

白花蛇舌草叶片离体培养及试管无性系的建立

李国平^{1,2}, 黄群策^{1*}, 秦广雍¹

(1. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南郑州 450052; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建莆田 351100)

摘要: 以白花蛇舌草叶片为材料, 建立了白花蛇舌草叶片高效不定芽发生、植株再生体系。研究了不同激素及其组合对外植体不定芽发生的效应。结果显示, 在 MS 基本培养基中单纯添加 6-BA, 当 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 时, 不能诱导离体叶片发生不定芽, 6-BA 浓度在 1.0~5.0 mg/L 范围内, 诱导率随 BA 浓度升高而增加, 适宜浓度为 3.0 mg/L; 当 6-BA 与 NAA 配合使用时, 其诱导率随着培养基中 6-BA 与 NAA 的相对比值的提高而提高; 以 MS+BA 3 mg/L+NAA 0.01 mg/L 作为继代培养基, 建立起白花蛇舌草高效、稳定的试管无性系, 为白花蛇舌草遗传转化研究奠定了基础。

关键词: 白花蛇舌草; 离体叶片培养; 不定芽; 再生

中图分类号: Q943.1; S661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)05-0455-04

In-vitro culture of *Hedyotis diffusa* leaves and establishment of regeneration system

LI Guo-ping^{1,2}, HUANG Qun-ce^{1*}, QIN Guang-yong¹

(1. Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, China)

Abstract: High frequency adventitious shoot formation and plant-let regeneration system were established through *in-vitro* culture of *Hedyotis diffusa* leaves. The results showed that leaf adventitious shoots could not be induced on basal MS medium supplemented with 6-BA 0.1 mg/L or 6-BA 0.5 mg/L. When 6-BA 1.0~5.0 mg/L was added in MS medium, adventitious shoots generated. The higher the concentration of 6-BA was, the higher the regeneration rate and number of adventitious shoot per leaf were obtained. However, MS medium added with 6-BA 3.0 mg/L was suitable for leaf adventitious shoot formation and growth. The combination of 6-BA and NAA promoted the regeneration efficiency of leaf *in-vitro*. This study indicated that it was the ratio of 6-BA/NAA rather than the quantity that influenced the regeneration of adventitious shoot. The optimal ratio of 6-BA/NAA was 10. MS basal medium supplemented with BA 3 mg/L and NAA 0.01 mg/L was used as subculture medium and a high frequency and stable regeneration system was built, which laid a foundation for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

Key words: *Hedyotis diffusa*; leaf culture *in-vitro*; adventitious shoot; regeneration

白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa*) 为茜草科耳草属植物, 是重要的抗癌植物, 临床广泛用于治疗多种恶性肿瘤。其研究多集中于分析化学成分及医疗价

值(吕华冲等, 1996; 逮萍等, 2000)。近年报道该植物含有具免疫活性的多糖, 有增强非特异免疫的作用(单保恩等, 2001; 谭宁华等, 2002; 于新等, 2002;

收稿日期: 2004-09-16 修订日期: 2005-02-20

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B); 福建省教育厅科研项目(JA02268)(Supported by the National Key Project of China, Grant No. 2001BA302B; the Scientific Research Fund of Education Department of Fujian Province, Grant No. JA02268)。

作者简介: 李国平(1966-), 男, 福建莆田人, 副教授, 博士生, 主要从事离子束植物诱变研究。

* 通讯作者(Author for Correspondence)

赵浩如等,2002;Li 等,2002)。利用植物生物技术,进行白花蛇舌草的组织、细胞培养研究,筛选高产免疫多糖的细胞株,通过细胞悬浮培养并从其培养物中提取纯化高含量的活性多糖,可为这种免疫多糖的产业化生产提供一条新的途径。带顶芽或带腋芽茎段离体培养经腋芽萌发途径再生植株已有报道(李国平等,2002)。本文通过该植物细胞组织培养的研究报道离体叶片培养及试管无性系建立的研究结果。

1 材料与方 法

1.1 外植体与接种

以野生植株分枝顶端 2~4 叶位的幼嫩叶片作为外植体。外植体灭菌方法:先用少量洗衣粉洗刷后在自来水下冲洗 2~3 h,然后在超净工作台上用 70%酒精消毒 20 s,再在 0.1%升汞溶液加数滴吐温 20 中灭菌 10 min,无菌水冲洗 5~6 次。自叶柄

顶端剪取叶片,远轴面向下,接种在培养基表面。每瓶接种 5 个叶片,每处理 9 瓶。

1.2 培养基

生根培养以 1/2MS 为基本培养基,其它实验项目中基本培养基均为 MS。按实验设计添加生长调节物质组合。培养基均附加蔗糖 30 g/L,琼脂 8.0 g/L,pH5.8。所有培养基均在 121 °C、1.1 kg/cm² 高温高压灭菌 20 min。

1.3 培养条件

培养温度为 25±2 °C,光照 12 h·d⁻¹,光照度为 1 500~2 000 lx。

1.4 结果调查与统计分析

在叶片接种后 30 d,对不定芽的发生情况进行调查。诱导率(%)=发生不定芽叶片数/接种叶片数×100;平均不定芽苗数(个/叶片)=不定芽苗总数/发生不定芽叶片数。不定芽苗指高度大于 0.5 cm 的由不定芽长成的无根不定芽苗。解剖、观察和

表 1 不同浓度 6-BA 对白花蛇舌草叶片不定芽发生的影响

Table 1 Effect of 6-BA on adventitious shoot regeneration from the leaf of *Hedyotis diffusa*

6-BA (mg/L)	诱导率 Regeneration rate (%)	平均不定芽 苗数(个/叶片) Shoots No. per leaf	开始出现不 定芽时间 Time of shoot initiation (d)	外植体形态变化 Morphological changes of explants
0.1	0	0	—	保持绿色,不见变化
0.5	0	0	—	稍微增厚、卷曲
1.0	33.3	8	19	增厚,于切口处形成少量愈伤组织继而发生不定芽
2.0	62.2	23	15	肿胀明显,整张叶片愈伤化,不定芽分布稍稀,芽苗节间长
3.0	100	52	10	肿胀,扭曲,继而叶两面呈疙瘩状突起,不定芽分布较密,芽苗正常
5.0	100	37	7	稍微弯曲,肿胀不明显,叶边缘形成密集不定芽,芽苗矮小

照相在体视显微镜下进行。

2 结果和分 析

2.1 细胞分裂素对离体叶片不定芽发生的影响

2.1.1 不同 6-BA 浓度对不定芽发生的影响 当离体叶片接种至培养基 MS+6-BA 0.1~5.0 mg/L (单位下同)上,发现不同浓度的 6-BA 对不定芽发生有较大影响,结果见表 1。由表 1 可见,当 6-BA 浓度为 0.1 和 0.5 时,不能诱导离体叶片发生不定芽;当 6-BA 浓度为 1.0~3.0 时,诱导率、平均不定芽苗数随 BA 浓度升高而增加,而始出现不定芽时间随 BA 浓度升高而缩短;当 6-BA 浓度为 5.0 时,培养至第 7 天即可观察到不定芽发生,诱导率 100%,但平均不定芽苗数有所减少,丛生芽苗数较矮少,且外植体愈伤化程度低,表现出一定的抑制作

用(图版 I:5)。综合几个指标,我们认为离体叶不定芽诱导的最适 BA 浓度应当为 3.0。在培养基 MS+6-BA 3.0 中,培养至第 10 天即可观察到不定芽发生,不定芽发生过程大致如下:叶片增厚→卷曲→肿胀→形成少量愈伤组织→叶两面呈疙瘩状突起→出现肉眼可见的“芽苗”→不定芽形成。经解剖观察,此“芽苗”具维管束与外植体相连,不易剥离,故属于不定芽发生途径(图版 I:1、2、3、4、6)。

2.1.2 不同细胞分裂素对不定芽发生的影响 在基础培养基 MS+NAA 0.01 中分别添加 6-BA、KT 和 ZT,浓度均为 3.0,以比较不同细胞分裂素对不定芽发生的影响。三种细胞分裂素均可高效诱导离体叶片不定芽发生,6-BA、KT 的诱导效果大致相当(表 2)。从离体叶片初始出现不定芽的时间看,ZT 的诱导作用较 6-BA、KT 强,6-BA 的作用较 KT 稍强。从不定芽苗形态看,培养基 MS+NAA 0.01+

ZT 3.0 中不定芽发生情形与 2.1.1 实验中 MS+6-BA 5.0 中的大致相似,外植体近于不经愈伤组织阶段而直接发生不定芽,不定芽较密集,所形成的芽苗较矮小,且平均不定芽苗数有所减少。所以,ZT 诱导不定芽发生的能力较强,浓度为 3.0 时即表现出一定的抑制作用。

2.2 不同 6-BA、NAA 配比对白花蛇舌草叶片不定芽发生的影响

在预备实验中,在 MS 基本培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA 对白花蛇舌草离体叶片的生长发育方向影响极大,于是我们设计、实施了一些实验组合,结果见表 3。由表 3 可见,BA 与 NAA 的相对比例影响离体叶片不定芽的发生。在 1 号处理中,外植体仅发生不定根;在 2、7 与 8 号处理中,外植体上亦无不定芽发生(图版 I:7);随着培养基中 6-BA 与 NAA 的相对比例逐渐提高,其诱导率也逐渐提高,且比值越高,每个外植体上形成的不定芽数量越多,外植体愈伤化程度越低;当培养基中 6-BA 与 NAA 的相对比例大于 2 时,外植体上才有不定芽发生。

表 3 不同 6-BA、NAA 配比对白花蛇舌草叶片不定芽发生的影响
Table 3 Effect of different combination of 6-BA and NAA on adventitious shoot regeneration from the leaf of *Hedyotis diffusa*

处理号 Treatment No.	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	6-BA : NAA	诱导率(%) Regeneration rate	外植体形态变化 Morphological changes of explants
1	0.0	0.1	—	0	近叶柄处发生少量不定根,无愈伤
2	0.1	0.1	1 : 1	0	叶片表面发生不定根,有少量愈伤
3	0.5	0.1	5 : 1	80	无不定根发生,愈伤稍多,不定芽少
4	1.0	0.1	10 : 1	100	无不定根发生,愈伤少,不定芽多
5	2.0	0.2	10 : 1	100	无不定根发生,愈伤少,不定芽多
6	2.0	0.5	4 : 1	45	无不定根发生,愈伤多,不定芽少
7	2.0	1.0	2 : 1	0	无不定根发生,愈伤多,但无不定芽
8	2.0	2.0	1 : 1	0	叶表面发生较多不定根,愈伤量稍多

2.4 生根培养与试管驯化移栽

从继代增殖培养基 MS+BA3.0+NAA 0.01 中,挑选高达 3~5 cm、茎叶粗壮的丛生芽苗,分割下来接种到生根培养基 1/2MS+NAA0.5 上,15~20 d 后可形成完整的根系,生根率可达 100%。已生根的试管苗经炼苗 5~6 d,小心洗净根部琼脂,移栽至灭过菌的草炭土和珍珠岩混合基质上,注意温度、湿度及水肥管理,移栽成活率可达 85% 以上。

3 讨 论

植物离体培养中器官发生是一个极其复杂的过程,受内源激素和外源生长调节物质的调控。6-

2.3 试管无性系的建立

综合 2.1、2.2 的实验,我们以 MS+BA 3.0+NAA 0.01 作为继代培养基,以芽苗顶端 2~4 叶位的离体叶片作为外植体,建立起白花蛇舌草试管无性系。在该培养基中,外植体从脱分化到不定芽高频形成需 10 d 左右,每个外植体可产生芽苗 50 个左右,每个月可继代 1 次,代期短且稳定性高(三年试验结果无差异),所以,成为我们开展白花蛇舌草离体培养研究的理想实验系统。

表 2 不同细胞分裂素对白花蛇舌草叶片不定芽发生的影响

Table 2 Effect of different CTK on adventitious shoot regeneration from the leaf of *Hedyotis diffusa*

细胞分裂素 CTK (mg/L)	诱导率 Regene- ration rate (%)	平均不定 芽苗数 (个/叶片) Shoots No. per leaf	开始出现不 定芽时间 Time of shoot initiation (d)	不定芽苗 Morphological of shoot
6-BA	100	48	11	正常
KT	100	43	13	正常
ZT	100	36	8	矮小

BA、NAA 是植物组织培养中最常用的生长调节物质,其不同配比是影响离体叶片再生不定芽的重要因素。本研究表明,在 MS 基本培养基中单纯添加 BA 时,低浓度的 6-BA 不能诱导白花蛇舌草离体叶片发生不定芽,高浓度的 6-BA 可以有效诱导不定芽发生,但 BA 浓度太高时表现出抑制作用。6-BA 的这个诱导作用与苹果、洋桔梗、毛白杨等植物离体叶片培养中的结果相似(杨震等,1997;师效欣等,1999;王艳等,2002;Du 等,2002)。

在 2.2 项实验中,我们观察到离体叶片在 MS+6-BA 0.5 培养基中无不定芽发生,但在 MS+6-BA 0.5+NAA 0.1 中可发生不定芽,可见,低浓度 6-BA 需与 NAA 配合才可诱导不定芽发生。另外,

影响不定芽发生的重要因素是培养基中 6-BA 与 NAA 的比例,而不是其绝对值,如在 MS+BA2+NAA2 中仅形成愈伤组织与不定根,无不定芽发生(图版 I :8);当培养基中 6-BA 与 NAA 的相对比例为 4 或 5 时,可诱导不定芽发生;当 6-BA 与 NAA 的相对比例为 10 时则可诱导不定芽高频发生。我们认为,这个实验结果的合理解释是:白花蛇舌草中有与不定芽发生有关的基因,此基因的表达受外源生长调节物质的调控,尤其是受到细胞分裂素与生长素比例高低的调控,当细胞分裂素与生长素浓度比例达到一定值时,两者能互相协同作用,启动不定芽发生基因的转录、翻译,从而促进不定芽的形成;在一定比值范围内,细胞分裂素与生长素浓度比值越高,有关基因表达得越快越强,不定芽发生所需时间更短,形成的不定芽更多,在形态上表现出不定芽的高频发生。

离体叶片在 MS+6-BA 0.5 和 MS+BA 2+NAA2 培养基中无不定芽发生,但在 MS+6-BA 0.5+NAA 0.1 中可发生不定芽,这个实验结果可为研究离体器官发生调控机制提供典型实验材料,我们将以此现象进一步研究细胞分裂素与生长素的相互影响机制和外源生长调节物质与基因表达的关系,以便更深入地阐明不定芽发生的调控机制。

一般认为,植物离体培养中不定芽发生有两条途径:一是经愈伤组织发生不定芽,二是不经愈伤组织阶段直接发生不定芽,但从本研究结果看,不定芽的形成是否经过愈伤组织阶段与培养基中 6-BA 浓度或 6-BA、NAA 配比有关,当 6-BA 浓度低或 6-BA:NAA 比值低时,离体叶片愈伤化程度高,而 6-BA 浓度高或 6-BA:NAA 比值高时,外植体愈伤化程度低,趋于直接发生不定芽(图版 I :5)。

研究离体器官发生首先需要—个较为理想和—致的、同步性好的试验材料(谷瑞升等,1999)。本研究所建立的白花蛇舌草无性系繁殖系统大致符合上述条件,且不定芽发生频率高,继代代期短,故可作为研究植物离体培养中器官发生调控机制的一个良好试验体系。白花蛇舌草高效、稳定再生体系的建立为我们利用细胞工程或基因工程技术进行遗传改良奠定了必要基础。

参考文献:

Du NX, Li Y, Yu HW, et al. 2002. Establishment of high frequency regeneration system of *Populus tomentosa*[J]. *For-*

estry Studies in China, 4(2):48—51.

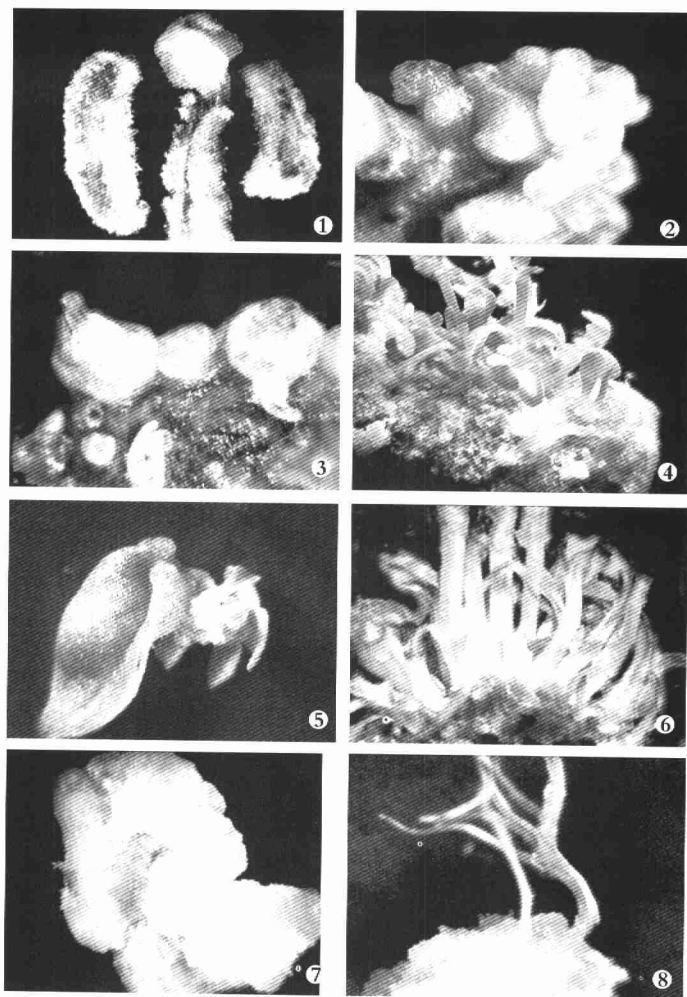
- Gu RS(谷瑞升), Jiang XN(蒋湘宁), Guo ZC(郭仲琛). 1999. Advances in the studies on the mechanism of plant organogenesis *in vitro* (植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 16(3):238—244.
- Li GP(李国平), Yang LS(杨鹭生). 2002. Tissue culture and plantlet regeneration of *Hedyotis diffusa* (白花蛇舌草组织培养与植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 38(2):150.
- Li R, Zhao HR, Lin YN. 2002. Anti-tumor effect and protective effect on chemotherapeutic damage of water soluble extracts from *Hedyotis diffusa*[J]. *J Chinese Pharmaceutical Sci*, 11(2):54—58.
- Lu HC(吕华冲), He J(何军). 1996. A study on chemical constituents of *Oldenlandia diffusa* (Willd) ROXB(白花蛇舌草化学成分的研究)[J]. *Nat Product Res Develop* (天然产物研究与开发), 8(1):34—37.
- Lu P(逮萍), Dai QH(戴乾圆). 2000. Summarization on the chemical constituents of *Oldenlandia diffusa* Willd(白花蛇舌草化学成分研究进展)[J]. *J Beijing Polytechnic Univ* (北京工业大学学报), 26(3):68—72.
- Shan BE(单保恩), Zhang JY(张金艳), Du XN(杜肖娜). 2001. Immunomodulatory activity and anti-tumor activity of *Oldenlandia diffusa in vitro* (白花蛇舌草的免疫学调节活性和抗肿瘤活性)[J]. *J Integrated Traditional Western Medicine* (中国中西医结合杂志), 21(5):370—374.
- Shi XX(师效欣), Du GQ(杜国强), Gao Y(高仪), et al. 1999. High adventitious shoot regeneration from leaves *in vitro* of apple cultivars(苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究)[J]. *J Fruit Sci* (果树科学), 16(4):255—258.
- Tan NH(谭宁华), Wang SM(王双明), Yang YB(杨亚滨), et al. 2002. Anticancer activity and principles of *Hedyotis diffusa* (白花蛇舌草的抗肿瘤活性和初步化学研究)[J]. *Nat Product Res Develop* (天然产物研究与开发), 14(5):33—36.
- Wang Y(王艳), Sun ZX(孙仲序), Zhao CZ(赵春芝). 2002. Factors influencing adventitious shoot regeneration from apple leaves *in vitro* (影响苹果离体叶片再生的因素分析)[J]. *Deciduous Fruits* (落叶果树), 34(6):19—22.
- Yang X(杨霞), Xu K(徐康). 1997. Tissue culture and rapid propagation of *Eustoma grandiflorum* (洋桔梗的组织培养及快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 33(6):435—437.
- Yu X(于新), Du ZJ(杜志坚), Chen YJ(陈悦娇), et al. 2002. Study on antioxidation effect from *Oldenlandia diffusa* Willd. (白花蛇舌草提取物抗氧化作用的研究)[J]. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 28(3):10—13.
- Zhao HR(赵浩如), Li R(李瑞), Lin YN(林以宁), et al. 2002. Influence of extraction process of *Hedyotis diffusa* on anti-tumor activity(白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响)[J]. *J China Pharmaceutical Univ* (中国药科大学学报), 33(6):510—513.

李国平, 等: 白花蛇舌草叶片离体培养及试管无性系的建立

图版 I

LI Guo-ping, et al.: *In-vitro* culture of *Hedyotis diffusa* leaves and establishment of regeneration system

Plate I



白花蛇舌草离体叶片不定芽发生

The regeneration of adventitious shoot from *in-vitro* leaves of *Hedyotis diffusa*

1. 外植体培养1周后卷曲, 开始膨分化; 2. 外植体上发生的不定芽丛; 3. 外植体上产生的芽原基; 4~6. 外植体上形成不定芽苗丛; 5. 不定芽直接从外植体上再生; 7. 外植体愈伤组织化, 无不定芽发生; 8. 外植体愈伤化并再生不定根。