

海南粗榧愈伤组织的诱导和培养

符文英¹ 杜道林^{2,*} 符木均¹

¹海南大学农学院, 海口 570228 ²海南师范学院生物系, 海口 571158

提要 海南粗榧的嫩茎和嫩叶以0.1%升汞消毒12 min的效果最好。外植体在MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+1 mg·L⁻¹ NAA+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+3.0%蔗糖+0.6%卡拉胶(pH 5.8)培养基中能顺利诱导出愈伤组织。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+0.1 mg·L⁻¹ KT+3 mg·L⁻¹ NAA+3.0%蔗糖(pH 5.8)。

关键词 海南粗榧; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 组织培养

Callus Induction and Culture of *Cephalotaxus mannii*

FU Wen-Ying¹, DU Dao-Lin^{2,*}, FU Mu-Jun¹

¹College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228; ²Department of Biology, Hainan Normal College, Haikou 571158

Abstract The results showed that: (1) Young stem and young leaf of *Cephalotaxus mannii* were sterilized best in 0.1% mercuric chloride for 12 min; (2) MS medium+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+1 mg·L⁻¹ NAA+2 mg·L⁻¹ 2,4-D+3.0% sucrose+0.6% carrageenan (pH 5.8) could induce calli from explants; (3) Liquid suspension and dark cultures were advantageous to proliferation of callus; (4) MS medium +0.1 mg·L⁻¹ KT+3 mg·L⁻¹ NAA+3.0% sucrose (pH 5.8) was optimum for proliferation of callus.

Key words *Cephalotaxus mannii*; callus; induction; proliferation; tissue culture

海南粗榧是国家二级保护濒危植物^[1,2]。自上世纪70年代,人们从其树皮和枝叶中分离出脱氧三尖杉酯碱(deoxyharringtonine)、异三尖杉酯碱(isoharringtonine)、三尖杉酯碱(harringtonine)和高三尖杉酯碱(homoharringtonine)等多种生物碱,并经动物肿瘤抑制试验及临床应用,证实对各类白血病及恶性淋巴瘤有很好疗效^[3,4]。以后,海南粗榧资源破坏严重。由于该树种生长缓慢,自然资源有限,很难满足日益增长的临床需求。因此,对海南粗榧进行细胞培养,让其产生有用的次级代谢产物,以解决其资源保护和开发利用的矛盾很有必要。

用细胞培养生产药用成分的工业化研究始于上世纪50年代,已有许多成功的先例^[5~8]。人们对三尖杉科其他树种组织培养和生物碱分析曾有过报道^[9~12]。但尚未见到海南粗榧细胞培养的有关报道。自1994年以来,我们开展了海南粗榧细胞培养、快速繁殖和生物生态学的研究^[14~16],试图通过海南粗榧的细胞培养提取有效抗癌次生代谢产物。本文是这方面工作的继续。

材料与方 法

海南粗榧(*Cephalotaxus mannii*)采自中国热带农业科学院热带植物园。取其嫩树皮、茎、叶为外植体。采用MS基本培养基,在不同培养阶段添加NAA(单位:mg·L⁻¹,下同)、2,4-D、

6-BA和KT等。固体培养基用0.6%卡拉胶固化,3.0%蔗糖,pH 5.8。培养温度为(25±3)℃。采用固体和液体悬浮振荡两种培养方式。光培养以日光灯为光源,连续照光10~12 h·d⁻¹,光照度为1 000~1 500 lx;暗培养在暗中进行。外植体在流水中冲洗后,放在新洁尔灭溶液中浸洗10 min,以蒸馏水洗净;于无菌条件下用70%酒精擦拭表面,再用70%酒精浸泡1 min;最后在0.1%升汞中消毒,消毒时间分别为10、12、15和20 min,用无菌水冲洗3~4次后接种。培养7 d后统计污染率和观察外植体长势。

诱导愈伤组织时,将外植体切成约1 cm的长条小块和1 cm×1 cm方块(树皮),接种于12种处理的诱导培养基中。接种时按树皮、茎、叶3种外植体类型分类接种,每处理接种4瓶,每瓶接种外植体3块,共12块。培养50~60 d后统计出愈块数,计算诱导率,同时观察愈伤组织生长情况。

愈伤组织继代增殖培养时,以6-BA 0.1+NAA

收稿 2003-02-12 修定 2003-06-30

资助 国家自然科学基金(39660018, 30260024)、海南省重点扶持学科“生态学”、海南大学科研基金、海南师范学院科研启动基金。

* 通讯作者(E-mail:dd1@hainnu.edu.cn, Tel:0898-68374118)。

1+2, 4-D 2培养基中诱导并继代3次的愈伤组织为材料。将愈伤组织切成等体积小块, 重约0.5 g, 接种于不同处理中, 连同培养瓶称重。每处理接种4瓶。培养45 d后称鲜重(此鲜重为45 d后培养瓶总重量和刚接种后培养瓶总重量的差值)。继代增殖培养试验有:(1)加入NAA和2, 4-D;(2)固相和液相培养试验(液相培养为振荡培养, 约 $140 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$);(3)光培养和暗培养试验。

观察愈伤组织生长动态时, 用KT 0.1+NAA 3培养基, 接种20瓶, 并在接种当天和培养后5、10、20、30、40、50、60 d分别称取培养瓶重量(W_0 和 W_j), 并按愈伤组织平均增长数(g) = $(W_j - W_0) / 20$ 绘制生长曲线。

结果与讨论

1 外植体消毒时间的比较

海南粗榧为多年生乔木, 材料带菌多, 不易彻底消毒; 同时, 此树种对消毒剂很敏感, 极易被杀伤变褐。表1的结果显示, 外植体的污染率以0.1%升汞处理10 min的为最高, 12 min次之, 15和20 min最低。但从外植体的表现情况看, 超过15 min则出现变褐死亡现象。这说明消毒时间过长, 不利于培养。故0.1%升汞的消毒时间应控制在12~15 min内。

2 海南粗榧愈伤组织的诱导

海南粗榧的树皮、茎段、叶片接种在12种不同生长调节物质组合的培养基中。光培养3周后, 部分组合中外植体开始膨大, 切口处先后长出黄绿色愈伤组织。培养60 d后的结果(表2)表明: 树皮在12种组合中都没能诱导成功; 2, 4-D

表1 海南粗榧外植体在1%升汞中消毒时间的效果比较

Table 1 Sterilizing time of explants of *Cephalotaxus manni* in 0.1% mercuric chloride

消毒时间/ min	接种数/ 块	污染数/ 块	污染率/ %	外植体 生长情况 ¹⁾
10	16	7	44	正常
12	16	2	13	正常
15	16	1	6	部分褐死
20	16	1	6	严重褐死

1) 接种15 d后观察的结果, 升汞浓度为0.1%, 培养基为MS培养基。

对愈伤组织的诱导有决定作用, 凡没有添加2, 4-D的组合诱导率均为零。6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 2可促进愈伤组织的诱导, 叶的诱导率比茎段高。

3 愈伤组织的继代增殖培养

从表3和表4可见:

(1) 5种处理间差异极显著。加2, 4-D的海南粗榧愈伤组织生长最好。但随着培养时间的延长, 愈伤组织有逐渐变褐、死亡的现象, 且2, 4-D浓度越高, 褐变现象出现得越早。加有NAA的愈伤组织生长快, NAA在愈伤组织的增殖中比2, 4-D重要(表3)。所有处理中以KT 0.1+NAA 3最好, 愈伤组织不仅生长快且色白、疏松; 其他处理的愈伤组织生长相对缓慢, 并有逐渐变褐、死亡的趋势。

(2) 液体培养的愈伤组织增殖比固体培养

表2 不同生长调节物质组合对海南粗榧愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different hormones on callus induction

生长调节物质浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	树皮			茎			叶		
	外植体 数/块	成愈数 /块	诱导率 /%	外植体 数/块	成愈数 /块	诱导率 /%	外植体 数/块	成愈数 /块	诱导率 /%
6-BA 0.1+NAA 1	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.1+NAA 2	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.1+NAA 3	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.1+NAA 5	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.5+NAA 1	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.5+NAA 3	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.5+NAA 5	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 1+NAA 0.1	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 3+NAA 0.1	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 5+NAA 0.1	12	0	0	12	0	0	12	0	0
6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 1	12	0	0	12	11	91.7	12	12	100
6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 2	12	0	0	12	12	100	12	12	100

培养60 d后测定的结果。

好; 暗培养比光培养更适合愈伤组织增殖; 液体暗培养的愈伤组织生长最好。KT 0.1+NAA 3 组合在任何培养条件下均优于其它组合(表4)。

4 愈伤组织的生长动态

图1显示, 培养前20 d, 愈伤组织生长较慢; 20~45 d的生长速度明显加快; 45~60 d的生长速度变慢。因此, 若要获得较高的愈伤组织生物量, 则以培养40~45 d为宜。

根据本文结果, 我们认为有几个问题须考虑: (1) 如何防止褐变。海南粗榧愈伤组织在继代增殖过程中常出现褐变现象, 尤其是培养基中添加2, 4-D的, 变褐较早且严重。(2) 培养基中2, 4-D对次生代谢产物的药用安全性如何。(3) 前人^[3, 4]工作表明, 海南粗榧不同部位

表3 NAA和2, 4-D对海南粗榧愈伤组织增殖的影响
Table 3 Effects of NAA and 2, 4-D on callus proliferation

生长调节物质/mg L ⁻¹	鲜重/g 瓶 ⁻¹	差异显著性	
		0.05	0.01
KT 0.1+NAA 3	1.55	a	A
6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 2	1.25	b	B
KT 0.1+2, 4-D 2	1.16	c	C
6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 1	1.10	d	D
KT 0.1+2, 4-D 1	1.06	e	E

$$F=33.6 > F_{0.01}=26.83$$

表4 培养方式对海南粗榧愈伤组织增殖的影响
Table 4 Calli proliferation with different culture methods

培养方式		鲜重/g 瓶 ⁻¹				
		KT 0.1+NAA 3	6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 2	KT 0.1+2, 4-D 2	6-BA 0.1+NAA 1+2, 4-D 1	KT 0.1+2, 4-D 1
固体培养	光培养	1.58	1.25	1.20	1.12	1.05
	暗培养	1.64	1.31	1.23	1.16	1.07
液体培养	光培养	1.70	1.34	1.28	1.20	1.10
	暗培养	1.74	1.37	1.32	1.24	1.16

培养45 d后测定。

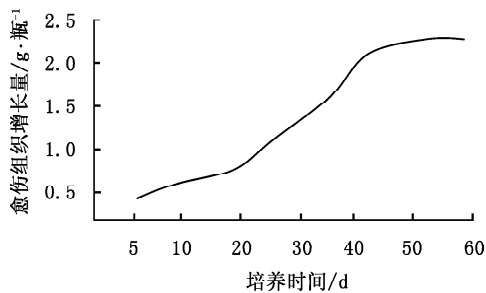


图1 海南粗榧愈伤组织生长进程

Fig. 1 Growth course of callus of *Cephalotaxus mannii*

组织中的生物碱含量差异很大, 以树皮含量最高。本文以树皮作外植体, 但由于树皮易于褐死, 诱导未能成功。如何解决这一问题, 也应深入研究。

参考文献

- 1 郑万钧, 傅立国. 中国植物志. 第七卷. 北京: 科学出版社, 1978. 432~434
- 2 陈毓亨, 黄全. 我国抗癌植物——三尖杉属的资源利用. 中草药, 1977, (6):14~17

- 3 中国医学科学院药物研究所, 中国人民解放军第一八七医院. 海南粗榧抗肿瘤有效成分的研究. 化学学报, 1976, 34(4): 283~293
- 4 吴承卫. 三尖杉及其生物碱类成份的研究进展. 国外医学药学分册, 1993, 20(3):321~325
- 5 郑光植. 植物细胞培养及其次级代谢. 昆明: 云南大学出版社, 1992. 10~35
- 6 何卓培. 植物组织培养生产有用化学物质的潜力与问题. 植物生理学通讯, 1983, (4):8~13
- 7 陈士云, 侯嵩生. 生产植物次生代谢物几项新技术研究进展. 生物工程进展, 1993, 14(2):43~45
- 8 侯嵩山. 植物细胞培养与有用化学物质生产的研究动态. 武汉植物学研究, 1986, 4(4):411~419
- 9 惠月明, 胡月红, 吴跃平等. 三尖杉组织培养的初步研究. 中草药, 1989, 20(1):31~33
- 10 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. 植物学报, 1995, 37(6):417~424
- 11 Delfel NE, Rothfus JA. Antitumor alkaloids in callus cultures of *Cephalotaxus harringtonia*. Phytochem, 1977, 10:1595~1598
- 12 Delfel NE. The effect of nutritional factors on alkaloid metabolism in *Cephalotaxus harringtonia* tissue cultures, Planta. 1980, 39:168~170
- 13 符文英, 潘学锋, 陈秀蕙等. 海南粗榧扦插与生根试验研究. 海南大学学报, 1997, 15(3):239~244
- 14 潘学锋, 符文英, 陈秀蕙等. 海南粗榧扦插繁殖研究. 热带作物研究, 1996, (3):25~30
- 15 杜道林, 苏杰, 付永川等. A study on the genetic diversity of *Cephalotaxus mannii*, a rare and endangered plant. 植物学报, 2002, 44(2):193~198