

培养基对甜叶悬钩子愈伤组织  
生长及甜茶甙产生的影响

王 雷 王蜀秀 温远影 胡昌序  
(中国科学院植物研究所, 北京)

甜叶悬钩子 (*Rubus suavissimus*) 为蔷薇科植物, 叶含甜茶甙 (图 1), 在广东、广西, 福建等地有栽培。

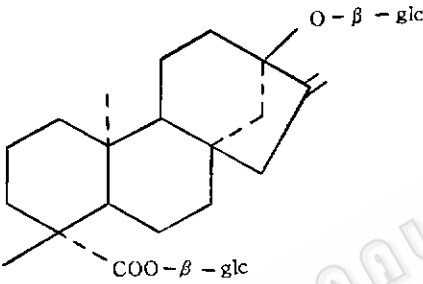


图 1 甜茶甙(rubusoside)结构 [1]

甜茶甙的甜度为蔗糖的 114 倍 [1], 但不具蔗糖的高能量, 是糖尿病人及肥胖病患者的理想甜味剂, 在食品工业中有广泛的应用前景。通过植物细胞大量培养, 实现工业化生产甜茶甙, 将节省我国有限的耕地面积, 并不受自然界条件及时间的限制进行连续生产。

本实验通过对继代半年以上的甜叶悬钩子愈伤组织的检测, 证明在愈伤组织中同样存在甜茶甙。初步探索了甜叶悬钩子愈伤组织生长及甜茶甙生产的较适培养条件, 从而为细胞悬浮培养生产甜茶甙的研究奠定了基础。

材 料 和 方 法

(一) 材料

植物材料采自广州华南植物研究所栽培的甜叶悬钩子, 它的幼嫩叶片经 70% 乙醇浸泡 30 秒, 然后用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 3min, 再用无菌水清洗干净, 接种于含 NAA 2mg/L, 激动素

0.5mg/L 的 MS 培养基中。在 25℃ 的暗室中培养一周后出现愈伤组织, 将愈伤组织转移到新鲜的同样培养基中, 在暗培养室中进行扩大培养, 愈伤组织继代半年后, 进行以下实验。

(二) 培养基成分的比较实验

1. 不同的氮源及浓度: 在 MS 培养基的基础上调整硝酸盐浓度如表 1。蔗糖浓度为 3%。

表 1 不同培养基的氮源和浓度

培 养 基	硝 酸 盐	含 量 (mg/L)
MS	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
MS I	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
	KNO <sub>3</sub>	1900
MS II	KNO <sub>3</sub>	1900
MS III	KNO <sub>3</sub>	950

2. MS 为基本培养基, 蔗糖浓度: a. 1%, b. 3%, c. 5%, d. 7%。

观察这些因子对愈伤组织生长及甜茶甙产生的影响。把暗培养 30 天的愈伤组织转移到上述各种培养基中, 转移时称重, 然后分别置于光、暗培养室中进行培养, 测定氮源浓度、蔗糖浓度和光对细胞生长及甜茶甙产生的影响。方法是每隔 7 天, 于每种培养基中抽取愈伤组织进行称重, 并与甜茶甙标准品对照, 求出细胞生长率及甜茶甙产率。

(三) 检测甜茶愈伤组织中甜茶甙的产生

用甲醇浸提愈伤组织, 然后用醋酸缓冲液

本文于 1989 年 8 月 21 日收到。

提取甲醇浸提物中的甜茶甙,再用高压液相色谱(HPLC)测定,测定条件是,层析柱: Waters Bondapak C-18; 洗脱液: 0.2mol/L 醋酸缓冲液, pH5.6; 流速: 4 ml/min; 鉴定器: 示差折光仪; 甜茶甙标准品由日本广岛大学田中治教授赠送。

## 结 果

图 2 为 HPLC 测定的甜茶甙的标准品 (a) 及愈伤组织中的甜茶甙 (b)。

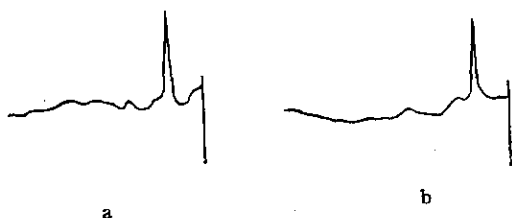


图 2 a. 甜茶甙的标准品  
b. 愈伤组织中的甜茶甙

继代半年后的甜叶悬钩子愈伤组织中检测出甜茶甙的存在,说明在愈伤组织中能合成甜茶甙,而不是由植物残留下来的,

甜叶悬钩子的愈伤组织在经过 38 天的培养之后,生物量的增长和甜茶甙的产率在不同的条件下都有不同的表现。

### (一) 愈伤组织生物量的增大

表 1 为在不同氮源浓度下愈伤组织生长率。

当培养基为 MS 时,愈伤组织生长率的峰值高于在其他培养基中愈伤组织生长率的峰值。在暗下培养的愈伤组织与在光下培养的相比,前者的生长率峰值大于后者的。此结果说明充足的氮源有利于甜叶悬钩子愈伤组织的生长。由于与 LS<sup>[2]</sup>、B<sub>5</sub><sup>[3]</sup> 等其他基本培养基相比,MS 培养基中氮源浓度较高,因此,它适宜于愈伤组织的快速生长。

表 2 为在不同蔗糖浓度下愈伤组织生长率。

表 1 不同氮源浓度下愈伤组织生长率(倍数)

时间(天)	MS		MS I		MS II		MS III	
培养条件	光	暗	光	暗	光	暗	光	暗
11	2.5	2.9	1.4	1.4	0.6	0.9	0.9	1.1
14	3.8	4.8	1.6	1.8	1.7	2.5	1.5	1.0
21	5.2	6.3	3.2	3.3	3.1	2.8	1.5	2.0
30	8.4	11.7	5.4	6.9	3.1	4.6	3.8	3.5
37	11.7	13.8	6.5	7.2	4.6	4.3	4.5	4.7

表 2 不同蔗糖浓度下愈伤组织的生长率(倍数)

时间(天)	蔗糖 1%		蔗糖 3%		蔗糖 5%		蔗糖 7%	
培养条件	光	暗	光	暗	光	暗	光	暗
8	0.7	1.0	1.2	1.1	0.4	2.0	0.6	0.8
15	2.0	2.0	4.3	5.4	6.5	5.8	1.2	3.8
24	4.2	3.7	5.8	6.8	8.2	11.6	5.1	3.7
30	4.8	4.5	8.4	11.7	12.7	16.0	9.6	9.6
38	9.4	6.9	12.3	14.2	14.6	14.0	—	12.4

由表可见,在 5% 的蔗糖浓度培养基中暗培养 30 天时,愈伤组织的生长率最高,其次为在同样培养基中光培养 38 天时的生长率。说明该浓度蔗糖为本实验愈伤组织迅速生长的最适浓度;同时,表明光照延长了愈伤组织生长周期,而黑暗条件促使其生长周期缩短,有利于

工业化生产。因此,获得较高生物量的适宜条件是在含 5% 蔗糖的 MS 培养基中暗培养 30 天。

### (二) 愈伤组织中甜茶甙产率的分析

表 3 为不同蔗糖浓度下,愈伤组织中甜茶甙产率。由表可见,在试验的 4 种蔗糖浓度条件下,培养 8 天后,光培养的甜茶甙产率均比相

应的暗培养的高。因此,光照促进甜茶甙的迅速合成,并在短期内达到较高值。从蔗糖浓度来看,浓度为7%,光培养8天时,愈伤组织中甜茶甙的产率最高,但随着时间延长,甜茶甙产率迅速降低,这可能是由于所产生的甜茶甙达到一定浓度后,反馈抑制其合成过程所

致。

表4为在不同氮源浓度下,愈伤组织中甜茶甙产率。4组培养基在光培养11天时,愈伤组织中甜茶甙的产率均高于各自暗培养的产率。用MS I培养基,光照条件下培养11天的愈伤组织中甜茶甙的产率最高。

表 3 不同蔗糖浓度下愈伤组织中甜茶甙产率\*

培养条件 时间(天)	蔗糖 1 %		蔗糖 3 %		蔗糖 5 %		蔗糖 7 %	
	光	暗	光	暗	光	暗	光	暗
8	0.019	0.008	0.023	0.007	0.026	0.009	0.052	0.033
15	0.024	0.040	0.012	0.015	0.018	0.011	0.034	0.007
24	0.013	0.008	0.019	0.017	0.022	0.012	0.023	0.023
30	0.007	0.007	0.012	0.006	0.015	0.013	0.011	0.015
38	0.008	0.021	0.010	0.008	0.009	0.010	—	0.006

\* 表中数据为每克细胞鲜重所含的甜茶甙重量(g)

表 4 不同氮源浓度下愈伤组织中甜茶甙产率\*

培养条件 时间(天)	MS		MS I		MS II		MS III	
	光	暗	光	暗	光	暗	光	暗
11	0.018	0.010	0.017	0.014	0.023	0.011	0.013	0.011
14	0.013	0.013	0.013	0.011	0.010	0.009	0.009	0.011
21	0.016	0.015	0.016	0.011	0.008	0.007	0.007	0.009
30	0.012	0.006	0.004	0.006	0.008	0.008	0.010	0.002
37	0.010	0.007	0.003	0.004	0.012	0.005	0.003	0.005

\* 表中数据为每克细胞鲜重所含的甜茶甙重量(g)

## 结 论

1. 通过组织培养,从甜叶悬钩子的叶愈伤组织中检测出甜茶甙的存在,说明可以通过叶愈伤组织的细胞大量培养来生产甜茶甙。

2. 实验结果说明,为获得最大的生物量及理想的次生物质产率,需要不同的培养基与培养条件,必须采用二步培养法。

3. 愈伤组织较适的生长培养基是含蔗糖

为5%的MS培养基;较适的生产培养基是含蔗糖为7%的MS I培养基。

4. 为了得到最大的生物量,愈伤组织培养应置于暗条件下进行。反之,在次生物质生产期,应将培养物置于光照条件下,以达到理想的产率。

5. 从生产效率考虑,愈伤组织生长培养30天,次生产物生产培养7—10天是本实验得出的最经济的培养生产周期。

## 参 考 文 献

- [1] 田中 治: フードケミカル, (10): 34—36, 1985.
- [2] Linsmaier, E. M. and Skoog, F.: *Physiol. Plant*, 18: 100—127, 1965.
- [3] Gamberge, et al.: *Exp Cell Res.*, 50: 151—158, 1968.

## The Effects of Medium on the Growth of *Rubus suavissimus* Callus and the Production of Rubusoside

Wang Lei Wang Shuxiu Wen Yuanying Hu Changxu

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

The culture methods and conditions promoting the callus of *Rubus suavissimus* to produce rubusoside had been studied. Totipotency of callus which can produce rubusoside had also been proved. Two-stage culture was required to obtain higher productivity of rubusoside. The media were divided into growth medium and production medium by modifying MS medium. The difference between cultures in light and in dark had also been studied.

### Key words

Rosaceae; *Rubus suavissimus*; rubusoside; tissue culture