

抗癌植物曼地亚红豆杉离体诱导培养及褐化抑制

杨淑慎^{1,2#}, 李守真^{2#}, 张江波², 李军超^{2*}

1 西安翻译学院, 陕西 西安 710105

2 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100

杨淑慎, 李守真, 张江波, 李军超. 抗癌植物曼地亚红豆杉离体诱导培养及褐化抑制[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3823-3832.

YANG Shushen, LI Shouzhen, ZHANG Jiangbo, LI Junchao. Callus induction, subculture, and browning inhibition of the anticancer plant *Taxus media*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3823-3832.

摘要: 为了获得抗癌植物红豆杉更为有效的细胞培养参数, 本研究以曼地亚红豆杉带芽茎段为外植体, 利用植物组织培养技术和正交试验对其愈伤组织诱导和继代培养条件进行优化, 并对培养过程中出现的褐化问题进行探讨。结果表明在黑暗条件下, B₅+0.25 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)+1.5 mg/L 萘乙酸(naphthaleneacetic acid, NAA)+0.5 mg/L 激动素(kinetin, KT)是愈伤组织诱导最适培养基, 表现为诱导时间短、诱导率高(86.7%); 最适继代培养基为 B₅+0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+1.5 mg/L KT; 在愈伤组织生长第 10 天进行继代培养的愈伤组织增殖倍数最高; 活性炭能够最大限度减轻褐变的发生, 其最佳浓度为 0.8 g/L。本研究将为曼地亚红豆杉细胞悬浮培养及通过细胞培养生产紫杉醇奠定基础。

关键词: 抗癌植物; 曼地亚红豆杉; 愈伤组织诱导; 继代培养; 褐化抑制

Callus induction, subculture, and browning inhibition of the anticancer plant *Taxus media*

YANG Shushen^{1,2#}, LI Shouzhen^{2#}, ZHANG Jiangbo², LI Junchao^{2*}

1 Xi'an Fanyi University, Xi'an 710105, Shaanxi, China

2 Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: In order to obtain more effective cell culture parameters of *Taxus* anticancer plants, we optimized the callus induction and subculture conditions of the explants (stem segments with

资助项目: 陕西省 2020 年重点研发计划(2020SF-318)

This work was supported by the Shaanxi Provincial 2020 Key Research and Development Plan (2020SF-318).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: LJCYS2014@163.com

Received: 2024-01-30; Accepted: 2024-06-26; Published online: 2024-07-19

buds) of the anticancer medicinal plant *Taxus media* by using the plant tissue culture technology and orthogonal test. Furthermore, we studied the method to inhibit browning in the culture. The results indicated that the optimal conditions for inducing callus was culture in the medium composed of B₅+0.25 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT in the dark, which showed short induction time and a high induction rate (86.7%). The formula of the optimal medium for subculture was B₅+0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+1.5 mg/L KT. The proliferation multiple of callus cultured by subculture on the 10th day of callus growth was the highest. Activated carbon inhibited the browning in callus subculture, with the optimal inhibitory concentration of 0.8 g/L. The results of this study lay a foundation for the production of taxol by suspension culture of *T. media* cells.

Keywords: anticancer plant; *Taxus media*; callus induction; subculture; browning inhibition

红豆杉又称紫杉,属于红豆杉科(Taxaceae)红豆杉属(*Taxus Linn.*),是第四纪冰川孑遗针叶树种,在地球上已有 250 万年历史,是世界上公认濒临灭绝的天然珍稀抗癌植物,1999 年被中国列为国家 I 级濒危重点保护野生植物^[1]。全球红豆杉属植物约有 11 种,中国有 4 种 1 变种:东北红豆杉、云南红豆杉、西藏红豆杉、中国红豆杉和南方红豆杉^[2]。曼地亚红豆杉(*Taxus madia*)是 20 世纪末引入中国的杂交品种,其母本为东北红豆杉,父本为欧洲红豆杉^[3]。红豆杉植物喜阴、耐旱、抗寒,主要分布于北半球的寒温带及亚热带地区,为常绿乔木或灌木^[4]。红豆杉的次生代谢产物紫杉醇(taxol)属天然二萜类化合物,具有独特的抗癌机制和较高的抗癌活性^[5],是迄今从植物中提取的最有效的控制癌细胞生长的抗肿瘤药物^[6]。普通红豆杉植株紫杉醇含量低,仅为干重的 0.005%–0.007%,而曼地亚红豆杉(*Taxus media*)紫杉醇含量为干重的 0.03%–0.06%^[7],是美国食品和药品监督管理局批准可以用作提取紫杉醇的红豆杉之一^[8]。

自然条件下红豆杉生长缓慢、再生能力差,目前世界范围内还未形成大规模的红豆杉原料林。随着抗癌药紫杉醇在全球多国的开发利用,对红豆杉属植物的需求量日益增大,直接从植物中提取紫杉醇的传统生产方式会导致自然资

源遭到严重破坏,也限制了紫杉醇抗癌治疗的临床应用^[9]。利用植物细胞工程技术提高紫杉醇产量是保护稀缺红豆杉资源和解决紫杉醇药源紧缺的有效途径之一^[5]。

自 1991 年 Christen^[10]获得首个红豆杉细胞培养专利以来,各国学者通过优化培养基及培养条件获得了一些品系红豆杉细胞培养的参数^[11-12],但至今还远不能达到规模化生产紫杉醇的要求,较其他品种而言,对于曼地亚红豆杉的研究报道较少,资料有限。

张文泉等^[13]指出,目前南方红豆杉组织培养急需解决的关键问题是愈伤组织的褐化及完整的植株再生体系的建立,曼地亚红豆杉组织培养也存在同样的瓶颈问题。本实验以曼地亚红豆杉当年生茎段为材料,对其愈伤组织诱导、继代培养以及培养过程中褐化抑制进行研究,以期为建立更稳定的红豆杉细胞悬浮培养体系和曼地亚红豆杉快繁体系提供资料,为进一步扩大红豆杉资源,缓解紫杉醇供求矛盾奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

六年生曼地亚红豆杉(*Taxus media rehder*)植株,由西北农林科技大学博览园提供。

1.2 培养基制备

愈伤组织诱导基本培养基: 参照文献[14]的方法, 基本培养基为 MS、B₅、TA 培养基, 分别加入激素萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA) 1.0 mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 1.0 mg/L、激动素(kinetin, KT) 1.0 mg/L 制成。

愈伤组织诱导正交试验: 对愈伤组织诱导结果进行比较, 发现 B₅ 培养基诱导效果较好, 拟作为正交试验基础培养基。正交表 L₉(3⁴) 制备采用文献[14]的方法(表 1)。

愈伤组织继代培养基: 继代培养基制备是在表 1 基础上调整了 NAA、2,4-D 和 KT 的浓度配比(表 2), 并于培养基中分别添加了抗褐化试剂 AgNO₃ (0.1、0.2、0.3 mg/L)、水解乳蛋白(0.3、0.5、0.8 mg/L)、聚乙烯吡咯烷酮(0.5、1.0、1.5 mg/L)和活性炭(0.6、0.8、1.0 mg/L)。继代时间设为 5、10、15、20 d。

1.3 培养方法

1.3.1 无菌材料的获得

外植体选用和材料处理参照文献[14]的方法。本次取曼地亚红豆杉当年生带芽茎段(φ=2 mm), 将材料消毒后, 切成 1–2 cm 的小段, 分别接种在不同类型的培养基上培养, 每瓶接种 3 个茎段, 每种培养基接种 15 瓶。

表 1 愈伤组织诱导 L₉(3⁴) 正交表

Table 1 L₉(3⁴) orthogonal design table of callus induction

No.	Medium	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)
1	B ₅	0.25	1.0	0.25
2	B ₅	0.25	1.5	0.50
3	B ₅	0.25	2.0	1.00
4	B ₅	0.50	1.0	0.50
5	B ₅	0.50	1.5	1.00
6	B ₅	0.50	2.0	0.25
7	B ₅	1.00	1.0	1.00
8	B ₅	1.00	1.5	0.25
9	B ₅	1.00	2.0	0.50

表 2 愈伤组织继代培养 L₉(3⁴) 正交表

Table 2 L₉(3⁴) orthogonal design table of callus subculture culture

No.	Medium	2,4-D (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)
1	B ₅	0.5	1.0	0.5
2	B ₅	0.5	1.5	1.0
3	B ₅	0.5	2.0	1.5
4	B ₅	1.0	1.0	1.0
5	B ₅	1.0	1.5	1.5
6	B ₅	1.0	2.0	0.5
7	B ₅	1.5	1.0	1.5
8	B ₅	1.5	1.5	0.5
9	B ₅	1.5	2.0	1.0

1.3.2 培养条件

愈伤组织诱导: 分光培养(光照度为 1 000 Lux)和暗培养, 培养温度 23 °C±1 °C, 周期为 30 d。

继代培养: 于黑暗条件下培养, 培养温度 23 °C±1 °C。

1.4 生长与褐化分析

愈伤组织生长质量分为 3 级^[15]: 好(颗粒状, 淡绿色); 较好(颗粒状, 浅黄或者灰白色); 差(颗粒状, 褐色或者白色)。

愈伤组织增殖倍数^[15]=25 d 后的愈伤组织重量(g)/每瓶接种量(g)。

愈伤组织褐化程度分为四级^[16]: 未褐化(淡绿色), 以“-”表示; 轻微褐化(黄白色), 以“+”表示; 褐化严重(灰白色), 以“++”表示; 褐化很严重(棕褐色)以“+++”表示。

按杨善朝等^[17]的方法, 使用 SPSS 统计软件分析不同处理组合方差。

2 结果与分析

2.1 不同培养基和培养条件对愈伤组织诱导的影响

经过对接种于 MS、B₅、TA 培养基上曼地亚红豆杉愈伤组织出愈时间和生长的观察, 发现在黑暗条件下, 接种于 B₅ 培养基上的愈伤组

织诱导效果较好,在第 10 天即可看到在茎切段的两端部分有明显的淡绿色半透明状愈伤组织生成(图 1),暗培养比光照培养更有利于愈伤组织的诱导(表 3)。

在 3 种培养基中愈伤组织出愈的速度大小依次为: $B_5 > MS > TA$; 愈伤组织诱导率的大小依次为: $B_5 > TA > MS$; 愈伤组织褐化程度的大小依次为: $B_5 < MS < TA$ 。

2.2 不同激素种类和浓度组合对愈伤组织诱导的影响

九种不同激素组合的 B_5 培养基在接种后第 10–21 天时,在茎段的切口处均开始生成愈伤组织,随之整个茎段逐渐愈伤组织化,第 25 天时所有的处理组合培养基 80% 以上的外植体均产生了愈伤组织,但其诱导率、诱导时间和褐化程度各不相同(表 4)。统计分析发现,2 号培养基

($B_5 + 0.25 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 1.5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L KT}$) 诱导愈伤组织时间最短,仅需要 10 d,诱导率高达 86.7%,且诱导效果最好,愈伤组织质量最理想(淡绿色)。

2.2.1 不同激素种类和浓度组合对愈伤组织继代培养的影响

随着初代培养时间的延长和细胞不断分裂,为了避免细胞相互接触而发生接触性抑制

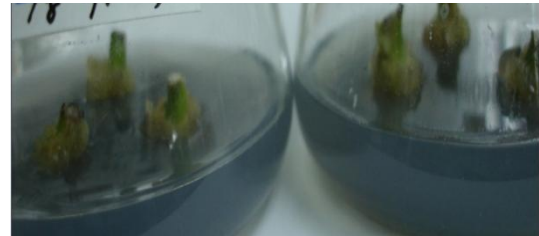


图 1 黑暗条件下 B_5 基本培养基愈伤组织的诱导
Figure 1 Callus induction by B_5 media under dark condition.

表 3 不同类型的培养基和培养条件对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different medium and culture conditions on the callus induction

No.	Medium	Culture conditions	Callus induced occurrence time (d)	Callus induced callus quality	Induced rate (%)	Browning grade
1	MS	Light	19	White	17.8	++
2	MS	Dark	14	Thin yellow	53.3	+
3	B_5	Light	16	Thin yellow	66.7	++
4	B_5	Dark	10	Thin green	77.8	-
5	TA	Light	19	White	60.0	+++
6	TA	Dark	16	Thin yellow	64.4	++

表 4 不同激素种类和浓度组合对愈伤组织诱导的影响

Table 4 The effects of different hormone composing on the callus induction

No.	Medium	Culture conditions	Callus induced occurrence time (d)	Callus induced callus quality	Induced rate (%)	Browning grade
1	B_5	Dark	13	White	68.8	+
2	B_5	Dark	10	Thin green	86.7	+
3	B_5	Dark	12	Thin yellow	77.8	+
4	B_5	Dark	14	Thin yellow	73.3	+
5	B_5	Dark	17	White	57.8	++
6	B_5	Dark	16	Thin green	62.2	+
7	B_5	Dark	18	White	60.0	++
8	B_5	Dark	13	Thin yellow	71.1	+
9	B_5	Dark	15	Thin green	64.4	+

以及培养基中营养物不足和代谢物积累而影响生长或发生中毒,需要将培养物及时分割继代到另外的培养器皿内。本次继代培养中,激素的不同种类和浓度对愈伤组织继代培养生长影响明显不同(表 5)。用 Bonferroni 方法^[18]对 9 种不同激素种类和浓度组合的培养基上诱导生长的愈伤组织进行增殖倍数的多重比较发现: 2,4-D、NAA 和 KT 浓度的适当提高均有利于愈伤组织继代培养生长; 3 号培养基(B₅+0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+1.5 mg/L KT)促进愈伤组织继代培养效果显著,增殖倍数高(6.53 倍)、褐化程度轻(黄白色); 4 号培养基上的愈伤组织增殖倍数小,褐化程度也相对严重。

2.2.2 不同抗褐化剂对愈伤组织继代培养的影响

褐化、菌类污染和玻璃化被称为植物组织培养三大技术难题。本研究在继代培养 10 d 后,可观察到愈伤组织和与其接触的培养基周围变成棕红色,随着培养时间延长,颜色逐渐变成

表 5 不同植物激素组合对愈伤组织继代培养的影响

Table 5 The effects of different hormone composing on growth of callus subculture culture

No.	Dosage per vial (g)	Callus weight after 25 days (g)	The difference between every treatment	Browning grade
1	1.32	7.67	5.81 ^a	+
2	1.43	6.95	4.86 ^b	+
3	1.40	9.14	6.53 ^c	+
4	1.56	5.96	3.82 ^{ab}	++
5	1.39	6.34	4.56 ^{abc}	+
6	1.44	8.05	5.59 ^{ac}	+
7	1.52	6.20	4.08 ^{bc}	++
8	1.46	6.57	4.50 ^{bc}	++
9	1.53	6.78	4.43 ^{bc}	+

Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$).

暗黄色甚至棕色且呈扩散状态,这是愈伤组织细胞内的多酚氧化酶催化酚类物质氧化成棕褐色醌类物质的结果。与此同时,愈伤组织生长速度变慢,甚至褐化死亡。继代培养 25 d 后,从愈伤组织生长量、增殖倍数以及愈伤组织褐化程度 3 个指标与未添加任何抗褐化物质的空白组进行比较,并用 Bonferroni 方法^[18]进行统计分析(表 6),发现生长于添加了吸附剂或抗氧化试剂培养基上的愈伤组织褐化程度相对较轻,且 4 种添加物均能一定程度抑制褐化,抑制效果大小依次为活性炭>水解乳蛋白>聚乙烯吡咯烷酮>硝酸银。活性炭对抑制红豆杉愈伤组织褐化效果最好,最适浓度为 0.8 g/L (图 2),硝酸银对细胞具有一定的毒性,随着时间延长对愈伤组织生长影响较大。

2.2.3 不同继代时间对愈伤组织继代培养的影响

诱导外植体出愈是组织培养成功的第一步,但愈伤组织能顺利继代培养和较好地抑制褐化则是成功的关键,其中继代时间的选择对控制愈伤组织褐化和保障愈伤组织良好生长有重要作用(表 7)。用 Bonferroni 等方法统计分析显示:在愈伤组织生长第 10 天进行继代培养能够很好地克服褐化现象(图 3),增殖倍数高(6.08 倍);第 15 天时,已经出现褐化现象,增殖倍数下降;第 20 天时,褐化已经较严重,增殖倍数仅为 4.19 倍。

总结发现,继代时间短(5 d),愈伤组织刚刚适应继代培养基条件就被进行转移继代,难以利用培养基中有效营养物质,并且频繁地继代,细胞创伤导致褐化提前、褐化速度增加,影响愈伤组织继续生长;继代时间长(20 d),培养基中有效营养物质将被全部消耗掉,愈伤组织正常生长受到抑制、代谢异常,从而导致分泌酚类物质增多,生长速度迅速降低。

表 6 不同抗褐化剂和浓度对愈伤组织继代培养的影响

Table 6 Effects of different anti-browning agents on growth of callus subculture culture

Treatment	Concentration of inhibitor (g/L)	Dosage per vial (g)	Callus weight after 25 days (g)	The difference between every treatments	Browning grade
CK	0.0	1.35	4.86	3.60 ^a	++
Silver nitrate	0.1	1.32	5.23	3.96 ^a	+
	0.2	1.38	4.94	3.58 ^a	+
	0.3	1.41	5.12	3.63 ^a	+
	0.6	1.32	8.08	6.12 ^a	-
Activated carbon	0.8	1.29	9.43	7.31 ^a	-
	1.0	1.36	7.71	5.67 ^a	-
	0.3	1.43	6.55	4.58 ^a	+
Lactalbumin hydrolysate	0.5	1.34	7.49	5.59 ^a	-
	0.8	1.38	6.75	4.89 ^a	-
	0.5	1.40	6.37	4.55 ^a	+
Polyvinylpyrrolidone	1.0	1.33	6.97	5.24 ^a	+
	1.5	1.37	6.33	4.62 ^a	+

Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$).



图 2 添加 0.8 g/L 活性炭 B₅ 培养基愈伤组织的生长
Figure 2 Growth of callus in 0.8 g/L activated carbon B₅ medium.



图 3 出愈第 10 天继代培养于 B₅ 培养基愈伤组织的生长
Figure 3 Callus growth was subcultured in B₅ medium on day 10 of extraction.

表 7 不同继代时间对愈伤组织继代培养的影响

Table 7 Effects of different subculture time on growth of callus subculture

Subculture time (d)	Dosage per vial (g)	Callus weight of different subculture time (g)	The difference between every treatments	Browning grade
5	1.26	6.02	4.78 ^a	-
10	1.38	8.39	6.08 ^a	-
15	1.32	7.51	5.69 ^a	+
20	1.42	5.95	4.19 ^a	++

Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

1971 年, Wani 等^[19]利用核磁共振和 X 射线技术确定了从太平洋短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中分离精制出的白色晶体分子结构, 将其命名为紫杉醇(taxol)。紫杉醇的分子式为 C₄₇H₅₁NO₁₄, 相对分子质量 853.92, 难溶于水, 易溶于有机溶剂, 属四环二萜酰胺类化合物^[19]。紫杉醇已经在 60 多个国家临床应用, 是目前唯一促微管聚合的新型抗肿瘤药物。紫杉醇通过

与形成细胞有丝分裂纺锤体的微管结合,阻止微管解聚,使肿瘤细胞停留在G2期和M期,进而抑制癌细胞增殖和生长^[20],紫杉醇也可以通过激活信号转导途径诱导肿瘤细胞凋亡^[21]。紫杉醇除被广泛应用于治疗子宫癌、乳腺癌、结肠癌和直肠癌等癌症,也用于治疗冠心病、皮肤疾病、肝肾纤维化、炎症和轴突再生^[22],具有很高的医疗价值和科研价值。紫杉醇的生产方式有天然提取法、化学合成法、化学半合成法、内生真菌发酵法、植物组织细胞培养法^[6]。其中细胞培养法由于具有不受自然条件限制、紫杉醇产量较高等优点,是当今实现紫杉醇工业化生产最有希望的方法^[23]。但由于在细胞培养过程中愈伤组织的异质性和继代培养褐化控制等技术性难题以及配套反应器要求较高等,至今未能达到产业化应用水平^[24]。生产上需要不断研究和优化红豆杉细胞培养各阶段的条件,实现紫杉醇的产业化发展^[25]。

进行红豆杉愈伤组织诱导的材料一般选择的外植体都是茎段。徐志荣在对南方红豆杉细胞培养技术研究后表明当年生茎段的愈伤组织诱导时间短、诱导率高^[26]。本研究实验材料选择的是当年生带芽茎段($\phi=2$ mm),接种后第10天就能看到有明显的淡绿色半透明状愈伤组织生成,愈伤组织生成部位主要是茎切段的两端部分,出愈早、培养效果比较好,带芽茎段是最适合诱导曼地亚红豆杉愈伤组织的外植体。当年生带芽茎段中含内生真菌少,染菌率低,茎芽中储藏物质丰富,细胞活力强,易于诱导愈伤组织。

Fett-Neto 等^[27]研究发现黑暗培养条件下愈伤组织中紫杉醇的含量是光照培养条件下紫杉醇含量的2倍。在本研究中,在黑暗培养条件下,不同类型培养基MS、B₅、TA愈伤组织的诱导率都明显高于光照培养;B₅愈伤组织培养

基诱导率最高,为77.8%。这可能是黑暗能够抑制多酚氧化酶基因表达,降低褐化抑制所致,这一点与东北红豆杉愈伤组织诱导结果不相同^[25]。

目前报道的用于红豆杉愈伤组织诱导的基本培养基有MS、B₅、6,7-V和WPM,南方红豆杉愈伤组织诱导最常用MS、B₅两种基本培养基^[13]。本研究通过对MS、B₅和TA这3种培养基的筛选,发现无论诱导率还是诱导时间,B₅培养基在暗培养条件下最适合作为曼地亚红豆杉愈伤组织诱导的基本培养基,这一点与南方红豆杉愈伤组织诱导结果不同。B₅培养基是1968年由Gamborg等发明设计的,含有高浓度NO₃⁻和较低浓度的NH₄⁺是其主要特点^[26],表明曼地亚红豆杉细胞比较适合在高硝态氮的培养基中生长。

在南方红豆杉组织培养过程中,生长素常用2,4-D与NAA,细胞分裂素常用6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)和KT^[13]。为了规避过多激素使用对细胞生长的副作用,本研究选用2,4-D、NAA、KT这3种激素作为诱导愈伤组织的添加激素,通过正交试验发现,B₅+0.25 mg/L 2,4-D+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L KT形成愈伤组织的时间最短(10 d)、愈伤组织质量最好(淡绿色),诱导率最高(86.7%),最适合曼地亚红豆杉愈伤组织的诱导。这一结果与徐志荣^[26]报道的南方红豆杉培养基激素配比(MS+1.3 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L NAA+1.3 mg/L 6-BA)存在一定差异,可能是诱导材料品种不同所造成的。

在高效诱导愈伤组织的过程中,可以根据红豆杉的种类和细胞的生长阶段选择不同的培养基^[13]。本研究以2,4-D、NAA、KT这3种激素作为愈伤组织继代培养的添加激素,通过正交试验,结果表明B₅+0.5 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+1.5 mg/L KT最适合愈伤组织继代培养,

增殖倍数可以达到 6.53, 3 种激素使用浓度都高于愈伤组织初代培养, 这是由于活性炭具有吸附作用, 所以继代培养基中激素浓度应适当提高^[28]。

由于在愈伤组织诱导时外植体中的多酚氧化酶被激活导致细胞代谢发生变化, 细胞活力降低, 增殖生长缓慢甚至死亡, 因而严重影响和阻碍组织培养正常进行。李张等^[29]报道, N-乙烯基酰胺类聚合物聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)对南方红豆杉愈伤组织的褐化抑制作用较好。本研究结果表明活性炭、水解乳蛋白等外源物质能明显抑制红豆杉愈伤组织褐化, 并且发现最有利于愈伤组织继代培养和最大限度减轻愈伤组织褐化程度的物质是活性炭, 最佳抑制浓度为 0.8 g/L。活性炭主要成分为碳, 具有很强的吸附性能, 可以通过吸附分泌到细胞外的有害代谢产物而发挥作用。

孟慧雯^[25]在研究东北红豆杉细胞培养时发现继代时间为 25 d 时最有利于愈伤组织的继代培养。本研究结果表明在第 10 天进行继代培养最有利于愈伤组织快速生长, 并且能够有效减轻褐变程度, 结果存在差异的原因可能是不同红豆杉品种生理代谢存在着差异, 吸收利用培养基中物质快慢有别, 向培养基中分泌酚类物质的量不同。但促进愈伤组织良好生长、缩短培养周期是组织培养的目标, 也是生产所需。

细胞工程的基础是细胞培养。植物细胞的初代培养是通过无菌操作分离植物体的一部分, 接种于固体培养基上, 在人工控制条件下进行培养, 使其产生愈伤组织或者完整植株。在培养过程中, 筛选生长良好的胚性愈伤组织以进行悬浮细胞培养。悬浮培养是将植物细胞或较小的细胞团悬浮在液体培养基中进行培养, 悬浮培养能够保持培养物有良好的分散状态, 也有利于各种诱导子、前体物以及旁路代

谢抑制剂的添加, 定向提高目标产物的产量。本研究主要目标是进一步优化探索愈伤组织诱导和褐化抑制, 系统建立一套适合曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养的技术体系, 以促进曼地亚红豆杉组织培养技术日臻完善, 最终目的是为更加有效地进行红豆杉细胞悬浮培养生产紫杉醇药物产业化研究和扩大红豆杉资源提供重要资料, 为丰富红豆杉组织培养研究的理论与实践提供参考。

REFERENCES

- [1] SHANKAR NAIK B. Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review[J]. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2019, 19(1): 1-13.
- [2] 董明珠, 王立涛, 吕慕洁, 孟冬, 杨春雨, 赵春建, 付玉杰, 杨清. 濒危植物野生东北红豆杉群落特征及保护策略[J]. *植物研究*, 2020, 40(3): 416-423.
DONG MZ, WANG LT, LÜ MJ, MENG D, YANG CY, ZHAO CJ, FU YJ, YANG Q. Communities and protection strategy of endangered species wild *Taxus cuspidata*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2020, 40(3): 416-423 (in Chinese).
- [3] 张照喜, 喻泓, 杜化堂, 廖迎春, 肖曙光, 李化泉, 申明海, 董铭. 曼地亚红豆杉径枝生长关系研究[J]. *武夷科学*, 2005, 21(0): 47-51.
ZHANG ZX, YU H, DU HT, LIAO YC, XIAO SG, LI HQ, SHEN MH, DONG M. A study on the relationship between stem diameter and the growth factors of branch of *Taxus media*[J]. *Wuyi Science Journal*, 2005, 21(0): 47-51 (in Chinese).
- [4] 吴文芳, 李隆云. 药用植物抗旱研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(24): 14647-14648, 14707.
WU WF, LI LY. Research progress of drought resistance of medicinal plants[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(24): 14647-14648, 14707 (in Chinese).
- [5] 王希清, 寇萍, 李弘琨, 秦祥宇, 王立涛, 赵春建, 付玉杰. 红豆杉资源加工利用产业发展现状[J]. *生物质化学工程*, 2020, 54(6): 13-17.
WANG XQ, KOU P, LI HK, QIN XY, WANG LT,

- ZHAO CJ, FU YJ. Industrialization development status of *Taxus* resources[J]. Biomass Chemical Engineering, 2020, 54(6): 13-17 (in Chinese).
- [6] 李德水. 烟曲霉 TMS-26 产紫杉醇发酵工艺优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- LI DS. Optimization of fermentation process for taxol production by *Aspergillus fumigatus* TMS-26[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [7] 吴长桥, 蒋路园, 杨艳芳, 陆英, 唐其, 陈段芬, 邱德有. 红豆杉属植物中紫杉烷化合物含量比较与分析[J]. 中草药, 2021, 52(2): 538-543.
- WU CQ, JIANG LY, YANG YF, LU Y, TANG Q, CHEN DF, QIU DY. Comparative, regression and cluster analysis on contents of six taxanes in *Taxus* spp[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(2): 538-543 (in Chinese).
- [8] KIERAN PM, MacLOUGHLIN PF, MALONE DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 59(1/2): 39-52.
- [9] 朱泽燕. 农杆菌介导 Txpam 基因转化烟曲霉 TMS-26 及其产紫杉醇条件优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- ZHU ZY. Agrobacterium-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus* TMS-26 with a phenylalanine aminomutase gene and optimization conditions of paclitaxel production[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [10] CHRISTEN AA, GIBSON DM, BLAND J. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture: US5019504[P]. 1991-05-28.
- [11] EL-SAYED ASA, SAFAN S, MOHAMED NZ, SHABAN L, ALI GS, SITOHY MZ. Induction of Taxol biosynthesis by *Aspergillus terreus*, endophyte of *Podocarpus gracilior* Pilger, upon intimate interaction with the plant endogenous microbes[J]. Process Biochemistry, 2018, 71: 31-40.
- [12] SARMADI M, KARIMI N, PALAZÓN J, GHASSEMPUR A, MIRJALILI MH. Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2019, 137(2): 319-328.
- [13] 张文泉, 邓洁. 南方红豆杉组培快繁技术研究进展[J]. 现代农业, 2021(5): 37-39.
- ZHANG WQ, DENG J. Research progress on tissue culture and rapid propagation technology of *Taxus chinensis* var. *mairei*[J]. Modern Agriculture, 2021(5): 37-39 (in Chinese).
- [14] 李守真. 曼地亚红豆杉组培技术体系建立及内生真菌分离鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- LI SZ. Establishment of tissue culture technology system of *Taxus mandia* and isolation and identification of endophytic fungi[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2011 (in Chinese).
- [15] 胡凯, 祝顺琴, 谈锋, 唐克轩. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养中抑制褐化的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2004, 29(4): 659-663.
- HU K, ZHU SQ, TAN F, TANG KX. Studies on callus induction of *Taxus media* and darkening inhibition in callus subculture[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science), 2004, 29(4): 659-663 (in Chinese).
- [16] 黄宁珍, 付传明, 何成新, 唐凤鸾, 李锋. 曼地亚红豆杉愈伤组织诱导和继代培养研究[J]. 广西科学, 2007, 14(3): 306-311.
- HUANG NZ, FU CM, HE CX, TANG FL, LI F. Callus induction and subculture of *Taxus media* var. *hickss*[J]. Guangxi Sciences, 2007, 14(3): 306-311 (in Chinese).
- [17] 杨善朝, 张军舰. SPSS 统计软件应用基础[M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 2001: 196-247.
- YANG SC, ZHANG JJ. Application basis of SPSS statistical software[M]. Guilin: Guangxi Normal University Press, 2001: 196-247 (in Chinese).
- [18] BENIAMINI Y, YEKUTIELI D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency[J]. The Annals of Statistics, 2001, 29(4): 1165-1188.
- [19] WANI MC, TAYLOR HL, WALL ME, COGGON P, McPHAIL AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*[J]. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [20] KUDO Y, ABE A, ITO K, CHO Y, YOTSU-YAMASHITA M, KONOKI K. Expression of

- recombinant alpha and beta tubulins from the yew *Taxus cuspidata* and analysis of the microtubule assembly in the presence of taxol[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 78(11): 1887-1894.
- [21] 刘丹, 康宏, 孙传真, 肖野, 赵凯. 紫杉醇诱导凋亡的信号传导通路及与凋亡相关的基因和蛋白[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(2): 153-160.
- LIU D, KANG H, SUN CZ, XIAO Y, ZHAO K. Paclitaxel induced apoptotic genes and pathways alterations: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(2): 153-160 (in Chinese).
- [22] KIMURA M, USAMI E, TERAMACHI H, YOSHIMURA T. Cost-effectiveness and safety of ramucirumab plus paclitaxel chemotherapy in the treatment of advanced and recurrent gastric cancer[J]. *Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 2018, 24(6): 403-411.
- [23] 白贺. 东北红豆杉细胞悬浮培养与紫杉醇提取分离技术研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2020.
- BAI H. Study on cell suspension culture and extraction and separation of taxol from *Taxus cuspidata*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2020 (in Chinese)
- [24] 邱涵, 孟丽媛, 杨婉婷, 凌树玉, 任凯利, 魏赛金[J]. 灵芝诱导子对南方红豆杉悬浮培养细胞产紫杉醇的影响. *河南农业科学*, 2023, 52(10): 52-59 (in Chinese).
- QIU H, MENG LY, YANG WT, LING SY, REN KL, WEI SJ. Effect of *Ganoderma lucidum* elicitor on paclitaxel production by *Taxus wallichiana* var. mairei suspension culture cells[J]. *Journal of Henan agricultural sciences*, 2023, 52(10): 52-59 (in Chinese).
- [25] 孟慧雯. 东北红豆杉悬浮细胞高效诱导紫杉醇及代谢调节研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2022.
- MENG HW. Efficient induction of taxol and metabolic regulation in suspension cells of *Taxus cuspidata*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [26] 徐志荣. 南方红豆杉细胞悬浮培养体系建立及培养条件优化[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2018.
- XU ZR. The establishment of cell suspension culture system and optimization culture conditions of *Taxus chinensis* var. mairei[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [27] FETT-NETO AG, PENNINGTON JJ, DiCOSMO F. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* sieb and zucc[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1995, 146(5/6): 584-590.
- [28] 李斌连, 邱萃, 刘金仙, 王贵荣, 何水林. 南方红豆杉愈伤组织诱导和继代培养体系的建立[J]. *福建农业大学学报*, 2006, 35(5): 515-518.
- LI BL, QIU C, LIU JX, WANG GR, HE SL. Establishment of callus induction and subculture system of *Taxus chinensis* var. mairei[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2006, 35(5): 515-518 (in Chinese).
- [29] 李张, 徐志荣, 娄佳兰, 谭小林, 刘怡婷, 上官桃凤, 魏赛金. 防褐化剂对南方红豆杉愈伤组织褐化及相关物质含量的影响[J]. *生物灾害科学*, 2018, 41(1): 69-73.
- LI Z, XU ZR, LOU JL, TAN XL, LIU YT, SHANGGUAN TF, WEI SJ. Effects of browning antagonists on callus browning and its related substance contents in *Taxus chinensis* var. mairei[J]. *Biological Disaster Science*, 2018, 41(1): 69-73 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)