

## 鱼腥草组培体系优化及耐低温突变体的筛选

胡根海\*, 董娜

河南科技学院中药资源研究所, 河南新乡453003

**摘要:** 为解决豫北地区没有鱼腥草栽培, 缺乏耐低温能越冬材料的需求, 本实验以鱼腥草茎段为外植体进行不同植物生长调节剂及其浓度的组织培养诱导侧芽发生, 优化了鱼腥草侧芽组织培养体系; 使用不同浓度的甲基磺酸乙酯(EMS)诱变侧芽, 诱导耐低温突变体, 通过测定诱变材料可溶性糖含量、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化鉴定材料耐寒性。结果表明茎段侧芽诱导的最佳植物生长调节剂组合培养基为MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>; 诱变处理的最佳组合为0.4% EMS处理6 h, 获得8株耐低温突变体; 侧芽生根的最佳浓度组合为1/2MS+NAA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>。

**关键词:** 鱼腥草; 甲基磺酸乙酯; 突变体

## Optimization of Tissue Culture System and Low Temperature Resistant Mutants Screening of *Houttuynia cordata*

HU Gen-Hai\*, DONG Na

Chinese Medicine Resource Research Institute, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China

**Abstract:** To solve the requirements for the favorable variant of *Houttuynia cordata* which could normally wintering and no *H. cordata* was planted in north Henan. The subterranean stems of *H. cordata* were employed for the purpose of inducing lateral bud by tissue culture to optimize *H. cordata* bud tissue culture method and the lateral buds were treated with ethyl methane sulfonate (EMS) at different concentration to induce low temperature resistant mutants, and then resistant mutants were selected with low temperature. Cold resistance was identified by determining mutagenic material soluble sugar content, changes in activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The best hormone combination medium of bud induced was MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>; The best combination of mutagenic treatment was 0.4% EMS for 6 h; Low temperature resistant mutants materials were obtained. The suitable rooting culture medium was 1/2MS+NAA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Houttuynia cordata*; ethyl methane sulfonate; mutants

鱼腥草(*Houttuynia cordata*)属于双子叶植物三白草科蕺菜属, 是一种具有腥味的多年生草本植物, 又因全株具有鱼腥味而得名。鱼腥草既可作菜食用, 又是一味重要的中药药材, 主要分布于我国长江以南各省, 生长于湿地和水旁, 喜温暖潮湿的生长环境, 怕干旱, 不耐低温(班纪华2011)。可能由于河南中北部冬季气温偏低, 目前河南中北部并没有发现野生鱼腥草资源也无引种栽培记录, 无论是作为蔬菜还是中药材均需由长江以南其他省地输入, 因此, 如能诱变出耐低温的鱼腥草材料, 不仅有可能改善河南中北部的蔬菜种植结构, 也可以丰富鱼腥草中药材的资源。目前鱼腥草组织培养工作主要集中在利用侧芽建立快速繁殖体系方面(龚伟等2005; 袁艺等2004; 黄放等2013; 苏月明等2012), 通过组织培养筛选鱼腥草耐

低温突变体的研究还未见报道。耐低温突变体诱导仅在其他少数植物有部分报道, 如金润洲等(1996)将来自11个基因型水稻幼穗的愈伤组织, 在15℃下继代培养, 在粳稻体细胞无性系中获得大量的可遗传耐冷变异体。赵福宽等(2003)用花药低温胁迫培养获得茄子细胞变异体, 并证明诱导产生的抗冷性与DNA某些区域的微细变化有关, 而且抗冷变异株的有性繁殖一代仍表现较强的抗冷性。本文将组织培养与化学诱变相结合, 探讨了获得鱼腥草耐低温突变体的途径, 以期为河南

收稿 2014-05-26 修定 2014-06-16

资助 国家自然科学基金(11305047)。

\* 通讯作者(E-mail: hgh1013@sohu.com; Tel: 0373-3040337)。

中北部提供耐低温的鱼腥草新种质材料。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

供试材料鱼腥草(*Houttuynia cordata* Thunb.)地下茎段购自安徽亿源生物工程有限公司, 材料用自来水冲洗数次, 再用1%洗衣粉溶液浸泡10 min后用毛笔刷清洗表面, 自来水冲洗30 min。在超净工作台上, 用500 mg·L<sup>-1</sup>青霉素溶液浸泡12 h, 用70%乙醇消毒30 s, 再用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理8~10 min, 无菌水冲洗至少4次后, 切成1 cm左右的带侧芽茎段, 备用。

### 2 方法

#### 2.1 鱼腥草侧芽诱导培养基筛选

所用培养基以MS为基本培养基, 蔗糖3%, 琼脂0.7%, pH 6.5~7.0, 附加不同种类、浓度的植物生长调节剂, 培养室温度为(25±1) °C, 光照强度30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照时间12 h·d<sup>-1</sup>, 将带侧芽的茎段接入培养基, 初代培养30 d后, 统计侧芽诱导情况。诱导率=启动外植体数/(接种外植体数-污染外植体数)×100%。

#### 2.2 EMS诱变半致死剂量的确定及材料的诱变处理

采用液体培养基, 以MS为基本培养基, 加蔗糖3%, 加入不同浓度(0, 0.2%, 0.4%, 0.6%和0.8%, pH 6.5~7.0)的化学诱变剂EMS, 放入切好的侧芽振荡培养6 h, 取出后接入培养基MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, pH 6.5~7.0, 30 d后观察死亡率, 确定半致死处理浓度。

使用半致死剂量的EMS处理后的鱼腥草侧芽接入培养基MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, pH 6.5~7.0中, 转入15 °C条件下培养10 d, 再放到4 °C条件下继续培养20 d, (25±1) °C恢复培养10 d后, 挑选存活下来的侧芽进行继代培养并诱导生根。

#### 2.3 鱼腥草再生植株的生根诱导

待侧芽长到2.0 cm左右时, 接种到培养基上进行生根培养, 所用培养基以MS为基本培养基, 蔗糖3%, 琼脂0.7%, pH 6.5~7.0; 培养基浓度设置为MS、1/2MS、1/3MS; NAA浓度设置为0.2、0.5、0.8、1.0和2.0 mg·L<sup>-1</sup>。接种后每7 d观察1次根的生长及生长情况, 每个处理接种100个外植体。培养30 d后调查生根率、根长和根粗。生根率=生根外

植体数/(接种外植体数-污染外植体数)×100%。

#### 2.4 鱼腥草突变植株的耐寒性测定

将获得的鱼腥草耐寒突变体植株和未诱变原始材料, 移栽到培养盒中, 置于(25±1) °C人工气候培养箱中, 恢复生长后, 经4 °C低温处理48 h, 在常温下恢复生长2 d后, 测定材料的可溶性糖含量和CAT、SOD活性。可溶性糖含量测定采用蒽酮比色法(林炎坤1989), CAT活性测定参照Chance和Meahly (1955)的方法, SOD活性测定用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光化还原法(张志良和瞿伟菁2003)。

电解质外渗率的测定采用相对电导率法(梁永恒1996), 材料处理在人工气候箱进行, 处理温度2、6、10、15、20和25 °C, 处理时间6 h, 每个样品称取叶片1 g左右, 放入试管中, 准确加入20 mL蒸馏水, 使材料完全浸入蒸馏水中, 放入真空泵中抽气处理1 h, 其后在振荡器上振荡3 h, 用DDS-307型电导仪测定其电导率, 测定煮沸前电导率, 然后再将试管置于沸水浴中煮10 min, 取出后冷却到室温, 再测定煮沸后电导率, 每个样品重复3次, 测定结果取平均值。实验以所用蒸馏水直接测得电导率为本底电导率, 按如下公式计算: 电解质外渗率=(煮沸前电导率-本底电导率)/(煮沸后电导率-本底电导率)×100%。

## 实验结果

### 1 不同植物生长调节剂配比及浓度对侧芽诱导的影响

从表1可以看出, 在无任何植物生长调节剂的条件下, 侧芽的诱导率最低, 仅10.1%, 且诱导出的侧芽生长缓慢, 细小且颜色浅; 如果单独使用6-BA诱导率也不太理想, 最高是2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 为50.2%, 仔细观察诱导出的侧芽, 发现诱导芽节间短粗; 在单独使用NAA的情况下, 与对照比较侧芽的诱导率也有所提高, 但单独使用NAA的侧芽诱导率不是太理想, 而且单独使用NAA有生根的现象。组合使用6-BA和NAA诱导出的侧芽高度适中且健壮, 个别已开始形成丛生芽。同时, 在相同6-BA浓度下, 随着NAA浓度的升高, 诱导率呈先升后降的趋势; 在相同NAA浓度下, 随着6-BA浓度的升高, 诱导率呈下降趋势。总体分析认为植物生长调节剂对侧芽诱导有促进作用, 但高浓度6-BA

表1 不同植物生长调节剂配比及浓度对侧芽诱导的影响  
Table 1 Effects of different plant growth regulators and concentrations on inducing lateral buds

处理	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	接种数	诱导率/%
1	0	0	50	10.1
2	0	1.0	50	34.4
3	0	2.0	50	50.2
4	0	2.5	50	41.6
5	0.2	0	50	74.1
6	0.2	1.0	50	84.3
7	0.2	2.0	50	91.7
8	0.2	2.5	50	77.4
9	0.5	0	50	65.1
10	0.5	1.0	50	67.0
11	0.5	2.0	50	83.3
12	0.5	2.5	50	66.0
13	0.8	0	50	55.4
14	0.8	1.0	50	54.1
15	0.8	2.0	50	58.2
16	0.8	2.5	50	52.1

对鱼腥草茎段侧芽的诱导具有抑制作用, 低浓度的6-BA和适当浓度的NAA组合可提高侧芽诱导率。实验结果显示茎段诱导侧芽的最佳植物生长调节剂组合培养基为MS+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>。

## 2 EMS对鱼腥草侧芽诱变半致死剂量的确定

经EMS处理后的鱼腥草侧芽的生长能力明显比对照组弱, 表现在株高较矮、叶片发黄等方面。EMS的致死效应随着处理浓度的增加而加大(表2), 在EMS为0.4%的浓度处理6 h时成活率为55%, 可以作为半致死浓度处理材料, 进一步进行耐低温筛选。

表2 EMS处理后6 h的侧芽成活率  
Table 2 Survival rate of the bud after 6 hours by EMS treatment

EMS浓度/%	接种外植体数	成活外植体数	成活率/%
0	100	100	100
0.2	100	83	83
0.4	100	55	55
0.6	100	32	32
0.8	100	11	11

## 3 鱼腥草侧芽耐低温诱变材料的获得及生理分析

鱼腥草侧芽经0.4% EMS处理后, 以未经EMS处理的侧芽作对照, 观察结果见表3。0.4%的EMS

对鱼腥草侧芽诱变有一定的作用, 但诱变产生的芽苗生长缓慢, 小苗与正常温度培养获得的小苗相比较矮小, 这可能是处理过程中生长温度较低造成的, 经低温筛选后8个外植体成活下来。当植物受低温冷害时, 其细胞膜的透性会显著增加, 因此细胞膜透性的变化即电解质相对外渗率可作为评价植物抗寒性的指标。实验随机取EMS诱导的低温成活植株的4个材料, 以未EMS处理鱼腥草材料作对照, 测定不同温度处理后幼苗组织电解质相对外渗率的变化(图1), 结果显示在15 °C以上温度时对照和诱变材料细胞膜透性变化很接近。当处理温度为10 °C时, 对照植株的电解质的相对外渗率为30.2%, 比诱变的4个材料略高。当2 °C和6 °C处理时, 诱变株的细胞膜电解质外渗率均小于37%, 而对照植株的细胞膜电解质外渗率大于46%。

表3 EMS处理后低温(4 °C)下外植体成活率

Table 3 Mutants survival rate after EMS treatment at low temperatures (4 °C)

EMS浓度/%	接种外植体数	成活外植体数	侧芽生长状况	成活率/%
0	100	0	变黑死亡	0
0.4	100	8	颜色绿, 缓慢生长	8

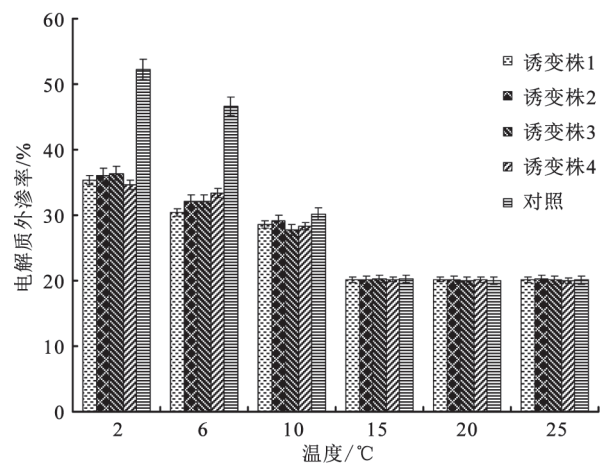


图1 诱变材料在不同温度下电解质相对外渗率的变化  
Fig.1 The changes of membrane permeability of mutagenic materials under different temperature

表4结果显示, 经4 °C处理后, 对照材料叶片可溶性糖含量从3.562%增加到4.214%, 增加了18.304%, 而诱变突变体材料低温处理后普遍增加

较多, 大于55%; 低温下植物体内产生大量活性氧, 其中超氧阴离子的产生和及时被清除对保持光合电子传递和增加跨膜离子梯度有很重要的作用, 有利于叶绿体功能的正常进行, 在一定程度上减轻过量光能引起的光抑制损伤。低温处理过程中SOD、CAT等保护酶可保护叶片免受低温伤害。从表4可以看出, 经低温处理后, 对照材料的CAT活性下降6.126%, SOD活性下降30.607%, 而4株突变体中CAT和SOD活性的下降分别小于3.356%和6.108%, 这说明突变体材料在低温处理后可溶性糖含量增高幅度大, 而CAT和SOD活性更高。

#### 4 培养基和NAA浓度对鱼腥草试管苗生根的影响

从表5可以看出, 不附加NAA时不同浓度的MS生根情况相比较, 1/2MS培养基诱导试管苗的生根率达100%, 高于MS和1/3MS培养基的生根率; 这3种培养基诱导出的不定根均较细长, 其中1/2MS培养基诱导出的不定根相对MS和1/3MS来说是最粗最长。当1/2MS培养基附加不同NAA浓度时, 生根率保持100%, 但根粗与未附加NAA相比成倍增加, 在NAA浓度小于 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随NAA浓度的上升而根粗增加; 但当NAA浓度高于

$0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随NAA浓度的增加, 根粗减小; 比较各NAA浓度的根长、根粗发现, 当NAA的浓度为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 根较粗、较长。

## 讨 论

鱼腥草原为野生植物。近年来, 由于市场需求量不断增加, 才逐渐驯化变为栽培种。自1995年Tsuzuki等通过组织培养的方法, 首次用鱼腥草叶诱导愈伤组织, 并进一步诱导出植株后。研究者们主要对鱼腥草茎作为外植体时如何快速诱导形成再生苗进行了研究(Borthakur等1999; Handique和Bora 1999)。但实验者使用植物生长调节剂不同结果也有差异, 本实验依据前人结果对鱼腥草侧芽再生进行了优化, 结果显示侧芽再生最佳组合为: MS+6-BA  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

鱼腥草因喜温暖潮湿, 不耐低温的生长特性, 目前仅限长江流域及以南地区栽培, 关于如何培育耐低温材料目前未见报道, 仅在辽宁发现一株自然突变体可以耐低温, 但不能越冬(苏月明等2012)。EMS作为一种化学诱变剂, 被广泛应用于各种植物的诱变育种中(李学宝1991)。本实验结

表4 突变体低温处理后叶片可溶性糖含量、CAT和SOD活性的比较

Table 4 Soluble sugar content and activities of CAT and SOD in different varieties compared with control after low temperature treatment

材料	可溶性糖含量/%			CAT活性/ $\Delta\text{OD}_{240}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$			SOD活性/ $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})$		
	25 °C	4 °C	增加值/%	25 °C	4 °C	增加值/%	25 °C	4 °C	增加值/%
对照	3.562	4.214	18.304	63.235	59.361	-6.126	150.241	104.256	-30.607
诱变株1	3.543	5.546	56.543	73.294	72.561	-1.000	160.235	151.241	-5.613
诱变株2	3.613	5.621	55.577	71.265	70.214	-1.475	161.234	152.341	-5.516
诱变株3	3.569	5.641	58.056	72.653	70.215	-3.356	163.214	154.253	-5.490
诱变株4	3.552	5.672	59.685	74.246	72.316	-2.599	162.253	152.342	-6.108

表5 不同培养基和NAA浓度对试管苗生根的影响

Table 5 Effects of different media and NAA concentrations on tube seedlings rooting

培养基	NAA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	生根率/%	平均根粗/mm	平均根长/mm
MS	0	73	0.42	41.3
1/2MS	0	100	0.47	45.3
1/3MS	0	95	0.43	42.1
1/2MS	0.2	100	0.75	19.4
1/2MS	0.5	100	1.21	19.1
1/2MS	0.8	100	1.52	23.1
1/2MS	1.0	100	1.43	22.1
1/2MS	2.0	100	1.13	19.5



果显示以0.4% EMS处理鱼腥草侧芽6 h, 转入15 °C条件下培养10 d, 再放到4 °C条件下继续培养20 d可以获得少数耐低温成活突变体。实验处理过程中出现了抑制生长, 再生能力下降, 死亡等现象, 但部分个体在低温筛选下能够成活, 经不同温度处理后电解质外渗率测定, 诱导突变体的电解质外渗率与对照比较明显降低, 经低温处理后叶片可溶性糖含量、CAT和SOD活性测定, 显示突变植株具有耐低温的生理特性, 初步证明EMS诱变结合低温筛选可能产生了突变体。

实验发现鱼腥草生根很容易, 但使用促生根的NAA和不使用有很大的区别, 使用不同MS浓度也有差别, 不使用NAA的最佳MS浓度为1/2MS, 使用NAA后根系变短变粗, 最佳组合为1/2MS+NAA 0.8 mg·L<sup>-1</sup>。

#### 参考文献

- 班纪华主编(2011). 药用野生蔬菜栽培及开发利用技术. 北京: 中国农业出版社, 243~249
- 龚伟, 胡庭兴, 宫渊波, 张健, 王景燕(2005). 鱼腥草组织培养研究. 亚热带植物科学, 34 (1): 60~62
- 黄放, 李炎林, 钟军, 熊兴耀(2013). 鱼腥草快速繁殖技术体系的建立. 湖南农业大学学报(自然科学版), 39 (2): 166~172
- 金润洲, 王景余, 都兴林, 侯春香, 叶来君(1996). 粳稻体细胞耐冷变异的诱导技术与遗传特性. 吉林农业科学, (2): 10~17
- 李学宝(1991). 甲基磺酸乙酯对水稻萌发种子的生理效应. 武汉植物学研究, 9 (3): 263~266
- 梁永恒(1996). 雪松、海桐等几种常见园林树种的电解质外渗率与抗冻性. 中山大学研究生学刊, 17 (4): 23~27, 34
- 林炎坤(1989). 常用几种蒽酮比色定糖法的比较和改进. 植物生理学通讯, (4): 53~55
- 苏月明, 高相国, 李玲玉, 宁淑香, 姜长阳(2012). 鱼腥草变异植株的组织培养及快繁体系研究. 山东农业科学, 44 (7): 10~12, 15
- 袁艺, 李燕, 应明(2004). 鱼腥草组织培养的研究. 激光生物学报, 13 (6): 414~417
- 张志良, 瞿伟菁(2003). 植物生理学实验指导(第3版). 北京: 高等教育出版社
- 赵福宽, 高遐虹, 程继鸿, 范双喜, 于颖(2003). 茄子抗冷细胞变异体的RAPD分析及自交一代株系的抗冷性鉴定. 华北农学报, 18 (1): 17~20
- Borthakur M, Singh RS, Bora P (1999). *In vitro* regeneration of *Houttuynia cordata*: a medicinal herb. *Planta Med*, 65 (7): 677
- Chance B, Meahly AC (1955). Assay of catalase and peroxidases. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds). *Methods in Enzymology*. Vol II. New York: Academic Press, 2: 764~775
- Handique PJ, Bora P (1999). *In vitro* regeneration of a medicinal plant—*Houttuynia cordata* Thunb. from nodal explants. *Curr Sci*, 76 (9): 1245~1247
- Tsuzuki K, Miyasita S, Kono N, Namiki M (1995). Report on the plant regeneration from the callus made the leaf segments of *Houttuynia cordata* Thunb. *Bull Nip Vet Anim Sci Univ*, 44: 65~68