

南方红豆杉组织培养育苗试验

叶添谋, 王羽梅

(韶关学院英东生物工程学院农业工程系, 广东 韶关 512005)

摘要:以南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L.K.Fu)的幼叶、幼嫩茎段、花蕾为外植体进行组织培养育苗试验, 结果表明: ①外植体诱导愈伤组织的容易程度为幼嫩茎段 > 幼叶 > 花蕾; ②诱导南方红豆杉产生愈伤组织的最佳培养基配方是: MS + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ③BA、ZT 和 KT 均能诱导愈伤组织分化不定芽, 其中以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT 效果最佳, 诱导率达 58%; ④生根培养阶段, 以附加 NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 0.1% 活性碳的 1/2MS 培养基效果最好, 生根率达 96%; ⑤试管苗移栽在河沙 + 泥炭的基质上, 成活率可达 95%。

关键词: 南方红豆杉; 外植体; 愈伤组织; 诱导; 组织培养

中图分类号: S791.490.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-7351(2008)03-0102-04

Study on the tissue culture of *Taxus chinensis* var. *mairei*

YE Tian-mou, WANG Yu-mei

(Biological Engineering Department, Shaoguan, Guangdong 512005, China)

Abstract: In this experiment, young leaves, tender shoots and blossom buds of *Taxus chinensis* var. *mairei* were used to induce the callus. The result showed that: ① for inducing the callus, the segments of tender shoots were the easiest, secondly were the leaves, finally were the blossom bud; ② the optimum medium for inducing callus was: MS + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2, 4-D $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ③ BA, ZT and KT all could induce the adventitious buds from callus, among which, KT with the concentration of $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was most effective, induced rate accounting for 58%; ④ for inducing the roots, with the additional NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + activated charcoal 0.1% into the 1/2 MS, the rooting rate reached 96%; ⑤ in the river sand mixed with turves, the survival rate of the tube seedlings reached the amount of 95%.

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

南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei* Cheng et L.K.Fu)是提取抗癌药物紫杉醇的原材料^[1], 生长在我国南方, 种子很难萌发, 天然条件下繁殖困难, 生长缓慢。目前其天然林所剩无几, 已经列入国家一级保护植物重点保护。利用现代生物技术繁殖南方红豆杉种苗将为解决其育苗难题提供有效途径, 本试验以南方红豆杉的幼叶、幼嫩茎段、花蕾为外植体, 开展组织培养育苗研究, 旨在寻求南方红豆杉组织培养繁殖的新途径, 为保护和开发南方红豆杉提供优良种苗。

1 材料与方 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、叶片和花蕾作外植体, 用自来水冲洗 15 min, 在无菌条件下, 用 75% 酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 然后将材料切成 0.5 cm 长的小段供接种用。以 MS 为基本培养基, 按不同的激素组成 8 种诱导愈伤组织的培养基、9 种诱导不定芽的培养基; 以 1/2MS 为基本培养基, 按不同的激素组成 3 种诱导不定根的培养基。所有培养基均含蔗糖 3%、琼脂 0.7%, pH 5.6。接种暗培养 2 d 后转入光培养, 培养温度为 28℃, 光照强度为 1 500 lx, 光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 每天进行观察。各个处理重复 3 次, 取平均值。移栽基质采用河砂和泥炭两者单独或者混合使用, 所有基质在装盆前均经太阳曝晒 3~5 d。

收稿日期: 2007-12-25; **修回日期:** 2008-02-15

基金项目: 韶关学院蔬菜学重点学科资金(2005)

作者简介: 叶添谋(1972-), 男, 广东汕尾人, 韶关学院讲师, 在职博士研究生, 从事植物组织培养、天然产物工程研究。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择

为了确定诱导南方红豆杉产生愈伤组织最合适的外植体,以MS为基本培养基,加入2,4-D,观察不同外植体,即叶片、茎段和花蕾出现愈伤组织的情况。结果见表1,从表中可知,幼嫩的茎段最容易诱导出愈伤组织,其诱导率达87.5%,叶片的诱导率相对较低,只有10%,而花蕾基本上没有反应,因此,试验确定幼嫩茎段为最佳外植体。

表1 不同外植体愈伤组织的诱导情况

外植体种类	培养基	调查外植体数/块	愈伤组织数/块	愈伤组织诱导率/%
叶片	MS+2,4-D1.0	40	4	10.0
幼嫩茎段	MS+2,4-D1.0	40	35	87.5
花蕾	MS+2,4-D1.0	40	0	0.0

*:表中激素质量浓度单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下同。

2.2 茎段愈伤组织的诱导

8种培养基配方诱导幼嫩茎段形成愈伤组织的结果见表2。从表2可以看出,配方4的愈伤组织诱导率最高,达到95.0%;其次为配方7,愈伤组织诱导率达87.5%;配方1的最低,为12.5%。凡是加入2,4-D的都明显促进愈伤组织的形成,愈伤组织诱导率较高,BA单独使用,效果不明显,但是和2,4-D配合使用,则可以提高愈伤组织的诱导率,表现出协同效应。试验表明激素的浓度效应明显,使用浓度不可过高,否则会使外植体出现褐化现象。

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系,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。

幼嫩的茎段最容易诱导出愈伤组织,出现部位是在茎和培养液接触的表面,少数出现在远离培养基的茎段顶部。然而,叶片折断以后接种,在横断面会出现少量的愈伤组织,花蕾则不产生愈伤组织,而且很容易褐化。

表2 不同激素对比对茎段愈伤组织的诱导情况

配方序号	培养基和激素配比	调查茎段数/块	愈伤组织数/块	愈伤组织诱导率/%
1	MS+KT 3.0+NAA 0.3	40	5	12.0
2	MS+KT 2.0+NAA 0.3	40	10	25.0
3	MS+KT 1.0+NAA 0.3	40	15	37.5
4	MS+BA 0.5+2,4-D 1.0	40	38	95.0
5	MS+BA 1.0+2,4-D 0.1	40	28	70.0
6	MS+BA 1.5	40	15	37.5
7	MS+2,4-D 1.0	40	35	87.5
8	MS+2,4-D 2.0	40	25	62.5

2.3 不定芽的诱导

当愈伤组织生长继代到一定程度时(继代5次),就进入诱导生芽阶段,分别使用不同的细胞分裂素种类和浓度诱导生芽,结果见表3。由表3可见:BA、KT和ZT都能够诱导南方红豆杉愈伤组织出现不定芽,其中以玉米素($0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的效果最好,诱导丛生芽达到58%以上。

不定芽生长阶段克服出现玻璃苗和弱苗的办法是:增加光照,可以适当用太阳光,或者加入 $5\sim 15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PP333,或者同时在培养基中加入椰子汁,可以有效地培养出壮苗。

表3 不同细胞分裂素对茎段愈伤组织诱导不定芽的情况

配方序号	培养基和细胞分裂激素	被调查愈伤组织数/块	产生不定芽数/块	不定芽诱导率/%
1	MS+KT3.0	50	25	50.0
2	MS+KT2.0	50	10	20.0
3	MS+KT1.0	50	15	30.0
4	MS+BA0.5	50	26	52.0
5	MS+BA1.0	50	25	50.0
6	MS+BA1.5	50	19	38.0
7	MS+ZT0.5	50	25	50.0
8	MS+ZT0.1	50	29	58.0
9	MS+ZT0.01	50	22	44.0

2.4 不定根的诱导

当不定芽生长到约2~3 cm高时,可以诱导不定根,结果如表4所示。在配方2(1/2MS+NAA1.0 mg·L⁻¹+0.1%活性炭)中不定根的诱导情况最好,达96%。

表4 不同配方诱导不定芽产生不定根的情况

配方序号	培养基和激素配比	调查不定芽数/个	产生不定根的芽数/个	不定根诱导率/%
1	1/2MS+NAA 0.2 mg·L ⁻¹ +0.15%活性炭	50	35	70.0
2	1/2MS+NAA1.0 mg·L ⁻¹ +0.1%活性炭	50	48	96.0
3	1/2MS+NAA2.0 mg·L ⁻¹ +0.1%活性炭	50	43	86.0

2.5 试管苗出瓶种植

当不定根生长到一定长度,试管苗大约5 cm高时,可以出瓶种植。首先进行炼苗,把瓶盖打开,在室内培养架上摆放2~3 d后,仔细地把根部的培养基清洗干净,注意不要弄伤幼嫩的不定根。移栽前先准备好基质,基质要经过曝晒,或者用高锰酸钾消毒,或者高温消毒。基质采用河砂、泥炭、河砂+泥炭的试验结果如表5所示,河砂和泥炭混合的效果最好,成活率达95%,这可能与基质中既可透气,又能提供适当的营养有关。

移栽后,在幼苗未长出新根的头30 d内不可施肥,但需保湿,如若基质湿度大,空气湿度高,则不需要淋水保湿,而当基质较为干燥时要及时淋水保湿。当试管苗出瓶种植大约60 d、苗高7 cm左右时,适当使用质量分数不高于0.1%的全价叶面肥,同时注意遮荫,最好放在温室或者大棚中培养,不直接置于室外。

表5 不同基质对南方红豆杉试管苗移栽成活率的影响

基质序号	移栽基质	调查试管苗数/株	成活数/株	成活率/%
1	河砂	100	35	35.0
2	泥炭	100	68	68.0
3	河砂+泥炭	100	95	95.0

3 结论和讨论

试验结果表明:①南方红豆杉外植体诱导愈伤组织的容易程度为幼嫩茎段>幼叶>花蕾;②诱导南方红豆杉产生愈伤组织的最佳培养基配方是:MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹;③BA、ZT和KT均能诱导愈伤组织分化不定芽,其中以0.1 mg·L⁻¹的ZT效果最好,诱导率达58%;④不定根培养阶段,以附加NAA 1.0 mg·L⁻¹+0.1%活性炭的1/2MS培养基效果最好,生根率达96%;⑤试管苗移栽在河砂+泥炭的基质上,成活率可达95%。

在外植体的选择上,以幼嫩的茎段作为外植体完全可以满足愈伤组织诱导的需要,是很好的愈伤诱导材料。但是如果操作不当极易污染,可将消毒过的外植体分成3份,这样可以减少交叉污染的概率,

在接种时把茎段的两端分别切去 0.5 cm,控制好升汞消毒时间大约 8 min,这样可以大大降低污染的概率。要在保持外植体有活力的情况下,最大限度降低污染率。

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,这与前人的经验基本相符^[2-4]。BA单独使用效果不明显,但两者混合使用有协同效应。在本试验中,发现愈伤组织的继代培养比较困难,容易褐化和凋亡,这可能与细胞对培养环境不适应有关^[5,6]。

红豆杉属植物细胞生长过程中,会分泌一些次生代谢产物——棕红色的酚类物质。这种酚类渗出物的积累会造成组织褐化、细胞死亡以及培养基变色。这也是红豆杉细胞生长缓慢的主要原因之一。一些实验室利用在培养基中加入抗氧化剂(Vc, VE, PVP等)、金属螯合剂、吸附剂(活性炭)等方法,抑制或缓解褐变的发生^[4-6]。本试验,在未加任何上述添加物的情况下,经5~6代驯化培养的愈伤组织褐化程度逐渐减弱,培养基中分泌物的颜色也由深红棕色逐渐变淡至几乎没有^[3]。这可能与培养基中激素配比、继代时间,以及试验材料差异有关。

参考文献:

- [1]陈永勤,朱蔚华,吴蕴祺,等.组培条件对云南红豆杉愈伤组织生长和形成紫杉醇的影响[J].中国中药杂志,2000,25(5):269-272.
- [2]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.
- [3]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):120-122.
- [4]Fert Neto A G.Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxaes[J].Bio-Technology, 1992,10(2):1572-1575.
- [5]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.
- [6]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.

(上接第97页)理差异显著。200和50 mg·kg⁻¹GGR-6处理的各项指标较100 mg·kg⁻¹GGR-6处理有所降低,两处理之间在生根时间和平均根长上差异不显著,在生根率和平均生根数上差异显著,但与清水处理各指标仍差异显著。而400 mg·kg⁻¹GGR-6处理的生根效果较差,除较清水处理生根早、生根率高外,平均生根数和平均根长与清水处理差异不显著。

3 小结

对‘大10’果桑进行全光照喷雾嫩枝扦插育苗是可行的。在整个扦插管理过程中,调控水分是该项技术的关键。水分过多,会造成插条的腐烂与脱叶;水分不足,易造成插穗上部所带叶片干枯,影响光合作用,对扦插生根不利。不同浓度GGR-6均可不同程度地提高插穗生根率,其中以100 mg·kg⁻¹GGR-6溶液浸泡60 min扦插效果最好。

表2 不同处理对果桑插穗生根的影响

GGR-6 浓度 /mg·kg ⁻¹	生根时 间/d	生根率 /%	平均生 根数/根	平均根 长/cm
400	32b	72.5c	4.8d	7.6c
200	29c	82.5b	6.8b	10.0b
100	25d	90.0a	7.9a	12.1a
50	30bc	75.0c	5.8c	9.4b
CK(0)	35a	60.0d	4.7d	7.2c

*:生根率先作 arcsinx^{1/2}转换再进行方差分析;表中数据后的小写字母表示5%水平差异显著性。

参考文献:

- [1]陈乐阳,郭文军,陈芳明.叶果兼用桑“大10”的经济性状和栽培技术[J].蚕桑通报,1998,29(4):38-39.
- [2]杨今后,杨新华,郭文军,等.果桑品种“大10”的引种与栽培[J].蚕桑通报,2001,32(4):12-15.
- [3]李志花.果桑“大十”的生物学特性及栽培技术初探[J].蚕学通讯,2007,27(1):23-24.
- [4]张彦欣,于然龙.小樱桃全光照弥雾扦插育苗技术[J].山西果树,2003(2):46.