

文章编号:1001-7380(2018)02-0021-04

铁线莲‘Avant-Garde’组织培养及快速繁殖试验

黄婧,张敏*,周鹏,周洁,蒋泽平

(江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153)

摘要:以铁线莲品种‘Avant-Garde’为材料,进行了植物组织培养和快速繁殖试验。通过比较试验发现,使用 WPM 作为基本培养基的效果优于 MS 培养基。在此基础上,采用全因子设计,研究不同质量浓度的植物生长调节剂对铁线莲具节茎段芽苗增殖和幼苗生根的影响,并对结果进行了方差分析和邓肯测验,发现较高质量浓度(≥ 2.0 mg/L)的 6-BA 会抑制芽苗的生长;幼苗生根率随着 NAA 质量浓度(0.05—0.15 mg/L)的升高而增加,随着 IBA 质量浓度(0.2—1.5 mg/L)的升高而减少。试验筛选得到芽增殖最佳培养基配方为 WPM+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA,增殖系数为 2.83;最佳生根培养基配方为 1/2 WPM+0.15 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA,生根率达到 50%。

关键词:铁线莲;植物组织培养;生根培养;NAA;6-BA;IBA

中图分类号:Q943.1;Q949.746.5

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.02.006

Study on the tissue culture of *Clematis florida* ‘Avant-Garde’

HUANG Jing, ZHANG Min*, ZHOU Peng, ZHOU Jie, JIANG Ze-ping

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China)

Abstract: The tissue culture and rapid propagation of *Clematis florida* ‘Avant-Garde’ were studied. It was found that WPM was suitable for induction culture compared with MS medium. After full factorial design used to study the effect of plant growth regulator with different concentration on the proliferation of shoots and rooting of seedlings, the results of variance analysis and Duncan test showed that high concentration (≥ 2.0 mg/L) of 6-BA could inhibit the shoot growth. And the rooting rate increased with the increase of NAA concentration (0.05—0.15 mg/L) and decreased with the increase of IBA concentration (0.2—1.5 mg/L). The best culture medium for bud proliferation was WPM+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA with 2.83 proliferation index. The best rooting medium was 1/2 WPM+0.15 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA with 50% rooting rate.

Key words: *Clematis florida* Thunb.; Plant tissue culture; Rooting culture; NAA; 6-BA; IBA

铁线莲(*Clematis florida* Thunb.)是毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属植物,多数为落叶或常绿草质藤本,有“藤本皇后”的美称。在我国主要分布于广西、广东、湖南、江西等地区^[1]。生于阳光充足、湿润、开阔的地方,喜肥沃、排水良好的碱性壤土。铁线莲的花期从早春到晚秋,果期夏季,花色艳丽,花形独特,具有较高的观赏价值^[2]。此外,铁线莲一直作为传统中药材使用,根和全株都可入药^[3]。国外对铁线莲的培育驯化工作开展较早,引进观赏性

较强的国外品种,可以扩大铁线莲属植物的应用范围,也能促进我国铁线莲属植物育种事业的发展。欧洲的铁线莲品种‘Avant-Garde’属于晚花大花型(Late Large-flowered Group)类群,有很高的观赏价值和经济价值。花红色,大而漂亮。花朵星形,花瓣深粉红色,花朵中部为重瓣花,浅粉红色,花药黄色。‘Avant-Garde’的种子繁殖非常困难,只能采用无性繁殖手段,扦插繁殖的成活率较低,采用组织培养技术可以有效地解决这些问题。本试验研究

收稿日期:2017-12-15;修回日期:2018-02-28

基金项目:江苏省农业三新工程项目“铁线莲优良品种高效繁育技术集成示范”(SXGC[2016]278)

作者简介:黄婧(1987-),女,江苏镇江人,研究实习员,博士。主要从事遗传学研究。

*通信作者:张敏(1980-),女,内蒙古人,副研究员,博士。主要从事生物技术与林木花卉良种繁育工作。

了铁线莲品种‘Avant-Garde’的组织培养技术,包括茎段增殖和瓶内生根的培养基配方选择,以期为产业化生产和推广应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料处理

剪取当年生嫩茎 10 cm 左右,用自来水清洗,接着用洗洁精浸泡 10 min,再用自来水冲洗干净。放置于超净台内的无菌瓶中,用 1%次氯酸钠溶液浸泡消毒 10 min,再用纯水冲洗干净。经表面消毒后的茎段用灭过菌的滤纸吸干,切成 1 cm 左右的具节茎段待用。

1.2 培养基设计

1.2.1 基本培养基筛选 将表面消毒后的茎段作为外植体,切下接种在培养基中,每个处理 10 瓶,每瓶接种茎段 4 个,重复 3 次。基本培养基配方是 MS 和 WPM。每种培养基附加 3%(30 g/L)的蔗糖,0.6%(6 g/L)的卡拉胶,pH5.8。20 d 后统计出芽外植体数和诱导的腋芽数。

1.2.2 增殖培养 以具节茎段为外植体,接种在诱导培养基中,每个处理 10 瓶,每瓶接种茎段 4 个,3 次重复。选择筛选出的较适宜基本培养基进行增殖培养,按照处理组合(见表 1)添加不同质量浓度的 NAA 和 6-BA,附加 3%(30 g/L)的蔗糖,0.6%(6 g/L)的卡拉胶,pH5.8。20 d 后统计新出的不定芽数,计算增殖系数。增殖系数=不定芽总数/诱导出不定芽的外植体总数。

表 1 增殖培养基中植物生长调节剂 mg/L		
组合	植物生长调节剂	
	NAA	6-BA
A ₁	0.05	0.5
A ₂	0.1	0.5
A ₃	0.5	0.5
A ₄	0.05	1.0
A ₅	0.1	1.0
A ₆	0.5	1.0
A ₇	0.05	2.0
A ₈	0.1	2.0
A ₉	0.5	2.0

1.2.3 生根培养 将新生的无菌苗切取 3—4 cm 左右的带顶芽茎段作为生根苗,接入生根培养基中,每个处理 10 瓶,每瓶接种茎段 1 个,重复 3 次。生根培

养基的配方以 1/2 WPM 作为基本培养基,按照处理组合(见表 2)添加不同质量浓度的 NAA 和 IBA,附加 3%(30 g/L)的蔗糖,0.6%(6 g/L)的卡拉胶,pH 5.8。20 d 后统计生根幼苗数量,计算生根率。

表 2 生根培养基中植物生长调节剂 mg/L		
组合	植物生长调节剂	
	NAA	IBA
B ₁	0.05	0.2
B ₂	0.1	0.2
B ₃	0.15	0.2
B ₄	0.05	0.5
B ₅	0.1	0.5
B ₆	0.15	0.5
B ₇	0.05	1.0
B ₈	0.1	1.0
B ₉	0.15	1.0
B ₁₀	0.05	1.5
B ₁₁	0.1	1.5
B ₁₂	0.15	1.5

1.3 组织培养条件

光照时间 12 h/d,光照强度 1 000 lx,温度(20±2)℃,相对湿度 60%。

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 对试验数据进行统计和分析,对增殖系数和生根数量进行方差分析和 Duncan 检验。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对具节茎段生长的影响

在不加任何植物生长调节剂的 MS 培养基和 WPM 培养基上接种铁线莲具节茎段,接种 20 d 后,对茎段生长情况和出芽外植体数进行了调查,结果见表 3。铁线莲茎段在 2 种培养基上都能被 100%诱导出芽,茎段在 WPM 培养基中的诱导腋芽数多于在 MS 培养基中的数量。同时,通过肉眼观察发现,在 WPM 培养基中生长的茎段更粗壮(未测量茎段粗度),颜色更绿。由此,选择 WPM 培养基为基本培养基,进行后续的增殖和生根培养。

表 3 不同培养基对腋芽诱导的影响			
处理	接种数	出芽外植体数	诱导腋芽数
MS	120	120	126
WPM	120	120	144

2.2 不同植物生长调节剂对具节茎段增殖的影响

在 WPM 培养基上添加不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 进行增殖培养基筛选,培养 20 d 后进行调查。从表 4 中可见,不同植物生长调节剂组合处理对铁线莲的继代增殖有较大影响,增殖系数从 1.41 至 2.83 不等。方差分析(见表 5)显示,不同质量浓度的 6-BA 处理之间有极显著差异($P < 0.01$),而不同质量浓度的 NAA 处理间没有显著差异($P > 0.05$)。具体而言(见表 6),6-BA 的 3 个质量浓度(0.5,1.0 mg/L 和 2.0 mg/L)之间有显著差异($P < 0.05$),其中,1.0 mg/L 的处理与另外 2 个质量浓度的处理相比,有极显著差异($P < 0.01$)。从数据的平均值来看,当 6-BA 为 1.0 mg/L 时,增殖系数最高,平均值为 2.66,所以最佳增殖培养的 6-BA 质量浓度是 1.0 mg/L;此外,当 6-BA 为 2.0 mg/L 时,增殖系数最低,平均值为 1.47,而其他 2 个质量浓度的增殖系数较高。这可能是由于较高质量浓度的 6-BA 在一定程度上抑制了茎段芽苗的生长。同时,随着 NAA 质量浓度的上升,增殖系数呈现先上升后下降的趋势,当 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,增殖系数最高,平均值为 2.13,所以最佳增殖培养的 NAA 质量浓度是 0.1 mg/L。因此铁线莲品种‘Avant-Garde’的最佳增殖培养基配方为 WPM+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA。

表 4 不同植物生长调节剂对茎段增殖培养的影响			
处理	接种数	增殖个数	增殖系数
A1	120	200	1.67
A2	120	251	2.09
A3	120	262	2.18
A4	120	298	2.48
A5	120	340	2.83
A6	120	320	2.67
A7	120	185	1.54
A8	120	175	1.46
A9	120	169	1.41

表 5 增殖系数的方差分析结果					
变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	Sig
校正模型	4	2.229	0.557	17.470	0.008
截距	1	37.332	37.332	0.001	0
NAA	2	0.091	0.045	1.420	0.342
6-BA	2	2.139	1.069	33.520	0.003
误差	4	0.128	0.032		
总计	9	39.689			
校正总计	8	2.357			

表 6 增殖系数的 Duncan 检验						
NAA/ (mg/L)	平均值	0.05 水平	6-BA/ (mg/L)	平均值	0.05 水平	0.01 水平
0.05	1.90	a	0.5	1.98	b	b
0.1	2.13	a	1.0	2.66	a	a
0.5	2.01	a	2.0	1.47	c	b

2.3 不同植物生长调节剂对幼苗生根的影响

通过添加不同质量浓度的植物生长调节剂来刺激幼苗在组织培养瓶内生根,结果统计见表 7。处理 B₃ 中生根数最多,生根率达到 50.00%;其次是处理 B₆,B₂ 和 B₉,生根率分别为 43.33%,40.00%和 40.00%。方差分析(见表 8)显示,每种植物生长调节剂的不同质量浓度处理间都存在极显著差异($P < 0.01$)。Duncan 检测结果显示(见表 9),NAA 的 3 种质量浓度水平之间存在显著差异($P < 0.05$),其中,0.15 mg/L 与另外 2 种质量浓度处理之间有极显著差异($P < 0.01$)。生根幼苗数量随着 NAA 质量浓度升高而增加,当质量浓度为 0.15 mg/L 时,幼苗生根数量最多,平均 12.25 个,由此认为诱导生根的 NAA 最适合质量浓度为 0.15 mg/L。IBA 在 0.2 mg/L 水平与其他 3 种质量浓度之间,有极显著差异($P < 0.01$),且生根幼苗数量随着 IBA 质量浓度升高而减少,在 0.2 mg/L 时,生根幼苗数量最多,平均 12.67 个,由此认为诱导生根的 IBA 最适合质量浓度为 0.2 mg/L。因此铁线莲品种‘Avant-Garde’的最佳生根培养基配方为 1/2 WPM+0.15 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA。

表 7 不同植物生长调节剂对生根培养的影响			
处理	接种幼苗数	生根幼苗数	生根率/%
B ₁	30	11	36.67
B ₂	30	12	40.00
B ₃	30	15	50.00
B ₄	30	7	23.33
B ₅	30	11	36.67
B ₆	30	13	43.33
B ₇	30	4	13.33
B ₈	30	7	23.33
B ₉	30	12	40.00
B ₁₀	30	4	13.33
B ₁₁	30	6	20.00
B ₁₂	30	9	30.00

表 8 幼苗生根数量的方差分析结果

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	Sig
校正模型	5	138.083	27.617	26.870	0
截距	1	1 026.750	1 026.750	999.000	0
NAA	2	66.500	33.250	32.351	0.001
IBA	3	71.583	23.861	23.216	0.001
误差	6	6.167	1.028		
总计	12	1 171.000			
校正总计	11	144.250			

表 9 生根数量的 Duncan 检验

NAA/ (mg/L)	平均值	0.05 水平	0.01 水平	IBA/ (mg/L)	平均值	0.05 水平	0.01 水平
0.05	6.50	c	b	0.2	12.67	a	a
0.1	9.00	b	b	0.5	10.33	b	ab
0.15	12.25	a	a	1.0	7.67	c	bc
				1.5	6.33	c	c

3 结论与讨论

本试验对适合铁线莲品种‘Avant-Garde’生长的增殖培养基和生根培养基进行了筛选,并对培养基中的不同植物生长调节剂质量浓度进行了比较分析,最终获得的最适增殖培养基配方是 WPM + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA,增殖系数达到 2.83;最佳生根培养基配方为 1/2 WPM+0.15 mg/L NAA +0.2 mg/L IBA,生根率达到 50%。

经过比较试验,发现铁线莲品种‘Avant-Garde’在 WPM 培养基上生长状态更好,所以选择 WPM 培养基为基本培养基。根据前人的研究^[4-6],发现不同的植物生长调节剂配比会对铁线莲的组织分化、生根诱导和次生代谢产生不同的影响。试验中发现,6-BA 的质量浓度过高会使幼苗基部的愈伤组织膨大、腋芽的生长速率变慢,这与前人研究的结果类似^[7-8]。这说明 6-BA 具有促进植株芽生长和诱导愈伤组织的双重功能,在今后应该根据培育目标采用合适的用量。

课题组前期的试验结果发现,铁线莲品种‘Avant-Garde’的扦插成活率较低(数据未发表),需要进行瓶内生根培养。瓶内生根技术可以使组织培养苗逐步适应外部环境,为幼苗成功移植到瓶外环境奠定基础,目前这种技术已经在铁线莲和许多

其他植物中得到良好的应用^[9-11]。生根培养需要降低培养基中的矿物元素浓度,减少幼苗体内积累的细胞分裂素,并加入适当的生长素。因此,本试验在生根阶段采用 1/2 WPM 作为基本培养基,去掉细胞分裂素 6-BA,并根据前人的研究经验^[12-14],加入不同质量浓度的生长素 IAA 和 NAA 诱导铁线莲生根。当 NAA 质量浓度为 0.15 mg/L,同时 IBA 质量浓度为 0.2 mg/L 时,生根效率最高,可达到 50%。今后,需要研究分析铁线莲‘Avant-Garde’扦插生根和组织培养瓶内生根过程中的植物生长调节剂水平、次生代谢和基因表达的异同,找出该品种生根困难的原因,提高品种的生根率、生根速度和移栽成活率。

参考文献:

[1] 王文采, 云南植物志[M]. 昆明:云南科学技术出版社, 2000.

[2] 章银柯, 江 燕. 我国铁线莲属植物研究现状及其园林应用[J]. 北方园艺, 2007(3):122-124.

[3] 刘玉国, 刘玉红. 铁线莲属药用植物化学研究概况[J]. 新疆中医药, 2000(1):58-59.

[4] 倪 新, 马 毓. 红花铁线莲(*Clematis coccinea*)的组织培养[J]. 植物学报, 1984, 2(23): 71-73.

[5] 王玉敏. 辣蓼铁线莲根芽愈伤组织试管苗培养研究[J]. 河南科学, 2014(3):372-375.

[6] 张启香, 胡恒康, 方炎明. 铁线莲‘Multi-Blue’体细胞胚诱导和植株再生[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(6):18-22.

[7] 成 璐. 两种铁线莲植物组织培养的初步研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2014.

[8] 李丽容, 金开正. 铁线莲组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15):138-139.

[9] 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.

[10] 高丽霞, 邹春萍. 花卉试管苗瓶内生根介质改进的研究[J]. 现代农业科技, 2008(12):37-37.

[11] 刘红坚, 范业赓, 何为中, 等. 甘蔗试管苗瓶内生根与瓶外生根培养方法比较研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(18):13-15.

[12] 黄余磊, 吕枷薪, 蒋 明, 等. 单叶铁线莲 *Clematis henryi* 愈伤组织诱导与植株再生[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(4):731-735.

[13] 李宗艳, 唐 岱, 黄开勇. 转子莲的繁殖研究[J]. 西南林学院学报, 2004, 24(3):4-6.

[14] 吴 荣, 林 萍, 樊国盛, 等. 铁线莲‘Gispy Queen’组织培养与快速繁殖(简报)[J]. 亚热带植物科学, 2011, 40(2):69-69.