

## 杀虫植物组织培养的研究进展

谢植干<sup>1</sup>, 曾涛<sup>2\*</sup>, 曾宪儒<sup>2</sup> (1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 广西农业科学院植物保护研究所, 广西南宁 530007)

**摘要** 植物杀虫剂由于其自身不足等原因, 使其利用发展缓慢, 利用植物组织细胞培养技术是解决该问题的重要途径。论述了杀虫植物的离体快繁、杀虫植物细胞培养技术的优缺点及调控技术的应用。

**关键词** 杀虫植物; 组织培养; 细胞培养; 研究进展

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)09-03548-03

### Research Progress in the Pesticide Plant through Tissue Culture

XIE Zhi-gan et al (College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

**Abstract** The development of plant pesticide was slow because of the shortcomings of botanical pesticide. The plant cell culture technology solution was an important way to promote its development. The pesticide plant propagation in vitro, advantages and disadvantages of the pesticide plant cell culture technology and the application of control technology were discussed in this paper.

**Key words** Pesticide plant; Tissue culture; Cell culture; Research progress

近年来植物杀虫剂在我国迅速崛起, 正成为生物农药市场上一支重要力量。但目前国内外对植物杀虫剂的利用却发展缓慢, 主要是由植物杀虫剂自身的一些不足所决定的。一是植物杀虫剂一般是缓效型药剂, 不像化学农药属即杀型, 农民难于接受; 二是植物杀虫剂的有效成分含量往往很低, 且结构复杂, 造成生产成本较高, 给市场推广造成一定难度; 三是植物有效成分含量往往因产地、季节、气候等因素影响而不同, 造成难于标准化生产; 四是植物资源有限, 特别是对需要采掘种子的杀虫植物, 还可能对当地的生态环境造成一定影响, 这也限制了植物杀虫剂的发展。因此, 加强对杀虫植物的深入研究和利用植物组织细胞培养技术及生物技术, 是解决上述问题的重要途径。

### 1 我国杀虫植物资源和生产应用情况

地球上植物农药资源十分丰富, 据统计, 当今世界至少有 25 万种不同植物, 有毒植物种类约占植物种类总数的 4%, 而在化学性质上进行过调查研究的仅占 10%。Ahmed 等于 1985 年就报道了全世界共有 1 600 种具有控制有害生物性质的植物, 其中具有杀虫活性的植物 1 005 种, 而能引起昆虫拒食、忌避、麻痹、生长阻滞及抑制种群繁殖的特异性杀虫植物达 700 多种<sup>[1]</sup>。中国植物资源十分丰富, 有毒植物就有上千种, 《中国有毒植物》一书列入有毒植物 1 300 余种, 其中许多种类具有杀虫(菌)作用或已被作为植物性农药利用。我国农药植物主要分布于南方各省区, 以云南、四川、湖南、江西、广东、广西、福建、海南及台湾等省区拥有种类最多<sup>[2]</sup>。20 世纪 30 年代以来, 对杀虫植物烟草、鱼藤、厚果鸡血藤、羊角扭、闹羊花、巴豆、雷公藤、昆明山海棠、博落回、百部等都进行过比较广泛的研究。

我国是研究和应用杀虫植物最早的国家, 进入 20 世纪 80 年代后, 中国对杀虫植物的研究进入一个新的发展阶段, 在某些方面已接近或达到了国际先进水平。华南农业大学、西北农林科技大学和有关单位协作, 在主要研究楝科植物的基础上, 先后曾对分属于 30 余科的 500 多种植物, 以 20 多种

农业害虫为试虫进行了忌避、拒食、内吸、触杀及抑制生长发育等方面的一系列室内及田间试验, 发现了一批有希望作为杀虫植物的品种, 取得了可喜的成果<sup>[3]</sup>。目前, 国外研究较多的有印楝、番荔枝、巴婆、万寿菊等农药植物, 其中最成功的当属印楝。而我国主要集中在楝科、豆科、卫矛科、柏科、菊科等科属植物, 其中前三科植物被认为最具开发利用价值。杀虫植物组织培养技术的应用主要包括两个方面: 一是利用快速繁殖技术生产大量优质种苗以满足人工栽培的需要; 二是通过愈伤组织或悬浮细胞的大量培养, 从杀虫植物细胞或组织中直接提取杀虫活性物质或通过生物转化、酶促反应等生产杀虫活性物质。

### 2 杀虫植物的离体快繁

植物离体繁殖的突出优点就是快速, 且材料来源单一, 遗传背景单一, 不受季节和地区等的限制, 重复性好。离体快繁比常规方法快数万倍至百万倍。目前, 在国内外研究杀虫植物组织培养方面, 离体快繁研究较多。Eswara 等将印楝叶培养于含 0.08 mg/L 细胞分裂素(KT)、0.1 mg/L 苄基腺嘌呤(BA)以及 0.6 mg/L 腺嘌呤肌酸盐 MS 培养基上, 最终获得再生植株<sup>[4]</sup>。龚伟等以印楝带芽茎段为外植体, 愈伤组织诱导率为 100%, 30 d 其繁殖系数可达 5~7 倍, 生根率可达 100%, 且根多、整齐, 生根苗移栽成活率在 95% 以上<sup>[5]</sup>。Sujatha 等进行苦楝微繁殖时, 使用等级低、价格便宜的琼脂、蔗糖, 减少诱根的程序, 直接把没有根的幼芽移栽到土壤中, 同样获得再生植株, 这比种子获取苗更为经济、有效<sup>[6]</sup>。刺果番荔枝、苦皮藤、烟草等杀虫植物均有离体快繁的研究报道。

### 3 杀虫植物的细胞培养

**3.1 植物组织培养获得杀虫活性物质的优点** 直接利用成熟的植物细胞或组织培养生产植物性杀虫剂较为简便, 是用生物工程法批量生产植物性杀虫剂最有希望的一条途径。利用组织培养技术获得杀虫活性物质的方法比常规途径有许多优点<sup>[7-9]</sup>: ①不受地区、季节、土壤及有害生物的影响。不论北方、南方、冬季、夏季都可生产, 且占地面积少, 便于工厂化生产。②细胞生长的自动控制和代谢过程的合理调节有助于降低成本和提高生长率。利用人工控制和调节, 可获得最大的生长量和合成有用次生代谢物的最大产量。③便于筛选高产细胞株; 利于生物转化, 寻找新的有效药物成分。

**基金项目** 广西区科技攻关项目(桂科基 063927)。

**作者简介** 谢植干(1982-), 男, 广西南宁人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫病理及农药应用技术。\* 通讯作者, 博士, 研究员, E-mail: zengtao63@126.com。

**收稿日期** 2008-02-22

对植物进行单细胞培养、辐射等手段,可能筛选出生长迅速、合成能力强的细胞系,且利于寻找新的有效药物成分。④个体差异小,实验周期短,设备简单,能节省人力、物力。⑤不需作高度提纯即可以使用,且能提高害虫的杀虫活性。

**3.2 调控技术应用研究** 自 Bonner 报道了银胶菊植物组织培养物能产生橡胶以来,利用组织、细胞培养技术生产植物次生产物方面已获得了很大成就。迄今为止,已经研究过的 400 多种植物的细胞培养可以产生超过 600 种的成分,许多重要的药用植物如紫草、人参、黄连、毛地黄、长春花、西洋参等细胞培养都十分成功,有些已实现工业化生产。

细胞培养研究重点是提高植物细胞培养物中的次生代谢产物。影响植物细胞培养次生代谢物产量的因素很多,在杀虫植物方面的研究主要有以下几方面:

**3.2.1 细胞系筛选及培养基优化。**在提高植物细胞培养次生代谢物产率的方法中,最传统的是细胞系筛选以及培养基优化。在细胞系研究方面,Lambert 等报道非洲山毛豆的自营养细胞系比异养细胞系的愈伤组织合成鱼藤酮的能力强,而且光混合营养的愈伤组织主要合成鱼藤酮及其类似物,异养细胞系愈伤组织合成的主要是鱼藤素和灰毛豆素<sup>[10]</sup>。董建新(2003)建立了除虫菊细胞悬浮培养体系,并筛选出高产的细胞悬浮株系。在培养基研究方面,Wewetzer 等研究表明,在蔗糖含量为 15 g/L 培养基中培养的愈伤组织,印楝素的含量是 30 g/L 蔗糖培养基中的 3 倍<sup>[11]</sup>。但有报道,印楝细胞的悬浮培养中含有 30g/L 蔗糖的培养液更有利于印楝素的合成和积累<sup>[12-13]</sup>。吴智鹏等筛选得到了除虫菊细胞悬浮培养的较优改良 MS 培养基,该培养基中碳、氮和磷等元素的浓度分别为 40.60 g/L、85.95 mmol/L 和 0.78 mmol/L;采用该培养基进行除虫菊细胞培养,细胞鲜重较优化前提高 93%<sup>[14]</sup>。

**3.2.2 培养方法的选择。**培养方法对培养细胞中的次生代谢产物的提高有很大影响,常用的培养方法有液体悬浮培养、固定化细胞培养、两步培养法、两相培养法等。液体悬浮培养雷公藤愈伤组织生产速度明显高于固体培养下的组织,其生产最快可达 11.93 g/(L·d),二萜内酯含量高达 6.414 mg/L<sup>[15]</sup>。Pepin 等利用固定化雷公藤细胞产生雷公藤二萜、三萜,研究表明:固定化细胞技术在产物获得方面具有悬浮培养所无法比拟的优点,目前已在 2 L 的反应罐中成功进行了固定化细胞的发酵<sup>[16]</sup>。有些植物细胞的次生代谢物生产与细胞生长并不是同步进行的,而是落后于细胞生长,即在细胞生长末期或结束时才开始累积次生物质,而且,细胞次生物质累积过程中,对培养基中营养元素的要求可能不同于细胞生长时期所需求的营养元素,因而,采用两步培养法较适合这一类植物,可显著提高次生代谢物产量。在黄花蒿细胞培养过程中分两步培养,第一步在含有 0.2~0.4 mg/L 6-BA 和 3~4 mg/L IAA 的  $N_6$  培养基中进行细胞的增殖培养,第二步将培养好的细胞转入含 0.2~0.4 mg/L 6-BA 和 0.2~0.4 mg/L IAA 的改良  $N_6$  培养基中进行青蒿素的合成,青蒿素的合成量为 190  $\mu$ g/L 干细胞左右<sup>[17]</sup>。

**3.2.3 发状根培养技术。**发状根培养技术是生产植物次生物质的一条新途径,是利用土壤中的一种发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染植物叶片组织,在感染过程中,发

根农杆菌质粒 Ri 转移并整合到植物基因中,诱导植物产生发状根<sup>[18]</sup>。Mukundan 等对比了正常根的愈伤组织和用发根农杆菌系 TR105 侵染黄花蒿组织产生的发状根,结果表明,发状根比正常根愈伤组织生长速度快,且生物合成量也高<sup>[19]</sup>。

**3.2.4 代谢调控技术。**在细胞培养过程中,适时适量加入营养物质、前体、引发剂等物质,使代谢向着合成所需目的产物的方向进行,从而获得高出率。这种代谢调控技术成功的关键是明了整个代谢网络,并对其中控制点有清楚的了解。谢建军通过对毛鱼藤离体培养生物合鱼藤酮调控技术进行系统和深入的探讨,添加不同浓度前体物对毛鱼藤愈伤组织合成鱼藤酮能力有明显的影响,100 和 150  $\mu$ g/ml 苯丙氨酸对其合成能力有较大的提高,1 L 培养基鱼藤酮的总产量可达 298.439 和 246.646  $\mu$ g/L,比对照高出近 1 倍<sup>[20]</sup>。

### 3.3 杀虫植物组织培养中存在的问题

**3.3.1 植物细胞生长慢。**在大量培养过程中,细胞生长速度慢必然生长周期长,不仅增加了成本还增加了污染的可能性,是大量培养中的一大问题。故建立具有高而稳定的生长速度的培养系统是非常重要的。

**3.3.2 所需的次生物质含量不高。**据报道,近 50 年来,研究者们对 400 多种植物进行了植物组织和细胞培养技术生产次生代谢物质的研究,从培养物种分离到 600 多种次生代谢物质,其中有近 60 多种在含量上超过或等于原植物<sup>[21]</sup>。但在大多数情况下,培养细胞的次生物质含量不高,其原因也是多方面的。George 等以黄栀子未成熟花的子房为外植体,在含有少量的硝酸盐、磷酸盐的 MS 培养基上,使用激素 IAA (1 mg/L)、KT(1 mg/L)诱导出的黄色愈伤组织含有番红花苷和番红花酸,但其含量低于黄栀子果实中的含量<sup>[22]</sup>。总之,建立所需物质的高含量培养系统是进行细胞大量培养的关键。目前,解决的办法是不断筛选高产细胞株和进行次生代谢物质调控技术的研究。

**3.3.3 缺乏有关理论研究的指导。**比如植物合成有用次生物质的代谢途径,细胞培养物的提取物分析,新的次生物质鉴定,以及相应的生物测定方法等有待进一步深入研究。

### 4 建议与展望

植物源杀虫剂具有高效、低毒或无毒、无污染、选择性强、不使害虫产生抗药性等优点,符合农药从传统的有机化学物质向“环境和谐农药”或“生物合理性农药”转化的发展趋势。利用植物组织培养技术生产大量优质种苗,可以在短时间内满足植物源杀虫剂的原料,是简单、快速的方法。但其也面临着与从自然界中直接获取杀虫活性物质同样的问题,比如植物中有效成分含量不稳定、药效不稳定等问题。而植物细胞培养技术生长次生物质具有明显的优越性,可以弥补利用植物组织培养获得杀虫植物所面临的问题。因此,今后的工作除了进行离体快繁的应用研究外,更应该重视利用植物细胞培养技术生产杀虫活性物质的研究。

目前,利用植物细胞培养技术进行植物次生代谢物质的生长还主要集中在医药制药工业中一些价格高、产量低、需求量的化合物上(紫杉醇、长春碱等),其次是油料(小豆、春黄菊油等)、食品添加剂(生姜等)、调味剂(胡椒等)、饮料

(咖啡、可可等)、树脂(阿拉伯胶等)等,在植物源农药研究与生产中应用还不多。鉴于植物细胞培养技术的各种优越性,今后这方面必将吸引更多科学家和投资者的参与。

综上所述,植物组织及细胞培养对生物种植及生产技术方面是一个突破性进展,在植物繁殖方面开拓了一个广阔的天地,它可以使不易进行有性繁殖的植物经组织培养培育出新苗用于生产;可加速植物的生长,使有用的次生成分达到或超过自然生长的原植物;可逐步地过渡到工业化生产,防止大量的采集而造成环境的破坏。

#### 参考文献

- [1] AHMED S, GRAINGE M. Potential of the neem tree for pest control and rural development[J]. *Economic Botany*, 1986, 40(2): 201-209.
- [2] 江建云. 植物性农药研究进展[J]. *湖南农业科学*, 1991(6): 43-46.
- [3] 康卓. 中国生物源农药产业化进展[J]. *农药*, 2001, 40(3): 4-8.
- [4] EESWARA J P, MORDUE A J, STUCHBURY T, et al. Azadirachtin, salannin and nimbin contents of seeds and callus of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Practice Oriented Results on Use and Production of Neem-Ingredients and Pheromones[M]. Wetzlar, Germany: Proceedings of the 5th Workshop, 1997: 251-261.
- [5] 龚伟, 宫渊波, 胡庭兴, 等. 印楝的组织培养和快速繁殖[J]. *西南农业大学学报: 自然科学版*, 2004, 26(6): 684-692.
- [6] SUJATHA M, CHANDRAN K. A commercially feasible micropropagation method for *Melia azedarach* L. [J]. *Indian Experimental Biology*, 1997, 35 (7): 787-791.
- [7] 郑光植. 药用植物组织培养及其在工业生产上应用研究的进展[J]. *植物生理学通讯*, 1980(4): 1-12.
- [8] 曾鑫年, 谷文祥, 谢建军. 鱼藤酮离体生物合成植物体的选择研究[J]. *热带作物学报*, 1998, 19(s): 74-78.

- [9] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [10] LAMBERT N, TROUSLOT M F, NEF CAMPA C, et al. Production of heterotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(6): 1515-1520.
- [11] WEWETZER A, KLEEBERG H, ZEBITZ C P W. Tissue culture of *Azadirachta indica* (A. Juss) and its potential for the production of azadirachtin. Practice Oriented Results on Use and Production of Neem-ingredients and Pheromones [M]. Wetzlar, Germany: Proceedings of the 5th Workshop, 1997: 243-249.
- [12] 梁军, 魏刚, 吕全, 等. 印楝细胞悬浮培养系的建立及悬浮培养[J]. *林业科学研究*, 2003, 16(5): 568-574.
- [13] 张娟芳, 戚树源, 何梦玲, 等. 几种生理因子对印楝细胞悬浮培养生长的影响[J]. *广西植物*, 2003, 23(6): 549-552.
- [14] 吴智鹏, 冯俊涛, 马志卿, 等. 除虫菊细胞悬浮体系营养条件优化研究[J]. *西北农业学报*, 2006, 15(4): 180-182.
- [15] 尹作鸿, 朱蔚华. 雷公藤愈伤组织悬浮培养的研究[J]. *生物工程学报*, 1992, 8(1): 95-98.
- [16] PEPPIN M, CHAVARIE C, ARCHAMBAULT J. Growth and immobilization of *Tripterygium wilfordii* cultured cells [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 38(11): 1285-1291.
- [17] 李弘剑, 张毅, 郭勇, 等. 黄花蒿培养细胞中青蒿素合成代谢的体外调节[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(3): 479-483.
- [18] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [19] MUKUNDAN U, HJORTISO M A. Thiophene content in normal and transformant root culture of *Tagetes erecta*: a comparison with thiophene content in roots of intact plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1990, 41(232): 1479-1501.
- [20] 谢建军. 毛鱼藤离体培养合成鱼藤酮及其生物活性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2000.
- [21] 孙敬三, 朱至清. 植物细胞工程试验技术[M]. 北京: 化工出版社, 2006.
- [22] GEORGE P S, RAVISHANKAR G A. Induction of crocin and crocetin in callus cultures of *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Food Biotechnology*, 1995, 9(12): 29-38.

(上接第 3512 页)

苗多, 13 d 麻黄幼苗的子叶顶部已开始接触到膜底部, 15 d 麻黄幼苗的子叶因接触到膜底部而被烤黄, 此时揭膜, 并开始记录数据, 观察历时 20 d (表 2)。方差分析表明, 激素处理均有利于提高种子出苗率, 尤其激素 BT 处理的出苗率较对照区高, 且差异显著。

**2.3 激素处理对麻类幼苗根长和成苗率的影响** 自 5 月 5 日起观察其成苗率与根长, 历时 20 d, 麻黄由 2 片子叶到抽出 4~5 基节 (表 3)。方差分析表明: BT 处理的麻黄种子幼苗的根长指标显著高于对照区, GA 处理的幼苗根长好于 CK, 但

不显著。激素处理能提高麻黄成苗率, 且 BT 提高显著。

表 2 激素处理对麻黄种子出苗率的影响

Table 2 Effect of hormone processing on seedling germination

处理 Treatment	播种后不同天数的出苗率/% Seedling germination			
	15 d	20 d	25 d	30 d
GA	8.53	13.27	15.18	13.60
BT	13.41	14.92	22.62*	14.70
CK	8.40	9.45	10.68	9.70

注: \* 表示差异显著。以下同。

Note: \* indicates significant difference. The same as below.

表 3 激素处理对麻黄种子幼苗根长和成苗率的影响

Table 3 Effect of hormone processing on root length of young seedling

处理 Treatment	幼苗根长//cm Root length of young seedling				成苗率/% Seedling survival rate			
	05-05	05-10	05-15	05-20	05-05	05-10	05-15	05-20
GA	6.91	8.29	11.32	13.61	13.60	12.70	12.60	10.24
BT	8.48	10.89	12.63	16.07	14.70	14.10	13.90	13.26*
CK	5.41	7.79	8.38	10.98	9.70	9.00	8.81	7.79

#### 4 讨论

(1) 该试验针对麻黄种子发芽率低的问题, 经激素处理种子, 通过 5 d 的观察, 发现 GA 和 BT 2 种激素均提高了种子发芽率, 尤其是赤霉素较生根粉更能促进种子发芽。

(2) 麻黄种子激素处理技术可显著提高种子的出苗率和成苗率, 对于早春在沙质土壤种植麻黄极为有利。

(3) 由根长观察表明, 麻黄种子激素处理技术可显著提

高麻黄幼苗期的根长, 提高其抗旱性, 从而更适应于保水性、保肥性差的土质, 更利于麻黄栽培的推广。

(4) 在生产中可以运用激素处理, 提高发芽率和集中出苗时间, 提高生产效率。

#### 参考文献

- [1] 郭强. 中药材现代化研究[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 4187.
- [2] 陈润政. 植物生理学[M]. 广州: 中山大学出版社, 1997: 200.
- [3] 中国药材公司. 中国常用中药材[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 810.