

文章编号: 1000-5692(2005)02-0241-05

常春藤离体快繁技术

张存旭¹, 杨锋利¹, 袁秀平²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 杨凌职业技术学院 林学系, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以常春藤 *Hedera nepalensis* var. *sinensis* 茎段为外植体, 研究了培养基、植物生长调节物质和移栽基质对常春藤离体快繁的影响。结果表明: 起始和增殖培养中高盐质量浓度的 MS 培养基好于低盐培养基 WPM 和 B₅。增殖培养时, 在培养基中同时添加 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 1.0 mg·L⁻¹ GA₃ 为佳, 增殖系数可达到 4。以 1/2 MS 为基本培养基, 虽然不添加任何生长调节物质亦能获得高生根率, 但附加 0.10 mg·L⁻¹ NAA 能更好地促进根系发育。移栽基质选用腐质土, 成活率可达 80% 以上。用自来水代替蒸馏水, 白砂糖代替蔗糖, 对常春藤试管苗的增殖和生长无显著影响, 可降低培养成本。表 6 参 9

关键词: 育苗; 常春藤; 快速繁殖; 体外培养

中图分类号: Q943.1; S682.36 **文献标识码:** A

常春藤 *Hedera nepalensis* var. *sinensis* 为五加科 Araliaceae 常春藤属 *Hedera* 多年生常绿观叶植物。其幼嫩的木质茎细长, 线条优美, 长可达数米, 多分枝, 蔓茎上的气生根可吸附它物攀援。常春藤既耐阴湿, 又较耐寒, 易管理, 是室内外绿化与装饰的优良品种, 可用来护坡, 作立交桥、棚架的垂直绿化, 也可作为鲜切花的辅助材料或制作常春藤盆景^[1]。但这一优良品种在自然条件下只能通过扦插方式繁殖, 速度慢。近年来随着组培技术的发展, 花卉离体快繁已引起国内外园艺工作者的重视, 并在生产上得到了广泛应用^[2]。常春藤的组织培养, 前人也做了一定的研究工作^[3,4], 但用于商业化生产尚需进一步探索。本文旨在通过系统地研究组织培养再生植株过程, 建立常春藤快繁体系, 为常春藤工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采取常春藤扦插苗的当年生嫩茎作为外植体。将嫩茎切成 1.5~2.0 cm 的带芽茎段, 经流水冲洗 2 h, 无菌条件下用体积分数为 75% 乙醇表面消毒 30 s 后用 1.0 g·kg⁻¹ HgCl₂ 浸泡消毒 6 min, 无菌水冲洗 4 次。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 用 MS (murashige and skoog), WPM (wood plant medium) 和 B₅ (gamborg's B₅ medium) 作为基本培养基, 三者都附加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA (6-benzylaminopurine), 每一处理接种 20 个培养体, 重

收稿日期: 2004-07-06; 修回日期: 2005-01-18

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2001K01-G7-01)

作者简介: 张存旭, 副教授, 博士研究生, 从事林木遗传及生物技术等研究。E-mail: cunxu@public.xa.sn.cn

复3次。

1.2.2 继代增殖培养基 以MS为基本培养基,分别附加0, 1.0, 2.0, 3.0 mg[°]L⁻¹6-BA, 0, 0.01, 0.05, 0.10 mg[°]L⁻¹NAA (α -naphthalene acetic acid)和0, 0.5, 1.0, 2.0 mg[°]L⁻¹GA₃ (gibberellin),采用L₁₆(4⁵)正交设计^[5]。

1.2.3 生根培养 以1/2MS为基本培养基,蔗糖15.0 g[°]L⁻¹,单独添加0, 0.05, 0.10, 0.30 mg[°]L⁻¹NAA, 0.20 mg[°]L⁻¹IBA (indole-3-butyric acid),以及同时添加0.1 mg[°]L⁻¹NAA和0.10 mg[°]L⁻¹IBA。采用单因素随机试验设计,每一处理接种20个培养体,重复3次。

1.2.4 培养基成分 培养基中琼脂(产地:北京)5.5 g[°]L⁻¹,蔗糖25.0 g[°]L⁻¹(生根除外),pH 5.6~5.8。用市售食用白砂糖(南宁糖业股份有限公司)和葡萄糖代替蔗糖,用自来水代替蒸馏水。

1.2.5 培养条件 所有培养容器均采用青色琉璃瓶(70 mm×90 mm),培养室温度(25±3)°C,光照强度1500~2000 lx,光照时间14 h·d⁻¹。

1.2.6 驯化移栽 待无菌苗根长5 cm左右,叶片颜色呈深绿色,茎杆半木质化,在培养间自然散射光下练苗6~7 d后,取出试管苗,洗净根际的培养基移栽于蛭石、沙子、3 蛭石:1 沙子、1 蛭石:3 沙子和腐质土5种不同成分的基质中,进行驯化栽培对比试验。每处理移栽30株,共150株,移栽后20, 40, 60 d分别调查成活率。

2 结果与分析

2.1 基本培养基筛选

将常春藤茎段接种到附加0.5 mg[°]L⁻¹6-BA的MS启动培养基上,建立无菌培养材料。13 d后腋芽萌动并开始伸长。待新芽长至1.0 cm左右,切取并分别接种到WPM, B₅和MS3种培养基上。8 d后腋芽开始伸长,茎段基部膨大,逐渐形成愈伤组织。25 d时观察在不同培养基上的生长情况。由表1可知,不同培养基间在萌芽率、萌芽数和芽伸长方面存在显著差异。MS培养基上的腋芽萌发率明显大于WPM和B₅培养基上的,新芽伸长生长和新芽数也为MS培养基上的大于WPM和B₅培养基上的。说明高盐培养基MS较有利于常春藤腋芽萌发与生长。

2.2 不同植物生长调节物质对萌芽率及生长的影响

以MS为基本培养基,添加不同质量浓度的6-BA, NAA和GA₃, 35 d后统计结果(表2)。培养基中只添加NAA和GA₃时,有不同程度的生根现象,芽萌发率很低。添加3.0 mg[°]L⁻¹6-BA

时,萌芽率均值最大,达到72.2%,且在嫩茎中上部有二重芽和三重芽萌发,也有2~3个芽从同一腋芽处萌发出来,呈丛生状,但伸长不明显,有的几乎成畸形,很难将单个芽分切进行继代培养。添加2.0 mg[°]L⁻¹6-BA时,芽萌发率次于6-BA质量浓度为3.0 mg[°]L⁻¹时,有二重芽萌发,主萌芽较长,增殖可达4倍。GA₃与适当质量浓度6-BA配合,芽长和萌芽率有所增加,但当GA₃质量浓度为2.0 mg[°]L⁻¹时,对腋芽萌发的促进作用减弱,芽变得细弱,节间过分伸长,有轻微玻璃化现象,不利于进一步继代培养和诱导生根培养。

由极值R(表3)可以看出,6-BA促进萌芽率效果最佳,其次为GA₃,对茎芽伸长生长的影响以GA₃效果最好,其次为6-BA, NAA的影响均较小。

2.3 不同碳源和水源对试管苗生长的影响

接种后的前20 d,不同碳源对常春藤增殖生长的影响差别明显。以蔗糖为碳源的培养基上,腋芽

表1 培养基对常春藤萌芽及生长的影响

Table 1 Effect of various media on bud break and shoot growth of *Hedera nepalensis* var. *sinesis* during initiation period

培养基	接种数/个	萌芽率/%	萌芽数/个	芽长/cm	叶片颜色
WPM	40	39.3	1.5	0.6	深绿
B ₅	40	43.7	1.8	1.4	淡绿
MS	40	76.6	2.2	1.9	绿色

表 2 不同植物生长调节物质及质量浓度配比对常春藤萌芽率及生长影响

Table 2 Effect of types and concentration of plant growth substances on bud break and shoot growth of *Hedera nepalensis* var. *sinensis*

处理	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	GA ₃ / (mg·L ⁻¹)	接种数/ 个	萌芽率/ %	芽长/ cm	叶色
1	0	0	0	40	0	0	深绿
2	0	0.01	0.5	40	7.5	0.8	深绿
3	0	0.05	1.0	40	22.5	1.5	深绿
4	0	0.10	2.0	40	15.0	1.6	深绿
5	1.0	0	2.0	40	47.5	2.1	绿色
6	1.0	0.01	0	40	50.0	1.5	绿色
7	1.0	0.05	0.5	40	45.4	1.8	绿色
8	1.0	0.10	1.0	40	42.5	1.7	绿色
9	2.0	0	1.0	40	59.6	1.6	淡绿
10	2.0	0.01	2.0	40	57.5	2.0	淡绿
11	2.0	0.05	0	40	62.7	1.2	淡绿
12	2.0	0.10	0.5	40	72.1	1.7	淡绿
13	3.0	0	0.5	40	80.5	0.6	黄绿
14	3.0	0.01	1.0	40	75.2	1.2	黄绿
15	3.0	0.05	2.0	40	62.5	1.4	黄绿
16	3.0	0.10	0	40	70.4	0.4	黄绿

萌发较早, 萌发率明显高于其他, 展开的叶片数较多。以葡萄糖为碳源的培养基上, 植株生长缓慢, 萌芽率很低, 即使少数有腋芽萌发, 也未见伸长。40 d 时观察生长情况, 结果见表 4。其中添加白砂糖的培养基上腋芽萌发增多, 茎芽明显伸长; 而以葡萄糖为碳源的培养基上, 萌芽表现较差, 茎芽伸长不明显。用自来水代替蒸馏水对萌芽率和茎芽数的影响不大, 植株生长正常, 说明自来水配制培养基对无菌苗的生长增殖不会造成抑制或危害, 因此, 可用自来水代替蒸馏水, 白砂糖代替蔗糖, 降低培养成本。

2.4 植物生长调节物质对常春藤试管苗生根的影响

当芽长 2~3 cm 时, 切取并进行生根培养, 保留 3~4 片叶。接种 10 d 后, 所有组合均可诱导常春藤无菌苗生根, 30 d 时结果如表 5 所示。常春藤无菌苗不经过愈伤组织直接从皮层生根, 这种根与维管束相连, 容易吸收营养, 移栽成活率高。虽然不加

任何激素也能诱导生根, 但生根数少, 根系细弱, 不利于移栽; 而加入过多 NAA (0.3 mg·L⁻¹) 会导致根短而细弱, 侧根少; 单独添加 IBA 时, 生根较其他组合晚 2 d, 根为圆柱状, 有第 2 侧根; 单独添加 NAA 或 NAA 和 IBA 配合使用, 根诱导较快, 且生长迅速, 根长而粗壮, 大多有第 2 侧根, 个别还有第 3 侧根。2 种处理在根数和根长方面无显著差异。但从降低生产成本考虑, 选用 0.10 mg·L⁻¹

表 3 不同植物生长调节物质对常春藤萌芽率及生长影响的极值

Table 3 Maximum different value of types of plant growth substances on bud break and shoot growth of *Hedera nepalensis* var. *sinensis*

均值	萌芽率			芽长		
	6-BA	NAA	GA ₃	6-BA	NAA	GA ₃
K ₁	11.3	46.9	40.6	1.0	1.1	0.8
K ₂	46.4	47.6	47.0	1.8	1.4	1.2
K ₃	63.0	48.3	56.3	1.6	1.5	1.5
K ₄	72.2	50.0	48.8	0.9	1.4	1.8
R	60.9	3.1	15.7	0.9	0.4	1.0

说明: K₁, K₂, K₃, K₄ 分别代表不同水平的平均值; R 代表平均值的极差

表 4 碳源对常春藤萌芽率和萌芽数影响多重比较及方差分析

Table 4 The variance analysis and least significant difference test for bud break and shoots number of *Hedera nepalensis* var. *sinensis* with different sugar sources

碳源	萌芽率/ %	萌芽数/ 个
白砂糖	92.0a	3.5b
葡萄糖	82.7b	1.9c
蔗糖	92.4a	4.0a
F 值	31.2 **	832.0 * *

说明: 同一栏内英文字母不同表示差异显著

NAA 更合适 (表 5)。

表 5 植物生长调节物质对常春藤小植株生根效果的影响

Table 5 Effect of types and concentrations of auxins on rooting of *Hedera nepalensis* var. *sinensis* plantlets

NAA/ (mg·L ⁻¹)	IBA/ (mg·L ⁻¹)	接种数/个	生根率/%	根数/条	根长/cm	根系形态
0	0	30	94	4.8	4.1	细长, 侧根极少
0.05	0	30	100	6.0	3.5	锥状, 侧根少
0.10	0	30	100	7.0	3.8	锥状, 较粗, 侧根多
0.30	0	30	100	6.2	2.4	细弱, 侧根少
0	0.20	26	100	5.8	3.6	柱状, 较粗, 侧根较多
0.10	0.10	26	100	6.6	4.1	锥状, 粗, 侧根多

2.5 不同基质对常春藤试管苗移栽成活率的影响

将常春藤试管苗移栽于不同成分的基质中, 20, 40, 60 d 分别统计移栽成活率。由表 6 可见, 试管苗移栽 20 d 时在不同基质的成活率均较高; 40 d 时沙子上的试管苗全部死亡, 1 蛭石 : 3 沙子上的成活率仅 10%; 60 d 时 1 蛭石 : 3 沙子上的试管苗也全部死亡。试管苗在蛭石和腐质土上保持了较高的成活率, 达 80% 以上。从物理性能看, 蛭石和腐质土吸水性及保水性较好, 试管苗能够很快形成新根, 因而移栽成活率高。从降低成本考虑, 腐质土作为常春藤无菌苗移栽基质较为适宜。

3 讨论

培养基中含有外植体生长所需要的营养物质是组织培养中外植体赖以生存和生长的基础, 目前, 适合多种植物一般营养条件的培养基, 有多种配方可供选择。本研究采用 MS, WPM 和 B₅ 等 3 种基本培养基, 其中 MS 为应用最广泛, 微量元素齐全, 钾盐、铵盐及硝酸盐含量均较高的高盐培养基; WPM 中大量元素含量较 MS 少, 微量元素基本相同, B₅ 为硝酸盐含量较高的中盐培养基。结果表明: 常春藤茎段起始和增殖培养基选用 MS 好于 WPM 和 B₅。这和前人的研究结果一致^[1, 3, 4]。

植物生长调节物质在组织培养中发挥着重要的作用。细胞分裂素 6-BA 在茎尖分化培养和增殖培养时应用较多。本研究发现在无 6-BA 的培养基中, 外植体不萌发, 当培养基中添加 1.0~3.0 mg·L⁻¹ 6-BA 时, 随质量浓度增加, 萌发率增加, 而茎芽伸长生长反而减小。在山楂 *Crataegus pinnatifida* 培养时也发现有类似现象^[9]。6-BA 与低质量浓度的 NAA 配合使用, 对茎芽伸长生长有一定促进作用, 这与韦弗曾经提出的分裂素和生长素具有协同作用的理论相一致^[7]。GA₃ 既能刺激茎顶端的细胞分裂又能刺激茎的伸长, 这种现象在福建山樱花 *Cerasus campanulata* 和红帝王 *Philodendron erubescens* 'Red King' 的组织培养中也有报道^[8, 9]。但在使用中质量浓度不能超过 2.0 mg·L⁻¹, 否则茎变得细长, 不适合生根培养。

在植物组培快繁中, 如何做到高产、低耗是人们一直关心的问题。本研究在增殖培养基中用自来水代替蒸馏水, 白砂糖代替蔗糖, 没有显著影响常春藤试管苗的增殖和生长, 一定程度降低了生产成本。要实现规范化生产, 仍需要在简化培养步骤, 减少能耗等方面做进一步研究。

参考文献:

[1] 李秀芬, 张德顺, 王小青. 常春藤应用概述[J]. 山东林业科技, 2002, (3): 39-40.

[2] 彭爱红, 何永睿, 邹修平, 等. 观赏植物组织培养与基因工程研究进展[J]. 热带植物学, 2002, 31(2): 58-63.

表 6 不同基质对常春藤试管苗移栽成活率的影响

Table 6 Effect of different culture media on the survival rate of *Hedera nepalensis* var. *sinensis* plantlets after transplanting 20, 40 and 60 d

基质	移栽 苗/株	成活率/%		
		20 d	40 d	60 d
蛭石	30	95.0	90.0	86.0
沙子	30	75.0	0	0
3 蛭石 : 1 沙子	30	80.0	70.0	60.0
1 蛭石 : 3 沙子	30	85.0	10.0	0
腐质土	30	90.0	84.0	85.0

结果表明: 常春藤茎段起始和增殖培养基选用 MS 好于 WPM 和 B₅。这和前人的研究结果一致^[1, 3, 4]。

- [3] 梁海永, 郑均宝, 王进茂, 等. 常春藤的组织培养[J]. 河北林果研究, 1998, 13(1): 86-90.
- [4] 李玉巧. 金边常春藤快繁试验[J]. 江苏林业科技, 1992, 19(3): 17-18.
- [5] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [6] 于亚军, 代汉萍, 李宝江. 植物激素和生长调节剂在果树组织培养中的应用[J]. 北方园艺, 2002, (6): 68-70.
- [7] 韦弗 R.J. 农业中的植物生长物质[M]. 中国科学院植物研究所植物生理生化研究室, 译. 北京: 科学出版社, 1979.
- [8] 王光萍, 黄敏仁. 福建山樱花的组织培养及植株再生[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2002, 26(3): 73-75.
- [9] 韩美丽, 唐玉贵. 几种天南星科荫生观叶植物组织培养研究[J]. 广西林业科技, 1998, 27(2): 53-56.

In vitro rapid propagation of *Hedera nepalensis* var. *sinensis*

ZHANG Cun-xu¹, YANG Feng-li¹, YUAN Xiu-ping²

(1. Institute of Forestry Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Department of Forestry, Yangling Vocational and Technical College, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Using nodal segments as a source of initial explants, the effects of basal medium, plant growth substances as well as transplantation medium on rapid propagation of *Hedera nepalensis* var. *sinensis* was studied. The results showed that the rich salt medium MS is more suitable for initial and multiplication culture than low salt media WPM and Bs. It is better to add $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ to multiplication medium, in which multiplication coefficient reached 4. Although high rooting percentage was obtained with free growth regulators on 1/2 MS medium, root system development could be improved on medium by adding $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. The survival rate of transplanation was about 80% in humus soil. Using tap water and edible white sugar instead of distilled water and sucrose have no significant effect on shoots multiplication and growth of *H. nepalensis* var. *sinensis*, so the culture cost could be reduced. [Ch, 6 tab. 9 ref.]

Key words: nursery stock growing; *Hedera nepalensis* var. *sinensis*; rapid propagation; in vitro culture