

TDZ 和 CPPU 在虎杖组织培养中的应用*

于树宏 张嫡群** 杨双革

(河北医科大学药学院 石家庄 050017)

摘要 将高活性细胞分裂素类物质 TDZ 和 CPPU 应用于虎杖的组织培养研究. 经实验筛选发现, 虎杖茎段比叶柄、叶片更容易诱导愈伤组织的形成, 其诱导愈伤组织较适的培养基组成为 MS + 0.5 mg/L CPPU + 0.2 mg/L NAA, 适宜的愈伤组织增殖培养基为 SH + 0.05 mg/L TDZ + 1.0 mg/L NAA; 诱导芽分化的适宜培养基为 MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA; 促进幼苗生长的培养基为 MS + 0.1 mg/L CPPU + 1.0 mg/L NAA + 0.5% 活性炭; 快速生根及壮苗的培养基为 1/2 MS + 1.0 mg/L NAA + 0.5% 活性炭. TDZ 和 CPPU 在愈伤组织的诱导、不定芽的分化及组培苗的生长等方面表现出不同的效果. 以此方式进行虎杖人工快速繁殖, 繁殖系数可达到 5~7, 繁殖时间缩短为 2~3 wk. 图 4 表 2 参 12

关键词 虎杖; 组织培养; TDZ; CPPU

CLC Q813.12

Application of TDZ and CPPU to Tissue Culture of *Polygonum cuspidatum**

YU Shuhong, ZHANG Diquan** & YANG Shuangge

(College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract This paper firstly reported the tissue culture of *Polygonum cuspidatum* *in vitro* with treatments of TDZ and CPPU, both of which are synthetic plant growth regulators with potent cytokinin. The screening tests showed that stem was a better explant for forming callus than petiole and leaf. MS medium added with CPPU 0.5 mg/L and NAA 0.2 mg/L was suitable for this culture. SH medium combined with TDZ 0.05 mg/L and NAA 1.0 mg/L as proliferation medium was good for callus. MS medium added with TDZ 0.05 mg/L and NAA 0.5 mg/L was suitable for bud formation. After being treated with 0.1 mg/L CPPU, 1.0 mg/L NAA and 0.5% charcoal, the sterile seedlings grew quickly and propagated effectively. The 1/2 MS medium added with 1.0 mg/L NAA and 0.5% charcoal was successful for rapid rooting and strong seedlings. TDZ and CPPU had different effects on callus induction, adventitious bud propagation and seedlings growth. In this way to conduct rapid propagation of *P. cuspidatum*, the proliferation coefficient was up to 5~7 and reproduction period could be reduced to 2~3 weeks. Fig 4, Tab 2, Ref 12

Keywords *Polygonum cuspidatum* Sieb.; tissue culture; TDZ; CPPU

CLC Q813.12

虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)为多年生蓼科草本植物, 主要分布于秦岭以南地区, 根或根茎入药, 其主要有效成分是芪类化合物和蒽醌类化合物, 其中芪类化合物主要包括白藜芦醇和白藜芦醇苷. 现代药理研究表明, 白藜芦醇及其苷类是一类具有多种药理作用的活性化合物^[1], 对癌变过程中细胞和组织变异的 3 个主要阶段(引发、增殖和发展)都具有抑制作用, 能够降血脂、抑菌、抗氧化、抗病毒、增强机体免疫力, 还是一种安全的天然植物雌激素, 广泛应用于临床医疗及保健业^[2]. 目前国内市场对虎杖原料供不应求, 但是野生资源存在生长周期长、含量低且不稳定、人工栽培品质退化、采集加工繁琐等问题, 这严重制约着该植物药在应用上的数量和质量^[3]. 当前关于虎杖活性成分分析及药理作用的研究报道很多, 但针对其组织培养领域的研究仍未深入和系统, 国内外的

相关报道也较少.

TDZ (N-苯基 N'-噻二唑-5-脲, thidiazuron) 和 CPPU [N-苯基-N'-(4-吡啶基) 脲, N-phenyl-N'-(4-pyridyl) urea] 均为人工合成的取代脲类, 是具有细胞激动素活性的植物生长调节剂, 已卓有成效地应用于某些植物的愈伤组织、体细胞胚及不定芽的诱导及增殖^[4,5]. 本研究旨在通过应用 TDZ 和 CPPU, 进一步缩短虎杖的组织培养周期, 提高人工快速繁育系数和组培苗的质量, 建立一种快速、高效的离体再生途径, 以满足药物生产及科学研究对虎杖的大量需求.

1 材料与方法

1.1 材料

虎杖外植体(茎、叶、芽等)取自河北师范大学生命科学学院植物园, 经植物学教研室鉴定为虎杖 *P. cuspidatum* 植株.

TDZ (纯度 ≥ 98%) 和 CPPU (纯度 ≥ 93%) 购自四川兰月科技开发公司.

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2005-03-15

* 河北省自然科学基金资助项目 (C2005000741) Supported by the Provincial Natural Science Foundation of Hebei, China

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: Yshfbq@eyou.com)

1.2 培养方法

野生虎杖外植体经常规消毒后,分别接种于①诱导愈伤组织培养基中,在光照或黑暗条件下培养,2 wk 继代一次,30 d 后切下膨大的愈伤颗粒,转接于②愈伤组织增殖培养基中生

长。一段时间后,筛选生长迅速的愈伤组织置于③分化培养基中继续培养。将诱导形成的丛生芽分离成单株接种于④幼苗生长培养基中进行培养。获得的小植株在⑤生根培养基中诱导生根并进一步壮苗。各种类型的培养基组成如表 1。

表 1 培养基组成
Table 1 Components of mediums

类型 Types	基本培养基种类 Basic medium	添加成分的种类及各浓度梯度 Components and their concentrations			
		CPPU ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	TDZ ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	NAA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	活性炭 Active cabon (w/%)
对照培养基 CK	MS	0	0	0	0
	SH	0	0	0	0
① 诱导愈伤培养基 Medium for callus inducing	MS	0.1,0.5,1.0,2.0,5.0	0	0.2	0
	MS	0	0.1,0.5,1.0,2.0,5.0	0.2	0
② 愈伤增殖培养基 Medium for callus proliferating	SH	0.05,1.0,5.0	0	1.0	0
	SH	0	0.05,1.0,5.0	1.0	0
③ 愈伤分化培养基 Medium for callus differentiating	MS	0	0.05,1.0,5.0	0.5	0
④ 幼苗生长培养基 Medium for seedling growing	MS	0.05,1.0,5.0	0	1.0	0.5
⑤ 生根培养基 Medium for rooting	1/2MS	0	0	0.5,1.0,2.0,5.0	0.5

以上各培养基均附加蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8~6.0,121℃ 高压灭菌 20 min All types of the above mediums were added with sugar 30 g/L and agar 7 g/L, pH 5.8~6.0, and sterilized for 20 min under 121℃ and high pressure

1.3 培养条件

温度:白天(27 ± 1)℃,夜晚(23 ± 1)℃;湿度:60%~65%;光强: $28\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照时间 14~16 h/d.

1.4 统计方法

愈伤组织诱导率(%)=形成愈伤的外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;愈伤组织分化率(%)=分化的愈伤外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;出根率(%)=出根外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;根诱导密度=生根数/出根外植体数;繁殖系数=增殖芽数/接种芽数。

每组实验平行重复 3 次,每次实验各处理数不少于 35 个外植体,结果以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s$)的方式表示。所取数据经数理统计分析,各组处理间进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 愈伤组织的诱导及增殖培养

分别取野生虎杖的茎段、叶片、叶柄等外植体,接种于 MS + 0.5 mg/L CPPU + 0.2 mg/L NAA 培养基中,光照下进行培养。30 d 后统计(图 1)表明:茎段的愈伤诱导率显著高于叶柄及叶片($P<0.01$),而且茎段脱分化的时间较早,大约 6~7 d 后可在其生理学下端见到浅白色颗粒状的愈伤组织,随着培养时间的延长,整个茎段表面都会密集生长迅速的愈伤大颗粒。

将茎段外植体接种到培养基①中,比较不同培养条件及不同生长调节剂处理下其脱分化情况。统计 21 d 时的结果(图 2)表明:与 CK 相比,各浓度 TDZ 或 CPPU 处理均可在一定程度上提高愈伤诱导率,其中以 0.1 mg/L TDZ 或 0.5 mg/L CPPU 处理效果极显著($P<0.01$)。TDZ 和 CPPU 两种处理间进行多重比较,则以添加 0.5 mg/L CPPU 并进行暗培养的茎段愈伤分化率显著增高($P<0.05$)。光暗两种培养条件下形成的愈伤组织在颜色、质地等方面有所不同,前者形成的愈伤组织多为淡绿色或粉红色颗粒状,致密湿润,而后者产生的愈伤组织则为浅白或淡黄色的小颗粒,干燥、松散呈絮状。

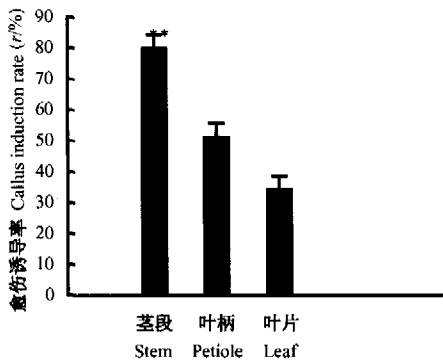


图 1 虎杖不同外植体愈伤组织诱导率的比较
Fig. 1 Comparison of callus induction rates of different explants from *P. cuspidatum*
* * $\alpha=0.01$,下同 The same below

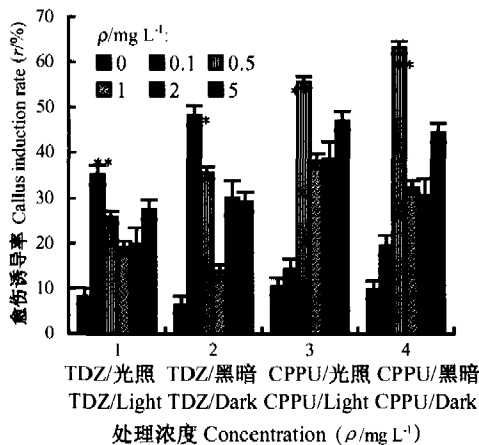


图 2 光暗条件下 TDZ 和 CPPU 对虎杖茎段愈伤组织形成的影响
Fig. 2 Effects of TDZ and CPPU on callus formation from stems of *P. cuspidatum* under light or dark condition

诱导 30 d 后,分离茎段表面生长较好的愈伤颗粒,转接到培养基②中继续进行培养。接种一段时间后发现:TDZ 和 CP-

PU 在愈伤组织的增殖生长方面具有完全不同的生理效应, 无论光暗培养条件下的愈伤组织, 经 CPPU 处理后, 均呈现雪白色, 质地坚硬, 表面干燥絮状, 基部易褐化, 不利于进一步的生长及分化(图 3-1a); 而经 TDZ 处理的愈伤组织, 颜色为淡粉或鲜粉色, 松散膨大, 表面颗粒密集, 凹凸不平, 似菜花状, 基部呈

淡绿色, 生长较快(图 3-1b). 对照组(SH_0)愈伤组织基部呈现高度褐化, 无明显生长现象. 持续培养 20 d 后观察, 以接种于 $SH + 0.05 \text{ mg/L TDZ} + 1.0 \text{ mg/L NAA}$ 中并进行暗培养的愈伤组织生长最为旺盛, 并有利于维持愈伤状态(图 3-2), 这为下一步调控愈伤胚性状态进行细胞悬浮培养奠定了基础.

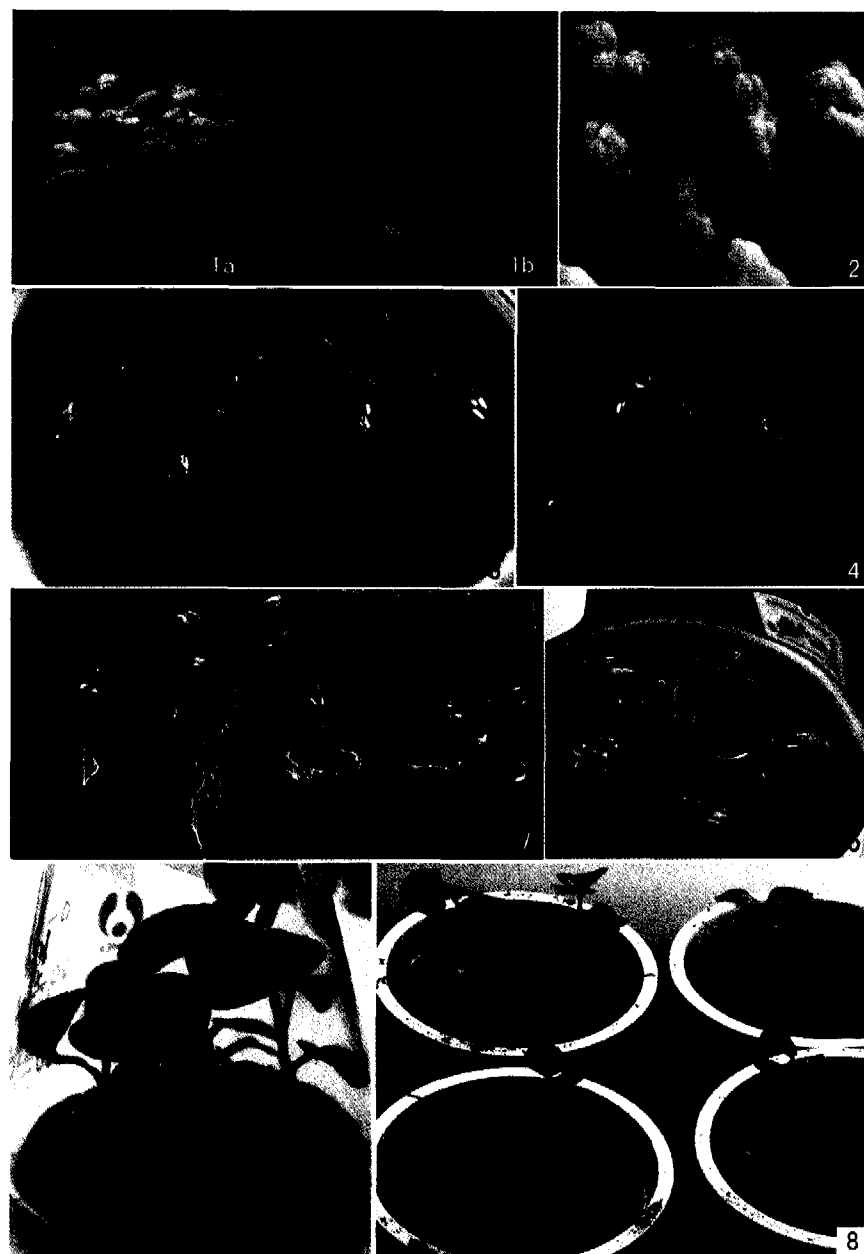


图 3 虎杖的组织培养

Fig. 3 Tissue culture of *P. cuspidatum*

1. 光照条件下, 愈伤组织在不同培养基上的增殖效果 Proliferous effects of calli in different media under light condition (a. 1.0 mg/L CPPU ; b. 1.0 mg/L TDZ); 2. 黑暗条件下, 置于 $SH + TDZ_{0.05} + NAA_{1.0}$ 中增殖培养的愈伤组织 Proliferous calli cultured on SH medium with 0.05 mg/L TDZ and 1.0 mg/L NAA in the dark; 3. 愈伤组织在分化培养基上生长 7 d 后形成的粉红色幼芽 Pink buds induced from calli, which grew on differentiation medium after 7 days; 4. 愈伤膨大置于 $MS + TDZ_{0.05} + NAA_{0.5}$ 培养基中 14 d 后诱导产生的丛生芽 Clumpy buds induced from callus swells cultured on MS medium with 0.05 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA after 14 days; 5. TDZ 诱导产生的幼苗表现玻璃化、矮小、难生根等现象 The vitreous, short and recalcitrant shoots induced by TDZ; 6. 0.1 mg/L CPPU 处理 14 d 后虎杖组培苗的生长状况 The growth state of seedlings treated with 0.1 mg/L CPPU after 14 days; 7. 不同浓度 NAA 处理 21 d 后形成的不定根 Adventitious roots formed after the treatment with different concentrations of NAA for 21 days (a. CK; b. 1.0 mg/L ; c. 2.0 mg/L ; d. 5.0 mg/L); 8. 经过炼苗后正常生长的虎杖小植株 Normal growing plantlets of *P. cuspidatum* after strengthened treatment

2.2 愈伤组织的分化及丛生芽的诱导

选取生长迅速、表面湿润并具颗粒状突起的粉红色愈伤组织接种于培养基③中。3 d 后可见有粉红色芽点萌动,1 wk 后大部分芽点突出表面(图 3-3),幼叶 1~2 片,嫩黄色或鲜粉红色、卷曲,生长较快,15 d 后便形成平均株高 1.0 cm 的幼苗。图 4 显示不同浓度 TDZ 处理后愈伤组织的分化率,统计分析表明:接种于 MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA 培养基上的愈伤组织分化效果极显著($P < 0.01$)。

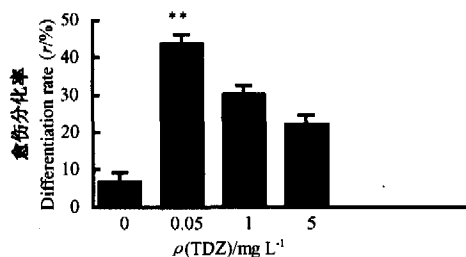


图 4 不同浓度 TDZ 对虎杖愈伤组织分化的影响

Fig. 4 Effects of TDZ with different concentrations on callus differentiation of *P. cuspidatum*

将来源于茎段侧芽生长获得的小植株切下,转入 MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA 培养基中生长,1~2 wk 后形成密集丛生的浅黄色不定芽,平均每株长芽 5~6 个,且在植株基部又形成愈伤性质的膨大,表面浅粉色、湿润疏松,内部浅

绿色、较硬实。将此愈伤膨大分离后切成小块,再次置于该培养基上,4~5 d 后又可见有芽点萌动,2 wk 后即分化形成丛生芽(图 3-4),分化率可达 67.9%,诱芽频率为 5.8。以此方式对虎杖组培苗进行快速繁殖,2~3 wk 后其繁殖系数可达到 5~7。但是在该培养基中生长的幼苗普遍表现出植株弱小、茎秆矮化、叶色发黄、生长缓慢、难以大量生根等 TDZ 作用的不良反应(图 3-5),因此应及时将其转入幼苗生长培养基中。

2.3 组培苗的生长培养

选取株高约 0.5~1.0 cm 的上述虎杖幼苗转入培养基④中进行生长。培养 1 wk 后发现,幼苗的叶色由浅黄转为绿色,叶脉深红,叶数由 2~3 片增至 5~6 片,叶片伸展且叶面积显著增大,有利于幼苗充分进行光合作用;茎秆伸长,木质化程度增加,植株挺立、健壮,且在幼苗膨大的基部有根萌生(图 3-6),一般 4~5 条,浅粉色或白色细长,被有白色根毛但分枝较少。统计分析表明,MS 培养基附加 0.1 mg/L CPPU、1.0 mg/L NAA 及 0.5% 活性炭有利于虎杖组培苗的正常生长,如果 CPPU 浓度过高,极易在幼苗基部形成浅褐色的愈伤膨大,影响植株对营养和水分的吸收,幼苗反而生长缓慢。

2.4 组培苗的生根及壮苗培养

切取虎杖组培苗顶部带芽茎段 1.5~2.0 cm,置于培养基⑤中,分别于 d 7、d 14、d 21 后统计生根情况,结果见表 2。

表 2 不同浓度 NAA 处理对虎杖组培苗生根的影响
Table 2 Effect of NAA with different concentrations on rooting of *P. cuspidatum* seedlings

$\rho(\text{NAA})/\text{mg L}^{-1}$	培养时间 Culture time (t/d)	出根率 Rooting frequency (r/%)	根诱导密度 Rooting density
0	7	45.3 ± 2.64	1.76 ± 0.68
	14	51.9 ± 1.11	2.40 ± 1.01
	21	64.9 ± 2.13	6.01 ± 0.11
0.5	7	45.2 ± 1.15	2.25 ± 0.16
	14	60.7 ± 1.68	4.78 ± 0.19
	21	91.6 ± 1.08	7.11 ± 0.64
1.0	7	58.9 ± 0.99	2.49 ± 0.08
	14	81.2 ± 1.13	6.08 ± 0.12
	21	97.3 ± 0.27	9.69 ± 0.27
2.0	7	51.9 ± 0.85	2.35 ± 0.12
	14	72.1 ± 1.77	5.76 ± 0.08
	21	87.2 ± 1.86	7.17 ± 0.32
5.0	7	15.6 ± 1.34	1.28 ± 0.22
	14	24.4 ± 0.81	1.21 ± 0.10
	21	53.4 ± 0.93	2.49 ± 0.14

各种浓度 NAA 处理的虎杖组培苗均在 21 d 后表现出明显的生根率,诱根频率升高($P < 0.05$),其中以 1.0 mg/L NAA 处理效果最好($P < 0.01$),不仅出根早,生根率高,而且根系发达,分枝多,可明显促进上部茎叶的旺盛生长,有利于壮苗。CK 组则出根较晚,根数少且基部多褐色膨大。高浓度 NAA 诱导产生的根浅黄色,呈短簇状,密集丛生,多根毛,生长慢,茎叶生长也不好(图 3-7)。

从培养瓶中取出已生根的虎杖组培苗,洗去根部附着的琼脂,移栽入装有蛭石的小花盆中,喷施 MS 营养液,表面覆盖塑料薄膜以保持湿度,经过 5~6 d 的炼苗处理便可移植到室外

栽培(图 3-8)。

3 分析与讨论

在大多数的植物组织培养研究中,通常使用 2,4-D 诱导愈伤组织的产生,使用浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$ [6]。但是 2,4-D 属中等毒性的植物生长调节剂,有一定的致癌作用及残留效应,大鼠急性口服 LD_{50} 为 375 mg/kg,因此在药用植物的组织培养过程中应慎重使用。相比之下,TDZ 和 CPPU 的使用浓度通常为 $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{ mol/L}$,大鼠急性口服 LD_{50} 分别为 $> 4\ 000 \text{ mg/kg}$ 及 2 787 mg/kg,无致畸、致癌、致突变作用 [7],因此有必

要深入研究这两种物质对植物的生理效应及作用机制,为今后取代 2,4-D 并广泛应用于药用植物的培养领域提供理论依据。

本实验发现, CPPU 和 TDZ 在虎杖愈伤组织的诱导、增殖及幼芽的快繁方面作用不尽相同。例如: CPPU 可较快地诱导虎杖外植体脱分化, 形成白色松散的絮状愈伤, 但是在增殖过程中该性质的愈伤生长缓慢, 基部极易褐化; 而 TDZ 却有助于维持愈伤组织较好的生长活力, 在适宜的分化培养基上能够迅速形成不定芽。

但是长期继代在含有 TDZ 培养基中的虎杖幼苗会表现出玻璃化、茎融合及矮小等特征, 这与前人报道的结果一致^[8,9], 因此需要及时将增生的幼芽转移至其他适宜生长的培养基中。CPPU 虽然诱导愈伤组织直接分化成不定芽的频率较低^[10], 但它可强烈地诱导器官再生和繁殖, Kefford 等采用 CPPU 处理豌豆幼苗, 发现它可使芽的生长较 CK 高 290%^[11], 在杜鹃花中 0.5 $\mu\text{mol/L}$ CPPU 促进芽的繁殖能力, 接近 5 $\mu\text{mol/L}$ 玉米素和 50 $\mu\text{mol/L}$ 异戊烯基嘌呤水平^[11]。本实验证实, 0.1 mg/L CPPU 处理 1 wk 后就可使矮小柔弱、轻度黄化的虎杖幼芽得到良好生长并生根。关于 TDZ 与 CPPU 在植物组织培养中表现出不同生理效应的机制, 还有待进一步的研究。

杨培君等^[12]发现, 虎杖带节茎段侧芽及不定芽易于诱导形成丛生芽, 繁殖系数较高, 而由愈伤组织诱导丛生芽则相对较慢, 这与本实验结果一致。但他们报道愈伤组织开始产生不定芽需要 20~30 d, 大量丛生芽的形成大约在 37 d 左右, 生长繁殖时间间隔较长。我们通过多次实验, 得出目前实现虎杖快速繁殖的方案为: 首先应用适宜浓度的 TDZ (0.05 mg/L) 和 NAA (0.5 mg/L) 处理侧芽基部愈伤性质的膨大部分, 1 wk 左右便可诱导大量丛生芽的形成, 平均芽增殖倍数为 5~7; 之后分离出单个芽, 转入含有 CPPU (0.1 mg/L) 和 NAA (1.0 mg/L) 的培养基中生长 1 wk, 再转入附加 NAA (1.0 mg/L) 和 0.5% 活性炭的生根培养基中, 10 d 左右可形成生长健壮、株高一致的组培苗, 经过适当炼苗后直接移栽入药圃, 成活率达到 100%。而且 TDZ 或 CPPU 与 NAA 的浓度配比为 0.1 就可产生较好的实验效果, 均低于其他细胞分裂素/生长素的比值, 这就有利于进一步降低组培成本。

该人工快繁虎杖方法的建立与进一步完善, 对今后缓解虎杖自然资源的需求压力及在实验室内利用生物技术手段调控虎杖有效成分的生物合成, 都有着重要的理论和应用意义。

致谢 四川兰月科技开发公司技术研究中心侯勇先生馈赠了 TDZ 和 CPPU 标准品, 并提供了指导性帮助; 河北师范大学生命科学院 2000 级本科生孙桂梅、李淑华、王俊仙及陈运喜等同学进行了论文中激素筛选的工作。

References

- Kimura Y, Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* roots prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularisation in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr*, 2001, **131**: 1844~1849
- Gusman J, Malonne H, Ghanem A. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 2001, **22**: 1111~1117
- Zhou JJ (周建军), Zhang HJ (张宏杰), Yang PJ (杨培君), Li HN (李会宁). Determination of resveratrol glucoside and resveratrol in radix and rhizome of *Polygonum cuspidatum* yielded in Hanzhong region. *Chin Trad & Herbal Drugs* (中草药), 2002, **33** (5): 414~416
- Wang GL (王关林), Fang HJ (方宏筠), Na J (那杰). Application of potent cytokinin thidiazuron (TDZ) to plant tissue culture. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1997, **14** (3): 47~53
- Reynolds AG. Phenylureas CPPU and thidiazuron affect yield components, fruit composition, and shortage potential of four seedless grape selections. *J Amer Soc Hort Sci*, 1992, **117** (1): 85~89
- He H (贺红), Pan RC (潘瑞焱), He YW (何亚文), Zhang LY (张兰英), Li GG (李耿光). Factors affecting organogenesis of *Citrus microcarpa* Bunge. *J Trop & Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 1997, **5** (3): 53~56
- 朱惠香, 张宗俭, 陈虎保. 常用植物生长调节剂应用指南. 北京: 化学工业出版社, 2002
- Ouma JP, Young MM, Reichert NA. Optimization of *in vitro* regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African J Biotechnol*, 2004, **3** (3): 169~173
- Quoirin M, Bittencourt JM, Zanette F. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured *in vitro*. *Revista Brasileira de Fisiol Vegetal*, 1998, **10** (2): 101~105
- Kefford NP, Zwar JA, Bruce MI. Antagonism of benzylurea "biochemistry and physiology of plant growth substances". Ottawa: Runge Press, Ltd., 1968. 61~69
- Watanabe H. The use of growth regulators applied to stem cuttings of Lilies. *Bull Arg Exp Sta*, 1989, **20**: 67~71
- Yang PJ (杨培君), Li HN (李会宁), Zhao H (赵桦). Tissue culture and rapid propagation of *Reynoutria japonica*. *Acta Bot Bor - Occid Sin* (西北植物学报), 2003, **23** (12): 2192~2195