

## 山荷叶的组织培养及无性系建立的研究

张恒庆\*, 孙毅

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

**摘要:**研究了山荷叶叶柄愈伤组织的诱导、分化、试管苗生根、移栽所需要的条件,并建立起山荷叶的无性系.结果表明:MS+La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2mg/L+BA 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L是山荷叶叶柄愈伤组织诱导的理想培养基;MS+La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L是山荷叶愈伤组织分化的理想培养基;1/3MS+IAA 0.5 mg/L是生根培养的理想培养基;以炉灰渣为试管苗的移栽扦插基质,移栽成活率为91%;试管苗在原产地生长正常.

**关键词:**山荷叶;愈伤组织;无性系.

**中图分类号:**Q949.763.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-5846(2007)01-0057-04

山荷叶(*Astilbodies tabularis* (Hemsl.) Engles) 又称大叶子、大脖子、佛爷伞,属于虎耳草科大叶子属多年生草本植物<sup>[1]</sup>,辽宁、吉林有分布,主要生长于山谷林下、沟旁,生长环境要求低温寡照、土壤肥沃.山荷叶的根茎中含有鞣质、淀粉等,可以制造铸胶和淀粉;此外,山荷叶还有收涩、固肠作用,对腹泻等疾病有一定疗效.由于山荷叶需要在较为特殊的环境中生长,并且在自然条件下不易形成种子,因此,分布区内的山荷叶的数量越来越少,已经成为辽宁地区的濒危植物<sup>[2]</sup>.为此,对山荷叶进行组织培养及无性系建立的研究有重要意义.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

旺盛的山荷叶嫩叶柄(从庄河市步云山采集).

### 1.2 方 法

将山荷叶的嫩叶柄剪成3~4 cm的柄段,放到500 mL的广口瓶中,流水冲洗30 min后,用

0.05%安利洗涤液振荡洗涤10 min,移至超净工作台上,再用无菌水洗涤1次,倒入70%乙醇灭菌约10 s,迅速用无菌水洗涤2次,0.05% HgCl<sub>2</sub>溶液振荡灭菌10 min,最后用无菌水洗涤6次,将无菌叶柄切成0.2~0.4 cm的柄段,接种到相应的固体培养基上,进行观察培养.

培养基以MS和1/3MS为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素和生长素.以MS为基本培养基时,加蔗糖30 g/L;以1/3MS为基本培养基时,加蔗糖10 g/L.培养基胂力强度为180 g/cm<sup>2</sup><sup>[3]</sup>,pH5.6~5.8,培养温度14~15℃,光照12 h/d,光照度1 000~1 200 lx.

## 2 结果与分析

### 2.1 叶柄愈伤组织诱导培养

将无菌嫩叶的叶柄接种到以MS为基本培养基,附加La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L及不同种类不同浓度植物激素的培养基上,进行愈伤组织诱导培养.接种50 d后分析统计结果.

由表1可知,在不加任何激素和只加浓度分

\* 作者简介:张恒庆(1962-),男,辽宁大连人,博士后,辽宁师范大学教授,从事植物学研究.  
收稿日期:2006-09-07

表1 植物激素对嫩叶的叶柄愈伤组织诱导的影响

培养基 编号	浓度/(mg/L)			接种数量	愈伤组织诱导数	诱导率/%	长势
	BA	NAA	2,4-D				
0	0	0	0	80	0	0	
1	0.5	0	0	80	0	0	
2	1	0	0	80	0	0	
3	1.5	0	0	80	0	0	
4	2.0	0	0	80	0	0	
5	0.5	1.5	0	80	67	83.75	+++
6	0.5	0	1.5	80	72	90	++
7	1	1.5	0	80	59	73.75	++
8	1	0	1.5	80	53	66.25	++
9	1.5	1.5	0	80	37	46.25	++
10	1.5	0	1.5	80	56	70	++
11	2.0	1.5	0	80	42	52.25	+
12	2.0	0	1.5	80	43	53.75	+

注: +++ 为长势好; ++ 为长势较好; + 为长势一般

别为 0.5 mg/L、1 mg/L、1.5 mg/L 和 2 mg/L 的 BA 培养基上,山荷叶嫩叶的叶柄不能诱导形成愈伤组织.而在含上述浓度 BA 培养基上,再分别加入 1.5 mg/L 的 NAA 或 1.5 mg/L 2,4-D 的培养基上,都能诱导山荷叶嫩叶的叶柄形成愈伤组织,愈伤组织的诱导率为 46.25%~90%.单纯从愈伤组织的诱导率看,BA 浓度为 0.5 mg/L,2,4-D 浓度为 1.5 mg/L 的 6 号培养基上最高,但若从愈伤组织的长势及外部性状上看,在 BA 浓度为 0.5 mg/L,NAA 浓度为 1.5 mg/L 的 5 号培养基上为最好.在这一培养基上诱导的愈伤组织不仅颜色嫩绿,而且呈均匀的颗粒状(见图 1).



图1 诱导的颗粒状愈伤组织

统计表明,一段长约 0.3~0.4 cm 的嫩叶柄,经过 50 d 的培养,可以形成 84~216 个直径为 0.1 cm 左右的绿色的愈伤组织颗粒.这样的愈伤组织为具有分化能力的愈伤组织<sup>[4]</sup>.对在 5 号培养基上诱导的愈伤组织,进行继代增殖培养,连续继代 13 代,所形成的愈伤组织不仅外观上保持不变.并且每继代增殖培养一代(40 d),每一个颗粒基本可以形成 94~166 个一致的颗粒.这说明 MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L 是诱导山荷叶嫩叶的叶柄形成具有分化能力愈伤组织的理想培养基.

## 2.2 愈伤组织的分化培养

取 5 号培养基上绿色颗粒状愈伤组织,接种到附加不同浓度 BA、IAA、NAA 的 MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L 培养基上,进行愈伤组织分化培养,第 24 d 可见分化出绿色的芽点,第 60 d 可见形成大量的丛生不定芽.

由表 2 可知,在 5 号培养基上诱导出的愈伤组织,在只含有 BA 和同时含有 BA 和 NAA 的 MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L 的培养基上愈伤组织不能分化,而在含有 0.5 mg/L BA 和 0.2 mg/L IAA 的 MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L 培养基上,愈伤组织颗粒分化率达 92%.结果表明,在该培养基上,不仅分化率高,而且分化的丛生不定芽长势较好(见图 2),这表明 MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L

L + BA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L 的 22 号培养基是 山荷叶愈伤组织分化的理想培养基.

表 2 不同浓度的激素对愈伤组织分化的影响

培养基 编号	浓度/(mg/L)			接种颗 粒数量	分化不 定芽数	分化率/%	长势
	BA	NAA	IAA				
0	0	0	0	100	0	0	
13	0.1	0	0	100	0	0	
14	0.5	0	0	100	0	0	
15	1	0	0	100	0	0	
16	1.5	0	0	100	0	0	
17	0.1	0.2	0	100	0	0	
18	0.5	0.2	0	100	0	0	
19	1	0.2	0	100	0	0	
20	1.5	0.2	0	100	0	0	
21	0.1	0	0.2	100	68	68	++
22	0.5	0	0.2	100	92	92	++
23	1	0	0.2	100	80	80	+++
24	1.5	0	0.2	100	36	36	+

注:+++为长势好;++为长势较好;+为长势一般

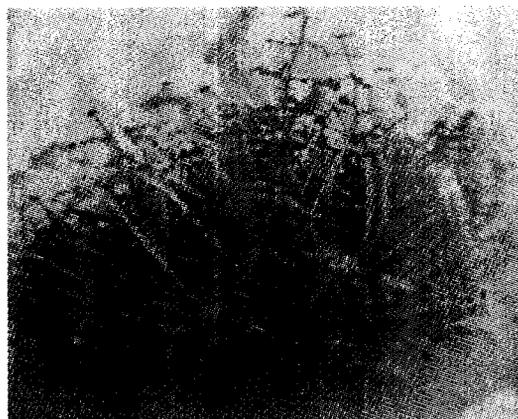


图 2 愈伤组织分化苗

### 2.3 不定芽生根培养

取 22 号培养基上的丛生不定芽,接种到以 MS 或 1/3MS 为基本培养基,附加不同浓度 IAA 的生根培养基中进行生根培养.30 d 后,以 1/3MS 为基本培养基的生根效果好于 MS.在 1/3MS + IAA 0.5 mg/L 的培养基上不仅平均生根数为 7.4 条/株,生根率达 96%,而且植株生长旺盛,生长速度快.结果表明 1/3MS + IAA 0.5 mg/L 这一培养基是山荷叶不定芽生根培养的理想培养基.

### 2.4 试管苗移栽及长势

将生根试管苗培养瓶的瓶塞打开,放在光照约 2 000 lx 左右的条件下炼苗 3~4 d 后取出,用清

水洗去基部的培养基,移栽到园土、黄土、河沙和炉灰渣四种不同基质的花盆中,25 d 时统计分析发现:以炉灰渣为基质,移栽的成活率为 91%,并且长势旺盛(见图 3).



图 3 移栽成活苗

将生长旺盛的盆栽山荷叶试管苗于 5 月中旬,移栽到试验材料的原产地庄河步云山野生山荷叶正常生长的林下,当年植株长势旺盛,叶片比自然生长的植株小三分之一左右,株高矮约二分之一.对根系进行观察表明,试管苗正常生长 3 个

月后,根系发达,相当于地上部的2倍。第二年观察证明,试管苗与野生植株生长一致,难以区别。

### 3 讨论

虽然目前已多有虎耳草科植物组织培养的报道<sup>[5-8]</sup>,但迄今未见大叶子属植物组织培养及无性系建立的报道。

以山荷叶的嫩叶柄为材料,进行了组织培养研究,成功地诱导了愈伤组织,建立起山荷叶的无性系,不仅可以提供在较低温度下能够越冬、长势整齐的山荷叶种苗,而且为山荷叶的种质保存、防止或延缓这种濒危植物的灭绝提供可行的技术途径。由此还能证明,山荷叶非分生组织和细胞也具有全能性。

山荷叶嫩叶柄诱导的颗粒状愈伤组织,在继代培养中一个颗粒40d可以形成94~166个颗粒,并且分化率达92%。这说明通过这种人工方法,山荷叶每年可以繁殖出大量无性系后代,从而可以满足保存种质和生产上对大量种苗需求,还可以把这种愈伤组织作为转基因研究材料,对山荷叶进行基因工程的研究。

把山荷叶生长旺盛盆栽的试管苗移栽到原产地进行栽培,试管苗与野生植株生长一致,说明通过组织培养的方法建立起山荷叶无性系能够保持

种质遗传特性。而在栽培的初期植株长得较小,这是由于在进行试管苗的培养中,由于空间极其狭小,生长环境特殊,导致移栽初期试管苗生长不良,植株瘦小引起的;但在试验中,栽培后期的山荷叶试管苗出现了根系非常发达的现象。这可能与以下原因有关:一是用于研究的材料是选择长势最旺盛的植株,材料本身就具有促进根系非常发达的遗传性;二是在生根培养过程中,培养基中加入了IAA,IAA的后效作用也促进了试管苗根系的生长。

### 参 考 文 献 :

- [1] 中国科学院植物研究所.中国高等植物图鉴(第二册)[M].北京:科学出版社,1972.
- [2] 李书心.辽宁植物志[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1991.
- [3] 姜长阳.植物组织培养中琼脂用量的商榷[J].植物生理学通讯,1992,(2):155.
- [4] 安利佳,姜长阳.植物组织培养导论[M].大连:辽宁师范大学出版社,1993.
- [5] 史定胜.野生大花溲疏植物组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,(1):68.
- [6] 戴小英.虎耳草及其组织培养技术[J].江西林业科技,2004,(6):13-15.
- [7] 贾瑞冬.梅花草的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,(6):798.
- [8] 李树丽,石文山.欧洲绣球的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2005,(4):498.

## Establishment of Regeneration Clones Tissue and Culls of *Astilbodies Tabularis* (Hemsl.) Engles

ZHANG Heng-qing, SUN Yi

(Biology Scientific College, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

**Abstract:** The conditions for induction differentiation, radication, transplantation of the callus of *Astilbodies tabularis*(Hemsl). Engles were studied and its regenerative clone was established. The best medium for callus induction is MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L. The high differentiation frequency was obtained in MS + La(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.2 mg/L + BA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L and 1/3 MS + IAA 0.5 mg/L is the suitable culture medium for radication. With cinder used as medium, a survival ration of 91% for graft was observed. The test tube plantlet grew naturally in original producing area.

**Key words:** *Astilbodies tabularis* (Hemsl.) Engles; callus; clone.

(责任编辑 李 超)