

库拉索芦荟组织培养细胞分化与芦荟素产生相关性研究

李景原¹, 柴志艳¹, 丁位华¹, 赵红艳¹, 代磊¹, 胡正海²

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:以库拉索芦荟叶为外植体, 诱导出愈伤组织。应用电子显微镜观察了愈伤组织培养细胞结构分化状况。用高效液相色谱法测定了培养物中芦荟素的含量。在此基础上探讨了芦荟组织培养细胞分化程度与芦荟素等有效成分产生的关系。结果表明: 以叶为外植体, MS+NAA 1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 培养基适于愈伤组织诱导和生长。细胞分化程度很低的愈伤细胞中芦荟素含量很低。细胞高度液泡化、分化程度高的愈伤组织中芦荟素含量较高。植物生长调节物通过影响芦荟愈伤组织细胞分化程度, 进而影响芦荟愈伤组织中芦荟素等有效成分的产生。芦荟素含量与愈伤组织中细胞结构分化有密切关系。

关键词: 芦荟; 组织培养; 细胞分化; 芦荟素

中图分类号: S 682.33; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)09-0157-03

利用细胞培养技术生产次生代谢产物是持续开发利用植物资源的有效途径之一。林建、杨美纯等报道了芦荟组织培养快速繁殖技术^[1,2], 王红星等报道了中华芦荟 (*Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg.) 组织培养物中芦荟素的测定³。但愈伤组织是如何产生芦荟素等有效成分的, 以及如何提高芦荟组织培养物中芦荟素等有效成分的含量尚未见报道。该文报道了库拉索芦荟愈伤组织的诱导及其芦荟素含量的测定结果, 并探讨了愈伤组织中细胞形态分化与次生代谢产物积累的关系。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织的诱导和培养

供试植物材料为库拉索芦荟 (*Aloe vera* L.) 幼叶。取芦荟的幼叶用自来水冲洗干净, 然后用 0.1% 升汞溶液浸泡消毒 10 min., 再用无菌水漂洗 5~6 次。将幼叶剪成长约 1 cm 的小段, 于无菌条件下接种到预先配制好的培养基上。基本培养基为 MS 培养基, 加蔗糖 20 g/L, 琼脂 8 g/L。分别添加不同种类和不同浓度的激素组合, 见表 1。在 (25±2) °C 温度, 每日光照 12 h 下培养。

1.2 高效液相色谱法测定培养物中芦荟素含量

第一作者简介: 李景原 (1963-), 男, 河南上蔡人, 博士, 教授, 现从事植物学教学与植物细胞分化的调控方面科研工作。E-mail: lijy-bot@sina.com。

通讯作者: 胡正海。E-mail: wtaixia@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470105); 河南省高校青年骨干教师资助计划; 河南省科技重点攻关资助项目 (072102270018)。

收稿日期: 2008-03-25

1.2.1 **仪器和色谱条件** Waters 600 高效液相色谱仪, 色谱柱为 20rbax C₁₈, 150×4.6 mm, 流动相为甲醇-水 (55 : 45), 柱温 20 °C, 流速 1 mL/min, 检测波长 365 nm。芦荟素标准品购自 Sigma 公司。

1.2.2 **标准曲线的绘制** 精确称取芦荟素标准品 2 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解、定容。然后, 分别进样 3、5、10、15、20 μL, 以峰面积为纵坐标, 对照品量为横坐标, 得回归方程 $A = 698.693C - 5.668$, $r = 0.9984$ 。

1.2.3 **芦荟素的含量** 将不同培养基上获得的愈伤组织在 60 °C 下干燥 24 h, 粉碎后过 20 目筛。分别精确称取样品粉末 0.5 g 于 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 50 mL, 超声提取 60 min, 静置后过滤。吸取过滤液 10 μL 进样, 根据峰面积计算芦荟素含量。

1.2.4 **精密度的测定** 吸取芦荟素标准品溶液 10 μL 进样, 测量峰面积。连续重复 5 次, 求得相对标准误差 (RSD) = 0.928%。

1.3 超薄切片法和电子显微镜观察

将材料切成长 2~3 mm, 宽 1 mm 的小块, 在 4 °C 下用 3% 戊二醛固定 2 h, 再用 1% 的锇酸固定 4 h, 经系列乙醇脱水后用 Epon812 树脂包埋。用 Reichert-Jung 型超薄切片机切片, 切片厚度 500~700 Å。醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 各染 30 min。用日本产 JEM100SX 型透射电子显微镜, 按照常规电子显微镜操作方法观察并照相。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和培养结果

外植体同是幼叶, 但在不同培养基上愈伤组织生长

表现出明显差异。激素种类和配比都能显著影响愈伤组织生长的速度和质地。2, 4-D 有利于诱导芦荟叶产生愈伤组织和促进愈伤组织生长, 含较高浓度 2, 4-D 培养基上形成的愈伤组织质地疏松。NAA 诱导芦荟叶产生愈伤组织的能力较 2, 4-D 稍弱, 但较高浓度的 NAA 也

能诱导产生愈伤组织和促进愈伤组织快速生长, 该试验中, 在 MS+NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基上生长最快。在含 NAA 培养基上形成的愈伤组织质地致密。

表 1 不同培养基上愈伤组织的诱导和生长状况

培养基序号	培养基附加激素种类和配比	愈伤组织的诱导和生长状况
1	NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织质地致密, 生长慢
2	NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织淡绿色或淡黄绿色, 质地致密, 生长慢
3	NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织淡绿色, 质地致密, 生长快
4	2, 4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织呈半透明状, 质地致密, 生长较慢
5	2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织呈半透明状, 质地疏松, 生长快
6	2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	愈伤组织半透明状, 质地疏松, 生长快

2.2 培养物中芦荟素含量的测定结果

高效液相色谱测定结果证明, 在含有 NAA 培养基上形成的愈伤组织质地致密, 其芦荟素含量较高, 为 0.5%~0.6%。而含有 2, 4-D 培养基上诱导出的愈伤组织质地疏松, 其芦荟素含量普遍较低, 为 0.01%~0.10%, 其还不到质地致密型愈伤组织芦荟素含量的十分之一。试验证明, 植物生长调节物通过影响芦荟愈伤组织质地, 进而影响芦荟愈伤组织中芦荟素等有效物质含量。

表 2 不同培养基上愈伤组织中芦荟素含量

培养基序号	培养基附加激素种类和配比	愈伤组织中芦荟素含量(干重)/%
1	NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.592
2	NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.589
3	NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.563
4	2, 4-D 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.104
5	2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.038
6	2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L	0.012

2.3 愈伤组织细胞分化的观察结果

在不同培养基上形成的芦荟愈伤组织, 其质地也不相同。在含有 NAA 培养基上形成的愈伤组织质地致密, 而含有 2, 4-D 的培养基上形成的愈伤组织质地多疏松, 且愈伤组织质地疏松程度随着 2, 4-D 浓度的增加而增大。显微观察表明, 质地不同的愈伤组织, 其细胞排列方式、细胞分化水平也不相同。质地疏松的愈伤组织, 细胞排列疏松、有较发达的细胞间隙, 其细胞中细胞核占的比例大, 细胞质浓, 细胞分化程度低。质地致密的愈伤组织, 细胞排列紧密, 愈伤组织细胞液泡化、分化程度高。

3 讨论

自从植物细胞的全能性被证明以来, 植物组织培养、细胞培养在多数植物中都已成功。植物组织培养、细胞培养作为一类成熟技术应用于植物快速繁殖、植物发育研究和植物遗传改良等。现在, 普遍认为利用细胞

培养技术生产植物次生代谢产物是持续开发利用植物资源的有效途径之一。然而, 经过近半个世纪的探索, 虽然植物组织培养、细胞培养方法和技术方面取得较大进展, 但利用细胞培养技术生产植物次生代谢产物达到工业化规模生产的却很少。其主要原因是培养物中有效成分含量太低, 工业生产成本高。因此, 研究培养物中细胞分化与有效成分产生之间的联系, 提高有效成分含量是利用细胞培养技术生产植物次生代谢产物的关键之一。

在自然生长的芦荟植物体内, 不是所有的植物体细胞都能产生芦荟素等有效成分, 而是只有一些特化的细胞才能产生和贮藏芦荟素等有效成分^[4-5]。该试验结果证明, 芦荟素含量与愈伤组织的质地和细胞分化程度有密切关系。质地疏松、细胞分化程度低的愈伤组织芦荟素含量低; 质地致密, 细胞分化程度较高的愈伤组织芦荟素含量也高。而愈伤组织质地和细胞分化程度是由培养条件决定的, 尤其与植物激素种类和浓度有密切关系。因此, 利用植物组织或细胞培养技术产生次生代谢物时, 不仅要求细胞分裂、生长的快, 生物产量高, 更重要的是通过选择适宜的培养条件, 使细胞产生特定的分化, 才能提高次生代谢物的产量。

参考文献

- [1] 林建, 陈绍潘. 芦荟组织培养快速繁殖试验研究[J]. 广西热作科技, 1997(2): 22-24.
- [2] 杨美纯, 周歧伟, 许鸿源. 芦荟的叶片组织培养[J]. 广西农业科学, 2001(5): 241-242.
- [3] 王红星, 王太露, 李发启, 等. 中华芦荟组织培养物的芦荟素含量测定[J]. 中药材, 2004, 27(9): 627-628.
- [4] 沈宗根, 李景原, 胡正海. 9 种芦荟属植物叶的结构和芦荟素含量的比较研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 278-286.
- [5] LI J R, WANG T X, HU Z H. Relation between leaf structure and ab-in content in 6 species of Aloe [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(5): 594-600.

红掌盆栽品种组织培养及种苗快繁技术

吴海红, 印东生, 赵兴华, 闫立萍

(辽宁省农业科学院 花卉研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对红掌 (*Authurium andraeanum*) 盆栽品种“北京成功”和“粉色的爱”的组织培养和快速繁殖进行了研究, 采用叶片、叶柄、茎段作为外植体进行诱导, 结果表明: 叶片的诱导效果最好; BA 与 KT 混合使用比单一使用效果好; 基本培养基改良 MS 优于 1/2 MS, 1/2 MS 优于 MS。红掌愈伤组织诱导以改良 MS+BA 1+KT 1+NAA 0.1+IBA 0.1 培养基效果最好, 试管苗在 MS+BA 1+IAA 0.05 培养基上增殖倍数最高。

关键词: 红掌; 组织培养; 种苗快繁

中图分类号: S 642.1⁺4; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)09-0159-03

红掌 (*Authurium andraeanum*) 又名火鹤花、安祖花、花烛, 为天南星科花烛属多年生附生常绿草本植物, 原产哥伦比亚, 1876 年由法国著名植物学家 Elouard Andr. 首次发现, 故有安祖花的谐音名。1940 年以后许多国家进行引种、育种, 培育出许多不同花色花型的品种, 已知的约有 500 个品种, 荷兰、哥伦比亚栽培较多, 既可作盆花, 也可作切花, 以切花为主。所有红掌品种其原生环境均为热带和亚热带森林, 为附生性植物, 对栽培介质、光线、温度、相对湿度、水质、营养等条件的要求较高。

盆栽红掌株高 40~50 cm, 茎极短; 叶自根茎抽出, 心形, 颜色鲜绿、革质; 单生顶花, 花梗长约 50 cm, 佛焰苞广心形, 颜色鲜红, 肉穗花序圆柱状, 黄色。别致的叶形加之火红挺直的佛焰苞, 犹如精美灯台上燃着的蜡烛, 高雅别致、气势非凡。因此, 红掌已成为当前国际上流行的名贵切花材料与盆栽品种。20 世纪以来, 荷兰将红掌作为一类重要的切花研究, 并培育出许多切花和盆栽新品种。20 世纪 70 年代引入我国, 目前已经成为我国高档名贵的盆花和切花品种。

目前, 国内外均采用组织培养的方法对红掌进行繁殖, 国外的技术已经比较成熟, 国内从事红掌组培研究的单位比较多, 但存在建立再生系统慢、繁殖速率不高、种苗整齐度不均以及种苗易退化等问题。辽宁省农业科学院花卉研究所的组织培养研究室利用盆栽品种“北京成功”和“粉色的爱”2 个品种针对国内存在的技术难题展开试验, 探索出适合红掌脱分化和再分化的培养

第一作者简介: 吴海红(1972-), 女, 助理研究员, 主要从事名优花卉组织培养工作。E-mail: wuhh1997@yahoo.com.cn.

基金项目: 辽宁省重点实验室建设资助项目(200740315); 沈阳市科技创新人才团队引进资助项目(1071275-0-02)。

收稿日期: 2008-03-28

Relationship Between Cell Differentiation and Aloin Production in the Callus of *Aloe Vera*.

LI Jing-yuan¹, CHAI Zhi-yan¹, DING Wei-hua¹, ZHAO Hong-yan¹, DAI Lei¹, HU Zheng-hai²

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an Shanxi 710069, China)

Abstract: The callus was induced from the leaf of *Aloe vera*, and the cell differentiation of the callus was observed with transmission electron microscopy (TEM). The aloin content in callus was determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Based on this result, compared the relations with the extent of cell differentiation of callus and the production of aloin. The results showed it was appropriate for the callus to be induced and growing on the medium of MS+NAA 1 mL/L+0.5 mg/L. The lower the extents of cell differentiation of the callus were, the lower aloin contents were. Thus, firstly plant growth regulators affected the extents of cell differentiation of the callus and further affected the production of aloin. In a word, there were considerable relations between aloin content and cell differentiation of the callus.

Key words: Aloe; Tissue Culture; Cell differentiation; Aloin