

褐毛铁线莲茎段诱导丛生芽的研究

王 非, 成 璐

(东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以褐毛铁线莲(*Clematis fusca*)带芽茎段为外植体进行组织培养,研究了不同取材季节及植物生长调节剂对茎段诱导不定芽的影响。结果表明:春季为外植体取材的最佳季节,带芽茎段初代培养的最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L,不定芽萌发率为 93.33%,带芽茎段的继代增殖培养的最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 1.0 mg/L,不定芽的增殖系数为 2.63。

关键词:褐毛铁线莲;带芽茎段;不定芽;组织培养

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0086-05

铁线莲属(*Clematis*)植物分布范围广泛,全世界约 355 种^[1]。国内外对铁线莲属植物的研究主要集中在植物分类、资源调查、地理分布、毒理学和药物学等方面^[2-7]。褐毛铁线莲(*Clematis fusca*)属毛茛科铁线莲属多年生直立草本或攀援藤本^[8],花大且花色特别,宿存瘦果圆球形,具有良好的园林观赏价值,可作为垂直绿

化和地被材料。作为一种东北特有的野生植物资源,褐毛铁线莲的抗逆性较强,园林开发利用价值较高,但以往试验结果显示,其种子不易萌发,繁殖较困难,无法满足园林绿化大面积栽培的需要。我国对于铁线莲属植物的研究取得了一定的成果,张启香^[9]以栽培品种 C. 'Multi-Blue'为试验材料分别进行了以带芽茎段为外植体的直接器官发生途径和以茎尖为外植体进行的体细胞胚诱导,均获得了再生植株,研究较深入全面;袁迎燕等^[10]以毛蕊铁线莲为试验材料,用带芽茎段进行组织培养,获得再生植株;王辉^[11]以湖州铁线莲、大花铁线莲和

第一作者简介:王非(1975-),女,吉林长春人,博士,副教授,研究方向为园林植物种质资源。E-mail:shuijing7539@163.com.

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术指导资助项目(11533018)。

收稿日期:2013-11-13

气候,既满足了不同花卉的采光要求,又成为室内一道独特的风景。室内移动式组合花架只占地 0.4 m²,解决了养花与占地面积的矛盾。且可随意移动,室内卫生不留死角。

室内移动式组合花架结构合理、坚固耐用、组装方便、健康环保,受到了试用者的一致好评。

参考文献

- [1] 朱春福,耿美云,于雷. 花架设计中存在的问题及其对策研究[J]. 安徽农业科学, 2012(18): 9768-9770.
- [2] 刘继展,李萍萍,将大林. 可动式螺旋立体花架系统的设计[J]. 中国农机化, 2003(6): 40-42.
- [3] 于辉. 工程力学[M]. 北京: 北京交通大学出版社, 2010.

Design of the Indoor Mobile Combination Pergola

YU Hui

(Jilin Technology College of Electronic Information, Jilin, Jilin 132021)

Abstract: Because of the acceleration of urbanization process, while the living conditions is being improved, the ecological environment has been changed, the green space has been reduced. Indoor mobile combination pergola can solve the contradiction between the flowers number and indoor area. Based on the analysis of the disadvantages of the existing indoor flower pergola, elaborated the structure advantages of mobile combination pergola, design and calculation of the core parts, so as to make mobile combination pergola's structure more reasonable, to meet the quantity and quality of indoor flowers, and improve the indoor environment.

Key words: pergola; mobile base; column; flowerpot tray; pot rack

短柱铁线莲 3 种中国野生铁线莲为试验材料,通过带芽茎段和茎尖诱导不定芽,建立起离体再生体系,并对湖州铁线莲进行了体细胞胚胎发生的初步研究,可见对于铁线莲属植物的组织培养以带芽茎段为外植体进行丛生芽诱导较为快速有效。该试验在借鉴前人研究的基础上,以褐毛铁线莲带芽茎段为外植体,对其进行组织培养,研究不同取材时间及植物生长调节剂对其茎段诱导丛生芽的影响,旨在选择诱导褐毛铁线莲丛生芽的最佳培养条件,为我国褐毛铁线莲在园林中的广泛推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自吉林省吉林地区磐石市烟筒山移植的野生褐毛铁线莲的带冬芽 2 年生苗,将其栽植于壤土和蛭石 1:1 的 20 cm 花盆中,置于室内,待冬芽萌发生长,春季后移置苗圃中培养。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌体系建立 取当年生嫩茎,长度大约 10 cm,用自来水冲洗表面浮尘,将嫩茎剪成 2~3 cm 左右带芽茎段,剪掉叶片,放入含洗衣粉水的三角瓶内充分摇动,静置浸泡 30 min 后,在流水下冲洗 1 h 以上。在超净工作台内将冲洗干净的带芽茎段放入 75% C₂H₅OH(酒精)中灭菌 10 s,无菌水冲洗 3~4 遍,用 0.1% HgCl₂(升汞)消毒 5 min。将灭菌后的茎段用无菌水冲洗 5 次以上,无菌滤纸吸干水分,用解剖刀切掉茎段两端与消毒液接触的伤口,保留带芽茎段 1 cm 左右,接于培养基上。

1.2.2 取材季节 以春季和秋季的带芽茎段为材料,研究不同季节外植体的污染率、死亡率、萌发率和萌动率。

1.2.3 初代培养 以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA(0.5、1.0、2.0 mg/L)和 NAA(0.05、0.1、0.5 mg/L),组成 9 种培养基,每种培养基接种 30 瓶,每瓶接 1 个外植体,30 d 后统计各不同浓度激素处理下带芽茎段不定芽萌发率及萌发新芽的生长状况。

1.2.4 继代增殖培养 将初代培养萌发的嫩茎剪成带芽茎段接种到 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA(1.0、2.0、3.0 mg/L)、NAA(0.05、0.1 mg/L)和 KT(1.0、2.0 mg/L),组成 8 种培养基,每个组合接种 10 瓶,每瓶接 3 个带芽的无菌材料,30 d 后统计增殖系数,记录芽的生长情况。

1.2.5 生根培养 选取生长健壮的幼苗,分别以 MS 和 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 NAA(0.01、0.05、0.1、0.3、0.5 mg/L)和 IBA(0.01、0.05、0.1、0.3、0.5 mg/L),以及 2 种植物激素的交叉组合。每个组合接种 10 瓶,每瓶接 3 个幼苗,30 d 后统计生根率,并记录平均根长和平均根数。

1.2.6 培养条件 除生根培养基中的蔗糖浓度为

15 g/L,其它 MS 培养基中均添加 30 g/L 蔗糖,8 g/L 琼脂,灭菌前调整培养基的 pH 为 5.8~6.0^[12],然后在 121℃ 高压灭菌锅(1.1 MPa)内灭菌 15 min 待用。接种后培养室的光照强度为 1 500~2 000 lx,光照时间为白天 12 h,晚上 12 h^[10],培养温度为(25±2)℃。

1.3 项目测定

统计长菌的茎段计算污染率。

污染率=污染的外植体个数/接种的外植体个数×100%。

以茎段褐化、茎段枯死为外植体死亡标准,统计死亡数及死亡率;以茎段芽萌发、茎段保持绿色为外植体存活标准,统计存活数及存活率。

死亡率=死亡的外植体个数/接种的外植体个数×100%;存活率=存活的外植体个数/接种的外植体个数×100%。

以芽从叶腋处萌动但没有继续生长为标准统计萌动的腋芽个数及萌动率;以腋芽抽出形成茎和叶片为标准,统计腋芽萌发的个数及萌发率。

萌动率=腋芽萌动的外植体个数/接种的外植体个数×100%;萌发率=腋芽萌发的外植体个数/接种的外植体个数×100%。

统计形成不定芽的外植体数量及不定芽数量,计算不定芽诱导率及增殖系数。

不定芽的诱导率=形成丛生芽的外植体个数/接种的外植体个数×100%;丛生芽的增殖系数=形成的有效苗的个数/接种的外植体个数×100%。

1.4 数据分析

采用 Excel 软件对原始数据进行整理,采用 SPSS 10.0 进行数据分析,其中包括极差分析法和方差分析法及邓肯显著性检验方法。

2 结果与分析

2.1 不同取材季节对褐毛铁线莲外植体的影响

由表 1 可知,春季即新梢萌发时期对褐毛铁线莲外植体的污染率、死亡率及萌发率有较大影响。春季带芽茎段污染率较低为 8%,而秋季带芽茎段污染率较高,达到 26%,春季不定芽几乎都能够很快萌动膨大且生长较快,萌动率和萌发率均在 50%以上,而秋季不定芽可以萌动,萌动率能够达到 38%,但几乎很难生长形成新芽。说明褐毛铁线莲外植体取材的最适合季节是春季。

2.2 不同激素组合对初代培养的影响

从表 2 可以看出,褐毛铁线莲不定芽萌发率最高为 93.33%,最低为 23.33%。其中当 6-BA 浓度在 1.0 mg/L 时,其与 NAA 的组合中不定芽的萌发率均高于其它 2 个浓度 6-BA 与 NAA 的组合,尤其当 6-BA 1.0 mg/L 与 NAA 0.05 mg/L 和 0.1 mg/L 组合时,其不定芽萌发率均达到 90.00%以上,而且芽长势良好。

表 1 不同季节外植体的污染率、死亡率、萌发率比较

Table 1 Comparison of explants' pollution rate,mortality rate,germination rate in different seasons

季节 Season	接种数 The number of explants/个	污染率 Pollution rate/%	死亡率 Mortality rate/%	存活率 Survial rate/%	萌动率 Bud rate/%	萌发率 Germination rate/%
春季 Spring	50	8	10	82	78	56
秋季 Autumn	50	26	18	56	38	6

表 2 不同激素组合对茎段不定芽萌发的影响

Table 2 Effects of different hormone combination on adventitious buds germination of stems

植物生长调节剂 Hormone concentration/mg·L ⁻¹		接种数量 The number of explants/个	萌发数量 The number of germination/个	不定芽诱导率 Inducing rate/%	生长状况 Growth conditions		
6-BA	NAA				长势 Growing	生长速度 Speed of growth	叶色 Leaf color
0.5	0.05	30	22	73.33	(++++)	中等	浓绿
0.5	0.10	30	24	80.00	(+++)	较快	绿
0.5	0.50	30	7	23.33	(+)	缓慢	黄
1.0	0.05	30	28	93.33	(+++++)	快	浓绿
1.0	0.10	30	27	90.00	(++++)	快	绿
1.0	0.50	30	10	33.33	(++)	缓慢	绿
2.0	0.05	30	24	80.00	(+++++)	中等	绿
2.0	0.10	30	20	66.67	(+++)	中等	嫩绿
2.0	0.50	30	8	26.67	(+)	缓慢	绿

注:生长非常好(+++++),较好(++++),一般(+++),不好(++或+)。
Note:The best growth(+++++),better growth(++++),intermediate growth(+++),bad growth(++or+).

从表 3 多重比较可以看出,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 和 2.0 mg/L 时的浓度水平差异不显著,而与 1.0 mg/L 浓度的水平差异显著,从平均值来看,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时发芽率最好,为 72.22%,而其它 2 个浓度的发芽率均较低,所以就萌发率而言,褐毛铁线莲芽茎段初代培养的最佳 6-BA 浓度为 1.0 mg/L。NAA 的 3 个浓度水平差异均极显著,且从平均值来看,随着 NAA 浓度的上升,萌发率呈下降趋势,NAA 浓度在 0.05 mg/L 时,萌发率最高,达到 82.22%,而当浓度在 0.5 mg/L 时,萌发率最低,仅为 27.78%,表明高浓度的 NAA 对褐毛铁线莲不定芽萌发有明显的抑制作用。所以就萌发

率而言,褐毛铁线莲芽茎段初代培养的最佳 NAA 浓度为 0.05 mg/L。

通过上述比较,细胞分裂素 6-BA 浓度为 1.0 mg/L,生长素 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,最有利于不定芽萌发,同时两激素在此浓度组合下,芽的生长状况也是最佳的,新生芽生长健壮,生长快(图 1A、B)。因此,适宜于褐毛铁线莲芽茎段初代培养的最佳激素组合为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

2.3 不同激素组合对继代增殖的影响

由表 4 可知,不同激素组合对褐毛铁线莲的继代增殖有较大影响,通过增殖系数的方差分析结果显示,

表 3 6-BA 和 NAA 3 浓度水平 Duncan 检验

Table 3 Duncan test on three concentration levels of 6-BA and NAA

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA	平均值 Average	0.05 水平 Level in 0.05	0.01 水平 Level in 0.01	NAA 浓度 Concentration of NAA	平均值 Average	0.05 水平 Level in 0.05	0.01 水平 Level in 0.01
0.5	58.89±2.40	b	B	0.05	82.22±0.58	a	A
1.0	72.22±1.38	a	A	0.10	78.89±1.04	b	B
2.0	57.78±0.91	b	B	0.50	27.78±0.88	c	C

表 4 不同激素组合对不定芽继代增殖的影响

Table 4 Effects of different hormone combination on proliferation of adventitious shoots

植物生长调节剂 /mg·L ⁻¹			接种数量 The number of explants/个	增殖系数 Coefficient of proliferation	丛生芽生长状况 Clustered shoots conditions			
6-BA	NAA	KT			基部愈伤组织 The amount of basical callus	生长速度 Speed of growth	叶色 Leaf color	粗壯度 Thickness
1.0	0.05	0	30	1.53b	少量	慢	黄	细
1.0	0.1	0	30	1.67b	中等	慢	浅绿	较细
2.0	0.05	0	30	2.36c	中等	中等	绿	粗
2.0	0.1	0	30	2.43d	少	较快	浅绿	细
3.0	0.05	0	30	1.16a	多	慢	黄绿	细
3.0	0.1	0	30	1.23a	较多	慢	黄	细
2.0	0.05	1.0	30	2.63e	少	快	浓绿	较粗
2.0	0.05	2.0	30	2.40cd	中等	慢	——	玻璃化

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。
Note:Different lowercase letters within the same column indicate significant difference at 0.05 level.

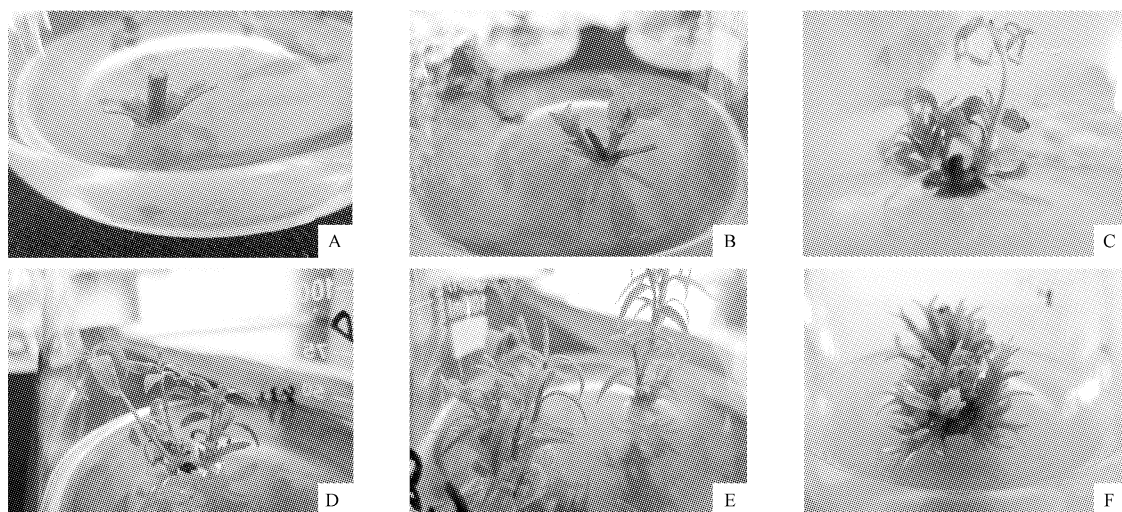


图1 褐毛铁线莲组织培养过程

注:A:不定芽萌发;B:不定芽生长;C、D、E:丛生芽生长较好;F:丛生芽生长不良。

Fig. 1 Formation process of *Clematis fusca* Turcz tissue culture

Note: A: Germanation of adventitious shoots; B: Growth of adventitious shoots; C, D, E: The good growth of clustered shoots; F: The poor growth of clustered shoots.

当 6-BA 浓度相同时,各处理之间差异不显著,但不同浓度的 6-BA 处理之间差异显著,可见 6-BA 在不定芽增殖过程中作用明显,是决定不定芽增殖的关键因素,同时通过表 4 和图 1 可知,KT 在不定芽的增殖中也起到了促进作用(图 1C、D、E),但 KT 浓度过高也会对不定芽增殖产生抑制作用,且丛生芽容易出现玻璃化现象(图 1F),故在 KT 浓度为 1.0 mg/L 时,与其它处理差异显著,增殖系数最高,达到 2.63,芽的生长状况良好。因此褐毛铁线莲不定芽继代增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 1.0 mg/L。

2.4 生根培养

褐毛铁线莲的生根情况不佳,几乎所有培养基均无或仅有极少的幼苗生根,无法记录根的生长状况,包括根的数量及根长度等,不足以进行比较分析,同时幼苗多生长不良,植株极易失绿枯死。

3 讨论

该研究中,春季(4月中旬左右)是外植体取材的最佳时期,其污染率相对较低,可能由于春季带芽茎段还未开始萌动或刚刚开始萌动,生长期较短,自身所带有害菌较少;但秋季(9月中旬左右)枝条经过半年左右的生长,芽苞处鳞片较多,容易积累大量微生物及有害菌,而外植体表面消毒又很难彻底将其杀灭,故污染率较春季高。春季新梢经过冬季休眠,其自身所带的多酚类含量较秋季低^[13],故在死亡率上春季外植体低于秋季。而秋季带芽茎段虽可以萌动,但萌发率很低,容易死亡,不利于丛生芽的诱导增殖。

初代培养中接种 5~10 d,不定芽开始萌动膨大,

10~15 d 开始萌发生长,包括开始芽的伸长生长和叶片的舒展。褐毛铁线莲不定芽萌发需要一定浓度的细胞分裂素,太高或太低均不利于不定芽萌发,而 6-BA 浓度在 0.5 mg/L 时的萌发率平均值又略高于 2.0 mg/L 浓度,可以推断 6-BA 浓度较高时可能会抑制褐毛铁线莲不定芽的萌发,有待进一步研究。而生长素 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,最有利于不定芽萌发。但是在不定芽的初代培养中,由于植株个体的差异,也可能影响不定芽的萌发率及生长速度和生长状况,易出现生长缓慢或萌发后停止生长以及玻璃化现象。

继代增殖培养中,6-BA 浓度过高或过低均会降低不定芽的增殖系数,减少丛生芽的产生,且不利于丛生芽的生长,当 6-BA 浓度在 2.0 mg/L 时,其增殖系数均在 2.00 以上。同时配合低浓度的 KT 可以提高增殖系数,且芽生长良好,说明 KT 在增殖过程中起到促进作用。但长期使用 6-BA 和 KT,又会使大量的激素在丛生芽体内积累,容易产生毒害,破坏体内正常激素的平衡代谢,导致丛生芽长势变弱,甚至枯萎死亡。

在丛生芽增殖过程中,其增殖系数并不高,且基部均有愈伤组织形成,愈伤在一定程度上存在褐化现象,进而可能会影响丛生芽的生长,这在袁迎燕^[14]对毛蕊铁线莲的带芽茎段不定芽的增殖培养中也存在类似的问题,故需要进一步优化在增殖过程中细胞分裂素和生长素的浓度组合。同时褐毛铁线莲由于其自身属于半木质藤本,故容易褐化^[15-16]。郭艳等^[17]在试验中采取在培养基中加入不同浓度活性炭作为吸附剂和多次转移缩短继代时间的方法,结果表明在培养基中加入活性炭防

止褐变的效果并不理想,而采用缩短继代时间的方法,可以在一定程度上减轻外植体的褐化现象。存在的最重要的问题是获得的组培苗不易生根。而在生根过程中,培养条件、基质、激素、水和糖都对无菌苗的生根率有较大影响^[18]。

该研究尝试了不同生根激素诱导,添加不同浓度蔗糖和不同浓度活性炭及分别进行光暗培养,并采用1/2MS和MS在生根前进行壮苗等措施,均无法诱导组培苗生根,组培苗呈现2种状态:1种是基部产生乳白色愈伤组织,上部芽苗枯黄死亡;另1种是基部无愈伤组织形成,但基部1~2 cm左右茎段变黑,上部芽苗枯黄死亡。这可能有多方面的因素影响,首先褐毛铁线莲是野生铁线莲品种,研究较少,其生根机理等方面无从参考,包括其自身可能存在抑制其生根的物质,故即使在不加任何激素的MS和1/2MS培养基上,芽苗的死亡率也较高,可能是由于在前期初代和继代培养中,细胞分裂素浓度较高,在植株体内残留,对植株产生毒害,加大了生根的难度;其次由于实验室的培养条件有限,在生根培养环节无法创造最适合其生长的生境,包括温度、光照、水分等,也是导致其不易生根的原因;而在生根诱导激素的种类和浓度方面还应做更多的尝试,包括不单纯使用常规生长素促进生根,还可以使用细胞激动素KT^[19],并辅助添加水解酪蛋白和维生素C等。褐毛铁线莲的生根培养还需多借鉴前人在其它铁线莲属植物的组织培养中的方法和经验,进一步进行试验研究,以探索出最适合其生根的培养条件。

参考文献

- [1] 王文采,李良千. 铁线莲属一新分类系统[J]. 植物分类学报,2005,43(5):431-488.
- [2] 严雄梁,吴璐璐,季梦成. 中国铁线莲属植物研究现状及展望[J]. 江西科学,2008,26(5):832-837.
- [3] 李新伟,李建强,王映明,等. 湖北铁线莲属的区系特征及地理分布

- [J]. 武汉植物学研究,2004,22(4):294-300.
- [4] Chaudhary M I, Qing H, Xiao P G, et al. Clematis huchouensis. Tamura: a traditional Chinese herbal medicine and its quality control using a high performance liquid chromatography technique[J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(1):165-168.
- [5] Peng H, Lv H, Wang Y, et al. Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities[J]. Peptides, 2009, 30(10):1805-1815.
- [6] Afolayan A J, Yakubu M T, Appidi J R, et al. Toxicological implications of aqueous extract of *Clematis brachiata* Thunb. leaves in male Wistar rats[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 3(11):531-538.
- [7] 普春霞,杨竹雅,刘小莉. 云南铁线莲属12种药用植物的RAPD分析[J]. 云南中医学院学报,2008,31(5):37-41.
- [8] 王文采. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1980.
- [9] 张启香. 观赏型铁线莲的引种及生物学研究[D]. 南京:南京林业大学,2007.
- [10] 袁迎燕,石大兴,王米力,等. 毛蕊铁线莲组织培养与植株再生研究[J]. 植物生理学通讯,2009,45(9):895.
- [11] 王辉. 三种中国野生铁线莲组织培养研究[D]. 南京:南京林业大学,2012.
- [12] 吴荣,林萍,樊国盛,等. 铁线莲‘Gipsy Queen’组织培养与快速繁殖(简报)[J]. 亚热带植物科学,2011,40(2):68-69.
- [13] 谷延泽,高瑞彦. 植物组织培养中的褐化现象及防治措施[J]. 河北农业科学,2008,12(6):56-58.
- [14] 袁迎燕. 毛蕊铁线莲组织培养与植株再生研究[D]. 雅安:四川农业大学,2010.
- [15] 潘娟,李先源,李名杨. 植物组织培养过程中常见问题及解决方法[J]. 安徽农业科学,2009,37(6):2392-2394.
- [16] 杨丽琴,李瑞,王俊,等. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺,2008(4):104-107.
- [17] 郭艳,杨海玲. 植物组织培养中的褐化现象及解决途径[J]. 山西农业科学,2009,37(7):14-16.
- [18] 祁宏英,徐洪国,张志. 矮牵牛组织培养及不同基质对生根的影响[J]. 北方园艺,2012(15):137-139.
- [19] 孔萌萌,周根余. 芦笋组织培养生根技术[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2006(35):93-94.

Study on Cluster Shoots Induction From the Stems of *Clematis fusca*

WANG Fei, CHENG Lu

(Landscape Architecture College, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Taking *Clematis fusca* with bud stem segments as explants for tissue culture, the effect of different seasons and plant growth regulator on the adventitious buds induction from the stems were studied. The results showed that the best season to collect the explants was in spring. The best initial medium from stems with buds was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L, the germination rate of adventitious buds was 93.33%, the best culture medium of proliferation from stems with buds was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 1.0 mg/L, the proliferation index of adventitious buds was 2.63.

Key words: *Clematis fusca*; stems with buds; adventitious buds; tissue culture