

过路黄的组织培养及叶片植株再生

王艳¹, 杜鸿云², 梁海永^{3*}, 刘桂林¹

(1. 河北农业大学 园林与旅游学院 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学, 河北 保定 071001; 3. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001)

摘要:用过路黄嫩茎作为外植体进行组织培养,在附加不同浓度激素的培养基上对其进行增殖、生根培养,诱导叶片愈伤组织的形成及叶片愈伤组织不定芽的形成,建立其叶片再生体系。结果表明,过路黄最适分化培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L,最适生根培养基是不附加任何激素的 1/2MS 培养基,诱导叶片愈伤组织最适培养基是 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L,诱导叶片愈伤组织不定芽形成最适培养基是 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

关键词:过路黄; 组织培养; 叶片再生

中图分类号: S688.403.54

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2008)04-0104-05

Tissue Culture and Plant Regeneration from the Leaves of *Lysimachia christinae*

WANG Yan¹, DU Hong-yun², LIANG Hai-yong^{3*}, LIU Gui-lin¹

(1. College of Landscape Architecture and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; 2. Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; 3. College of Forestry, 104 Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: The infancy stem segments of *Lysimachia christinae* were taken as explants to be cultured in the media supplemented with different levels of hormone to investigate its proliferation, rooting, formation of leaf callus and adventitious bud from leaf callus, and to establish leaf regeneration system. The resulted showed that preferable propagation medium was MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L, rooting medium was 1/2MS, medium for leaf callus induction was MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L.

Key words: *Lysimachia christinae*; tissue culture; plant regeneration

过路黄 (*Lysimachia christinae*), 报春花科过路黄属, 多年生匍匐茎草本植物, 别名金钱草、对坐草、爬地黄等, 其生长期长、绿色持续期长, 能够平卧匍匐生长, 蔓延扩展能力很强, 植株极富密集性, 平卧整齐, 无草丘坑凹的现象。叶色翠绿诱人, 特别是当进入盛花期时, 宛如绿色绒毯上刺绣的花饰图案, 黄花绿叶, 相映成趣, 十分惹人喜爱, 具有较高的观赏价值^[1], 并且有降低地表温度、减少尘土飞扬、防止水土流失的功能。因此它是一种不可多得的能就地取材铺设地面优良活地被植物和草坪草种植物, 对推动园林建设事业的发展, 特别是对绿地建设, 具有一定的实用价值^[3]。

近年来, 国内外关于过路黄的研究多为其生药

鉴定、化学成分、生物学特性的研究^[3-19], 但对过路黄外植体组织培养和叶片植株再生方面的研究报道较少。本研究以过路黄带芽嫩茎为材料进行组织培养, 讨论附加不同浓度激素的培养基对其增殖、生根、叶片愈伤组织形成及不定芽的诱导的影响, 研究了过路黄叶片组织培养过程中叶片愈伤组织的诱导再生、生根培养等关键问题, 为过路黄的生物技术改良和优良品系的快速繁殖提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所采用的过路黄取自河北农业大学苗圃 1 a 生扦插苗, 取当年生嫩茎作为试验材料。

收稿日期: 2007-12-15 修回日期: 2008-01-06

基金项目: 河北省交通厅重点攻关项目 (Y-050116)。

作者简介: 王艳, 女, 在读硕士, 主要从事园林植物资源利用及评价方面研究。

*通讯作者: 梁海永, 男, 高级实验师, 主要从事林业生物技术及仪器分析方面的研究。

1.2 方法

1.2.1 无菌培养体系的建立 取过路黄带芽嫩茎,用自来水冲洗 30 min,在无菌操作台上,70%酒精浸泡 30 s,20%84 消毒液浸泡 7 min,无菌水冲洗 4~5 次,带芽嫩茎剪成 1.5~2.0 cm 小段接于不附加任何激素的 MS 培养基上进行培养。

1.2.2 培养条件 本试验所采用的基本培养基是 MS 培养基和 1/2MS 培养基,附加不同浓度及不同种类的激素。培养基加蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L, pH5.8~6.0。培养条件为温度 25℃,光照度 2 000~3 000 lx,光照时间 10 h。

1.2.3 分化培养基的筛选 取无菌苗茎段(1.5~2.0 cm)接于附加不同激素的 MS 培养基上进行培养,一个月后调查过路黄在附加不同浓度激素的 MS 培养基上的分化情况,统计增殖率及平均苗高。

$$\text{增殖率}^{[5]} = (\text{增殖后外植体数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

1.2.4 生根培养基的筛选 取无菌苗茎段(1.5~2.0 cm)接于附加不同激素的 MS 和 1/2MS 培养基上进行试验,20 d 后调查过路黄在附加不同浓度激素的培养基上的生根情况,统计生根率及平均苗高。

$$\text{生根率}^{[5]} = (\text{有生根现象的茎段数} / \text{接种茎段数}) \times 100\%$$

$$\text{生根系数}^{[5]} = \text{生根条数} / \text{有生根现象的茎段数}$$

1.2.5 愈伤组织培养 取无菌苗叶片,叶片横切 2~3 刀,剪过中脉,均平铺于附加不同激素的 MS 培养基上,进行愈伤组织的培养。在培养基上培养 45 d 后,统计出愈率、死亡率及愈伤组织生长情况。

$$\text{出愈率} = (\text{形成愈伤组织的外植体数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

$$\text{死亡率} = (\text{死亡外植体个数} / \text{接种外植体数}) \times 100\%$$

1.2.6 愈伤组织形成不定芽的诱导 将叶片愈伤组织平铺于附加不同激素浓度的 MS 培养基上,进行不定芽的诱导,一个月后统计不定芽的数量及不定芽形成率。

$$\text{不定芽形成率} = (\text{产生不定芽的愈伤组织块数} / \text{接种愈伤组织块数}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 过路黄组织培养体系的建立

采用 20%84 消毒液消毒 7 min,接于不附加任何激素的 MS 培养基中即可获得过路黄无菌苗,且长势良好,较易建立过路黄的组培体系。

表 1 6-BA、NAA 对过路黄带芽茎段分化的影响

Table 1 Effecte of 6-BA and NAA on stem regeneration

of <i>L. christinae</i>						
培养基	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种外 植体数	增殖后外 植体数	增殖率 / %	平均茎 高/cm
MS	0	0	20	52.19	260.95	2.84
MS	0	0.1	19	62.11	326.89	3.03
MS	0	0.5	20	58.71	293.55	2.94
MS	0.5	0	20	48.22	241.10	2.41
MS	1.0	0	20	42.31	211.55	2.33
MS	0.5	0.05	20	63.22	316.10	3.16
MS	0.3	0.1	20	65.57	327.85	3.10
MS	0.5	0.1	19	70.92	373.26	3.73
MS	1.0	0.1	20	60.20	301.00	3.01
MS	1.0	0.2	21	55.58	264.67	2.65
MS	2.0	0.1	19	44.28	233.05	2.33
MS	2.0	0.5	20	41.54	207.70	2.08



图 1 过路黄的分化情况

Fig.1 Differentiations of *L. christinae*

2.2 6-BA、NAA 对过路黄带芽茎分化的影响

在 MS 培养基中添加不同浓度 6-BA、NAA 对过路黄带芽嫩茎进行培养。由表 1 可知,过路黄带芽茎在不附加任何激素的 MS 培养基上即可成活,但是增殖率和平均苗高均不如添加激素 6-BA、NAA 时高,NAA 能有效诱导芽的分化,促进侧芽萌发生长,添加 NAA 与不附加任何激素的 MS 培养基比较,增殖率和平均苗高都有所增加,且随着 NAA 浓度的增加,增殖率和平均苗高有所增加。只添加 6-BA,与不附加任何激素的 MS 培养基比较,增殖率和平均苗高却有所降低,且随着浓度的增加,增殖率和平均苗高降低。但是在同时添加 6-BA、NAA 两种激素时,增殖率和平均苗高均比单独加 6-BA、NAA 时有所增高,在 6-BA 浓度一定时,随着 NAA 浓度的增加,增殖率和平均苗高有所增加,当 NAA 浓度超过 1.0 mg/L 时,增殖率和平均苗高开始降低,在 NAA 浓度一定时,随着 6-BA 浓度的增加,增殖率和平均苗高有所增加,说明 6-BA

浓度为 0.5 mg/L, NAA 浓度为 1.0 mg/L 时, 最适宜过路黄茎段分化, 增殖率达 373.26%, 平均茎高达 3.73 cm。

表 2 不同生根培养基对过路黄生根的影响

Table 2 Effects of different rooting medium on rooting of *L. christinae*

培养基	激素		生根率 / %	生根系数	平均根长 / cm	平均茎高 / cm
	NAA / (mg · L ⁻¹)	IBA / (mg · L ⁻¹)				
MS	0	0	100	2.75	0.78	2.09
MS	0.1	0	75	1.83	0.83	2.67
MS	0	0.1	100	1.75	0.76	2.50
MS	0.1	0.1	100	2.50	0.62	2.06
MS	0.2	0.1	100	3.13	0.76	2.75
MS	0.1	0.2	100	2.86	0.56	2.30
1/2MS	0	0	100	5.63	0.75	2.33
1/2MS	0.1	0	87.5	2.14	0.58	1.94
1/2MS	0	0.1	100	2.50	0.67	1.99
1/2MS	0.1	0.1	100	1.50	0.68	1.80
1/2MS	0.2	0.1	100	2.60	0.85	2.34
1/2MS	0.1	0.2	100	2.43	1.10	2.37

表 3 6-BA、NAA 对过路黄叶片愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of 6-BA and NAA on the induction of leaf callus of *L. christinae*

培养基	6BA / (mg · L ⁻¹)	NAA / (mg · L ⁻¹)	接种外植体数	出愈率 / %	死亡率 / %	愈伤组织生长情况
MS	0	0.1	20	90	10	A 愈伤组织上可直接长根, 且根数多
MS	0	0.2	20	90	10	A 愈伤组织生长量少, 愈伤组织上可直接长根
MS	0.5	0.05	20	100	0	A 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗
MS	0.5	0.1	20	100	0	A 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗
MS	1.0	0.1	20	100	0	A 愈伤组织生长量少, 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗
MS	1.0	0.2	20	100	0	A 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗
MS	2.0	0.5	20	100	0	A 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗
MS	2.0	0.1	20	100	0	A 50% 长苗
MS	0.3	0.1	20	100	0	A 生长较快, 愈伤组织上已长出约 1 cm 高的苗, 且苗生长较一致, 苗量最多
MS	0.5	0.1	20	55	0	A 愈伤组织生长量很少
MS	0	0	20	85	0	A 且愈伤组织生长量较多



图 2 在附加 NAA 的 MS 培养基上, 愈伤组织可直接长根

Fig. 2 The root of callus in MS medium with NAA

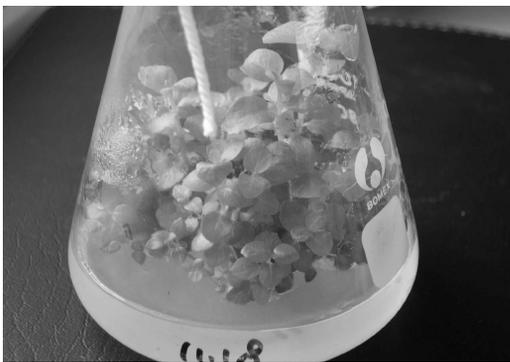
2.3 不同生根培养基对过路黄生根的影响

以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 NAA 和 IBA。带芽茎在接种后逐渐从基部和茎节处产生数条不定根, 三周后的调查生根情况, 结果

从表 2 可知, 在不附加任何激素的 MS 培养基上, 过路黄茎段即可生根, 在单独添加 NAA 后, 生根率和生根系数有所下降, 但是平均根长和平均茎高有所增加, 说明添加 NAA 不利于对过路黄茎的生根, 但对茎的增高有明显作用, 在单独添加 IBA 后, 生根情况也不如不附加任何激素的 MS 培养基, 但是同时添加 NAA 和 IBA, 生根情况有所改善, 且平均茎高也有升高, 其中以 NAA 0.2 mg/L + IBA 0.1 mg/L 时最适宜。在不附加任何激素的 1/2MS 培养基上, NAA 和 IBA 浓度的变化对过路黄生根的影响与添加在 MS 培养基上一致, 但是添加后的生根情况却远不如不附加任何激素的 1/2MS 培养基。在不附加任何激素的 1/2MS 培养基上, 生根系数达到了 5.63, 平均根长和茎高情况也较好, 即不附加任何激素的 1/2MS 培养基最适宜过路黄茎段生根的培养。

2.4 6-BA、NAA 诱导过路黄叶片愈伤组织的形成

采用不同浓度 6-BA、NAA 的 MS 培养基对叶片愈伤组织进行诱导,45 d 后,结果见表 3。过路黄叶片在培养基不附加任何激素的 MS 上即可长愈伤组织,但出愈率不高。NAA 对叶片伤口长愈伤组织有效,随着浓度的升高,其愈伤组织生长数量多,质量好,且在愈伤组织上可直接长根(如图 2),但浓度在 0.2 mg/L 时愈伤组织生长量不如浓度为 0.1 mg/L 时,这说明 NAA 浓度在 0.1 mg/L 时比较适宜叶片伤口长愈伤组织。在附加 6-BA 和 NAA 两种激素时比单独加 NAA 时出愈率高,但不直接长根而是长芽,说明 NAA 对过路黄愈伤组织生长具有生根作用,6-BA 对过路黄愈伤组织生长具有分化长芽的作用,其中以 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的条件下出愈效果最好(如图 3)。



注:据调查统计愈伤组织生长情况分为两种:A:愈伤组织较致密,呈颗粒状,颜色黄绿;B:愈伤组织较疏松,呈水浸状,颜色黄白。

图 3 在附加 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上,叶片愈伤组织所长苗生长情况

Fig.3 The growth of leaf callus in MS medium with 6-BA 0.3 mg/L and NAA 0.1 mg/L

表 4 不同激素浓度对过路黄叶片愈伤组织不定芽诱导的影响

Table 4 Effects of different concentrations of hormones on the adventitious bud formation of callus induced from leaves

培养基	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	愈伤组 织块数	产生不定芽的 愈伤组织块数	不定芽形 成率/ %
MS	0	0	20	8	40
MS	0	0.1	18	0	0
MS	0	0.2	18	0	0
MS	0.5	0.05	20	10	50
MS	0.5	0.1	20	12	60
MS	1.0	0.1	20	10	50
MS	1.0	0.2	20	15	75
MS	2.0	0.5	20	16	80
MS	2.0	0.1	20	10	50
MS	0.3	0.1	20	20	100
MS	0.5	0.1	20	18	90

2.5 不定芽的诱导

将由叶片产生的愈伤组织转入 MS 培养基,附加不同浓度的 6-BA、NAA,三周以后即可长出不定芽,随着时间的延长,不定芽的数量有所增加,一个月后统计不定芽的形成情况,结果见表 4。在只附加 NAA 的培养基上,愈伤组织上不能形成不定芽,但在附加 6-BA 和 NAA 的培养基上,愈伤组织能够形成不定芽,但不是浓度越高形成不定芽的数量越多,其中 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最适宜,不定芽形成率可达 100%。

2.6 不定芽的增殖

将不定芽接于适宜增殖培养基即 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L 中培养,生长良好。

2.7 完整植株的获得

将增殖后的不定芽接种于适宜生根的培养基即不附加任何激素的 1/2MS 培养基中,三周后即可生根,形成完整植株。

3 小结与讨论

适宜过路黄增殖的培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L。

在过路黄生根培养中,在 MS 培养基上,NAA 和 IBA 浓度的变化对过路黄生根具有明显作用,但是 1/2MS 培养基中,添加 NAA 和 IBA 的生根情况却远不如不附加任何激素的 1/2MS 培养基,造成这种差异的原因有待进一步研究。

适宜过路黄叶片愈伤组织诱导的培养基是 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L,二者的浓度在 3:1 时比较适宜,浓度太高或太低都不适宜愈伤组织的诱导,这与前人研究结果不一致,造成研究结果差异的原因有待进一步研究。

适宜过路黄叶片愈伤组织诱导不定芽的培养基为 MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

参考文献:

[1] 中国科学院.中国植物志编辑委员会.中国植物志(第 59 卷第一分册)[M].北京:科学出版社,1989:94-95.

[2] F. Chittendon. RHS Dictionary of Plants plus Supplement [M]. Oxford University Press,1956.

[3] 苏怀林,苏容.地被植物过路黄研究初报[J].湖北农学院学报,2000,20(4):20-21.

[4] 张宏,解检清,吕丹.过路黄的组织培养[J].湖南农业科学,2005(3):83-85.

[5] 杨培君,李会宁,赵桦.过路黄的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2003,39(2):146.

[6] 陈劲松,董鸣,于丹,等.不同光照条件下聚花过路黄的克隆构型和分株种群特征[J].应用生态学报,2004,15(8):1383-1388.

[7] 王琼,刘霞,王爱丽,等.过路黄克隆生长对光照强度的反应

- [J]. 西华师范大学学报, 2003, 12(4): 390-395.
- [8] 许桂芳, 吴铁明, 向佐湘. 干旱胁迫对两种过路黄抗性生理生化指标的影响[J]. 作物研究, 2006(2): 138-140.
- [9] 许桂芳. 2 种过路黄抗旱生理特性的研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(5): 12-14.
- [10] 周筱玲, 廖亮, 陈晔, 等. 两种过路黄的核型研究[J]. 广西植物, 1999, 19(3): 236-238.
- [11] 黄珂, 吴铁明, 吴哲. 过路黄组植物研究进展及园林应用展望[J]. 林业调查规划, 2007, 32(4): 47-50.
- [12] 李冰岚, 王健生, 陈宗良. 点腺过路黄的生药鉴定[J]. 时珍国药研究, 1998, 9(3): 247-248.
- [13] Liao L, Xu LL, Tian XH. Study of chromosome of four species in *Lysimachia* from China[J]. Wuhan Bot Res, 1996, 14(4): 370-372.
- [14] 郭剑. 聚花过路黄的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 10(4): 12-14.
- [15] 薄锋, 袁玲, 张永和. 金钱草总黄酮提取物的抗血栓作用研究[J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(2): 10-11.
- [16] Tanaka A, M Nizume. Karyomorphological studies on species differentiation in some species of *Lysimachia* [J]. La Kromosomo 1978, II-1: 1-12 301-312.
- [17] Tanaka A, M Hizume. Karyomorphological studies on species differentiation in some species of *Lysimachia* II. Chromosomal interrelationships of Japanese species[J]. La Karomoso mo, 1980, II-1, 8-19: 515-525.
- [18] Kohd II, Takeda O, Tanaka S. Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikokiana* [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37: 3304.
- [19] Shen LD, Tao FR. Studies on the chemical of the herb *Lysimachia christinae* Hance [J]. Zhong Yao Tong Bao, 1988, 13(7): 31-34, 63.

(上接第 103 页)

度。生根时用 $1/2MS + IBA 0.3 \text{ mg/L}$ 可得到最好效果。苗子的质量和移栽后的保湿是确保移栽成活的两大关键因素, 健壮的苗子移栽后用地膜保湿 7 d 以上一般都可以成活。

参考文献:

- [1] 杨杰雄. 花中珍品——八仙花[J]. 农村实用技术, 2002(6): 35.
- [2] 徐振华, 王学勇. 花团锦簇八仙花[J]. 植物杂志, 1999(4): 23.
- [3] 上绿. 新优植物推荐[J]. 园林, 2007(9): 71-72.
- [4] 赫重运. 花团锦簇的八仙花. 花木盆景[J]. 花卉园艺, 2001(11): 16-16.
- [5] 曾宋君. 五彩缤纷八仙花[J]. 园林, 2003(5): 15-16.
- [6] 刘锦霞, 杨兰廷. 八仙花组培苗促成栽培[J]. 经济林研究, 2007(3): 61-64.
- [7] 刘锦霞, 杨兰廷. 多效唑对八仙花组培苗营养生长及成花的影响[J]. 北方园艺, 2007(6): 205-207.
- [8] 任叔辉. 八仙花的组织培养与快繁技术[J]. 防护林科技, 2006(1): 10-11.
- [9] 龚伟, 王米力, 石大兴. 八仙花离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003(6): 624.
- [10] 黄作喜, 王育章. 基质配比及生长调节剂对八仙花扦插生根的影响[J]. 天津农业科学, 2005(4): 10-12.
- [11] 李浚明. 植物组织培养技术教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992.