97.1%,除 D19 培养基上萌动的芽头不能正常伸长外,其它培养基的芽头都能正常生长。在 D13 培养基培养的外植体多数出现多个腋芽萌动,而且在木质化程度较高的外植体上,形态学上端最上面的 1~2 个腋芽先萌动,而木质化程度较低的外植体,形态学下端的 1~2 个腋芽先萌动。在同一母体上,先萌发的腋芽生长速度较快,后萌发的腋芽生长速度慢。表 3 结果显示,最佳的萌发培养基为 D13:DCR + 0.1 mg/L IBA + 0.05 mg/L BA。

### 2.3 GA<sub>3</sub>对腋芽生长的影响

将在D13培养基上腋芽已萌动的外植体分别转置于D20、D21培养基上培养至第15天,腋芽芽头继续伸长,不展叶,第20天后,出现展叶,但节间很短。说明GA<sub>3</sub>对南方红豆杉的节间伸长可能无促进作用。

### 2.4 不同季节对腋芽萌动的影响

将外植体3A、6A、9A和12A分别置于D13培养基上培养,结果如表4所示,腋芽萌动率高低及萌动快慢顺序均为3月>6月>9月>12月。

表4 不同季节对腋芽萌动的影响

外植体编号	外植体个数	萌芽外植体个数	萌动率(%)	萌动时间(d)
3A	48	47	97.9	7
6A	35	34	97.1	8
9A	32	28	87.5	13
12A	36	20	55.6	16

### 2.5 外植体生理年龄对腋芽萌动的影响

外植体6A、6B置于D13培养基上培养,结果如表5所示。外植体6B的芽萌动率明显低于外植体6A,芽萌动滞后2d左右,表明处于旺盛生长期的嫩枝是腋芽增殖培养的最佳外植体。

表5 外植体生理年龄对腋芽萌动的影响

外植体编号	外植体数(个)	萌芽外植体(个)	萌动率(%)	萌动时间(d)
6A	32	30	93.8	8
6B	24	20	83.3	10

### 2.6 不同浓度的IBA对小苗生长的影响

小苗在D13、D14、D16培养基上培养35d后,结果如表6所示。D13培养基上小苗生长速度最快,小苗平均增长长度达2.3cm。在D14、D16培养基上小苗生长较慢,平均增长长度分别为1.9cm和1.6cm。因此,选择D13为最佳的生长培养基,即DCR+0.1mg/L IBA+0.05mg/L BA。

表6 不同浓度的IBA对小苗生长的影响

培养基编号	小苗数(个)	增长长度总和(cm)	平均增长长度(cm)
D13	30	69	2.3
D14	30	57	1.9
D16	30	48	1.6

### 2.7 生根培养及移栽

将高约3cm、生长健壮、半木质化的小枝切下,

转入生根培养基上培养50d,在添加IBA 0.1mg/L和IBA 0.2mg/L的生根培养基上,其发根率分别为65.3%和85.1%,因此选择White+0.2mg/L IBA为最适生根培养基。在根长约0.5cm时,移栽至营养钵中,在温度25℃、75%以上湿度下栽培30d左右,逐渐加大光照强度,植株成活率可达90.1%。

## 3 结论与讨论

DCR培养基是南方红豆杉茎段培养最适的培养基。在本研究中,DCR培养基培养的外植体,芽萌动率高,小苗健壮,展叶正常;而在B<sub>5</sub>、MS和White培养基上培养的外植体芽萌动率低,小苗瘦弱,大部分叶片不能正常展开,当转入DCR培养基上培养,仍能恢复正常生长发育,与张秀清等的研究结果一致<sup>[4]</sup>,可能与培养基中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和肌醇含量有关。在培养基中同时添加IBA和BA有利于腋芽的萌动及生长。一般认为,生长素和细胞分裂素的浓度是器官分化和植株生长的重要条件<sup>[5]</sup>。在本研究中,DCR+IBA 0.1mg/L+BA 0.05mg/L培养基培养的外植体,腋芽萌动率最高,达97.1%,并在同一外植体上出现多个腋芽萌发,小苗健壮,生长速度快。且同时添加IBA和BA的培养基上芽萌动率远高于只添加其中一种激素,说明IBA和BA均有促进芽萌动的作用,二者配合使用,更有利于外植体内的激素代谢平衡。

处于生长活跃期的材料作为外植体,腋芽易萌动。在本研究中,3月和6月份所取的外植体,其腋芽萌动快,萌动率均在90%以上,9月以后取材切取的外植体,腋芽萌动慢,萌动率低;2a生的外植体萌动率更低,萌动所需时间更长,这可能与树体本身的生理状况和芽的休眠深度有关。

南方红豆杉试管苗移栽较易成活,移栽初期注意保湿是成活的关键。

#### 参考文献:

- [1] 赵炳芬,许风岚,刘建明,等.紫杉醇的研究进展[J].中华临床医药,2004,5(6):72-73.
- [2] 陈卫东,刘晓东.抗肿瘤药紫杉醇脂质体的研究进展[J].中国药物与临床,2005,5(10):776-778.
- [3] 汪智慧,李勇,黄建国.南方红豆杉营养特性的研究[J].植物营养与肥料学报,2004,10(1):47-50.
- [4] 张秀清,庄晓蕾,王刚.培养基成分对南方红豆杉细胞生长的影响[J].植物生理学通讯,2001,37(5):421.
- [5] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛.植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J].植物学通报,1999,16(3):238-244.

(责任编辑:张广平)