

文章编号: 1001-6880(2006)04-0569-08

植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织培养和紫杉醇合成的影响

杜亚填^{1*}, 陈建华², 许建宇¹, 曹庸¹, 周朴华³

(1. 吉首大学湖南省林产化工工程重点实验室; 2. 吉首大学城乡资源与规划学院, 张家界 427000;

3. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 长沙 410128)

摘要:通过不同种类和水平植物生长调节剂对南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)愈伤组织诱导、生长和紫杉醇合成能力影响的研究发现:诱导培养初期,以无植物生长调节剂的MS为基本培养基,在附加不同植物生长调节剂组合作用下愈伤组织产生的时间和生长、在相同植物生长调节剂组合作用下不同外植体愈伤组织的产生时间和生长均表现出较显著差异,2,4-D/NAA高于0.4时,不利于南方红豆杉愈伤组织的诱导。转换到附加不同植物生长调节剂组合的B5培养基上后,随培养继代次数的增加,生长差异逐渐缩小,直至不显著,表明参考不同文献报道最优配方所设计的各植物生长调节剂组合对南方红豆杉愈伤组织的生长均较适宜,有利南方红豆杉愈伤组织生长的植物生长调节剂优化组合没有唯一性。但不同调节剂组合作用下的同源愈伤组织中、相同调节剂作用下不同源愈伤组织中紫杉醇含量均存在着极显著差异,适当水平(2 mg/L)的2,4-D单用,或与适当水平的KT、6-BA、KT+GA配合使用,对南方红豆杉愈伤组织紫杉醇的合成较有利,NAA则不太有利,幼茎和叶愈伤组织产紫杉醇的水平较其它愈伤组织为高。

关键词:植物生长调节剂;南方红豆杉;紫杉醇;愈伤组织培养

中图分类号:Q813.1+2;Q946.88

文献标识码:A

Influence of Plant Growth Regulator on *Taxus chinensis* var. *mairei* Callus Culture and Biosynthesis of Taxol

DU Ya-tian^{1*}, CHEN Jian-hua², XU Jian-yu¹, CAO Yong¹, ZHOU Pu-hua³

(1. Forest Products Chemical Industry Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Jishou University;

2. Town-village Resource & Program College, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

3. Bioscience & Biotechnology College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To explore the influence of different kinds and concentrations of plant growth regulators on induction, growth and biosynthesis ability of taxol of *Taxus chinensis* var. *mairei* callus, various explants of *T. mairei*, including young stem, young stems bark, cambium, immature needle, apical meristem were respectively inoculated on 8 kinds of callus-induction medium containing MS basal salts and vitamins, 2% sucrose and different kinds of plant growth regulators with different concentrations, and were induced to produce callus and cultured for 3 ages (about 29 day. age⁻¹), then the calluses were respectively transferred on 8 kinds of callus-multiplication medium containing Gamborg B5 basal salts and vitamins, 3% sucrose and different kinds of plant growth regulators with different concentrations. Taxol content of various callus cultures were analysed by HPLC when sub-cultured for two ages (60 day). The result shows: for initial stages of inducing culture, the differences between the time of producing callus and the growth value of callus were significant when the same callus was cultured in different medium containing various regulator combination, or when different callus were cultured on the same medium containing certain regulator combination. The induction rate of *T. mairei* callus would be reduced when the concentration of 2,4-D to the concentration of NAA is higher than 0.4. However, for following frequent subculturing, when these calluses were transferred on 8 kinds B5 callus multi-

收稿日期: 2005-05-27 接受日期: 2005-06-21

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (03JJY5017)

* 通讯作者 Tel: 86-744-8231386; E-mail: duyatian6688@163.com

plication medium, the above differences would be gradually deminished till insignificant. These results suggested that all the regulator combinations in callus-multiplication medium determined based on the optimization directions in reference, were beneficial to the growth of *T. mairei* various callus, i. e. . There are many optimized combinations of plant growth regulator suitable for the growth of *T. mairei* callus. Nevertheless, there were significant difference between taxol content in the calluses, when the same callus was cultured on different medium containing various plant growth regulator combination, or when different callus were cultured on the same medium containing the certain regulator combination. Proper concentration of (2 mg/L) 2, 4-D used independently, or properly supplemented with KT, 6-BA or KT + GA, benefit the biosynthesis of taxol in *T. mairei* callus, but NAA is not. The biosynthesis of taxol in young stem and leaf callus are higher than in other explant calluses.

Key words: plant growth regulator; *Taxus chinensis* var. *mairei*; taxol; callus culture

南方红豆杉 (*Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu. 又称美丽红豆杉) 为红豆杉科 (Taxaceae) 红豆杉属 (*Taxus*) 在中国的 1 个变种^[1], 经研究发现其枝、皮、叶、根和果肉中均含有紫杉醇^[2], 故以其组织和细胞培养生产紫杉醇的研究报道较多, 但未见有关植物生长调节剂种类和水平对其愈伤组织诱导、生长和愈伤组织合成紫杉醇影响的系统研究报道^[3-12]。所以, 我们以其幼茎、较成熟幼茎皮、形成层、幼叶、顶端分生组织为原始诱导材料, 以 MS 附加不同水平和组合的 2, 4-D、NAA、KT、6-BA 为愈伤组织诱导培养基, 以 B₅ 附加不同水平和组合的 2, 4-D、NAA、KT、6-BA、GA 为生产培养基, 结合 HPLC 法检测, 对该方面进行了比较系统的研究, 以探索植物生长调节物质对植物次生代谢的调控作用, 为组织或细胞大量培养工业化生产紫杉醇提供基础。

1 材料与方法

1.1 南方红豆杉愈伤组织诱导、培养

1.1.1 外植体

原始外植体: 南方红豆杉幼茎、较成熟幼茎皮、形成层、幼叶、顶端分生组织均自本室资源收集圃所采南方红豆杉 (1996 年引种于桑植八大公山自然保护区所培育约 7 年生苗) 春梢 (茎皮为绿色) 上获得。

1.1.2 外植体消毒

将野外材料洗净后分剪成较成熟幼茎、嫩枝、带幼叶枝梢三个部分, 然后分别进行表面消毒处理。将带幼叶枝梢先用自来水冲洗干净, 晾干表面水后, 分别用 75% 酒精浸泡 5 s、0.1% HgCl₂ 浸泡 20 min, 无菌水清洗 7 次后备用; 将较成熟幼茎和嫩枝先用自来水冲洗 2 h, 晾干表面水后分别用 75% 酒精浸泡 15 s、0.1% HgCl₂ 浸泡 20 min, 无菌水清洗 7 次后备用。

1.1.3 培养基 (表 1, 表 2)

1.1.4 无菌接种

茎段: 将已经消好毒的幼茎切去其上叶片, 再切成 0.5 cm 长的小段接入诱导培养基中。

较成熟幼茎皮: 将已消好毒的较成熟幼茎用手术刀小心刮去表面栓皮, 后剥取周皮, 将皮切成约 0.5 × 0.5 cm 小块接入诱导培养基中 (注意剥取周皮时不要伤及形成层), 裸茎杆留作削取形成层用。

形成层: 用手术刀小心切削剥皮后裸茎上的表面形成层组织, 然后切成小块接入培养基。

发育未成熟幼叶: 将已消毒带幼叶枝梢上发育未成熟幼叶自叶柄基部切下, 后切成 0.5 cm 长小段接入诱导培养基中。

顶端分生组织: 用尖头镊子从取过幼叶的枝梢顶端挑取顶端分生组织, 接入诱导培养基中。

接种量: 每一个处理接 5 瓶 (5 个重复), 每瓶接 5 块外植体, 共计有 40 组实验、200 个重复、约 1000 个外植体。

1.1.5 培养

暗诱导培养: 温度 25 ± 1 °C、湿度 85% ± 5% 和温度 23 ± 1 °C、湿度 80% ± 5% 条件下各暗培养 12 h 交替进行, 诱导培养 7 d。

弱光诱导培养: 经暗培养 7 d 后, 转为每天白天温度 25 ± 1 °C、湿度 85% ± 5%、光照 1000 ~ 1200 Lx 弱光, 夜晚温度 23 ± 1 °C、湿度 80% ± 5% 黑暗条件下 12 h。

1.1.6 观测记录与数据处理

诱导时间: 外植体接入诱导培养基后每天观察一次, 每个处理 5 个重复中第 1 块外植体长出愈伤组织所需时间即为该处理的愈伤组织诱导时间。计算愈伤组织诱导率的公式:

$$\text{愈伤组织诱导率}(\%) = \frac{\text{产生愈伤组织外植体个数}}{\text{接入外植体个数} - \text{被污染外植体个数}} \times 100\%$$

在继代培养前观察记录愈伤组织的颜色、形状和生长状态。

表 1 愈伤组织诱导培养基

Table 1 Callus-induction medium

Medium number	Base medium	2,4-D mg/L	6-BA mg/L	GA ₃ mg/L	KT mg/L	NAA mg/L	Sucrose g/L	Agar g/L	pH value
MS1 ^[13]	MS	3.0	-	-	-	-	20	8	5.8
MS2 ^[13]	MS	-	-	-	-	3.0	20	8	5.8
MS3 ^[13]	MS	2.0	-	-	-	0.5	20	8	5.8
MS4 ^[13]	MS	0.5	-	-	-	3.0	20	8	5.8
MS5 ^[16]	MS	1.5	-	-	0.5	-	20	8	5.8
MS6 ^[17]	MS	-	-	0.5	0.1	3.0	20	8	5.8
MS7 ^[14]	MS	1.2	2.8	-	-	3.0	20	8	5.8
MS8 ^[14]	MS	1.2	2.8	-	-	4.0	20	8	5.8

表 2 生产培养基

Table 2 Production medium

Medium number	Base medium	2,4-D mg/L	6-BA mg/L	GA ₃ mg/L	KT mg/L	NAA mg/L	CH g/L	Coconut mL/L	Sucrose g/L	Agar g/L	pH value
C ₁ ^[18]	B ₅	2.0	-	-	-	-	-	-	30	8	5.8
C ₂ ^[19]	B ₅	2.0	0.1	-	-	-	1.0	-	30	8	5.8
C ₃ ^[13]	B ₅	2.0	-	-	-	0.5	-	-	30	8	5.8
C ₄ ^[16]	B ₅	2.0	-	-	0.5	-	1.0	100	30	8	5.8
C ₅ ^[13]	B ₅	0.5	-	-	0.5	1.0	-	-	30	8	5.8
C ₆ ^[20]	B ₅	2.0	-	0.5	1.0	-	-	-	30	8	5.8
C ₇ ^[16]	B ₅	1.5	-	-	0.5	-	1.0	100	30	8	5.8
C ₈ ^[17]	B ₅	-	-	-	0.1	3.0	-	-	30	8	5.8

1.2 南方红豆杉愈伤组织增殖继代培养

选取在 8 种诱导培养基(表 1)上诱导、继代培养了 3 代以上、黄绿色、生长旺盛、结构疏松、大小一致的 5 种外植体来源愈伤组织,在无菌条件下转接到 8 种生产增殖培养基(表 2)上进行增殖继代培养,每一个处理接 5 瓶(5 个重复),每瓶接 5 块愈伤组织,共计有 40 组实验、200 个重复、约 1000 块愈伤组织,接入的每块愈伤组织大小基本保持一致。

1.2.1 生产增殖培养

于 25±1℃、湿度 85%±5%,1000 Lx 左右光下 12 h,23±1℃、湿度 80%±5%,黑暗 12 h,连续循环培养 2 代(每代培养 30 d)。

1.2.2 观测记录与数据处理

愈伤组织块直径月平均生长量:经诱导培养基诱导培养所获得愈伤组织继代接入生产增殖培养基后每三天观测一次(共观测 10 次),用直尺量取每块愈伤组织最大方向上的直径 D_{d+2} (mm),5 瓶共 25 块愈伤组织每 3 d 第 3 d 最大方向直径的和为 $\sum D_{d+2}^{25}$,若前一次观测的和为 $\sum D_d^{25}$,则 $\sum D_{d+2}^{25} - \sum D_d^{25}$ 即为当次观测每处理 5 重复 25 块愈伤组织直径 3 d 的总生长量,观测次数为 10 次,每处理每块愈伤

组织直径的月均生长量的公式:

$$\text{月均增长量} = \frac{\sum(\sum D_{d+2}^{25} - \sum D_d^{25})10}{25(\text{或每处理愈伤组织总块数})}(\text{mm})$$

同时观察记录愈伤组织的颜色、形状和生长状态。

1.3 紫杉醇含量检测

1.3.1 材料

将在生产培养基上继代培养了 2 代的愈伤组织按来源和处理不同分别收集冻藏待测。

1.3.2 紫杉醇标准溶液的配制

用十万分之一天平准确称取紫杉醇对照品 2.94 mg,用甲醇(色谱纯)溶解定容至 10 mL 备用。

1.3.3 HPLC 检测^[15-19]

色谱柱:Sciencehome C₁₈(4.60×250 mm,5 μm);流动相:甲醇:乙腈:水(25:35:45,v/v/v);进样量:5 μL(未经处理对照品为 1 μL);灵敏度:0.01 Auf;流速:1 mL/min;柱温:40℃;检测波长:227 nm。

1.4 仪器与试剂

1.4.1 仪器设备

LC-9A 高效液相色谱仪(日本岛津);SPD-6AV 紫外检测器(日本岛津);R-210 薄膜旋转蒸发仪(日

本); UC-55N 恒温水浴(日本); AEL-40SM 十万分之一天平(日本岛津); 冷冻干燥器; FD-230 型红外水分计(日本); 生长室(LPH-300); 无菌操作台(CCV-1311); 高压蒸汽灭菌锅(SM-52); 干热灭菌箱(SG-62); 过滤装置; 萃取装置。

1.4.2 试剂与药品

除 HPLC 检测所用试剂与药品为色谱纯外, 其

余均为分析纯。紫杉醇对照品购于中国药品生物制品检定所。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织诱导培养的影响

2.1.1 对诱导时间的影响(表 3)

表 3 植物生长调节剂对愈伤组织诱导时间的影响

Table 3 Influence of plant growth regulators on the callus induced time

培养基中植物生长调节剂的组合与水平 Concentration of plant growth regulators in medium	愈伤组织诱导所需天数 Callus induced time(day)				
	Young stems	Bark	Cambium	Needle	Apical meristem
MS1: MS + 3 mg/L 2,4-D	13	10	-	6	6
MS2: MS + 3 mg/LNAA	13	14	-	11	8
MS3: MS + 2 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LNAA	13	41	-	11	8
MS4: MS + 0.5 mg/L2,4-D + 3 mg/LNAA	9	9	-	21	7
MS5: MS + 1.5 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LKT	26	19	-	7	4
MS6: MS + 3 mg/LNAA + 0.1 mg/LKT + 0.5 mg/LGA ₃	12	44	-	11	8
MS7: MS + 1.2 mg/L2,4-D + 3 mg/LNAA + 2.8 mg/L6-BA	17	47	-	32	17
MS8: MS + 1.2 mg/L2,4-D + 4 mg/LNAA + 2.8 mg/L6-BA	9	12	-	13	7

结果显示, 植物生长调节剂各组合对南方红豆杉幼茎和较成熟幼茎皮的影响比较一致, 2,4-D 与 NAA 适当的组合较有利二者愈伤组织的快速诱导, 似乎与 2,4-D/NAA 的比值有关, 组合为 2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA(比值为 4)时的明显不如组合为 0.5 mg/L 2,4-D + 3 mg/L NAA(比值约为 0.17), 在有 6-BA 存在时差异更加明显(MS7 与 MS8), 较低的该比值(0.16~0.3)较为有利。较高的 2,4-D(MS1: 3 mg/L)、或较低的 2,4-D(MS5: 1.5 mg/L)适当增补 KT(0.5 mg/L)均较有利于幼叶愈伤组织的诱导, NAA 对幼叶愈伤组织的快速诱导不太适合。顶端

分生组织启动最快, 较低水平的 2,4-D 或 NAA 对其启动更有利, 这可能与其本身的内源生长素水平较高有关。形成层组织在各组合的作用下均未启动, 可能是取材不当所致。总的看来, 2,4-D/NAA 高于 0.4 时(MS7), 不利于南方红豆杉愈伤组织的诱导。

2.1.2 对诱导率的影响(表 4)

结果与 2.1.1 的相接近, 诱导率的结果进一步证明, 2,4-D/NAA 的组合对南方红豆杉愈伤组织的诱导影响较大, 其比率大小应据材料不同而定。3 mg/L 2,4-D 条件下幼茎的诱导率只有 5% 的结果, 是非正常现象, 可能是材料和接种的原因所致。

表 4 植物生长调节物质对诱导率的影响

Table 4 Influence of plant growth regulators on percentage of callus induced

培养基中植物生长调节剂的组合与水平 Concentration of plant growth regulators in medium	愈伤组织诱导率 Percentage of callus induced(%)				
	Stems	Bark	Cambium	Needle	Apical meristem
MS1: MS + 3 mg/L 2,4-D	5.00	100.00	-	93.33	100.00
MS2: MS + 3 mg/LNAA	100.00	0	-	93.33	100.00
MS3: MS + 2 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LNAA	100.00	75.00	-	100.00	100.00
MS4: MS + 0.5 mg/L2,4-D + 3 mg/LNAA	100.00	71.40	-	62.96	100.00
MS5: MS + 1.5 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LKT	100.00	77.78	-	100.00	83.33
MS6: MS + 3 mg/LNAA + 0.1 mg/LKT + 0.5 mg/LGA ₃	100.00	100.0	-	93.33	100.00
MS7: MS + 1.2 mg/L2,4-D + 3 mg/LNAA + 2.8 mg/L6-BA	83.33	0	-	43.43	100.00
MS8: MS + 1.2 mg/L2,4-D + 4 mg/LNAA + 2.8 mg/L6-BA	100.00	100.00	-	86.21	100.00

2.1.3 对愈伤组织生长状况的影响(表5)

表中所示结果与上述诱导率结果基本相对应,

除深褐色外,其它生长状态均为正常。皮和叶愈伤组织的颜色相对偏深。

表5 植物生长调节剂对诱导培养基中各愈伤组织生长状态的影响

Table 5 Influence of plant growth regulators on the growth state of callus on induction medium

培养基 Medium	Young stem apical meristem		愈伤组织种类 Young stem bark(callus)				Needle	
	颜色 Colour	生长状态 Growth state	颜色 Colour	生长状态 Growth state	颜色 Colour	生长状态 Growth state	颜色 Colour	生长状态 Growth state
MS1	黄绿 Olivine	疏松 Friable	浅褐 Beige	疏松 Friable	深褐 Puce	紧密 Tightness	黄绿 Olivine	疏松 Friable
MS2	浅褐 Beige	疏松 Friable	黄绿 Olivine	疏松 Friable	浅褐 Beige	紧密 Tightness	黄绿 Olivine	疏松 Friable
MS3	黄绿 Olivine	疏松 Friable	黄绿 Olivine	疏松 Friable	浅褐 Beige	紧密 Tightness	浅褐 Beige	疏松 Friable
MS4	黄绿 Olivine	疏松 Friable	浅褐 Beige	疏松 Friable	浅褐 Beige	紧密 Tightness	黄绿 Olivine	疏松 Friable
MS5	深褐 Puce	疏松 Friable	浅褐 Beige	疏松 Friable	浅褐 Beige	紧密 Tightness	黄绿 Olivine	疏松 Friable
MS6	黄绿 Olivine	疏松 Friable	浅褐 Beige	疏松 Friable	黄绿 Olivine	紧密 Tightness	黄绿 Olivine	疏松 Friable
MS7	浅褐 Beige	疏松 Friable	-	-	浅褐 Beige	紧密 Tightness	浅褐 Beige	疏松 Friable
MS8	浅褐 Beige	疏松 Friable	浅褐 Beige	疏松 Friable	浅褐 Beige	紧密 Tightness	浅褐 Beige	疏松 Friable

2.2 植物生长调节物质对南方红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇合成量的影响

2.2.1 对愈伤组织生长的影响(表6~8)

结果显示,在生产培养基上培养的第一个月内,植物生长调节剂的作用极显著,如幼茎皮愈伤组织,

其愈伤组织块最大方向直径的月均生长量最高是最低的约10倍,以2,4-D附加适当水平的KT为佳;顶端分生组织的是近18倍,形成层的是5倍多,幼茎和幼叶愈伤组织的差异虽不如上述显著,但最高也是最低的2倍多(表6)。愈伤组织生长状态与其生

表6 植物生长调节物质对生产培养基中愈伤组织生长的影响(第1月)

Table 6 Influence of plant growth regulators on callus growth on production medium (the first month)

培养基中植物生长调节剂的组合与水平 Concentration of plant growth regulators in medium	Every month average growth value of diameter of each callus mass (mm)				
	Young stems bark	Young stem	Callus cambium	Immature needle	Apical meristem
2 mg/L 2,4-D	0.31	1.87	0.33	0.49	0.09
2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA	1.00	2.63	0.23	0.32	0.13
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	0.82	1.49	0.37	0.30	0.25
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT	1.41	3.28	0.31	0.79	0.45
0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT	1.37	3.18	0.49	0.54	0.29
2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KT + 0.5 mg/L GA ₃	0.98	3.38	0.41	0.45	0.27
1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT	3.00	2.31	1.16	0.76	1.58
3 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT	0.92	2.21	0.44	0.71	0.41

表7 植物生长调节物质对生产培养基中愈伤组织生长的影响(第2月)

Table 7 Influence of plant growth regulators on callus growth on production medium (the second month)

培养基中植物生长调节剂的组合与水平 Concentration of plant growth regulators in medium	Every month average growth value of diameter of each callus mass (mm)				
	Young stems bark	Young stem	Callus cambium	Immature needle	Apical meristem
2 mg/L 2,4-D	1.64	2.03	1.30	1.47	1.51
2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA	3.04	2.25	1.60	2.03	1.90
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	2.46	2.21	0.87	1.41	1.31
2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT	2.10	2.46	0.78	1.66	1.77
0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT	1.69	1.90	0.92	1.43	1.25

2 mg/L 2,4-D + 1 mg/LKT + 0.5 mg/LGA	1.35	1.46	0.67	1.47	0.94
1.5 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LKT	2.01	2.61	1.52	2.07	2.14
3 mg/LNAA + 0.1 mg/LKT1.41	1.41	1.90	0.98	1.43	1.34

长量相对应,如幼茎皮愈伤组织在 2 mg/L 2,4-D 和 3 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT 两个组合下的生长量均较低,其愈伤组织的颜色均为深褐色,其它几种也是一样,凡褐色、深褐色愈伤组织的生长量均较低,但少数浅褐色愈伤组织的生长量较高(表 8)。进入增殖继代培养第 2 个月后,所采用植物生长调节剂各组合对各愈伤组织作用间的差异性出现显著缩小的趋势(表 7)。如幼茎皮愈伤组织,最高与最低之间

由原来的 10 倍降到了 2 倍多一点,顶端分生组织由 18 倍也降到了 2 倍多,原 2 倍者则已几乎没有了差异。愈伤组织的生长状态更是如此,经第 2 个月培养后,颜色均接近黄绿色,且生长均较疏散。这与所采用植物生长调节剂组合均参考各文献的优化组合有关,说明对南方红豆杉愈伤组织培养有利的植物生长调节剂组合可能有多种。

表 8 植物生长调节物质对生产培养基中各愈伤组织生长状态的影响(第 1 月)

Table 8 Influence of plant growth regulators on growth state of various callus on production medium(the first month)

培养基 Medium	愈伤组织颜色 Colour of various callus				
	愈伤组织种类 Callus				
	Stems	Bark	Cambium	Needle	Apical meristem
C1	黄绿 Olivine	深褐 Thick brown	深褐 Thick brown	浅褐 Thin brown	深褐 Thick brown
C2	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine
C3	黄绿 Olivine	浅褐 Thin brown	浅褐 Thin brown	褐 Brown	深褐 Thick brown
C4	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine
C5	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	褐 Brown	浅褐 Thin brown
C6	黄绿 Olivine	浅褐 Thin brown	浅褐 Thin brown	褐 Brown	浅褐 Thin brown
C7	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	黄绿 Olivine	浅褐 Thin brown	黄绿 Olivine
C8	黄绿 Olivine	褐 Brown	深褐 Thick brown	浅褐 Thin brown	浅褐 Thin brown

2.2.2 植物生长调节物质对南方红豆杉各愈伤组织紫杉醇合成量的影响(表 9)

HPLC 检测(图 1)结果(表 9)显示,植物生长调节物质对南方红豆杉各外植体来源愈伤组织紫杉醇合成量的影响,即存在不同调节剂组合对同一种愈伤组织紫杉醇合成水平的影响差异(表 9 纵行中的差异),也存在同一调节剂组合对不同种愈伤组织作用效果的差异(表 9 横行中的差异),且两方面的差异都极显著。根据检测图谱(图 1),分离效果较好,结果完全可以作为依据。

2 mg/L 2,4-D 仅对幼茎愈伤组织合成紫杉醇有

利,其愈伤组织中紫杉醇积累达到了 0.026%,其它愈伤组织中的紫杉醇合成似乎受到了抑制,几乎未检测出含量。

2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT 仅对叶愈伤组织有利,测得紫杉醇含量达 0.027%(图 1A),与茎的相接近。

2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KT + 0.5 mg/L GA 对幼茎也较有利,其作用下愈伤组织中紫杉醇含量达 0.023%(图 1C),且对顶端分生组织愈伤组织也有一定作用,其中检测到了 0.005%的紫杉醇含量。

表 9 各愈伤组织培养物中紫杉醇的含量

Table 9 Taxol content in various callus cultures on subcultural-medium

培养基中植物生长调节剂的组合与水平 Concentration of plant growth regulators in medium	Taxol content in various callus cultures(% , dry weight)				
	Young stems	Young stem bark	Callus cambium	Immature needle	Apical meristem
C1: 2 mg/L 2,4-D	0.026	0.000	-	0.000	0.001
C2: 2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L6-BA	0.006	0.004	0.002	0.009	0.000

C3:2 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LNAA	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002
C4:2 mg/L2,4-D + 0.5 mg/LKT	0.002	0.004	-	0.027	0.004
C5:0.5 mg/L2,4-D + 1 mg/LNAA + 0.5 mg/LKT	0.001	0.000	-	0.027	0.004
C6:2 mg/L 2,4-D + 1 mg/LKT + 0.5 mg/LGA ₃	0.023	0.004	-	0.000	0.005
C7:1.5 mg/L2,4-D + 0.5mg/LKT	0.001	0.000	-	0.012	0.009
C8:3 mg/LNAA + 0.1 mg/LKT	0.000	0.000	-	0.000	0.004

注:表中数据均为3次测定的平均值。

Note:Taxol content in various callus were average value from 3 times determinations by HPLC.

1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT 组合对南方红豆杉愈伤组织紫杉醇的合成也较有利,在其作用下,幼叶和顶端分生组织的愈伤组织中分别检测到了0.012%和0.009%的紫杉醇含量。

2 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L 6-BA 对顶端分生组织愈伤组织紫杉醇的合成表现出抑制作用,对其他则是否影响不大。但对愈伤组织生长最有利,该组合培养基上愈伤组织的月平均生长量最高。

2 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT、3 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT 3 个组合作用下,各愈伤组织中均未检测出或检出很低紫杉醇的含量。且对生长的作用也不是太显著。

由此认为,适当水平(2 mg/L)的 2,4-D 单用,或增补适当水平的 KT、KT + GA、6-BA 配合使用,均较有利于南方红豆杉愈伤组织紫杉醇的生物合成,而 NAA 则似乎不太有利于其紫杉醇的合成。C2、C4、C7 的结果是否与所加入 CH、Coconut Water 天然复合

物有关,还有待实验验证。

3 讨论

本实验所采用植物生长调节剂种类和水平的各个组合均根据苏应娟、赵芳等^[10-14]文献所报道的最优组合设计而成。结果表明,在诱导初期 NAA 较 2,4-D 要好,且表现出较强依赖调节剂组合的差异性,但随培养时间的加长,植物生长调节剂作用的差异性更多受愈伤组织植物组织细胞学起源差异性的影响。经过几代培养后,愈伤组织生长相关各方面的差异性均迅速缩小,直至无显著性差异。由此认为,南方红豆杉愈伤组织培养存在多个植物生长调节剂的优化组合,本实验中所应用 8 种诱导培养基和 8 种生产培养基,除个别(如 MS7 等)应加以改进外,其余均可作为南方红豆杉愈伤组织培养的优化培养基,并可根据初期的差异表现结合紫杉醇生产对其实施进一步优化改进。

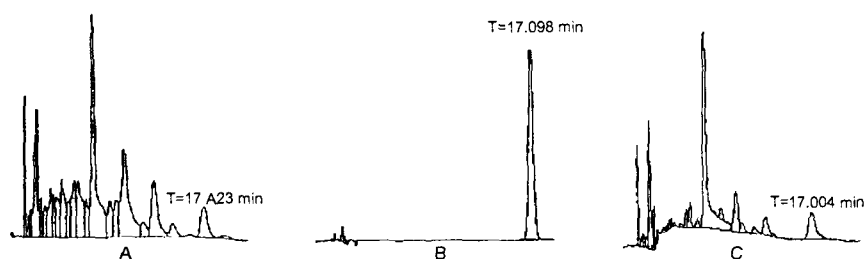


图1 紫杉醇含量的 HPLC 分析

Fig.1 HPLC chromatographic analysis of taxol content

A. Sample number 21; B. Taxol; C. Sample number 27

根据结果,南方红豆杉愈伤组织合成紫杉醇即受植物生长调节剂的调控影响,又存在着愈伤组织不同外植体起源间的差异。2,4-D 对南方红豆杉愈伤组织紫杉醇的合成有促进作用,而 NAA 则似乎不太有利,这可能与 2,4-D 作为除草剂的独特作用机理有关,有逆境调控概念。文中有多处理均未能

检测出紫杉醇的含量,可能与所用 HPLC 法有关技术参数、分离柱、检测器灵敏度等有关,不能认为其中紫杉醇的含量为零,只能代表其中含量很低。

南方红豆杉愈伤组织和细胞悬浮培养,已有众多成功的实验研究报道^[2-12],但同时用 5 种外植体、8 种诱导培养基和 8 种增殖培养基进行完全区组实

验来全面验证多种植物生长调节物质不同组合和水平的协同作用,尤其是南方红豆杉顶端分生组织愈伤组织诱导、培养及其生物合成紫杉醇的调控研究,在国内外均还未见类似的报道。

参考文献

- 1 Pharmacopoeia Committee of the Ministry of Health PR China (中华人民共和国药典委员会). China Pharmacopoeia, The First Copy (中华药典, 第1卷). Beijing: People's Medical Publishing House, 1977. 79.
- 2 Su YJ(苏应娟), Wang T(王艇), Li XY(李雪雁), et al. Analysis on the amounts of taxol in different location of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 13(2): 19-20.
- 3 Wang L(王丽), Qiu Y(仇燕), Wang G(王刚). Kinetic study on suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *J Hebei Normal Univ, Nat Sci* (河北师范大学学报, 自科版), 2003, 27: 81-83.
- 4 Su YJ(苏应娟), Wang T(王艇), Li XY(李雪雁), et al. Two factors in effect cell growth of *Taxus chinensis* var. *mairei* and taxol content. *Ecologic Sci* (生态科学), 2001, 20(4): 12-15.
- 5 Qiu Y(仇燕), Jia N(贾宁), Wang L(王丽), et al. Effects of subculture time on the growth and taxol production in *Taxus chinensis* var. *mairei* cell. *J Hebei Normal Univ, Nat Sci* (河北师范大学学报, 自科版), 2002, 26: 301-304.
- 6 Wang YD(王艳东), Ma ZY(马振毅), Yuan YJ(元英进). Studies on apoptosis and apoptotic kinetics in *Taxus chinensis* var. *mairei* cells of suspension culture treated with taxol. *Chem Engin* (化学工程), 2002, 30(5): 53-57.
- 7 Yuan YJ, Li C, Hu ZD, et al. A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30: 774-778.
- 8 Yuan YJ, Li C, Hu ZD, et al. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. *Process Biochemistry*, 2002, 38: 193-198.
- 9 Zhang ZQ(张宗勤), Yang JY(杨建英), Wu YW(吴耀武). Taxol production in tissue culture of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Acta Bot Boreal Occident Sin* (西北植物学报), 1998, 18: 488-492.
- 10 Su YJ(苏应娟), Wang T(王艇), Yang LX(杨礼香), et al. Induction and culture on callus of *Taxus chinensis* var. *mairei* bud. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32: 637-639.
- 11 Zhao F(赵芳), Ni L(倪良), Geng Z(耿征), et al. Studies on the tissue culture of *Maire Yew* (*Taxus chinensis* var. *mairei*) I. Callus inducement and optimization of the culturing methods. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30: 213-215.
- 12 Yang LX(杨礼香), Zhou SY(周诗毅). The tissue culture and the determination of taxol content in callus of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *J Central Chin Normal Univ, Nat Sci* (华中师范大学学报, 自科版), 2001, 35: 453-455.
- 13 Luo JP(罗建平), Niu BT(牛炳韬), Jia JF(贾敬芬). Establishment of tissue culture from *Taxus yunnanensis*. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 1997, 13: 326-330.
- 14 Sun BX(孙彬贤), Zhang GY(章国瑛), Liu D(刘涤), et al. Comparison of growth and paclitaxel content in 4 *Taxus* cell suspensions. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 1999, 35: 279-280.
- 15 Zhao F(赵芳), Geng Z(耿征), Liu QG(刘谦光), et al. Determination of taxol in tissue culture of *Taxus mairei* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1997, 25: 941-943.
- 16 Zhang ZQ(张志强), Wang YS(王云山), Su ZG(苏志国). The purification of taxol with reversed phase chromatography at normal pressure. *Chem J Chin Univ* (高校化学学报), 2001, 15: 56-60.
- 17 Xu XZ(许学哲). Study on extraction and separation of taxol. *J Yanbian Univ, Nat Sci* (延边大学学报, 自科版), 1998, 24: 42-44.
- 18 Zhang S(张姝), Yu F(余斐), Wang CG(王传贵), et al. The effect of ultrasound on the cell growth and release of taxol. *Biotech* (生物技术), 2001, 11(2): 14-17.
- 19 Chen HT(陈海涛), Wei ZJ(未作君), Yuan YJ(元英进). Basic study on taxol separation from the organic solvents in two-liquid phase cultures of *Taxus* cells. *Chem Indus Engin* (化学工业与工程), 2001, 18(2): 99-103.