

南方红豆杉组织培养研究进展*

何 康 樊正球 李 丽 王祥荣**

(复旦大学环境科学与工程系生物多样性与生态工程教育部重点实验室 上海 200433)

摘 要 阐述了组培微繁诱苗过程中不同外植体诱导愈伤组织的效果差别、培养基选取和优化、植物生长调节剂浓度和配比、生理碳源、光条件和小分子添加剂等因素的作用影响;从细胞次生代谢诱导和生物反应器应用两方面总结了细胞悬浮培养生产紫杉醇研究现状。此外,对南方红豆杉组织培养的主要问题和方向进行了探讨和展望。

关键词 南方红豆杉 组织培养 细胞悬浮培养 紫杉醇 生物反应器

Review on *Taxus chinensis* var. *mairei* tissue culture research. HE Kang, FAN Zheng-Qiu, LI Li, WANG Xiang-Rong (Key Lab for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University and Ministry of Agriculture, Shanghai 200433, China), *CJEA*, 2007, 15(5): 215~218

Abstract Progress on *Taxus chinensis* var. *mairei* tissue culture is reviewed in this paper. The paper discusses the effects of explants, culture medium, growth regulator, carbon resources, light condition and small molecular additive on the induction and multiplication of *Taxus chinensis* var. *mairei* callus in tissue culture and suggests optimal alternatives. Paclitaxel production is discussed from the view of cell secondary metabolism and application of bio-reactor to *Taxus chinensis* var. *mairei* cell suspension culture. Finally, the problems and development direction of *Taxus chinensis* var. *mairei* tissue culture research are advanced.

Key words *Taxus chinensis* var. *mairei*, Tissue culture, Cell suspension culture, Paclitax, Bio-reactor

(Received Dec. 15, 2005; revised March 9, 2006)

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)又名美丽红豆杉,为国家一级保护植物,主要分布于我国长江流域、南岭山脉和河南、陕西、甘肃及台湾省等地,多分布在海拔 1000~1200m 以下。南方红豆杉体内含有一种抗肿瘤特效成分——紫杉醇(Paclitaxel),紫杉醇具有独特的微管稳定作用而被广泛用于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、头颈部肿瘤、非小细胞性肿瘤以及类风湿性关节炎的治疗。南方红豆杉体内紫杉醇含量可达 0.02% 甚至更高^[19],具有极高经济价值。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。

目前有关红豆杉的研究主要集中在红豆杉植物的人工种植、化学提取、组织和细胞培养、紫杉醇的合成和化学修饰、生物转化、微生物和基因工程等方面。组织培养技术在红豆杉产业中应用最为广泛,最初始于 20 世纪 80 年代,迄今已有大量文献报道^[1~4,20,21]。红豆杉组织培养技术包括两个层面:一是利用组培微繁技术生产大量的组培苗以满足人工栽培需求;二是通过愈伤组织或细胞悬浮大量培养,直接提取紫杉醇成分并用于药物生产。本文分别对此进行综述,旨在为进一步研究、开发利用南方红豆杉资源提供参考。

1 南方红豆杉的组培微繁育苗

南方红豆杉的种子实生繁殖、扦插育苗和组培微繁技术的根本目的都是快速、大量获得再生植株。相对于另两种常规繁殖技术,组培微繁技术具有繁殖速度快、可控性强、植物材料利用少等突出优点,还可用于脱毒苗繁殖及新品种选育。近年来,众多学者在南方红豆杉组培微繁育苗方面进行了系统研究,并在组培微繁关键技术如光照、温度、pH 调控以及外植体选用和激素配比等方面都取得长足进展。

外植体。南方红豆杉是木本裸子植物,由于其本身所具有的特殊性质,诱导愈伤组织比较困难。通常使用茎和枝条^[1,2,5~8]诱导愈伤组织,但也可利用芽^[3]、叶^[4,5]和成熟种子胚^[9]。因外植体种类、生长情况和

* 复旦大学中青年杰出人才基金项目(EXH1829310)资助

** 通讯作者

收稿日期:2005-12-15 改回日期:2006-03-09

培养条件不同,愈伤组织诱导率和生长速率差异显著。杨礼香等^[7]对芽和茎段进行比较分析发现,在相同培养条件下,芽比茎产生愈伤组织时间早,诱导率高,愈伤组织生长速率快,且污染率低;张宗勤等^[1]发现,与成年植株老枝条相比,幼苗茎段产生愈伤组织时间早,诱导率高;而章国瑛等^[5]研究表明,在 B₅ 培养基上,茎段愈伤组织诱导率高于叶片,但在 MS 培养基上,叶片愈伤组织诱导率高于茎段。总体看来,茎段取材方便、细胞分化能力较强,是南方红豆杉诱导愈伤组织常用外植体。

培养基。合适的培养基对南方红豆杉组织培养至关重要。愈伤组织诱导阶段常用的基本培养基是 MS 培养基^[3,6~8]和 B₅ 培养基^[1,2,5,9,10]。章国瑛等^[5]的研究表明,在黑暗环境下,B₅ 培养基诱导愈伤组织成功率高于 MS 培养基。陈永勤等^[2]把 B₅ 培养基中的烟酸浓度增加到 1.25mg/L,并添加 1.0mg/L 维生素 B₁,诱导愈伤组织成功率达 100%,愈伤组织中 75% 可用于继代培养。邱德有等^[9]利用基于 B₅ 改良的 mB₅ 培养基和 BLG 2/1 培养基成功诱导出胚愈伤组织。在愈伤组织增殖培养阶段,常用的基本培养基是 B₅ 培养基^[2,3,7,10,11]。苏应娟等^[3]发现,B₅ 培养基较 MS 培养基更适合愈伤组织增殖生长。张宗勤等^[2]将 MS 培养基中 NO₃⁻-N 量增加,NH₄⁺-N 量减少而制成的 TA 培养基,获得了细胞疏松、褐化程度轻、体积大、生长情况明显优于 B₅ 培养基的愈伤组织。这表明对 MS 培养基进行改良,同样可获得较好的愈伤组织培养效果。

植物生长调节剂。植物生长调节剂浓度和配比显著影响植物细胞分裂和发育,是组织培养技术的关键。南方红豆杉组织培养中,常用生长素有 2,4-D(2,4-二氯苯氧基乙酸)、NAA(萘乙酸),常用细胞分裂素有 6-BA(6-苄氨基嘌呤)、KT(激动素)。通常将生长素和分裂素配合使用,并根据培养阶段和外植体情况进行浓度配比。在愈伤组织诱导阶段,生长素浓度常高于分裂素浓度。章国瑛等^[5]利用茎段作外植体,在 B₅ 培养基中添加 3.0mg/L NAA 和 0.1mg/L 6-BA,使愈伤组织诱导率达 100%。张宗勤等^[1]认为,2,4-D 本身具有致癌活性,不适合用于作为药源的南方红豆杉组织培养,实验证明适宜浓度的 NAA 可以替代 2,4-D。杨礼香等^[7]使用芽外植体进行实验,发现培养基中添加适宜浓度的 2,4-D 和 NAA 即可使愈伤组织诱导率高达 100%,说明当外植体细胞分裂能力较强时,只需使用细胞生长素即可诱导愈伤组织。KT 的作用比较复杂,0.2%~0.5% 的 KT 会延迟茎段愈伤组织的产生,降低诱导成功率,甚至完全抑制芽外植体产生愈伤组织^[7]。但苏应娟等^[3]认为,低浓度的 KT 对愈伤组织的质地有明显的改善作用。CH(水解酪蛋白)和 GA₃(赤霉素)对南方红豆杉愈伤组织生长也存在影响,但在不同条件下常表现不同。赵芳等^[6]发现,高浓度(1.0~5.0mg/L)的 CH 和 GA₃ 对嫩枝愈伤组织诱导和生长存在不同程度的抑制作用。而用叶外植体时,低浓度的 CH 既能促进愈伤组织的生长,又不影响愈伤组织中紫杉醇的含量,且低浓度的 CH 和 GA₃ 能明显抑制 POD(过氧化物酶)和 PPO(多酚氧化酶)的活性,从而缓解褐化现象,促进愈伤组织良性生长^[10]。

表 1 南方红豆杉组织培养研究情况 *

Tab. 1 Information about tissue culture research of *Taxus chinensis* var. *mairei*

外植体 Explant	培养基 Culture medium	生长调节剂 Growth regulator	愈伤组织 Callus	光条件 Light condition	文 献 Literature
茎段	B ₅	NAA, 6-BA	诱导	暗	[1]
茎段	B ₅	2,4-D, KT	增殖	-	[11]
茎段	改良 B ₅	2,4-D, 6-BA	增殖	-	[2]
茎段	改良 B ₅	2,4-D, 6-BA, CH	诱导	暗	[2]
茎段	MS	2,4-D, 6-BA, NAA	诱导	光照	[6]
茎段	MS	2,4-D, NAA	诱导	暗	[7]
茎段	TA	NAA, 6-BA	增殖	-	[1]
叶片	B ₅	2,4-D, KT	诱导	暗	[10]
叶片	B ₅	2,4-D, KT, CH	增殖	-	[10]
芽	B ₅	2,4-D, NAA, KT	增殖	-	[7]
芽	MS	2,4-D, NAA	诱导	暗	[3]
种子胚	改良 B ₅ BLG2/1	NAA, KT	诱导	暗	[9]

* 表中 - 表示文献中没有注明光条件如何。

生理碳源。在南方红豆杉组织培养中,通常使用蔗糖作为生理碳源,浓度一般为 2%~3%。赵芳等^[6]利用嫩枝外植体,在最佳浓度植物激素组合条件下,分别向 MS 培养基中添加 2% 的蔗糖、果糖和葡萄糖,诱导 60d 后发现在蔗糖作为碳源条件下,愈伤组织诱导率和增重均优于果糖和葡萄糖,表明蔗糖是南方红豆杉组织培养的合适碳源。

光条件。通常条件下,暗培养有利于南方红豆杉愈伤组织的诱导和增殖^[3,5,9,10],但在某些特定条件下,光照反而比黑暗更有利于愈伤组织诱导。赵芳等^[6]在光照条件下对愈伤组织诱导率和生长量进行了比较,发现在光照强度为 1000~1200lx,光照时间为 12h/d 时,MS

培养基和 B₅ 培养基对嫩枝愈伤组织诱导率分别为 98% 和 76%, 褐化发生率分别为 30% 和 85%, 说明在适宜条件下使用 MS 培养基进行南方红豆杉组织培养时, 有光条件能够促进愈伤组织产生, 并减轻褐化现象。

小分子物质。向培养基中适当添加特殊小分子物质如苯丙氨酸、乙酸钠等, 可以改善南方红豆杉愈伤组织的生长情况或形态, 或影响愈伤组织中紫杉醇含量。继 Strobe 等发现苯丙氨酸是紫杉醇的合成前体后, 国内也报道其有利于紫杉醇的生物合成。盛长忠等^[7]在 B₅ 培养基中分别添加低浓度的苯丙氨酸和乙酸钠对南方红豆杉叶片进行愈伤诱导, 发现愈伤组织生长速率变化不大, 但紫杉醇的含量显著增加, 最高含量为对照的 3 倍。根皮苷是一种酚类糖苷, 但可以作为生长调节剂, 促进植物愈伤组织的生长。陈惠等^[12]通过试验证明了根皮苷的这种促进作用对南方红豆杉同样有效。南方红豆杉组织培养研究情况见表 1。

2 南方红豆杉的细胞悬浮培养研究

利用细胞悬浮培养方法提取紫杉醇是近年来南方红豆杉研究的一个重要课题。自 1989 年首次报道细胞培养法生产紫杉醇以来, 各国学者开展了广泛研究, 特别是在紫杉醇生物合成途径及代谢调控、细胞培养动力学、利用生物反应器扩大培养和紫杉醇类物质的分离纯化方面取得了较大进展^[12~16, 20, 22~24]。

2.1 细胞次生代谢诱导

利用细胞培养法生产紫杉醇的一般步骤为: 诱导愈伤组织→愈伤组织继代培养→细胞悬浮培养→扩大细胞培养。通常利用南方红豆杉经 5 次以上愈伤组织继代培养产生的细胞系进行悬浮培养^[11, 14, 20], 悬浮培养媒介通常选用改良液体 B₅ 培养基^[11, 20, 25], 并广泛使用 IAA(吲哚乙酸)、2, 4-D、NAA、6-BA 等植物激素促进细胞生长。目前的研究表明: 向悬浮培养体系添加某些真菌诱导子或生物物质如真菌提取物^[15, 25]、SA(水杨酸)^[25]、MJ(茉莉酸甲酯)^[21]、硝酸银^[12]、丙氨酸、稀土元素化合物 La₂O₃、Tb₂O₃^[26]和 Ce^[13]等, 可有效刺激红豆杉细胞次生代谢启动机制, 促进紫杉醇的合成, 从而提高悬浮培养体系的紫杉醇含量。

2.2 生物反应器的应用

近几年使用生物反应器替代摇瓶进行红豆杉细胞规模培养逐渐成为研究热点^[22, 23, 26], 应用最为广泛的是气升式生物反应器(Airlift bioreactor)和通气搅拌式反应器(Stirred bioreactor)。Alberto 等^[22]发现, 在 20L 气升式生物反应器中, 喜马拉雅红豆杉细胞生长能力强于欧洲红豆杉, 其产生紫杉醇和巴卡亭Ⅲ的能力分别达到 21.04mg/L 和 25.67mg/L。针对生物反应器通常造成细胞生长速率降低的缺点, Wang^[26]发现, 添加 CM 培养基和适当浓度的 MJ, 能够显著促进中国红豆杉在 1L 气升式生物反应器中的细胞生长速度; Pan^[23]分别使用 1.5L 通气搅拌反应器、2.5L 气升式反应器和 1.5L 鼓泡柱式气升反应器(Bubble column bioreactor)对中国红豆杉进行细胞悬浮培养, 发现培养基中乙烯含量是影响细胞生长的主要因素, 当乙烯浓度为 18mg/L 时, 反应器中细胞生长达到最高水平; 而 Yu^[27]报道, 在 10L 通气搅拌式反应器中, 利用两次去磷酸盐培养或 4℃ 低温培养的方法可以加快中国红豆杉细胞生长速度, 培养基中紫杉醇产量最高达 27 mg/L。虽然生物反应器的结构、培养液对细胞的剪切强度及其传质、传热状态、悬浮培养中细胞颗粒的大小和生长速度变化会致使放大过程中植物细胞合成次级代谢物的能力降低^[24], 但总体看来, 利用生物反应器进行细胞培养生产紫杉醇是一个充满希望的方向。遗憾的是, 南方红豆杉的细胞悬浮培养目前仍停留在摇瓶阶段, 利用生物反应器进行培养鲜有报道。如何利用生物反应器进行大规模南方红豆杉细胞悬浮培养是今后的研究重点。

3 问题与展望

目前, 南方红豆杉的组培微繁和细胞培养已经取得了较大进展, 但还存在诸多需要克服的技术性难题, 尤其是愈伤组织褐化控制和植株再生技术是急需解决的关键问题。愈伤组织的褐化控制。与很多木本植物一样, 南方红豆杉的愈伤组织在培养中极易发生褐化现象, 这主要是因为外植体中的多酚氧化酶被激活, 使细胞代谢发生变化^[17]。褐化导致细胞活力降低、增殖生长缓慢甚至死亡, 因而严重影响和阻碍组织培养正常进行。如何减轻和控制培养过程中的褐化问题, 是组织培养关键因素。目前有关南方红豆杉组织培养过程中褐化问题研究并不透彻, 除了选择合适的外植体、培养基和适宜激素组合外, 在培养基中附加一些酚类吸收剂如活性炭或还原剂如抗坏血酸等也可以对褐化起到一定的抑制作用^[6]。但是, 活性炭和抗坏血酸在解决褐化问题上都存在缺点: 活性炭在吸附酚类物质同时, 也会吸附培养基中的无机盐和植物激素, 导致愈伤组织生长营养供给不足, 生长缓慢; 不适当浓度的抗坏血酸则会影响愈伤组织生长。因此, 如何有效控制南方红豆杉愈伤组织褐化, 并同时保证愈伤组织正常甚至加速生长, 是今后必须解决的关键问题。组培

苗生产。组培微繁技术不受气候、土壤和水分等影响,能够实现植物批量生产。同时,通过茎尖诱导产生的脱毒苗进行繁殖,则可以得到不会或极少发生病毒病的植株^[18],对植物的物种保护具有积极意义。利用东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)、云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)、欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)外植体成功培养获得不定根、不定芽或完整再生植株均有报道^[18,28]。然而,目前对南方红豆杉组织培养的研究多处于愈伤组织诱导和增殖阶段,还没有实现真正意义上的植株再生。加快和加强南方红豆杉组培植株再生研究,不仅有利于其物种保护,更为持续提取紫杉醇提供了另外一条有效渠道。南方红豆杉再生植株诱导和培育,是今后需要解决的研究重点之一。

参 考 文 献

- 1 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.西北植物学报,1998,18(4):488~492
- 2 陈永勤,朱蔚华.不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异.中草药,2000,31(3):216~218
- 3 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.中草药,2001,32(7):637~639
- 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.南开大学学报(自然科学版),2001,34(4):120~122
- 5 章国瑛,王 晓,刘 涿,等.南方红豆杉的组织培养和紫杉醇的含量测定.上海中医药杂志,1996(11):43~44
- 6 赵 芳,倪 良,耿 征,等.南方红豆杉组织培养研究. I. 愈伤组织诱导和培养条件优化.中草药,1999,30(3):213~215
- 7 杨礼香,周诗毅.南方红豆杉组织培养和紫杉醇含量测定.华中师范大学学报(自然科学版),2001,35(4):453~455
- 8 张宗勤,罗新谈,王喆之,等.红豆杉的愈伤组织诱导及培养研究(初报).西北植物学报,1996,16(5):16~18
- 9 邱德有,李如玉,李 玲,等.红豆杉及南方红豆杉体细胞胚胎发生的研究.林业科学,1998,34(6):50~54
- 10 盛长忠,王淑芳,王宁宁,等.南方红豆杉愈伤组织培养的研究.中草药,2000,31(2):130~132
- 11 陈 惠,王文科,赵杰宏,等.根皮苷和 GA₃ 对南方红豆杉愈伤组织和细胞悬浮培养物生长的影响.山西师范大学学报(自然科学版),2000,14(4):59~63
- 12 未作君,胡宗定.硝酸银作用下南方红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇动力学研究.化学反应工程与工艺,2000,16(4):313~318
- 13 李景川,马忠海,元英进,等.钾对悬浮培养南方红豆杉细胞可溶性蛋白和紫杉醇合成动态的影响.中国稀土学报,2001,19(20):162~166
- 14 孙彬贤,翁颖琦.代谢中间产物和诱导子对南方红豆杉培养细胞生长和紫杉醇含量的影响.上海中医药大学学报,2000,14(3):54~56
- 15 张长平,李 春,元英进,等.真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞态势及紫杉醇合成的影响.生物工程学报,2001,17(4):436~440
- 16 苏应娟,王 艇,李雪雁,等.稀土元素对南方红豆杉细胞培养及紫杉醇含量的影响.植物生理学通讯,2001,37(5):420~421
- 17 潘瑞炽.植物组织培养.广州:广东高教出版社,2000
- 18 王 水,贾勇炯,魏 峰,等.云南红豆杉的组织培养及植株再生.云南植物研究,1997,19(4):407~410
- 19 Liu G. M., Fang W. S., Qian J. F., et al. Distribution of paclitaxel and its congeners in *Taxus mairei*. Fitoterapia, 2001, 72(7):743~746
- 20 Yuan Y. J., Li C., Hu Z. D., et al. A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxyspru*. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(6):774~778
- 21 Wang Y. D., Yuan Y. J., Wu J. C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19(3):259~265
- 22 Navia-Osorio A., Garden H., Cusido R. M., et al. Taxol R. and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. J. Plant Physiol., 2002, 159(1):97~102
- 23 Pan Z. W., Wang H. Q., Zhong J. J. Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(9):714~723
- 24 Sang-Hyun P., Heung-Bok P., Bong-Kyu S., et al. A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*. Process Biochemistry, 2004, 39(12):1985~1991
- 25 Yuan Ying-jin, Li Chun, Hu Zong-ding, et al. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. Process Biochemistry, 2002, 38(2):193~198
- 26 Wang Zhen-yu, Zhong Jian-jiang. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. Biochemical Engineering Journal, 2002, 12(2):93~97
- 27 Yu Long-jiang, Lan Wen-zhi, Qin Wen-min, et al. High stable production of taxol in elicited synchronous cultures of *Taxus chinensis* cells. Process Biochemistry, 2002, 38(2):207~210
- 28 Zhiri A., Jaziri M., Guo Y., et al. Tissue cultures of *Taxus baccata* as a source of 10-deacetyl baccatin III, a precursor for the hemisynthesis of taxol. Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 1995, 376(10):583~586