

## 苦丁茶愈伤组织的诱导与褐变抑制

祝 骥<sup>1\*</sup>, 姚汝华<sup>2</sup>, 黄毓文<sup>1</sup>, 梁承邨<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650; 2. 华南理工大学生物工程系, 广东 广州 510641)

**摘要:** 以叶片为材料, 对苦丁茶愈伤组织的诱导, 继代培养及褐变调控的研究表明: (1) 苦丁茶愈伤组织的诱导及继代培养均以 MS 附加 BA 2.0 mg L<sup>-1</sup> 和 NAA 4.0 mg L<sup>-1</sup> 的培养基效果最好; (2) 0.1% 的植酸可明显促进愈伤组织生长、抑制褐变, 而硫代硫酸钠效果最差; (3) 连续培养 40-50 d 愈伤组织增长倍数达到最大值; (4) 继代 27 次以后愈伤组织生长速度开始下降。这些条件为下一步细胞培养生产苦丁茶甙等生物活性物质提供了基础。

**关键词:** 苦丁茶; 愈伤组织诱导; 褐变

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)04-0319-05

## CALLUS INDUCTION AND BROWNING INHIBITION IN *ILEX KUDINGCHA* C. J. TSENG

ZHU Ji<sup>1</sup>, YAO Ru-hua<sup>2</sup>, HUANG Yu-wen<sup>1</sup>, LIANG Cheng-ye<sup>1</sup>

(1. South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Department of Biotechnology, South China Science and Technology University, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** Young leaf segments from micropropagated plants were used to study the optimum medium and growth regulators for callus induction of *Ilex kudingcha*. The highest multiplication rate for callus induction and subculture of calluses was obtained using MS medium supplemented with 2.0 mg L<sup>-1</sup> BA and 4.0 mg L<sup>-1</sup> NAA. 0.1% phytic acid could markedly promote the growth of calluses and inhibit callus browning. Multiplication rate of calluses was highest in calluses cultured for 40-50 days, and decreased after 27<sup>th</sup> generation in subculture.

**Key words:** *Ilex kudingcha*; Callus induction; Callus browning

苦丁茶(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)又名苦灯茶, 属冬青科<sup>[1]</sup>。原产我国华南沿海省区, 其老叶和嫩芽均可作药、茶两用, 有较高的经济价值。它含有咖啡碱、熊果酸、芳香油、苦丁茶甙、 $\alpha$ -香树脂、 $\beta$ -谷甾醇, 以及多种维生素与微量元素等生物活性物质, 具多种药用功效与保健作用, 对高血压、动脉硬化、冠心病、便秘、咽喉肿痛及糖尿病等多种疾病有显著疗效, 尤其是它有效的减肥作用<sup>[1,2]</sup>。苦丁茶叶及其制剂在国际市场上走俏, 近年来其种植面积逐渐扩大。苦丁茶的有性繁殖速度极慢, 植株 6-7 年后才能开花, 种子萌发率极低, 而且栽培要

收稿日期: 2000-01-03

\* 现在华南理工大学生物工程系攻读博士学位

占用大量耕地, 因此利用组织及细胞培养进行工厂化生产, 是苦丁茶研究领域的重要课题<sup>[3]</sup>。苦丁茶试管苗快速繁殖已有几例报道<sup>[4,5]</sup>, 其愈伤组织诱导及细胞培养尚不多见。

## 1 材料和方法

**材料** 苦丁茶种苗由华南植物园提供。取盆栽植株的幼嫩枝条, 剪去叶片并切成长约 2-3 cm 的茎段, 用 10% 次氯酸钠洗净后, 经蒸馏水冲洗, 转移到超净工作台上用 0.1 mol/L  $\text{HgCl}_2$  浸泡 15-20 min, 无菌水冲洗 3-5 次, 滤纸吸干后, 将材料切成带有一个腋芽的茎段, 并将形态学下端向下插于繁育培养基, 温度为  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 光照每天 12 h, 光强 2000 lx。接种 8 d 左右, 腋芽开始萌动, 两个月形成 3-4 cm 的无菌试管苗, 其幼嫩的叶片即可作为愈伤诱导的外植体。

**培养基** 基本培养基 (MS): MS 大量元素和微量元素 + 肌醇  $100 \text{ mg L}^{-1}$  + 烟酸  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  + 盐酸硫胺素  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  + 盐酸吡哆醇  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  + 甘氨酸  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  + 琼脂 0.7% + 蔗糖 3.0%。繁育培养基: MS + BA  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  + KT  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  + IBA  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ 。愈伤诱导及继代培养基: MS 或 White 基本培养基, 附加 BA、NAA、2,4-D、植酸 (PA)、活性炭 (AC)、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、维生素 C (V-C) 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  等不同成分。体细胞胚成熟培养基: MS + BA  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ 。

**愈伤组织诱导** 取苦丁茶试管苗幼嫩叶片作外植体, 切成 2-4  $\text{mm}^2$  小块, 接种到不同激素配比的愈伤诱导培养基上。每个处理接种 15 瓶, 共 60 块, 每个 50 ml 的三角瓶加 20 ml 培养基。培养 50-60 d 后统计出愈伤块数, 计算诱导率, 同时观察愈伤组织生长情况。

**抗褐变剂处理** 以 MS + BA  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  + NAA  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$  培养基上培养的叶片愈伤组织为试材, 并仍以此培养基进行以下 2 项试验: (1) 植酸 (PA) 浓度试验: 0.02%、0.1%、0.5% 和 1.0%、2.0%, 对照 PA 为 0; (2) 抗褐变剂比较试验: PA 0.1%、AC 0.1%、V-C  $5 \text{ mg L}^{-1}$ 、PVP 0.5% 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.1%, 以不添加抗褐变剂为对照。此 2 项试验每个处理接种 20 瓶。

**愈伤组织生长动态观察** (1) 愈伤组织在 MS + BA  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  + NAA  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$  + PA 0.1% 培养基上连续培养, 接种 80 瓶, 分别于培养后 5、10、20、30、40、50、60 d 各取 10 瓶称取愈伤组织重量, 绘制生长曲线。(2) 将褐变程度最低的愈伤组织每 30 d 更换新鲜培养基, 每瓶愈伤组织分为两瓶, 并在更换培养基前取 10 瓶称重, 考察继代培养代数对愈伤组织生长的影响。

**愈伤组织褐变等级划分** 褐变程度等级划分: 0 级—外观鲜艳, 乳白略带浅黄色; 1 级—轻度褐变, 黄色; 2 级—褐变, 黄褐色; 3 级—严重褐变, 黑褐色。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织诱导

苦丁茶的幼嫩叶片在接种后培养约 20 d 开始出现愈伤组织。MS 与 White 基本培养基相比, 前者更适合苦丁茶的愈伤组织诱导, 其诱导频率可达 37.93%—53.33%, 而且其中有部分愈伤组织可以进一步分化出胚状体并再生出小植株。White 培养基则几乎不能诱导愈伤组织产生。MS 基本培养基附加 BA 和 NAA 诱导的愈伤组织生长较慢, 黄白色, 内有颗粒状的结构—

胚状体, 继代培养后很快变成松散的颗粒状愈伤组织, 不易褐变, 胚状体多, 其中 26.54% 可再生出植株; 附加 BA 与 2,4-D 诱导的愈伤组织, 前期生长快, 乳白色, 后期易褐变, 胚状体少且植株再生频率低(表 1)。

表 1 不同培养基对苦丁茶叶片愈伤组织诱导及植株再生的影响

Table 1 Effects of different media on callus induction and plant regeneration of *Ilex kudingcha*

激素 Growth regulators (mg L <sup>-1</sup> )	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导频率 Callus induction rate (%)	胚状体数/外植体 No. of embryoid per explant	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)
MS+BA 2.0+2,4-D 4.0	58	37.93	1.5	12.64
MS+BA 2.0+NAA 4.0	60	53.33	2.7	26.54
White+BA 2.0+2,4-D 4.0	55	0	0	0
White+BA 2.0+NAA 4.0	58	3.45	0	0

## 2.2 抗褐变剂对愈伤组织生长的影响

### 2.2.1 PA 浓度对愈伤组织生长及褐变的影响

PA 在许多植物的组织培养中用作抗褐变剂, 但不同浓度其效果差异显著。在苦丁茶的愈伤组织诱导中, 添加适当浓度的 PA 可以促进愈伤组织生长, 抑制褐变(表 2)。其中以 0.1% 和 0.5% 的效果为最好, 愈伤组织分别增长 9.46 和 7.85 倍, 对照只有 6.41, 差异显著, 而且愈伤组织呈淡黄色或乳白色, 褐变受到明显的抑制, 基本没有褐变发生。此外, 还可提高植株再生的频率。但在 0.02% 的低浓度时效果不明显; 而超过 0.5% 时不仅不能抑制褐变, 反而对愈伤组织的生长有阻碍作用, 甚至在 2.0% 时表现出加速褐变的情况。

表 2 PA 对苦丁茶叶片愈伤组织生长、褐变及植株再生的影响

Table 2 Effects of phytic acid (PA) on callus growth, callus browning and plant regeneration of *Ilex kudingcha*

PA (%)	接种时愈伤组织鲜重 CFW* at inoculation (g)	30 d 后愈伤组织鲜重 CFW after 30 days (g)	增长倍数 Increasing times	褐变程度 Browning drgree**	植株再生频率 Plant regeneration frequency (%)
0	2.09	13.39	6.41	1	25.6
0.02	2.33	15.21	6.53	1	27.2
0.1	2.15	20.34	9.46	0	37.7
0.5	2.40	18.84	7.85	0	34.5
1.0	2.34	13.01	5.56	1	29.1
2.0	2.20	11.66	5.30	2	20.3

\*CFW: Callus fresh weight. \*\*Browning degree are represented by: 0 — bright, milk white; 1 — slight browning, yellow in colour; 2 — browning, yellowish brown; 3 — serious browning, dark brown.

### 2.2.2 不同抗褐变剂处理的效果

许多抗氧化剂能抑制植物组织的褐变。由表 3 可以看出, PA、AC 和 V-C 效果较好, 愈伤组织外观鲜艳, 浅黄色, 褐变受到抑制(0 级), 其中 PA 最好, 不仅能有效抑制褐变, 对组织生长也有明显的促进作用, 愈伤组织增重达 10.42 倍。0.1% 的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 则对愈伤生长有抑制作用, 而且褐变加重。

表3 不同抗褐变剂对褐变调控的比较

Table 3 Effects of browning-resistant agents on callus browning

抗褐变剂 Browning resistants	接种时愈伤鲜重 CFW at inoculation (g)	30 d 后愈伤鲜重 CFW after 30 days (g)	增长倍数 Callus increasing times	褐变程度 Browning degree
0	2.31	16.52	7.15	1
Phytic acid (0.1%)	2.11	21.94	10.42	0
Active carbon (0.1%)	2.35	22.98	9.78	0
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (0.1%)	2.08	6.68	3.21	3
Vitamin C (4 mg L <sup>-1</sup> )	2.21	18.63	8.43	0
Polyvinylpyrrolidone (0.5%)	2.25	14.33	6.37	1

Abbreviations and symbols are as in Table 2.

### 2.3 愈伤组织的连续培养

对连续培养的愈伤组织,测定其生长5、10、20、30、40、50、60 d的鲜重增长量并计算增长率,结果见图1。在培养的前20 d,愈伤组织生长缓慢;20-40 d,生长速度呈指数增长,为对数生长期;40 d以后生长速度又明显减慢,为停滞期。因此,要获得较高的生物量,则应在培养40-50 d内收获培养物。

### 2.4 愈伤组织的继代培养

如果要将培养的愈伤组织进行继代培养,必须选对数生长期的组织细胞。因为停滞期虽然生产量最高,但组织细胞已趋向老化。本实验选取生长最旺盛的组织细胞(培养30 d)进行继代培养,并比较了不同继代培养次数愈伤组织生长情况,结果见图2。继代培养1-6代,愈伤组织增长率迅速提高,6代以后增长率达到高峰,这种旺盛的生长可以持续到27代,27代以后增长率就开始下降。同时还发现经3-5次继代培养后,其愈伤诱导的能力提高,生长对数期也提前约10 d,故在6次继代后继代时间改为20 d。

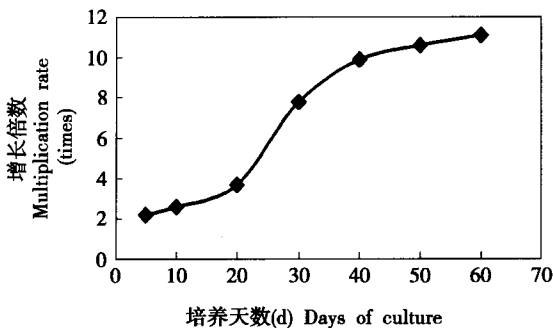


图1 苦丁茶愈伤组织生长曲线

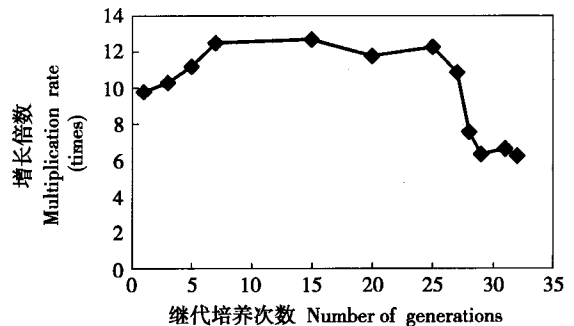
Fig. 1 Callus growth curve for *Ilex kudingcha*

图2 苦丁茶愈伤组织继代培养生长曲线

Fig. 2 Callus growth curve in subculture of *Ilex kudingcha*

以上研究结果表明,苦丁茶愈伤组织的诱导和继代培养以MS培养基附加BA与NAA的效果最好,诱导出的愈伤组织为乳白色或浅黄色,其结构较松散,呈颗粒状,很少褐变,而且能够形成相当数量的胚状体,并再生出小植株;而附加BA和2,4-D后诱导的愈伤组织生长快,淡黄色,半透明松软,连续培养40 d就开始褐变,胚状体再生植物频率明显低于前者。2,4-D

在许多植物的愈伤组织诱导中非常有效<sup>[6-8]</sup>, 在本研究中发现仅加 2,4-D 不能诱导苦丁茶愈伤组织。而 White 培养基也基本不能用于苦丁茶的愈伤组织诱导。这也说明因基因型的不同, 各种植物对同一培养基及激素的反应差异极大。

褐变在许多植物的组织培养中相当普遍, 轻则抑制愈伤组织生长, 严重的会导致外植体的迅速死亡。因而减轻或控制褐变发生是许多植物细胞、组织培养研究的重要内容。褐变的主要机理是组织细胞受到伤害后, 使得其还原性物质被空气中的氧气氧化为醌类物质, 后者具有细胞毒性<sup>[9]</sup>。Broome<sup>[10]</sup>研究发现, 对于易褐变的材料进行连续转移可以减轻醌类物质对培养物的毒害作用, 在培养基中加入抗氧化剂进行材料的预处理可预防醌类物质的形成。本试验结果表明, PA、AC 和 V-C 均具有抑制苦丁茶愈伤组织褐变的作用, 但以 PA 效果最好, 不仅能控制褐变发生, 还能促进愈伤组织生长、胚状体的形成及植株再生。刘淑兰等<sup>[11]</sup>研究表明, 硫代硫酸钠能有效地控制核桃外植体的褐变, 然而在苦丁茶的愈伤组织诱导中不仅没有表现出对褐变的抑制作用, 反而加速褐变, 是何原因尚需进一步研究。尽管细胞、组织培养中的褐变调控涉及多个方面, 但最关键的是要选择适宜的培养基及激素组合, 使外植体或细胞处于旺盛生长的状态, 再配合一些抗褐变剂的使用, 才能取得满意的效果。

继代培养是植物组织及细胞培养工厂化生产具有生物活性的次生代谢物质的基础。然而要进行有效的继代培养, 必须选择愈伤组织生长即将达到顶峰之前, 这时愈伤组织的细胞处于旺盛分裂之中, 继代后很容易进入生长期。反之等到愈伤组织停止生长了, 在转移到新鲜培养基上, 则较难恢复细胞分裂。同时, 愈伤组织经长期培养会出现遗传不稳定性和变异性, 利用这一特性可能选择合适的培养时期获得含次生代谢物质很高的愈伤组织。如铁海棠 (*Euphorbia milii*) 愈伤组织, 其细胞经 21 次继代培养选择后, 其细胞含丰富的花青素。然而有些植物细胞经长期继代培养后失去生长能力, 如天仙子的愈伤组织经过 44 次继代培养 (21 d 继代 1 次) 后逐渐丧失其生物碱的生产能力<sup>[9]</sup>。在苦丁茶的研究中发现继代培养 27 次后其愈伤组织生长增长率逐渐下降, 其生物活性成分生产能力是否也随之下降, 尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 朱莉芬, 李美珠, 钟伟新, 等. 苦丁茶的心血管药理作用研究 [J]. 中药材, 1994, 17(3):37-40.
- [2] 吕江陵, 刘广南, 刘惠纯, 等. 健美袋泡剂降脂减肥作用的实验研究 [J]. 中药材, 1997, 20(5):251-253.
- [3] 刘国民. 苦丁的经济价值与海南岛发展苦丁的可行性分析 [J]. 海南大学学报 (自然科学版), 1994, 12(4):324-327.
- [4] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996, 227-229.
- [5] 刘德华. 苦丁茶树微繁殖技术的研究 [J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(3):234-236.
- [6] 祝骥, 黄毓文, 梁承鄞, 等. 提高木薯循环培养的次生体胚再生植株频率研究 [J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(2):144-151.
- [7] Sofiari E, Raemakers C J J M, Kanju E, et al. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in cassava [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 50(1):45-56.
- [8] Yeung E C. Structural and Developmental Pattern in Somatic Embryogenesis [A]. In: Thorpe F L. *In vitro* embryogenesis in plants [M]. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995, 205-247.
- [9] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1996, 34-37.
- [10] Broome O C, Zimmerman R H. *In vitro* propagation of Blackberry [J]. Horticulture Science, 1978, 13:151-153.
- [11] 刘淑兰, 韩碧文. 核桃愈伤组织的诱导 [J]. 植物生理学通讯, 1984, 4:38.