

云南红豆杉离体胚的培养

赵沛基 沈月毛 彭丽萍 甘烦远* (中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 在 MS 培养基上生长的云南红豆杉离体胚的萌发率较高, 达 80%; 成熟种子胚的萌发率高于未成熟胚; 胚的萌发率随着种子贮存时间的延长而下降; 胚乳有助于胚的萌发。胚培养 1 个月左右可获得正常的红豆杉幼苗, 成苗率 15% ~ 20%。幼苗中的紫杉醇含量为 0.004%, 远远低于成年树皮中紫杉醇的含量(0.02%)。

关键词 云南红豆杉; 胚培养; 紫杉醇

In vitro Embryo Culture of *Taxus yunnanensis*

ZHAO Pei-Ji, SHEN Yue-Mao, PENG Li-Ping, GAN Fan-Yuan* (Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract The germination rate of excised embryos of *Taxus yunnanensis* cultured on MS medium reached 80%. The bud-forming rate of mature embryos was higher than that of immature embryos. The rate of embryo bud formation was reduced with increasing of embryo storage period. The endosperm was suitable for the embryo bud formation. Normal seedlings were obtained after embryos culture for about 30 d, the rate of seedlings formation was about 15% ~ 20%. The taxol content in seedlings was 0.004%, and much lower than that in the barks of mature trees.

Key words *Taxus yunnanensis*; embryos culture; taxol

云南红豆杉因其含有抗卵巢癌、乳腺癌等癌症的有效成分紫杉醇(taxol)而日益受到人们的重视。但由于其生长缓慢, 成熟种子一般需经 2 年的休眠期才能萌发, 从而限制了这一资源的利用。近年来, 采用组织培养和细胞培养方法已从基础研究方面解决了一些问题, 但离实际应用仍然有很长一段距离^[1]。体外胚培养方法不仅可解决种子休眠时间长的问题, 还可使胚在 1 ~ 2 个月内形成正常幼苗, 这也为研究红豆杉中紫杉醇生物合成提供了良好的培养系统^[2-5]。本文报道云南红豆杉离体胚培养的结果。

材料与方法

不同成熟度的云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)种子采自本所植物园, 去假种皮和外种皮, 在自来水下冲洗干净, 一部分经沙埋处理后, 贮存于 4℃ 冰箱中; 另一部分经 70% 酒精和 0.1% 升汞常规表面消毒后, 于无菌条件下剥离种子的种皮, 分离出胚, 分别接种于 MS、B₅ 和 6.7-V 等不同基本培养基

上。培养基的 pH 为 5.8 (灭菌前), 并添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂。培养温度为 (25 ± 1)℃, 每天光照 12 h, 光照度为 2 000 lx。

紫杉醇含量测定参考文献 6 的方法, 测定由胚形成的云南红豆杉幼苗(全株)中的紫杉醇含量。

萌发胚指具有子叶和胚轴的胚, 形成的红豆杉幼苗指具子叶、胚轴和胚根的小苗。萌发率为萌发胚数与接种胚数之比, 成苗率指幼苗数与萌发胚数之比。

结果与讨论

1 不同培养基对胚萌发的影响

从表 1 可见, 成熟种子的胚在 MS 培养基上的萌发率均高于其他两种培养基, 萌发率达 80%,

收稿 2002-08-12 修定 2002-11-21

资助 云南省应用基础研究基金(96C082M)和云南省人才培养基金项目(97C025G)。

* 通讯作者 (E-mail: zws007@public.km.ac.cn; Tel: 0871-5223080)。

而在6.7-V中的效果较差,萌发率仅为20%。如果培养基中添加一些植物生长调节剂(如2,4-D或BA等),萌发的胚很容易形成愈伤组织。这说明胚含有的内源激素已可满足其生长需要。这与其他种类的红豆杉胚萌发所需的条件^[7]有所不同。

表1 不同培养基对胚萌发的影响

Table 1 The influence of different media on the bud formation rate

培养基	接种胚数	萌发胚数	萌发率/%
MS	50	40	80
B ₅	50	36	72
6.7-V	50	10	20

2 种子胚成熟度对萌发率的影响

种子胚成熟度按外种皮色泽划分。我们采用的成熟种子胚是指外种皮已变红的种子的胚,未成熟种子胚则是外种皮仍为绿色的。虽然未成熟种子在剥离外种皮时较为容易,但由于胚仍未生长成熟,因而萌发率较低。相反,尽管成熟种子在剥离时较为困难,但在MS培养基中培养的萌发率要比未成熟种子胚的高,达82%(表2)。

表2 胚成熟度对种子胚萌发率的影响

Table 2 The germination rates of embryo at different degree of maturity

种子成熟度	接种胚数	萌发胚数	萌发率/%
成熟	50	41	82
未成熟	50	20	40

3 胚乳对胚萌发率的影响

表3表明:接种时,如果完全把胚剥离出来,不带胚乳,胚的萌发率极低;接种时,在剥离胚时或多

表3 胚乳对胚萌发的影响

Table 3 The influence of endosperm on embryo forming buds

胚	接种胚数	萌发胚数	萌发率/%
带胚乳	50	43	86
不带胚乳	50	12	24

或少带上胚乳,萌发率大大提高,最高可达86%。说明胚在培养基中培养时,仍需胚乳提供其生长必需的内源营养物质或激素。

4 种子低温贮存时间对胚萌发率的影响

采集到的一部分种子经沙埋处理后,贮存于4℃冰箱中,保存不同时间后分别取种子剥离出胚,再进行培养。结果表明,胚萌发率随种子保存时间的延长而下降,从树上采到的种子立即剥离胚培养的萌发率最高,达80%,在4℃下贮存的种子30 d后,再剥离胚培养的萌发率仅为40%(表4)。

表4 种子贮存时间对胚萌发的影响

Table 4 The influence of embryo storage periods on

embryo forming buds

种子贮存时间/d	接种胚数	萌发胚数	萌发率/%
0	50	40	80
7	50	38	76
14	45	29	60
30	45	18	40

5 胚的生长状态

接种在培养基上的胚于第7天左右开始变绿,并开始增大,伸长;15 d左右可以明显看到两片子叶,胚轴亦随之伸长;30 d左右地上部分继续伸长,子叶张开,胚根伸长,形成完整的幼苗(图1)。在上述培养条件下,幼苗成苗率并不是很高,据统计只有15%~20%左右。幼苗转至新鲜的不含生长调节物质的MS培养基上可继续生长,壮苗后移至温室花盆中可继续生长,其生长率与种子萌发的幼苗生长率相当。

6 幼苗中紫杉醇含量

收集一定量的幼苗,冰冻干燥后测定紫杉醇的含量,以种子直接萌发的幼苗和成年树树皮含量作对照。结果表明:由胚萌发而来的幼苗具有合成紫杉醇的能力,但由于幼苗生长期较短,有效成分积累量不够,因而幼苗中紫杉醇含量较低,仅为0.004%,与种子直接萌发的幼苗含量(0.006%)相当,但远远低于成年树的树皮中的含量(0.02%)。

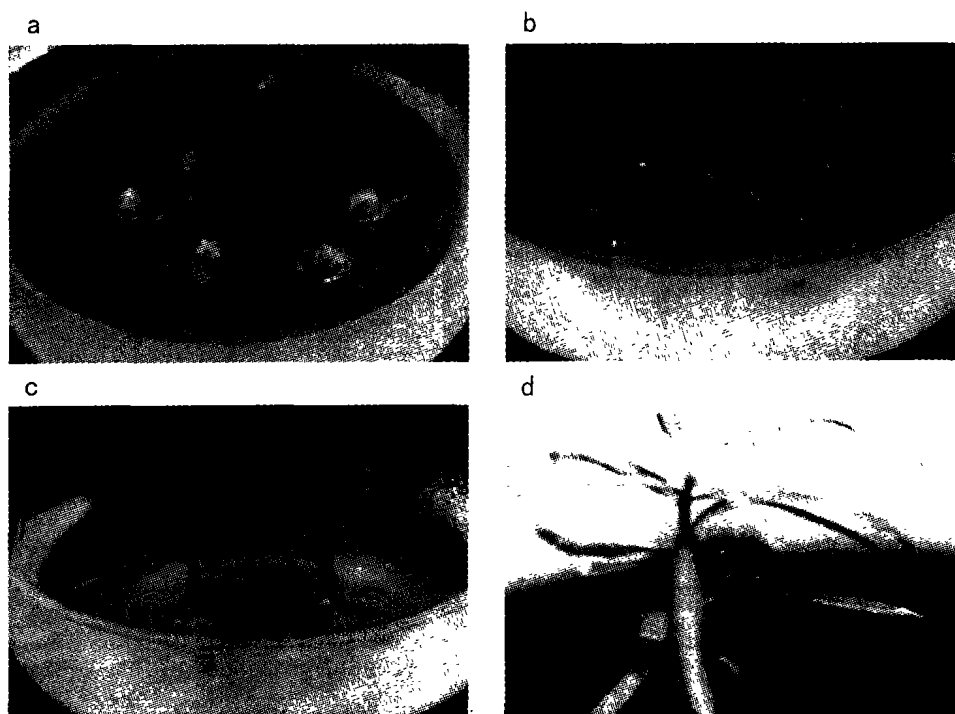


图1 胚的生长

Fig. 1 Growth of embryo

a. 刚剥离的胚, b. 子叶张开的幼苗, c. 生根的小苗, d. 移栽后的小苗

参考文献

- 1 甘炳远, 沈月毛, 郝小江. 红豆杉生物工程的研究进展. 武汉植物学研究, 1999, 17: 65 ~ 74
- 2 Chee PP. *In vitro* culture of zygotic embryos of *Taxus* species. *HortSci*, 1994, 29: 695 ~ 697
- 3 Chee PP. Organogenesis in *Taxus brecifolia* tissue cultures. *Plant Cell Rep*, 1995, 14: 560 ~ 565
- 4 Flores T, Wagner LJ, Flores HE. Embryos culture and taxane production in *Taxus* spp. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 1993, 299: 160 ~ 165
- 5 Zhiri A, Jaziri M, Homes J *et al.* Factors affecting the *in vitro* rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 39: 261 ~ 263
- 6 甘炳远, 郑光植, 彭丽萍等. 高效液相色谱法测定红豆杉培养细胞中紫杉醇的含量. 色谱, 1996, 14: 306 ~ 307
- 7 陈永勤, 戴均贵, 朱蔚华. 红豆杉成熟胚的离体培养. 植物生理学通讯, 1998, 34: 191 ~ 193

广东省植物生理学会第九次会员代表大学简讯

广东省植物生理学会第九次会员代表大会于2002年11月23日在广州召开。出席代表共100多人。会议收到大会专题报告12篇, 专题论文摘要85篇(已编入会议论文摘要汇编)。与会代表对1998年以来广东省植物生理学领域的基础和生产应用研究进展进行了交流。上届理事长陈汝民对广东省植物生理学研究的进展、问题和未来工作作了回顾和展望。秘书长彭长连代表理事会作了工作总结报告。广东省科协有关领导出席了开幕式, 并向大会表示祝贺。会议选出第九届理事会理事26名。黄学林任理事长, 彭新湘、王小菁、彭长连、易干军任副理事长; 蒋跃明任秘书长, 李玲、张北壮和毛荣森任副秘书长。理事会下设学术、青年和科普三个工作委员会和生长调节物质专业委员会。(蒋跃明)