

文章编号:1000-582X(2007)05-0113-06

# 中华芦荟愈伤组织的诱导

潘宇,胡宗利,陈国平,刘阳,王肖云,陈绪清

(重庆大学生物工程学院,重庆 400030)

**摘要:**以中华芦荟幼苗茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,通过添加不同浓度的生长素、细胞分裂素或两者组合,以及添加 Vc 或活性炭(共 350 种组合),研究中华芦荟愈伤组织的诱导及生长情况。结果表明,在单独使用不同种类的生长素时,不同浓度的生长素诱导的愈伤组织频率差异明显,且愈伤组织的生长状态也各异;单独使用细胞分裂素时,愈伤组织的诱导率极低。当组合不同浓度和种类的生长素和细胞分裂素时,愈伤组织诱导频率差异显著;同时发现在减轻愈伤组织褐化的效果上,Vc 较活性炭好。通过对愈伤组织诱导结果的比较,MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 10 mg/L Vc 为中华芦荟愈伤组织诱导的较好培养基,愈伤组织诱导率达到 91.4%,且愈伤组织生长较旺盛。

**关键词:**中华芦荟;愈伤组织;诱导;生长素;细胞分裂素

**中图分类号:**Q943.1

**文献标志码:**A

中华芦荟(*Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg)亦称中国芦荟、斑纹芦荟,是百合科芦荟属多年生常绿多浆草本植物。中华芦荟为库拉索芦荟的变种,原产中国,在中国福建、广东、广西、云南、四川、重庆等地区均有栽培。中华芦荟是少数几种药用芦荟之一,具有抗衰老、抗癌症、消炎、杀菌等多种作用,也具有美容功效,亦可食用或作为观赏植物<sup>[1-3]</sup>。由于中华芦荟的市场需求量很大,常规繁殖方法以扦插和分株为主,繁殖速度较慢,而且容易使病菌积累,影响植株生长,甚至导致其退化。利用组织培养方法,可以提高中华芦荟的繁殖速度和品质。

虽然过去 10 多年中,中华芦荟组织培养已有多篇报道,但是大多侧重于芦荟的组织培养植株再生的某些环节,如诱导丛生芽和快速繁殖获得试管苗等<sup>[4-9]</sup>。本试验旨在诱导中华芦荟产生愈伤组织以及使产生的愈伤组织保持在较好的状态和较大的生长量。着重研究各种植物生长素、细胞分裂素、活性炭和维生素 C(Vc)等对芦荟愈伤组织诱导的影响,筛选出最优化参数组合,建立芦荟最优的愈伤组织诱导和再生体系,为芦荟细胞的悬浮培养和将来开展芦荟转基因研究建立

坚实的基础。

## 1 材料和方法

中华芦荟购自沙坪坝花卉市场。取中华芦荟幼苗,洗净外表泥土,再用流水冲 30 min,在无菌条件下先用 75% 酒精表面消毒 30 s,尔后置于 0.1% 升汞处理 10 min,最后用无菌水冲洗 5~7 次,将幼苗的根和大部分叶去除,剩余 2 cm 左右带少量叶片的幼苗茎段,接种在 MS + 0.5 mg/L KT + 3.0 mg/L 6-BA 的培养基上进行分化和诱导不定芽<sup>[10]</sup>,用于获得大量的无菌芦荟组培苗。参考周根余等的方法<sup>[11]</sup>,以中华芦荟组培苗为材料,将组培苗沿两边对称叶片的中央纵切再沿叶片的中心线纵切,所得的 1/4 幼苗茎段作为愈伤组织诱导的试验材料。

以 MS 为基本培养基(30 g/L 蔗糖,0.8% 琼脂,pH 5.8),单独或者组合使用不同浓度的 IAA、IBA、NAA、2,4-D、KT、ZT、6-BA 等激素,培养基经高压灭菌 20 min 备用,每个处理接种 5 瓶,每瓶接种 7 个茎段,在 26 °C 光照 16 h,18 °C 黑暗 8 h 的条件下培养。接种 30 d 后调查出愈率(出愈率 = 出现愈伤组织的外

收稿日期:2007-01-14。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(8045、2004-56 号)。

作者简介:潘宇(1982-),女,重庆大学硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。陈国平(联系人),男,教授,博士生导师(Tel)023-65112674;(E-mail) chenguoping@cqu.edu.cn。

植体数/接种外植体的总数)和出芽率(出芽率=每种处理诱导出的不定芽总数/接种外植体的总数)。以其中4种愈伤组织诱导率较好的激素组合为基础,分别添加5、10 mg/L的Vc或0.5、1 g/L的活性炭,接种20 d后观察愈伤组织的褐化情况。

## 2 结果分析

### 2.1 植物激素对中华芦荟愈伤组织诱导和生长的影响

#### 2.1.1 生长素对愈伤组织诱导和生长的影响

不同浓度的IAA, IBA, NAA和2,4-D对愈伤组织诱导和生长的影响见表1。

表1 生长素对愈伤组织诱导和生长的影响

生长素种类	生长素浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	出愈率 / %	愈伤组织生长状况
IAA	0.5	0	无愈伤组织, 生根
	1.0	0	无愈伤组织, 生根
	2.0	0	无愈伤组织, 生根
	3.0	0	无愈伤组织, 生根
	5.0	25.71	愈伤组织黄褐色, 生长量不大
	7.5	34.28	愈伤组织黄褐色, 生长量不大
	10.0	42.86	褐化严重, 愈伤组织死亡
IBA	0.5	0	无愈伤组织, 生根
	1.0	0	无愈伤组织, 生根
	2.0	0	无愈伤组织, 生根
	3.0	0	无愈伤组织, 生根
	5.0	31.43	愈伤组织黄色, 生长量不大
	7.5	34.28	愈伤组织黄褐色, 生长量不大
	10.0	45.71	褐化严重, 愈伤组织死亡
NAA	0.5	0	无愈伤组织, 生根
	1.0	0	无愈伤组织, 生根
	2.0	0	无愈伤组织, 生根
	3.0	8.57	愈伤组织生长量不大, 淡黄色
	5.0	37.14	愈伤组织褐色, 少量生根
	7.5	42.86	愈伤组织褐化, 生长量不大
	10.0	51.43	愈伤组织褐化严重, 部分死亡
2,4-D	0.5	0	无愈伤组织, 生根
	1.0	0	无愈伤组织, 生根
	2.0	51.43	愈伤组织黄色
	3.0	34.28	愈伤组织黄色
	5.0	54.28	愈伤组织黄褐色
	7.5	51.43	愈伤组织褐化
	10.0	65.71	愈伤组织褐化严重, 部分死亡

从表1中可以看出4种生长素对愈伤组织的诱导存在着明显的差异。IAA和IBA在浓度达到5 mg/L时开始出现愈伤组织,且浓度达到10 mg/L时愈伤组织开始死亡。IAA和IBA诱导的出愈率不高,IAA、

IBA在相同浓度下诱导的出愈率相近,且愈伤组织生长情况相似。

NAA和2,4-D在浓度分别达到3 mg/L和2 mg/L时出现愈伤组织,且2,4-D的诱导率显著高于NAA。2,4-D在浓度10 mg/L时诱导率最高,但褐化很严重。附加2,4-D处理培养8~10 d后,幼茎切口处开始膨胀,培养20 d左右开始长出愈伤组织,愈伤组织的褐化程度随着2,4-D浓度的增加而加重。因此使用2,4-D诱导芦荟愈伤组织时,应附加抗氧化剂、吸附剂等物质来消除或者减轻褐化。

#### 2.1.2 细胞分裂素对愈伤组织诱导和生长的影响

细胞分裂素6-BA, KT和ZT对愈伤组织诱导和生长的影响见表2。

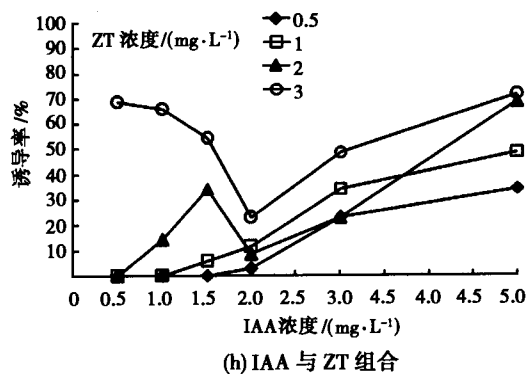
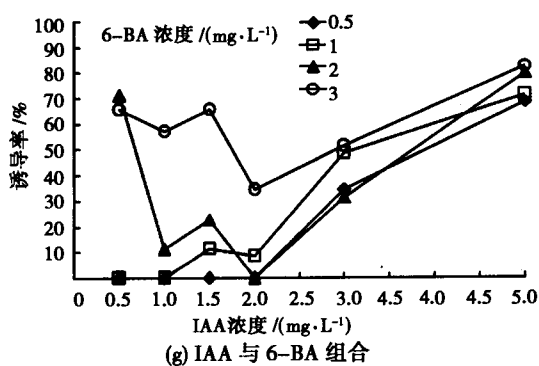
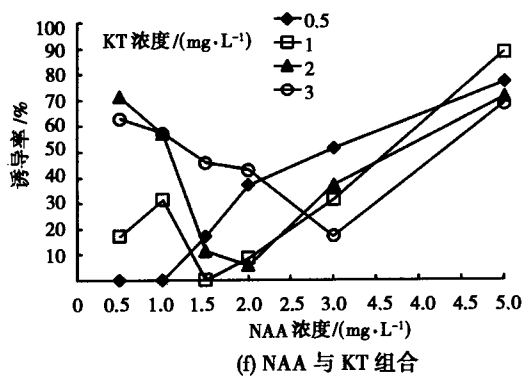
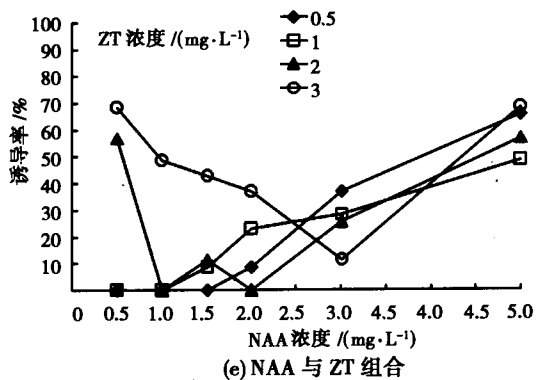
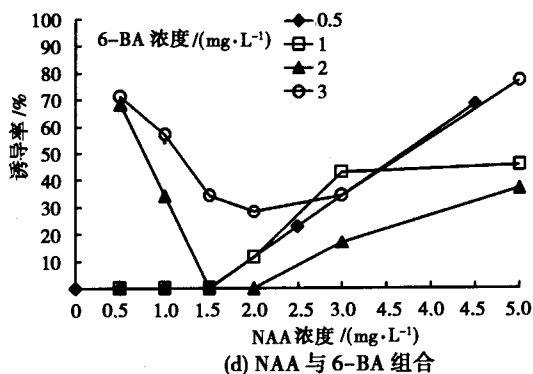
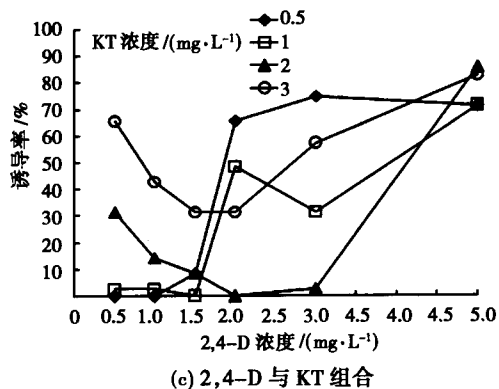
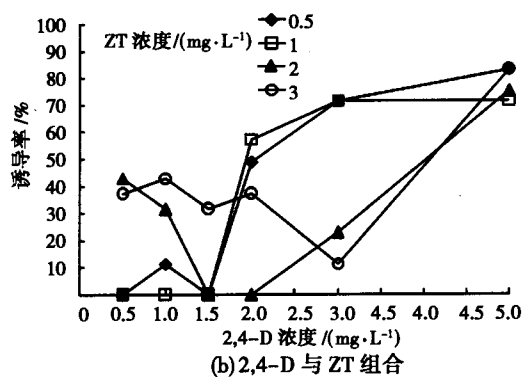
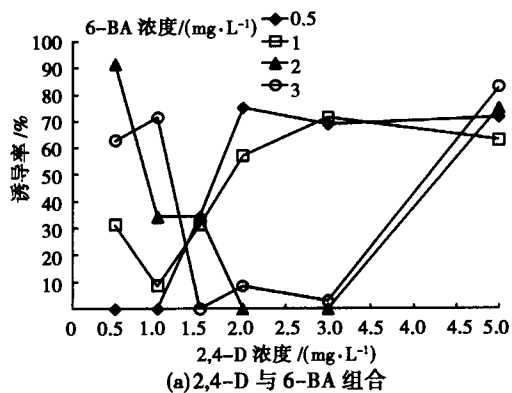
表2 细胞分裂素对愈伤组织诱导和生长的影响

细胞分裂素名称	细胞分裂素浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	出愈率 / %	愈伤组织生长状况
ZT	0.5	0	无愈伤组织, 出芽率70%
	1.0	0	无愈伤组织, 出芽率230%
	2.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%
	3.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%, 褐化
	5.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%, 褐化
	10.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%, 褐化严重
	KT	0.5	2.9
1.0		0	无愈伤组织, 出芽率200%
2.0		0	无愈伤组织, 出芽率260%
3.0		0	无愈伤组织, 出芽率400%
5.0		0	无愈伤组织, 出芽率300%, 褐化
10.0		0	无愈伤组织, 出芽率400%, 褐化
6-BA		0.5	0
	1.0	0	无愈伤组织, 出芽率100%
	2.0	5.7	愈伤组织黄色, 褐化
	3.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%
	5.0	0	无愈伤组织, 出芽率530%
	10.0	0	无愈伤组织, 出芽率400%, 褐化严重

由表2可知,所有参试浓度ZT均未诱导出愈伤组织,而KT和6-BA分别在浓度为0.5和2.0 mg/L时可诱导出愈伤组织,但愈伤组织诱导率极低,分别为2.9%和5.7%,基本上可以忽略不计。显然,单独使用KT,6-BA和ZT不能有效地诱导出愈伤组织。在试验的同时笔者还发现,KT,6-BA和ZT均可诱导芦荟分化出芽,因而可将细胞分裂素配合生长素使用来诱导愈伤组织以及保持愈伤组织的胚性。

#### 2.1.3 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

在不同浓度的生长素和细胞分裂素交互作用下,中华芦荟愈伤组织诱导率的变化见图1。



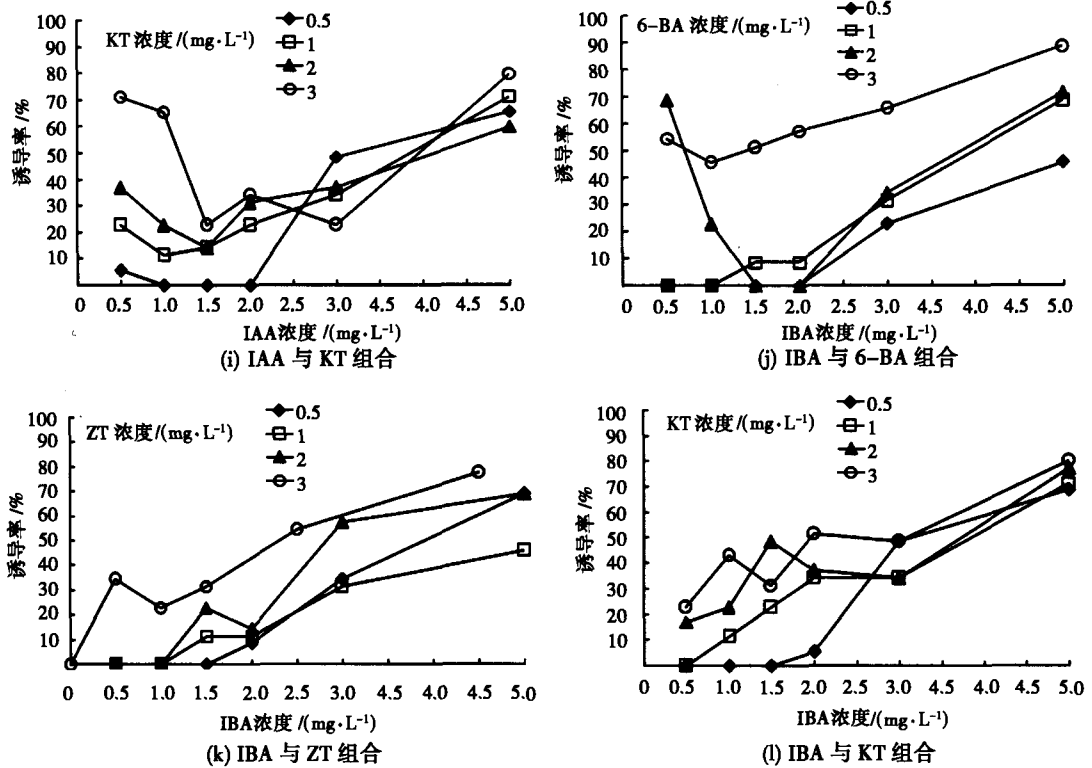


图 1 生长素和细胞分裂素的交互作用对愈伤组织诱导的影响

由图 1 可知,细胞分裂素和生长素的不同浓度组合对愈伤组织的诱导率在 0~91.4% 之间,其中 2,4-D 0.5 mg/L 和 6-BA 2 mg/L 的组合愈伤组织诱导率最高,达 91.4%。培养基 MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 2 mg/L 6-BA 诱导的愈伤组织呈淡黄色至黄色,米粒状,较为致密,中度褐化,有少量出现水渍化现象,但生长较好。

2.2 Vc 和活性炭对愈伤组织诱导和生长的影响

愈伤组织在培养的过程中由于细胞中的酚类物质受多酚氧化酶催化的氧化作用经常出现褐化现象<sup>[12]</sup>。在中华芦荟愈伤组织诱导过程中,存在着不同程度的褐化现象,这对愈伤组织的培养和生长不利。前人报道通过添加抗氧化剂 Vc 或者活性炭可以有效地减轻和消除褐化现象<sup>[8-9,13-15]</sup>。因此在愈伤组织诱导率最高的 4 种培养基中通过分别添加 Vc 和活性炭,以观察它们对中华芦荟愈伤组织的诱导和褐化的影响。

4 种诱导效率最高的培养基激素浓度组合如下。

A: MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 6-BA (诱导率 91.4%),

B: MS + 5.0 mg/L IBA + 3.0 mg/L 6-BA (诱导率 88.6%),

C: MS + 5.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L KT (诱导率 88.6%),

D: MS + 5.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L KT (诱导

率 85.7%)。

表 3 Vc 对愈伤组织诱导和生长的影响

培养基	Vc 浓度 / (mg · L <sup>-1</sup> )	愈伤组织生长状况
A	0	淡黄色至黄色,中度褐化,部分出现水化现象,生长较好
	5.0	淡黄色至黄色,褐化较轻,水化减轻,生长较好
	10.0	淡黄色至黄色,生长量增大,褐化较轻,水化减轻,生长旺盛
B	0	黄色,中度褐化,生长较好
	5.0	黄色,褐化较轻,生长较好
	10.0	黄色,褐化较轻,生长旺盛
C	0	黄色,严重褐化,生长较好
	5.0	黄色,褐化较轻,生长较好
	10.0	黄色,褐化较轻,生长旺盛
D	0	黄色,中度褐化,有部分有水化现象,生长较好
	5.0	黄色,褐化减轻,水化减轻,生长较好
	10.0	黄色,褐化较轻,水化减轻,生长旺盛

从表 3 结果可以看出,在 A、B、C、D 4 种培养基中,添加了 Vc 之后仍然是培养基 A 对愈伤组织的诱导和生长最为有利。添加了 10 mg/L Vc 的培养基 A 中,愈伤组织生长旺盛,培养 3 周后的愈伤组织未出现明显褐化,30 d 后部分愈伤组织开始出现褐化但是程

度较轻。(见图2)



图2 培养基 A + 10 mg/L Vc 所诱导的中华芦荟愈伤组织

表4 活性炭对愈伤组织诱导和生长的影响

培养基	Vc 浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> )	愈伤组织生长状况
A	0	淡黄色至黄色,中度褐化,部分出现水化现象,生长较好
	0.5	淡黄色至黄色,褐化减轻,部分水化,生长较好
	1.0	淡黄色至黄色,褐化很少,部分水化,生长较好但略减慢
B	0	黄色,中度褐化,生长较好
	0.5	黄色,褐化减轻,生长较好
	1.0	黄色,褐化较轻,生长减慢
C	0	黄色,严重褐化,生长较好
	0.5	黄色,中度褐化,生长较好
	1.0	黄色,褐化较轻,生长缓慢
D	0	黄色,中度褐化,有部分有水化现象,生长较好
	0.5	黄色,褐化减轻,水化,生长较好
	1.0	黄色,褐化较轻,水化,生长较好

表4结果表明,活性炭对愈伤组织的褐化有抑制作用。当培养基中添加的活性炭浓度达到 1.0 g/L 时,愈伤组织褐化现象很轻。但是活性炭对愈伤组织的生长有一定的影响,在添加活性炭的培养基中愈伤组织生长较慢(见图3)。

另外在培养基 A 中同时加入 10 mg/L Vc 和 1.0 g/L 活性炭,愈伤组织生长较好,生长旺盛,褐化程度比单独使用 10 mg/L 的 Vc 时减轻,但生长量没有单独使用 10 mg/L Vc 时大,且水渍化现象没有明显减轻(数据未显示)。

综上所述,在以上试验的 350 种不同激素组合的培养基中,当单独使用细胞分裂素(KT,ZT 和 6-BA)



图3 培养基 A + 1.0 g/L 活性炭所诱导的中华芦荟愈伤组织

时愈伤组织诱导率极低;单独使用生长素时,不同浓度的生长素诱导的愈伤组织频率差异明显,生长素对中华芦荟愈伤组织的诱导效率:2,4-D > NAA > IBA ≈ IAA。当组合不同浓度和种类的生长素与细胞分裂素时,愈伤组织诱导频率差异显著,在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D 培养基中,中华芦荟的愈伤组织诱导率可达到 91.4% (愈伤组织有中度褐化现象)。在减轻愈伤组织褐化方面,Vc 的作用效果较活性炭好。在添加 10 mg/L Vc 的 MS + 6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基中,中华芦荟的愈伤组织诱导率保持不变,同时愈伤组织生长良好,褐化现象减轻。

### 3 讨论

中华芦荟愈伤组织的诱导受多种因子的影响,植物激素和抗氧化剂是其中的主要因子。在愈伤组织诱导过程中,MS 培养基为外植体脱分化提供必要的营养条件,而适当的激素配比是外植体脱分化、细胞分裂及愈伤组织增殖生长的必要条件。实验结果表明,在单独使用不同种类的生长素时,不同浓度的生长素诱导的愈伤组织频率差异明显,且愈伤组织的生长状态也各异;单独使用细胞分裂素时,愈伤组织的诱导率极低。虽然在所有植物激素中单用 2,4-D 对中华芦荟愈伤的诱导率最高,但是在 2,4-D 的浓度较低时愈伤组织的生长量较小,浓度较高时褐化也相对比较严重,因而芦荟的愈伤组织诱导适合于细胞分裂素和生长素搭配使用。当组合不同浓度和种类的生长素和细胞分裂素时,愈伤组织诱导频率差异显著,MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D 为中华芦荟愈伤组织诱导的较好培养基。

在中华芦荟愈伤组织的诱导过程中,出现了不同程度的褐化现象,一般认为是芦荟细胞内的酚类物质在多酚氧化酶的作用下转变为醌类物质所致。在诱导芦荟愈伤组织的培养基中,添加抗氧化剂 Vc 和吸附剂活性炭,结果表明,活性炭虽能较好地抑制中华芦荟外植体的褐化,但同时也抑制了愈伤组织的生长;而 Vc 在浓度 10.0 mg/L 时能有效地减轻中华芦荟愈伤组织的褐化现象,并且不影响愈伤组织的生长。因而 Vc 在芦荟愈伤组织的培养中是一个很好的抗氧化剂,可以在今后的研究中试着将 Vc 和其他物质配合而达到最佳的抗氧化效果。

另外,笔者在研究中发现,中华芦荟的愈伤组织很难长期停留在愈伤组织状态,在愈伤组织继代培养后易分化出芽。前人的研究在中华芦荟植株再生和快速繁殖方面很成功。中华芦荟愈伤组织易分化的特性有利于品质优良的植株进行快速繁殖和增加产量。同时这种特性也有利于中华芦荟的遗传转化,转基因获得的愈伤组织可以很快地出芽从而获得转基因植株。但是愈伤组织易分化的特性同时限制了从同一外植体上获得更多的愈伤组织。从每个外植体得到的愈伤组织量仅是其他物种(如番茄、半夏等)的 1/5 ~ 1/4,这对于以愈伤组织作为供体材料进行细胞悬浮培养是不利的。目前在部分药用植物上已经开展了以细胞悬浮培养的方式进行工业化生产有药用价值的次生代谢物质,但是作为具有重要药用价值的中华芦荟,国内外目前尚无细胞悬浮培养获得成功的报道。笔者初步开展了其细胞悬浮培养的试验,发现芦荟愈伤组织较小的生长量及其褐化现象是开展芦荟细胞悬浮培养亟需首先解决的问题。在今后的工作中将进行进一步的研究。

#### 参考文献:

### Callus Induction of *Aloe vera* L var *chinensis* (Haw) Berg

PAN Yu, HU Zong-li, CHEN Guo-ping, LIU Yang, WANG Xiao-yun, CHEN Xu-qing  
(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Studies were given to the induction and growth of callus of *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg when the young stem was applied as explant. MS was taken as basic medium, added with various concentrations of auxins (IAA, IBA, NAA and 2, 4-D), cytokinins (6-BA, KT and Zeatin) and the different combinations of these plant growth regulators. Results showed that the callus is barely induced by cytokinin alone, and the callus induction rates have significant difference when different concentrations of auxin and different combinations of auxin with cytokinin are used on the MS medium. In order to inhibit callus browning during culturing, various concentrations of vitamin C or active carbon are added into four combinations of auxin and cytokinin respectively, which can induce callus most effectively. The result showed that vitamin C can alleviate callus browning more effectively than the active carbon. The most efficient medium for induction and growth of callus of *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg was MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2, 4-D + 10 mg/L vitamin C, with which the callus induction rate can reach to 91.4% and callus grow vigorously.

**Key words:** *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg; callus; induction; auxin; cytokinin

(编辑 李胜春)

- [1] 熊佑清. 芦荟[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 顾文祥, 诸淑琴. 芦荟栽培与加工种用[M]. 上海:上海科学普及出版社,1999.
- [3] 黄卓忠, 潘颖南, 苏宾, 等. 芦荟的应用概括及开发应用前景[J]. 广西农业科学, 1999(2): 108-110.
- [4] 徐启红, 任平国. 中华芦荟的组织培养[J]. 荆门职业技术学院学报, 2005, 20(6): 8-9.
- [5] 曲春香. 中华芦荟的组织培养及快速繁殖[J]. 苏州大学学报:自然科学版, 2002, 18(3): 97-99.
- [6] 贺红, 刘春来, 肖省娥, 等. 中国芦荟离体培养和快速繁殖[J]. 广州中医药大学学报, 2001, 18(1): 71-73.
- [7] 廖志华, 陈敏, 谈锋, 等. 中华芦荟无性系的快速克隆繁殖[J]. 西南师范大学学报:自然科学版, 2000, 25(6): 689-693.
- [8] 李琳, 钟昌松, 周香, 等. 活性炭在库拉索芦荟(*Aloe vera*)的组织培养中的应用[J]. 西南农业学报, 2005, 18(1): 105-107.
- [9] 唐玉明, 姚万春, 任道群, 等. 两种芦荟的组织培养研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(5): 439-441.
- [10] 任建宏, 艾海航, 亢福仁. 中华芦荟的组织培养与快速繁殖[J]. 榆林学院学报, 2003, 13(3): 28.
- [11] 周根余, 丁洪峰, 施望敏, 等. 芦荟的无性快速繁殖[J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 410-411.
- [12] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社, 2000.
- [13] 杨婷婷, 罗晓芳. 芦荟愈伤组织诱导的初步研究[J]. 西南林学院学报, 2005, 25(1): 16-19.
- [14] 李琳, 叶春. 影响库拉索芦荟(*Aloe vera* L.)愈伤组织诱导的因素[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2003, 40(5): 963-965.
- [15] 许继宏. 药用植物组织培养[M]. 北京:中国农业科技出版社, 2003.