

松杉纲裸子植物组织培养研究现状及展望

岳彩鹏¹, 黄进勇¹, 王新建², 何威²

(1. 郑州大学生物工程系, 河南 450001; 2. 河南省林科院, 郑州 450008)

摘要: 我国目前已经开展组织培养研究的松杉纲裸子植物主要集中在红豆杉、三尖杉等个别药用价值高、资源匮乏的药源植物和具有较大经济价值的松科植物。并且对裸子植物组织培养的研究多数仅停留在实验室阶段, 分子生物学与生物工程相结合的研究方法将可能在相关领域获得突破。

关键词: 松杉纲; 裸子植物; 组织培养

中图分类号: S791.24

文献标识码: A

文章编号: 1003-2630 (2006) 03-0019-02

The Present Situation and Prospect of Researches
on the Tissue Culture in *Coniferopsida Gymnosperms*

YUE Cai-peng, HUANG Jin-yong

(Bioengineering department, Zhengzhou university, Henan 450001, China)

Abstract: *Coniferopsida Gymnosperms* have already launched into researches on the tissue culture includes some deficient medicine source plants, such as *taxus* and *cephalotaxaceae* etc. and some *pinaceae* plants with higher economic worth. Some researches on the tissue culture in *gymnosperms* only remain at the stage in the laboratory, the method to combine molecular biology and bioengineering together may make a breakthrough in this research field.

Key words: *Coniferopsida*; *Gymnosperms*; Tissue culture

近年来, 国内外开展起来的裸子植物的离体组织培养研究, 取得了令人瞩目的进展。裸子植物组织培养可为相关树种的无性转化、遗传改良和新基因型树种的形成提供新的方法(齐力旺等, 1997)。目前国内外在裸子植物的组织细胞培养研究方面, 开展较多的树种主要集中在松杉纲的相关树种。

松杉纲是现代裸子植物中数目最多, 经济价值最大, 分布最广的一个类群。我国有6科, 约150种。我国在松杉纲树种中开展组织培养研究较多的有红豆杉科和松科等, 近年来, 杉科、三尖杉科、柏科和南洋杉科等树种的组织培养也逐渐得以开展。

1 红豆杉科 (*Taxaceae*) 裸子植物研究现状

红豆杉科是一类常绿乔木或灌木, 5属约23种, 其中红豆杉属(*Taxus*)全球约有11种, 我国有其中的4种和1变种。20世纪70年代 Wani 首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中提取出紫杉醇(*Taxol*)。1992年美国FDA正式批准紫杉醇作为抗晚期卵巢癌新药上市。自然界中天然红豆杉现存数量很少, 它生长缓慢, 极少成林。红豆杉树皮中紫杉醇含量极低, 仅为0.01%左右。目前全世界每年200kg紫杉醇的消耗量意味着要砍伐100万棵红豆杉。随着紫杉醇应用范围的继续扩大, 其需求量必然会逐年增加。近10年来, 国内外许多大公司的研究机构试图利用生物技术生产紫杉醇。目前, 植物组织细胞培养方法已成为近年来人们所期望的商业化生产的优选方法之一。该方法不仅可以在生物反应器中大规模培养细胞, 而生产出大量紫杉醇, 而且还可以生产出紫杉醇半合成的前体物质, 及其他有抗癌活性的、原植体内不含有的化合物。

国内研究机构对云南红豆杉、南方红豆杉、中国红豆杉和东北红豆杉等组织培养进行了较多研究。经研究, 东北红

豆杉紫杉醇的含量较高, 其根、茎、叶中紫杉醇的含量是云南红豆杉和南方红豆杉相应器官紫杉醇含量的2~5倍(张鸿等, 2000)。利用组织和细胞培养解决药源, 保护和发展资源已经引起国内外学者的广泛关注。表1列出了部分文献对红豆杉植物中东北红豆杉、南方红豆杉和红豆杉三种植物组织培养所选用外植体材料及培养效果。

甘烦远等(1999)、王水等(1997)分别选用当年生嫩枝、针叶片作为外植体在相应的培养基上对云南红豆杉进行愈伤组织的诱导。研究认为不同培养基对云南红豆杉外植体的愈伤组织诱导有不同的效果, 其中以MS培养基为最佳。在MS培养基上添加2, 4-D, 对诱导外植体形成愈伤组织效果较好; 附加一定浓度的NAA、2, 4-D、KT和植物激素, 愈伤组织诱导率达到最高, 其中嫩枝条诱导率达100%, 针叶达78%。因此采用一年生的嫩枝条作为诱导愈伤组织的外植体, 愈伤组织的诱导率较高, 生长亦较快。肖尊安(2000)选用自然生长的成年树当年生成熟枝(9月份取样)作为外植体, 对墨西哥红豆杉进行愈伤组织的诱导。墨西哥红豆杉茎段在接种后2~4周, 即可诱导出白色疏松的愈伤组织。接种后6周, NN69培养基的出愈率最高, 达到67.5%, 高于B5培养基的32.6%。

陈永勤等(2000)对不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异进行了研究, 研究认为愈伤组织形成的迟早和比率在不同种类红豆杉之间和同一种类不同植株之间差异较大。黑暗中添加有0.1mg/L BAP和1.0~3.0mg/L 2, 4-D的B5培养基上, 50%~100%的云南红豆杉、红豆杉、南方红豆杉、杂种红豆杉和春、夏季取样的东北红豆杉的茎段可以形成愈伤组织; 云南红豆杉和红豆杉愈伤组织系的紫杉醇含量普遍比较高, 因此, 这两种红豆杉可作为获得高紫杉醇含量愈伤组织系的外植体源。

可见,我国科学家试图通过植物组织培养方法快速繁殖红豆杉属植物的研究中,培养方法主要集中在愈伤组织再生植株法和少量的嫩芽增殖法(程广有等,1997;苏应娟等,1997)。愈伤组织再生植株法中,再生植株的分化与移栽成活都比较容易,但从愈伤组织分化出芽以及腋芽的萌发较慢,很大程度上影响了快速繁殖的速度。但为无性快速繁殖提供了一种方法,为红豆杉植物的工厂化育苗奠定了基础。嫩芽增殖法由于红豆杉基因型不同,导致此种培养方法可行程度不一致,最后似乎很难培养得到完整小植株。这表明,对红豆杉属植物剪切外植体时供体植株的适宜生理状况还有待进一步研究与确定。

2 三尖杉科 (*Cephalotaxaceae*) 研究现状

三尖杉科植物为常绿乔木或灌木,主产东亚,我国有 7 种;其中,该科植物三尖杉 (*Cephalotaxus fortunei* Hook f.) 是我国特有树种,树皮含的三尖杉脂碱、高三尖杉酯碱和异三尖杉酯碱等酯类生物碱对于急性白血病及恶性淋巴瘤有很好的疗效。国内在 80 年代以来就陆续进行了三尖杉的组织培养。张长河等(1996)从三尖杉当年生嫩茎和未成熟的假种皮诱导出了愈上组织,紫杉醇含量达到细胞干重的

0.00209%;胡之壁等(1995)在三尖杉植物的细胞培养过程中研究了不同接种量、光照、pH 值、碳源、激素及添加物等诸因素对悬浮细胞的影响。

在三尖杉科的其它植物种中,符文英等(2004)最近开展了对海南粗榧 (*Cephalotaxus hainanensis* Li, *Cephalotaxus mannii* Hook f.) 愈伤组织的诱导和培养的相关研究,认为海南粗榧的嫩茎和嫩叶以 0.1% 升汞消毒 12min 的效果最好。外植体在 MS+0.1mg/L 6BA+1mg/L NAA+2 mg/L 2, 4-D+3.0%蔗糖+0.6%卡拉胶 (PH5.8) 培养基中能顺利诱导愈伤组织。液体悬浮和暗培养均有利于愈伤组织的增殖。愈伤组织增殖的最佳培养基为 MS+0.1mg/L KT+3mg/L NAA+3.0%蔗糖 (PH5.8)。最近,我们开展了对三尖杉科另一植物中国粗榧 (*Cephalotaxus sinensis* (Rehd. Et Wile.) Li) 的细胞组织培养研究,已经筛选出能够较好地诱导愈伤组织的培养基体系,但继代培养基配方尚未确定合适的物质组成及比例。

3 松科 (*Pinaceae*) 组织培养研究现状

松科是松杉纲中种类最多,经济意义最重要的一个科。近年来为了开发利用松科植物资源,采用组织培养技术,相

表 1 国内部分研究中红豆杉植物组织培养所选用外植体及培养效果

文献	外植体材料	培养目标及效果
红豆杉 (<i>Taxus cuspidata</i> sieb et zuce)		
于世选 (1994)	叶	愈伤组织诱导率达 56.5%; 叶前部和后部作诱导材料较好; 叶脉方向对诱导率无显著影响
蔡朝辉等 (1995)	嫩茎、幼叶、芽	均能在 2 周内诱导出愈伤组织; 芽愈出率最高达 100%; 叶愈伤组织紫杉醇含量最高可达 0.03%
刘丽萍等 (1998)	幼叶、幼茎	MS 培养基幼叶出愈率高达 78.3%; B ₅ 培养基幼茎出
刘铁燕等 (2002)	幼嫩种子	率 76.0%; 诱导愈伤组织最适 2,4-D 浓度为 2-3mg·l ⁻¹
刘铁燕等 (2002)	幼茎	最高诱导率 86.7%; 愈伤组织最短生长周期 15-18d
南方红豆杉 (<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>)		
章国瑛等 (1996)	茎、叶片	愈伤组织紫杉醇含量达提取后干重的 0.008%
苏应娟等 (2001)	芽	加适宜浓度的 2,4-D 和 NAA, 适于愈伤组织增殖、驯化和紫杉醇积累
红豆杉 (<i>Taxus chinensis</i> (Pilger) Rehd.)		
张宗勤等 (1996)	雄球花、茎段	愈伤组织诱导及生长的适宜培养基为 1/2MS 附加适宜浓度的 2,4-D 和 NAA
孙君等 (2000)	幼茎段	诱导愈伤组织的生长素浓度范围较宽; IAA, IBA, NAA 及 2,4-D 和 6-BA 各种组合均可使外植体 30d 愈伤组织发生率 60% 以上

继开展了松科植物的无性繁殖、遗传改良和新基因型树种的形成和改造等研究。到 90 年代初期,已对 40 多种该科松属树种及品种进行了细胞、组织、器官的培养(邢世岩,1990)。近年来相关研究进展也极为迅速。顾淑荣等(1995)以白皮松 (*Pinus bungeana* Zucc.) 和油松 (*P. Tabulaeformis* Carr.) 的未成熟胚乳,即雌配子体为外植体进行培养,诱导产生了愈伤组织,诱导频率最高达到 25%。经细胞学观察证明,愈伤组织细胞确为单倍性,并在含有 ABA 的原诱导愈伤组织培养基上分化出绿色小芽。

对落叶松属植物的组织培养研究得出,在外植体的选取上幼嫩的组织(如未成熟或成熟的合子胚、雌配子体、子叶、胚轴等)和较成熟的组织(如芽、嫩茎)以及未成熟的针叶簇等均可;且该属植物的组织培养大都或先通过诱导愈伤组织,继而诱导出不定芽或体细胞胚,或经过愈伤组织阶段而直接诱导出不定芽或腋芽,大部分试验能够得到离体苗(祝朋芳等,2000)。如吴克贤等(1996)以长白落叶松的叶芽为外植体,经过诱导、分化和生根,培育出了可用于造林的幼苗。落叶松属树种在诱导外植体分化成苗上已经获得成功,芽苗伸长后也有部分生了根,实现了再生植株的成活。但外植体诱导率尚较低,生根成活率则更低,还无以满足发

展无性系林业的需要,这方面的工作尚需进一步深入实验和研究。

此外该科植物中的濒危种银杉 (*Cathaya argyrophylla* Chun et Kuang),采用成熟种子的剥离胚作为外植体进行离体培养和愈伤组织的诱导也获得了成功。如孙敏(1994)在研究中可使离体培养的成苗率达到 87%。

4 其它科组织培养研究现状

除上述三科以外,学术界近年来也逐步开展了对该纲其它科植物的组织培养研究,如庞惠仙等(2004)和吴代坤(2002)分别对杉科中的软叶杉 (*Cunninghamia lanceolata* cv. *mollifolia*) 和秃杉 (*Taiwania flousiana* Gaussen) 进行了组织培养的尝试研究,选用外植体材料分别为 1-2 年生的茎段和幼树的上部侧枝,但前者成苗率低而后者不能形成完整的根系而最终黄化死亡。柏科植物仅限于圆柏 (*Sabina chinensis*) (辜夕荣等,2000) 和侧柏 (*Platycladus orientalis*) (齐力旺等,1995) 等个别树种,研究主要集中在外植体的筛选和试管苗分化率和成活率的探索上。罗建勋(1997)通过对南洋杉 (*Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco) 组织培养中的腋芽诱导、初步诱导后芽的

(下转第 23 页)

- [5] 韩建民. 抗旱性不同的水稻品种对渗透胁迫的反应及其与渗透调节的关系[J]. 河北农业大学学报, 1990, 13(1): 17~21
- [6] 胡章立. 渗透胁迫对 ABA 及 PMH⁺-ATPase 活性影响. 深圳大学学报(理工版), 2002, 19(1): 54~59
- [7] 郭秀林, 李孟军, 关军锋. PEG 胁迫下小麦幼苗 ABA 与 Ca²⁺/CaM 的关系. 作物学报, 2002, 28(4): 537~540
- [8] 王志琴, 戴国钧, 杨建昌. 水分胁迫对稻茎中碳的运转与淀粉水解酶活性的影响. 江苏农业研究, 2001, 22(3): 1~6
- [9] 洪法水, 董振吉. 干旱胁迫下不同 Ca²⁺浓度对萌发小麦种子某些酶活性的影响. 安徽农业科学, 1994, 22(3): 229~231
- [10] 杨晓玲, 鲁玉哲, 杜香华. 干旱胁迫下新红星苹果叶片一些生理指标的变化. 河北农业技术师范学院学报, 1996, 10(3): 23~26
- [11] 吴诗光, 陈龙, 刘怀攀. 芦苇愈伤组织对渗透胁迫和 ABA 的若干生理响应. 华北农学报, 2001, 15(3): 64~67
- [12] 邵艳军, 李广敏. 水分胁迫对不同抗旱性冬小麦愈伤组织的影响. 华北农学报, 2000, 15(1): 47~52
- [13] 张勇为, 纳海燕, 王大一. 甘薯愈伤组织中的淀粉酶. 植物生理与分子生物学报, 2002, 28(5): 375~378
- [14] Masa-aki ohto, kyoko Nakamura-kito. Induction of expression of genes coding for sporamin and β -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. Plant Physiol. 1992, 99: 422~427

(责任编辑: 王文彬)

(上接第20页)

伸长和增殖以及生根诱导所需要的培养基条件进行筛选和比对, 建立了优化的培养基技术体系, 基本上解决了南洋杉优良单株常规无性繁殖困难的问题, 为下一步使用顶梢作为外植体, 建立快繁系统奠定了技术基础。

5 展望

已经开展起来的松杉纲植物的组织培养多数是与其较高的药用价值和观赏使用价值分不开的。虽然用组织细胞培养来解决这些植物资源在理论上具有吸引力, 在研究中也确实取得了令人满意的成绩, 但在分离稳定细胞系、获得高产等目标化合物或具有完整根系的成活幼苗上有困难。因此, 许多研究仅停留在实验室阶段, 与生产实际应用仍有一定的距离。

另外, 值得提出分子生物学与生物工程研究相结合的潜力不应被忽视, 例如, 组织培养中有关某些药用成分生成的多种关键酶的表达, 或将整个生物合成序列的基因密码转录到微生物或细胞培养系统, 采用生物反应器进行合成等。因此, 要得到高产目标化合物进入产业化, 道路还很艰巨。

参考文献:

- [1] 齐力旺, 韩素英, 杨云龙, 等. 几种裸子植物胚乳愈伤组织的诱导[J]. 应用与环境生物学报, 1997, 3(1): 19~22.1.
- [2] 张鸿, 杨明惠. 国产红豆杉各部位紫杉醇含量分析[J]. 中草药, 2000, 31(6): 434~436.2.
- [3] 于世选. 北红豆杉愈伤组织培养研究 I. 叶片愈伤组织的诱导[J]. 生物技术, 1994, 4(2): 30~32.3.
- [4] 蔡朝晖, 高山林. 东北红豆杉愈伤组织的诱导、生长及紫杉醇含量测定. 药物生物技术, 1995, 2(3): 11~14.4.
- [5] 刘丽萍, 张立莹, 贾景明, 等. 东北红豆杉组织培养的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(4): 302~305.6.
- [6] 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]. 东北师大学报自然科学版, 2002, 34(2): 67~71.7.
- [7] 章国瑛, 王晓, 刘涤, 等. 南方红豆杉的组织培养和紫杉醇的含量测定[J]. 上海中医药杂志, 1996, (11): 43~44.9.
- [8] 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[J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 488~492.10.
- [9] 苏应娟, 王艇, 杨礼香. 南方红豆杉芽愈伤组织的诱导和培养[J]. 中草药, 2001, 32(7): 637~639.13.
- [10] 孙王君, 胡正海. 红豆杉愈伤组织的诱导培养及紫杉醇的产生[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2000, 30(1): 55~59.15.
- [11] 甘烦远, 彭丽萍, 郑光植. 云南红豆杉愈伤组织培养及其生产紫杉醇的研究[J]. 生物工程学报, 1999, (增刊): 308~311.17.
- [12] 王水, 贾勇炯, 魏峰, 等. 云南红豆杉的组织培养及植株再生[J]. 云南植物研究, 1997, 19(4): 407~410.刊: 308~311.18.
- [13] 肖尊安. 墨西哥红豆杉愈伤组织的诱导和器官发生[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 536~537.19.
- [14] 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 不同种类红豆杉愈伤组织的诱导及紫杉醇含量的差异[J]. 中草药, 2000, 31(3): 216~218.20.
- [15] 张长河, 廖衍慧, 罗鹏. 三尖杉的组织培养-紫杉醇来源的新途径[J]. 生物技术, 1996, 6(5): 17~18.21.
- [16] 胡之璧, 周秀佳, 郭济贤, 等. 三尖杉培养细胞中抗癌活性成分的研究[J]. 植物学报, 1995, 37(6): 417~424.22.
- [17] 符文英, 杜道林, 符木均. 海南粗榧愈伤组织的诱导和培养[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 34~36.23.
- [18] 邢世岩. 松属树种细胞、组织、器官培养名录[J]. 植物生理学通讯, 1990, (1): 75~79.24.
- [19] 顾淑荣, 朱至清, 赵敬芳. 白皮松和油松雌配子体愈伤组织的诱导和分化[J]. 植物学报, 1995, 37(3): 217~221.25.
- [20] 祝朋芳, 罗凤霞, 陈长卿, 等. 落叶松属树种的组织培养研究概述[J]. 辽宁农业科学, 2000, (5): 29~32.26.
- [21] 吴克贤, 李伟, 等. 长白落叶松组织培养的研究[J]. 林业科学, 1996, 32(2): 125~133.27.
- [22] 孙敏, 汤绍虎, 陈安和, 等. 银杉成熟胚离体培养及愈伤组织诱导的研究[J]. 西南林学院学报, 1994, 14(3): 155~158.28.
- [23] 庞惠仙, 张光飞, 苏文华. 软叶杉的组织培养与快速繁殖研究[J]. 林业实用技术, 2004, (3): 7~8.29.
- [24] 吴代坤. 秃杉组织培养技术研究[J]. 林业实用技术, 2002, (10): 11~13.30.
- [25] 辜夕容, 石大兴. 圆柏组织培养繁殖研究[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(2): 40~42.31.
- [26] 齐力旺, 杨云龙, 韩素英. 侧柏的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1995, (4): 284~285.32.
- [27] 罗建勋. 南洋杉组织培养与快速繁殖的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(1): 100~102.33.

(责任编辑: 王文彬)