

铁线莲‘朱卡’组织培养技术及再生体系的建立

高 燕,莫建彬,付艳茹,奉树成*

(上海植物园,上海城市植物资源开发应用工程技术研究中心,上海 200231)

摘要:【目的】以铁线莲‘朱卡’(*Clematis* ‘Julka’)的带芽茎段为起始材料,通过组织培养方法建立再生体系。【方法】利用腋芽诱导—不定芽增殖—生根和愈伤组织诱导—增殖—分化—生根两种途径,建立该品种的组织培养再生体系,形成铁线莲‘朱卡’完整植株。【结果】铁线莲‘朱卡’组织培养最适宜灭菌条件为质量分数10%次氯酸钠溶液灭菌12min;带芽茎段诱导腋芽最适培养基为MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,不定芽增殖最适培养基为MS+IBA 0.20 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L;带芽茎段诱导愈伤组织最适培养基为MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 2.0 mg/L,愈伤组织增殖最适培养基为MS+NAA 0.20 mg/L +6-BA 2.0 mg/L,愈伤组织分化最适培养基为MS+NAA 0.03 mg/L+6-BA 3.0 mg/L;最佳生根培养基为1/2 MS+IBA 0.3 mg/L。【结论】首次用两种器官发生方法建立了稳定高效的铁线莲‘朱卡’再生体系。直接形成不定芽时增殖倍数可达5.52。诱导愈伤组织途径的器官发生中,愈伤组织分化率可达76.7%,分化不定芽平均数超过3。两种途径诱导生根率都在90%以上。

关键词:铁线莲‘朱卡’;腋芽诱导;愈伤组织诱导;愈伤组织分化;再生体系

中图分类号:S682.19

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2006(2021)03-0109-08



Tissue culture and plant regeneration of *Clematis* ‘Julka’

GAO Yan, MO Jianbin, FU Yanru, FENG Shucheng*

(Shanghai Botanical Garden, Shanghai Engineering Research Center of Sustainable Plant Innovation, Shanghai 200231, China)

Abstract: 【Objective】Stem segments having buds of *Clematis* ‘Julka’ were used as the explants to construct a regeneration system. 【Method】The system was established via two ways: one is initiates from induction of axillary buds, then proliferation of adventitious buds, and rooting induction; the other is from callus induction and proliferation to differentiation, final rooting. 【Result】The method for explants surface sterilization was incubated in 10% (mass fraction) sodium hypochlorite for 12 min. The medium for inducing axillary buds was MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L and for adventitious buds proliferation was MS+IBA 0.20 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L. The medium for callus induction was MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, for callus proliferation was MS+NAA 0.20 mg/L +6-BA 2.0 mg/L, and for callus differentiation was MS+ NAA 0.03 mg/L +6-BA 3.0 mg/L. The Optimal rooting induction medium was 1/2MS+IBA 0.3 mg/L. 【Conclusion】This study established a stable and high-efficient regeneration system *in vitro* for *Clematis* ‘Julka’ by using two ways of organogenesis. The multiplication rate was 5.52 when shoot organogenesis were formed directly. In the organogenesis of callus induction pathway, the ratio of callus differentiation was 76.7% and the average number of differentiated adventitious buds was more than 3. The rates of plantlet rooting in two ways were more than 90%.

Keywords: *Clematis* ‘Julka’; axillary buds induction; callus induction; callus differentiation; plant regeneration

铁线莲(*Clematis florida*)被誉为“藤本皇后”,为毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属多年生草质或木质藤本植物,少数直立草本或灌木^[1]。铁线莲

萼片花瓣状,着色丰富,几乎包括了所有常见的花色,花型多变;花期长,可以做到三季开花;应用形式多样,近些年在注重拓展城市绿化空间、增加绿

收稿日期 Received: 2019-12-10

修回日期 Accepted: 2020-09-08

基金项目:上海市科技兴农引进消化吸收再创新项目(沪农科引字(2017)第1-3号)。

第一作者:高燕(69262835@qq.com),高级工程师,博士。*通信作者:奉树成(shbg2009@126.com),教授级高级工程师,ORCID(0000-0002-8187-3924)。

引文格式:高燕,莫建彬,付艳茹,等.铁线莲‘朱卡’组织培养技术及再生体系的建立[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(3):109-114.GAO Y, MO J B, FU Y R, et al. Tissue culture and plant regeneration of *Clematis* ‘Julka’ [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2021, 45(3): 109-114. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.201912012.

量、关注立体绿化的城市,特别在大中型城市精致园艺中受到广泛关注,具有很大的观赏和应用价值。铁线莲除南极洲外,在全球范围内广泛分布,全世界记录铁线莲属植物约15组350余种,主要分布在热带、亚热带,我国有9组140余种(不包括变种)^[2],是该属的主要分布中心之一。国内铁线莲育种工作起步较晚,现在应用的多数品种来自欧洲等国。然而由于价格昂贵、品种数量少,极大影响了铁线莲在中国园林绿化中的应用。

波兰铁线莲品种 *Clematis* 'Julka' ('朱卡') 属早花大花型类群(early large-flowered group),在2002年的荷兰 Plantarimu 植物展会上获银奖。'朱卡' 萼片长6~8 cm,宽4 cm左右,花径可达10~15 cm,紫红色带有深红色条纹。在上海地区4~8月开花。目前由于种苗市场垄断,进口品种价格高,种子繁殖困难,母株少,分株或扦插繁殖受限,难以满足市场需要。因此,研究铁线莲'朱卡'组织培养快繁技术对规模化生产以开拓国内市场具有重要意义。

对铁线莲的组织培养研究,黄鑫^[3]分别以铁线莲'蓝天使'和'紫铃铛'的茎段和叶片为起始材料研究了器官发生两种途径的组织培养方式并建立再生体系。铁线莲'蓝天使'和'紫铃铛'利用不同的NAA和6-BA组合诱导出腋芽和愈伤组织,再经过芽增殖—壮苗—生根和愈伤组织增殖—分化的方法,构建组织培养体系。张丽琼等^[4]对绿花重瓣铁线莲以MS为基本培养基,添加不同浓度2,4-D和6-BA形成愈伤组织;马育珠等^[5]以 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 的幼嫩茎段为起始材料,以MS为基本培养基添加6-BA和IBA形成愈伤组织,但绿花重瓣铁线莲和 *C.* 'Bill MacKenzie' 的后续愈伤组织分化及生根等均鲜见报道。宋微等^[6]铁线莲'波兰精神' (*C.* 'Polish Spirit') 带芽茎段为外植体,直接诱导丛生芽获得完整植株。吴红等^[7]进行了钝齿铁线莲根尖组培再生体系的研究。魏淑云等^[8]以铁线莲'里昂城' (*C.* 'Ville de Lyon') 为材料建立再生体系。近些年对铁线莲组织培养的研究开始增多,利用组织培养技术获得大量铁线莲是快速实现铁线莲推广应用最优的手段之一。

本研究以铁线莲品种'朱卡'的幼嫩茎段为起始材料,进行腋芽诱导—不定芽增殖和愈伤组织诱导—愈伤组织再分化两种途径的研究,旨在建立该品种的组织培养再生体系,为进一步促进铁线莲优良品种的推广和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及培养条件

两年生铁线莲'朱卡',取自上海植物园种苗基地。春季3—4月下旬,取'朱卡'顶端20 cm以内部分,截取带顶芽或腋芽的0.6~1.2 cm茎段作为试验材料。

试验培养温度为(23±2)℃,光照度1500~2500 lx,光周期为16 h/d,相对湿度为60%~80%。

1.2 灭菌处理

对以下试验用品进行高压灭菌锅灭菌:蒸馏水、培养基、带盖三角瓶、镊子、解剖刀、滤纸。准备体积分数75%乙醇、质量分数10%次氯酸钠溶液、酒精灯。

将截取的铁线莲'朱卡'茎段用体积分数2%洗洁精溶液震荡清洗并浸泡20 min,后流水冲洗30 min,置于灭菌的超净工作台中。将植物材料移入灭菌三角瓶中,加入75%乙醇震荡漂洗30 s,再用无菌水漂洗1次,接着用10%次氯酸钠溶液浸泡,设置时间梯度。植物材料接种25 d后,根据污染和诱导情况确认最适合的灭菌方式。每个处理接种13个茎段,重复5次。

1.3 直接器官发生途径

以幼嫩茎段为外植体诱导腋芽,增殖不定芽后生根,形成完整植株。

1)腋芽诱导。①基本培养基的筛选:采用MS、1/2 MS、WPM为基本培养基,添加NAA 0.05 mg/L、6-BA 0.5 mg/L、蔗糖30 g/L和琼脂6.9 g/L。观察并统计25 d后的诱导率。每个处理接种30个茎段,重复5次。②植物生长调节剂的筛选:采用MS为基本培养基,添加植物生长调节剂6-BA和NAA并设置梯度浓度。诱导30 d后,统计腋芽诱导率和芽苗生长状态,并综合确定最佳诱导培养基,每个处理接种21个茎段,重复5次。

2)不定芽增殖。增殖培养基以MS为基本培养基,添加植物生长调节剂6-BA、IBA和GA₃并设置梯度。培养25 d后,比较几种培养条件的增殖系数,观察不定芽的生长和增殖情况,每处理接种9个芽,重复5次。确定最佳不定芽增殖培养基。

1.4 间接器官发生途径

以幼嫩茎段为外植体诱导愈伤组织,愈伤组织再分化形成不定芽且生根后形成完整植株。

1)愈伤组织诱导。①基本培养基的筛选:采用MS、1/2 MS、WPM为基本培养基,添加6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.05 mg/L、蔗糖30 g/L和琼脂6.9

g/L,观察愈伤组织状态,统计25 d后的诱导率,每个处理接种16个茎段,重复3次。②植物生长调节剂的筛选:以MS为基本培养基,添加不同浓度的6-BA和NAA。统计25 d后的诱导率,观察愈伤状态。每个处理7个茎段,重复5次。

2)愈伤组织增殖。以MS为基本培养基,添加蔗糖30 mg/L、琼脂6.9 mg/L,并添加不同浓度的植物生长调节剂6-BA和NAA,统计25 d后的愈伤增殖情况,观察愈伤组织状态。每处理接种7个愈伤组织,重复8次。

3)愈伤组织分化。以MS为基本培养基,添加蔗糖30 mg/L、琼脂6.9 mg/L,并添加不同浓度的植物生长调节剂6-BA、NAA,观察并统计25 d后的愈伤组织分化不定芽数量、不定芽生长情况,综合统计出最佳的不定芽分化培养基。每个处理接种愈伤组织12个,重复6次。

1.5 不定芽生根

以1/2 MS为基本培养基,分别添加植物生长调节剂IBA或NAA并设置梯度,经过25 d生长,对比生根数和根的生长状况,得出最佳的生根培养基。每处理接种4个芽,重复5次。

1.6 数据统计

各评价指标的计算公式如下:

污染率 = 污染数量 / 外植体总数 × 100%;

腋芽诱导率 = 诱导30 d后的萌芽数 / 外植体总数 × 100%;

腋芽增殖率 = 增殖培养25 d后的不定芽数 / 起始接种的腋芽数 × 100%;

出愈率 = 诱导30 d诱导出的愈伤组织数 / 外植体总数 × 100%;

愈伤组织增殖倍数 = 继代培养后愈伤质量 / 继代培养接种时愈伤质量 × 100%;

增殖倍数 = 25 d分化后不定芽数(每颗不定芽至少包含1个节);

生根率 = 生根数 / 接种数 × 100%;

平均根长 = 总根长 / 总根数;

平均根数 = 总根数 / 总生根苗数。

试验数据采用Excel和SPSS软件统计,采用方差分析和多个独立样本非参数检验方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对铁线莲消毒效果的影响

采用10%次氯酸钠溶液对起始材料灭菌,灭菌时长如表1所示,采用多个独立样本非参数检验分析。灭菌时间越长,污染率越低,对应的出芽率

和出愈率均呈现先上升后下降的趋势。灭菌12 min(A2)可以达到比较好的灭菌效果,污染率为14.6%,对应的出芽率和出愈率分别达到41.8%和56.4%。因此,以10%次氯酸钠溶液灭菌12 min(A2)为最佳的灭菌方法。

表1 不同灭菌时间对铁线莲消毒效果的影响

Table 1 Effects of sterilization time on bud induction

编号 No.	灭菌时间/ min sterilizing time	污染率/% rate of contamination	出芽率/% rate of germination	出愈率/% rate of callus induction
A1	6	65.5±6.8 a	7.3±3.6 a	16.4±3.6 a
A2	12	14.6±4.5 ab	41.8±4.5 b	56.4±5.7 b
A3	18	3.6±4.5 b	9.1±5.7 ac	23.6±4.4 ab

注:表中数值为平均值±标准差。同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。Values represent as mean ± SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences among treatments at a 0.05 level. The same below.

2.2 芽诱导基本培养基的筛选

以MS、1/2 MS、WPM为起始诱导基本培养基,均添加NAA 0.05 mg/L和6-BA 0.5 mg/L,采用多个独立样本非参数检验方法,比较不同基本培养基的芽诱导情况,结果如表2所示。当MS为基本培养基时出芽率最高,腋芽生长健康,叶片舒展、叶绿,无黄化、枯萎、玻璃化等不正常的现象,芽生长速度较快。以1/2 MS为基本培养基时,植株矮,叶片小,生长缓慢。以WPM为基本培养基时,出芽率极低,且生长30 d以后观察,植株矮小,叶片逐渐发黄后期枯萎。因此,MS为最适合铁线莲‘朱卡’的基本培养基。

表2 不同基本培养基对铁线莲诱导的影响

Table 2 Effects of different basic medium on bud induction

编号 No.	基本 培养基 medium	出芽率/ % rate of germination	芽苗生长状况 state of shoots growth
B1	MS	35.3±1.6 a	生长健康,无黄化、玻璃化现象
B2	1/2MS	6.0±2.1 b	生长基本健康,较矮小,生长缓慢
B3	WPM	2.0±1.6 b	出芽后生长极缓慢,叶逐渐发黄后期枯萎

2.3 芽诱导植物生长调节剂的筛选

以MS为基本培养基,添加生长素NAA和细胞分裂素6-BA,观察芽生长情况,采用多个独立样本非参数检验方法,比较不同植物生长调节剂下的出芽率,结果如表3所示。

在不含生长素(C4、C7)、不含分裂素(C2、C3)或者完全不含植物生长调节剂(C1)的培养基上,诱导的出芽率均较低,叶片发黄,或生长缓慢。当6-BA增加为1.0 mg/L,腋芽诱导率上升,其中NAA

0.1 mg/L 时,诱导率达到 72.4%;NAA 0.3 mg/L 时,出芽率达到 38.1%,这两种情况下腋芽生长迅速,叶片舒展,无畸形,为最佳的诱导植物生长调节剂浓度配比。但过高的分裂素含量对诱导有抑制作用,且腋芽绿色,生长迅速,没有形成愈伤组织。

表 3 不同植物生长调节剂对铁线莲腋芽诱导的影响

Table 3 Effects of different hormones on bud induction

编号 No.	c(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	c(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	出芽率/% rate of germination	生长状况 state of shoots growth
C1	0	0	0.0±0.0 a	无法诱导
C2	0.1	0	8.6±1.9 abc	腋芽生长慢
C3	0.3	0	12.4±2.3 abc	腋芽生长慢,叶片黄
C4	0	1.0	10.5±1.9 abc	腋芽生长慢,增殖效率差
C5	0.1	1.0	72.4±3.6 d	腋芽长出节间生长点,生长迅速
C6	0.3	1.0	38.1±3.0 c	腋芽长出节间生长点,两侧切口处略有膨胀
C7	0	2.0	5.7±1.9 ab	诱导出芽少
C8	0.1	2.0	11.4±2.3 abc	诱导出芽较少
C9	0.3	2.0	15.2±1.9 bc	两侧切口略膨胀

注:c 为生长调节剂质量浓度。下同。c indicate hormones content. The same below.

表 4 不同植物生长调节剂对铁线莲芽增殖的影响

Table 4 Effects of different hormones on bud proliferation

编号 No.	c(IBA)/ (mg·L ⁻¹)	c(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	c(GA ₃)/ (mg·L ⁻¹)	增殖倍数 rate of multiplication	生长状况 state of shoots growth
D1	0.05	0.5	0	1.16±0.15 a	茎段细,单节略有伸长,丛生芽少,生长速度慢
D2	0.05	1.0	0.1	2.32±0.30 bc	茎段细,生长速度较快,叶片舒展
D3	0.05	2.0	0.2	2.08±0.32 b	生长速度较快,叶片舒展
D4	0.20	0.5	0.1	3.28±0.20 d	茎段粗,单节伸长,丛生芽较少
D5	0.20	1.0	0.2	5.52±0.30 e	茎段粗,单节略有伸长,分节多,且增殖多,生长迅速
D6	0.20	2.0	0	2.36±0.15 bc	茎段细,生长速度差异大
D7	0.40	0.5	0.2	2.04±0.15 b	单节有伸长,部分分节,生长较慢
D8	0.40	1.0	0	2.48±0.20 c	茎段细,分节较多
D9	0.40	2.0	0.1	2.32±0.24 bc	增殖较低,茎段较细,生长速度较快

2.5 愈伤组织诱导基本培养基的筛选

MS、1/2 MS、WPM 作为愈伤组织起始诱导基本培养基,均添加 NAA 0.05 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L,利用多个独立样本非参数检验方法,比较不同基本培养基下的出芽率及芽生长状况,结果如表 5 所示。

3 种培养基条件均可形成愈伤组织。当以 1/2 MS 为基本培养基时,16 d 左右从茎段两侧切口处开始膨胀,形成浅黄色愈伤组织,出愈率为 33.3%。以 MS 为基本培养基,12 d 左右开始形成浅黄色愈伤组织,出愈率为 56.3%。以 WPM 为基本培养基,获得愈伤组织很少,且呈黄色,致密,在后期培养过程中未能分化成芽,因此,最优的基本

2.4 芽增殖生长调节剂的筛选

诱导出的芽转入增殖培养基。以 MS 为基本培养基,添加不同浓度 IBA、6-BA 和 GA₃。利用方差分析的方法比较不同植物生长调节剂条件下不定芽增殖速率,并观察芽生长状况,结果如表 4 所示。

因生长调节剂浓度及配比的不同,增殖倍数、芽生长状况均有差异。增殖过程中采用 3 因素 3 水平中 L₉(3⁴) 正交试验,随着 6-BA 浓度的增加,芽的增殖数出现先增加后略微下降的情况。在浓度较低时,茎段细,单节略微生长,较少出现分节。当添加 6-BA 1.0 mg/L、IBA 0.20 mg/L、GA₃ 0.2 mg/L 时,增殖倍数达到最大,茎段粗壮,分节较多,生长迅速,叶片深绿。因此,几种处理中 D5 为最佳增殖方案,增殖系数达 5.52,且植株健康,即 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.20 mg/L+GA₃ 0.2 mg/L 为最优方案。

培养基为 MS 培养基。

表 5 不同基本培养基对铁线莲愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of different basic mediums on callus induction

编号 No.	基本培养基 basic medium	出愈率/% rate of callus induction	愈伤组织 生长状况 state of callus growth
E1	1/2 MS	33.3±2.9 a	16 d 左右两端切口处开始膨胀,形成浅黄色松软愈伤组织
E2	MS	56.3±5.1 b	12 d 左右两端切口处开始膨胀,形成浅黄色松软愈伤组织
E3	WPM	10.4±2.9 a	愈伤组织黄色,致密

2.6 愈伤诱导植物生长调节剂的筛选

以MS为基本培养基,添加6-BA和NAA两种生长调节剂,形成9种不同的配比。利用多个独立样本非参数检验方法,比较不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织诱导的影响,结果如表6所示。

表6 不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织诱导的影响

Table 6 Effects of different hormones on callus induction

编号 No.	c(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	c(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	出愈率/% rate of callus induction	生长状况 state of callus growth
F1	0	1.0	17.1±5.7 a	量少、淡黄色、疏松
F2	0.05	1.0	22.9±7.0 ab	淡黄色、有突起
F3	0.10	1.0	14.3±0.0 a	愈伤组织长速快、疏松
F4	0	2.0	45.7±5.7 abc	淡黄色、疏松
F5	0.05	2.0	71.4±9.0 bc	淡黄色、疏松
F6	0.10	2.0	40.0±5.7 abc	淡黄色、较致密
F7	0	4.0	77.1±7.0 c	黄色、愈伤组织长速快、 过度致密
F8	0.05	4.0	54.3±5.7 abc	黄色、致密
F9	0.10	4.0	22.9±7.0 ab	黄褐色、过度致密

愈伤组织从11 d开始长出。整体来说,浓度较低的情况下,形成的愈伤组织呈淡黄白色且疏松,有利于后期愈伤组织分化成芽。高浓度的愈伤组织黄色且致密,后期愈伤组织基本无法分化成芽。其中F5、F7两种培养基的出愈率,均超过70%。比较两者的生长状况,其中F5为浅黄色,疏松;F7为黄色,愈伤组织增殖速度快但过于致密,在后期无法分化成芽。因此以F5(6-BA 2.0 mg/L、NAA 0.05 mg/L)为更优的植物生长调节剂配比。

2.7 愈伤组织增殖植物生长调节剂的筛选

不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织增殖的影响见表7。愈伤组织增殖过程中,低浓度愈伤

组织呈浅黄色,增殖极为缓慢,长时间增殖后愈伤组织僵化。高浓度下愈伤组织出现褐化。当6-BA 4.0 mg/L时,愈伤组织从淡黄色转至黄色,硬化,后期愈伤组织无法分化成芽。G4和G5培养基增殖倍数均接近4,两种培养基无显著差异,愈伤组织生长状态好,浅黄色,与诱导出的愈伤组织状态相似。考虑到植物生长调节剂宁低勿高的原则,以NAA 0.2 mg/L、6-BA 2.0 mg/L的G4培养基为愈伤组织增殖最优培养基。

表7 不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织增殖的影响

Table 7 Effects of different hormones on callus multiplication

编号 No.	c(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	c(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	增殖倍数 rate of callus proliferation	生长状况 state of callus growth
G1	0.2	1.0	1.25±0.13 a	增殖很差
G2	0.5	1.0	2.19±0.11 b	淡黄色、疏松
G3	1.0	1.0	2.03±0.10 b	淡黄色、疏松
G4	0.2	2.0	4.09±0.14 f	淡黄色、疏松
G5	0.5	2.0	3.89±0.11 ef	淡黄色、疏松
G6	1.0	2.0	2.63±0.23 c	淡绿色、致密
G7	0.2	4.0	3.35±0.16 d	黄色、致密
G8	0.5	4.0	3.68±0.07 e	黄色、过度致密、硬化
G9	1.0	4.0	3.19±0.17 d	黄褐色、硬化

2.8 愈伤组织分化植物生长调节剂的筛选

将状态较好的愈伤组织转移至分化培养基上,9种分化培养基如表8所示,按照多个独立样本非参数检验方法,比较不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织分化的影响。当6-BA为1.0 mg/L时无法分化成芽;当6-BA为3.0 mg/L时,愈伤组织生长状态发生变化。当NAA 0.03 mg/L时,愈伤组织

表8 不同植物生长调节剂对铁线莲愈伤组织分化的影响

Table 8 Effects of different hormones on callus differentiation

编号 No.	c(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	c(6-BA)/ (mg·L ⁻¹)	分化率/% rate of callus differentiation	不定芽数 number of adventitious buds	分化生长状况 state of callus differentiation
H1	0.01	1.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	愈伤组织不分化
H2	0.03	1.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	愈伤组织不分化
H3	0.05	1.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	愈伤组织不分化
H4	0.01	3.0	19.4±3.9 bc	1.6±0.3 b	愈伤组织少量分化
H5	0.03	3.0	76.7±4.8 d	3.1±0.3 b	愈伤组织黄绿色,分化出1~3个节间的茎段,叶片略小
H6	0.05	3.0	29.2±4.1 c	1.9±0.3 b	愈伤组织黄绿色,可分化茎段
H7	0.01	5.0	15.3±3.1 b	1.3±0.4 b	极少形成不定芽,愈伤组织较致密
H8	0.03	5.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	愈伤组织褐化且不分化
H9	0.05	5.0	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	愈伤组织褐化且不分化

黄绿色,有突起,可分化成芽,芽在经过 15 d 左右生长至 1.5~3.5 cm 的高度,且可分化出 1~3 个节间的茎段,叶片略小,分化率可达 76.7%,平均不定芽为 3.1;而 NAA 增至 0.05 mg/L 时,分化率和不定芽数均下降。因此,最优分化培养基为 6-BA 3.0 mg/L、NAA 0.03 mg/L。

2.9 不定芽生根植物生长调节剂的筛选

以 1/2 MS 为基本培养基,分别添加 IBA 和 NAA 两种生长调节剂,比较不同植物生长调节剂

对铁线莲生根的影响,如表 9 所示。根据根的生长情况、生根数、植株生长状况综合考虑,筛选植物生长调节剂及配比。添加 NAA 无法形成根;添加 IBA 时,从生根率看,I1 和 I2 处理没有显著差异,但生根数有显著差异。当 IBA 0.3 mg/L 时,平均生根数为 4.10,明显高于 IBA 0.1 mg/L 条件下的生根数,且 I1 和 I2 两种情况下根的生长状态没有太大差异,根系粗壮,生长较快,因此,添加 IBA 0.3 mg/L 为更优的生根方案。

表 9 不同植物生长调节剂对铁线莲生根的影响

Table 9 Effects of different hormones on plantlet root development

编号 No.	c(IBA)/ (mg·L ⁻¹)	c(NAA)/ (mg·L ⁻¹)	生根数 number of rooting	生根率/% rate of rooting	生长状况 state of rooting
I1	0.1	0	1.35±0.28 b	90.0±6.9 c	根系发达,生长快,15 d 左右开始长根
I2	0.3	0	4.10±0.42 d	91.7±8.3 c	愈伤组织上生根,15 d 左右开始长根;根粗壮洁白,根系发达,生长快
I3	0.5	0	2.65±0.29 c	60.0±6.9 b	根特别粗壮,极个别出现畸形
I4	0	0.1	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	无生根
I5	0	0.3	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	无生根
I6	0	0.5	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	无生根

3 讨论

组织培养能加速植物种苗繁殖,提高植物产量和品质。德国植物学家 Haberlandt 于 1902 年提出植物细胞全能性(cell totipotency)理论,即植物体的每个细胞都有发育成整个体的潜能^[9]。组织培养是在离体条件下利用人工培养,在无菌情况下培养、生长、发育再生出完整植株的过程^[9]。起始材料选取茎尖分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮组织、胚乳组织等部位^[10]。顶芽或腋芽再生是观赏植物离体再生的主要途径^[11],在铁线莲‘朱卡’组织培养中,选用顶芽和靠近顶端的腋芽部位,该部分细胞分裂旺盛,是组织培养中常用的起始材料。

起始材料的灭菌要求较高,一般表面积越大,越难灭菌。铁线莲表面有细小绒毛,更易附着病原菌,增加了灭菌难度。组织培养的灭菌剂可以选用体积分数 70%~75%乙醇、次氯酸钙、次氯酸钠、过氧化氢、硝酸银、氯化汞等溶液。其中,体积分数 70%~75%乙醇具有较强的杀菌力、穿透力和润湿作用,可以排除材料上的空气以利于其他消毒剂的渗入,因此常常和其他灭菌剂共同使用。本试验使用 75%乙醇结合 10%次氯酸钠溶液对铁线莲‘朱卡’灭菌,不同的灭菌时间对腋芽和愈伤组织诱导率的影响均呈现先上升后下降的趋势,时间过短会

导致灭菌不彻底,外植体污染严重;时间过长会加大灭菌剂对材料的伤害。随后需用灭菌水多次漂洗材料并用滤纸吸收残留水,尽量减少残留灭菌液对外植体的伤害^[12]。

基本培养基在植物组织培养中起到支撑作用,包含了植物生长所需的基本元素。黄鑫^[3]在对铁线莲‘蓝天使’的带芽茎段诱导中,腋芽萌发以 MS 为最适合的基本培养基,而不定芽增殖以 1/2 MS 基本培养基为佳;在对铁线莲‘蓝天使’的愈伤组织诱导和增殖中以 MS 为佳。宋微等^[6]在对铁线莲‘波兰精神’的腋芽诱导中,以 1/2 MS 基本培养基为佳。铁线莲‘朱卡’在芽和愈伤组织的诱导中尝试采用 MS、1/2 MS 和 WPM 基本培养基,均以 MS 基本培养基最佳。由此可见,铁线莲不同品种之间、不同组培阶段对各种元素的需求不同,需要根据培养过程中的表现进行调节。这一结论与板栗品种组织培养的基本培养基相似,对不同树种或者同一树种采用不同的诱导途径,选用的基本培养基有所差异,甚至需要在常用基本培养基上对某些元素含量进行调整^[13]。

植物生长调节剂对细胞生长、组织和器官的分化发育、植物离体培养中的细胞分化和形态建成都具有明显的调节作用^[14]。天然植物生长调节剂包括生长素、细胞分裂素、赤霉素、乙烯和脱落酸。本试验中添加的生长调节剂包括生长素(NAA、IBA)、

细胞分裂素(6-BA)和赤霉素(GA_3)。生长素参与植物根和茎的发育、器官衰老和维管束组织的形成等植物生长分化过程。生长素浓度较低时,导致增殖缓慢,植株长势弱;但生长素浓度过高时,导致叶片和芽苗畸形。在对喜树和红松组培生根的过程中,添加生长素类植物生长调节剂可以形成大量不定根^[15]。黄鑫^[3]在对铁线莲‘蓝天使’诱导生根时添加0.05 mg/L NAA,生根率可以达到70.22%。本试验对铁线莲‘朱卡’的诱导生根中尝试用IBA和NAA两种生长素,只有在添加IBA时可诱导生根。细胞分裂素可以促进细胞分裂扩大,抑制衰老,诱导芽分化和侧芽生长^[12]。在对铁线莲相关研究中应用较多的分裂素包括6-BA、KT、TDZ。在绿花重瓣铁线莲中6-BA更有利于愈伤组织诱导。本试验分裂素6-BA可以起到较好的芽和愈伤组织诱导、增殖的作用。过低的分裂素导致芽或愈伤组织生长缓慢,但过高的分裂素在增殖过程中导致芽增殖过密,芽苗细弱、节间短,个别出现新芽失色转至枯黄现象,可能是因为浓度过高导致顶端分生组织停止分化或细胞坏死所致^[16]。细弱芽苗在后期炼苗过程中影响移栽存活率。

生长素与细胞分裂素常常一起使用,植物生长调节剂的组合效应大于单种植物生长调节剂的效应^[14],生长素与细胞分裂素的比值控制着植物形态建成的发展方向。以茎段为起始材料诱导时,细胞分裂素6-BA和生长素NAA浓度配比不同,诱导出的结果不同。较高浓度6-BA加上较低浓度NAA有利于愈伤组织诱导,铁线莲‘朱卡’在愈伤组织诱导中采用NAA 0.05 mg/L+6-BA 2.0 mg/L的浓度配比,腋芽诱导中采用NAA 0.1 mg/L+6-BA 1.0 mg/L的浓度配比效果最好。这与铁线莲‘蓝天使’诱导结论类似^[17]。浓度过高会影响植株生长发育,引起畸形或褐化等情况。相比较铁线莲‘朱卡’愈伤组织诱导和增殖过程,高浓度细胞分裂素有助于愈伤组织分化,但高浓度NAA抑制愈伤组织分化,因此分化过程中考虑提高细胞分裂素和降低生长素浓度。在铁线莲‘朱卡’分化过程中,提高细胞分裂素6-BA浓度至3.0 mg/L并降低生长素NAA浓度至0.03 mg/L,在此浓度配比下可得到较好的分化率和不定芽数。这与铁线莲‘蓝天使’^[17]和木本油料作物美藤果(*Plukenetia volubilis*)^[18]愈伤组织分化结论一致。

赤霉素对高等植物的各个生长发育阶段,特别是茎段延展^[19-20]、叶片生长^[21-22]等生理过程起到重要的调控作用。赤霉素(GA_3)在马铃薯试管苗

快繁中应用较多。张志军^[23]研究表明,马铃薯在IAA、 GA_3 和BAP 3种植物生长调节剂共同作用下,相比较使用IAA和BAP的处理,其鲜质量和平均直径分别提高409.6%和184.4%,由此证明 GA_3 和IAA在马铃薯块茎形成中互作增强。本试验中,添加 GA_3 后芽苗明显伸长,叶片舒展。铁线莲‘朱卡’不定芽增殖阶段,最佳培养基为MS+IBA 0.20 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+ GA_3 0.2 mg/L。

生根培养时,大多数植物都需要经过愈伤组织诱导分化形成根,这个过程经常需要植物生长调节剂的参与。铁线莲‘朱卡’的芽基部形成颗粒状愈伤组织,并在愈伤组织上生根,属于愈伤型生根。这种生根方式与重瓣榆叶梅^[24]、柑橘等情况相似^[25]。

参考文献(reference):

- [1] 王凯.弱光和盐碱逆境对两种铁线莲生理特性的影响[D].哈尔滨:东北林业大学,2017. WANG K. Effect of weak light and salinity stress on physiological characteristics of two species of *Clematis* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017.
- [2] 闫双喜,王鹏飞,何松林,等.河南铁线莲属植物的观赏特性及开发利用[J].河南科学,2005,23(2):218-220. YAN S X, WANG P F, HE S L, et al. Ornamental characters of plants of *Clematis* L. from Henan and their utilization [J]. Henan Sci, 2005, 23(2): 218-220. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3918.2005.02.018.
- [3] 黄鑫.两个品种铁线莲的组织培养及工厂化生产成本控制研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2018. HUANG X. Studies on the tissue culture and factory propagation on the cost control of two species of *Clematis* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018.
- [4] 张丽琼,常权记,廖咸康,等.绿花重瓣铁线莲愈伤组织诱导研究[J].北方园艺,2010(20):152-154. ZHANG L Q, CHANG Q J, LIAO X K, et al. Inducement of *Clematis florida* var. *plena* Callus [J]. North Hortic, 2010(20): 152-154.
- [5] 马育珠,李林芳,马玲玲,等.铁线莲品种 *Clematis* ‘Bill MacKenzie’ 愈伤组织的诱导[J].北方园艺,2015(24):94-97. MA Y Z, LI L F, MA L L, et al. Callus induction from *Clematis* ‘Bill MacKenzie’ [J]. North Hortic, 2015(24): 94-97. DOI: 10.11937/bfyy.201524027.
- [6] 宋微,张虎,王磊,等.铁线莲‘Polish Spirit’组培快繁体系的建立[J].分子植物育种,2020,18(1):261-267. SONG W, ZHANG H, WANG L, et al. *Clematis* ‘Polish spirit’ establishment of tissue culture and rapid propagation system [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(1): 261-267. DOI: 10.13271/j. mpb. 018.000261.
- [7] 吴红,李成忠,张成霞.钝齿铁线莲根尖组培再生体系的研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2017,32(1):120-124. WU H, LI C Z, ZHANG C X. Establishment of micropropagation system from root tip segment of *Clematis apifoliavar* [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 2017, 32(1): 120-124. DOI: 10.16211/j. issn.1004-390X(n).2017.01.018.
- [8] 魏淑云,陈建华,张荻,等.‘里昂城’铁线莲组培体系的建立[J].上海交通大学学报(农业科学版),2017,35(1):22-28,

33. WEI S Y, CHEN J H, ZHANG D, et al. Establishment of regeneration system of *Clematis* 'Ville de Lyon' [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci), 2017, 35(1): 22-28, 33. DOI: 10.3969/J.ISSN.1671-9964.2017.01.004.
- [9] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2007; 14-24. GONG Z H, SHEN S X. Plant tissue culture [M]. 2nd Ed, Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 14-24.
- [10] 茅汝佳, 高燕. 巴迪亚寿的组织培养及育苗技术[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(3): 477-481. MAO R J, GAO Y. Tissue and seedling technique of *Haworthia mirabilis* var *badia* [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2018, 59(3): 477-481. DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20180337.
- [11] 马燕, 韩瑞超, 臧德奎, 等. 木本观赏植物组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 1956-1958, 2036. MA Y, HAN R C, ZANG D K, et al. Research advances in the tissue culture of woody ornamental plant [J]. J Anhui Agric Sci, 2012, 40(4): 1956-1958, 2036. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2012.04.201.
- [12] 高燕, 张婷, 奉树成. 木本植物的无性繁殖方法[J]. 现代农业科技, 2018(4): 129-130, 132. GAO Y, ZHANG T, FENG S C. Asexual propagation of woody plants [J]. Mod Agric Sci Technol, 2018(4): 129-130, 132.
- [13] 邓小梅, 吴乔娜, 李蕊萍, 等. 壳斗科植物组织培养研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(4): 171-180. DENG X M, WU Q N, LI R P, et al. Research progress on *in vitro* micropropagation of Fagaceae plants [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 2018, 42(4): 171-180.
- [14] 胡蓉. 植物激素在组织培养中的作用[J]. 川北教育学院院刊, 1989(1): 44-47. DOI: 10.13974/j.cnki.51-1645/z.1989.01.012.
- [15] 吉训志, 秦晓威, 胡丽松, 等. 木本植物组织培养[J]. 热带农业科学, 2019, 39(4): 33-40. JI X Z, QIN X W, HU L S, et al. Current research on tissue culture of woody plants [J]. Chin J Trop Agric, 2019, 39(4): 33-40.
- [16] MANDEGARAN Z, SIEBERV K. Somatic embryogenesis in *Clematis integrifolia* × *C. viticella* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2000, 62(2): 163-165. DOI: 10.1023/A:1026514707169.
- [17] 黄鑫, 张彦妮. 铁线莲 'BlekitnyAniol' 组织培养及再生体系建立[J]. 草业科学, 2018, 35(3): 542-550. HUANG X, ZHANG Y N. *In vitro* tissue culture and plant regeneration of *Clematis florida* 'BlekitnyAniol' [J]. Pratacultural Sci, 2018, 35(3): 542-550.
- [18] NAZ S, ALI A, SIDDIQUE A. Somatic embryogenesis and plantlet formation in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245 [J]. Journal of Aapos, 2008, 24(4): 593-598.
- [19] 杨塞, 肖层林. 赤霉素的生物合成及促进水稻茎伸长机理研究进展[J]. 作物研究, 2004, 18(5): 317-320. YANG S, XIAO C L. Research progress of gibberellin biosynthesis and mechanism of promoting rice stem elongation [J]. Crop Res, 2004, 18(5): 317-320. DOI: 10.16848/j.cnki.issn.1001-5280.2004.s1.006.
- [20] RADHA J, SINGH S N, SOLOMON S, et al. Potential regulatory role of gibberellic acid on sprouting and early stalk growth of sugarcane [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(9): 1025-1028.
- [21] JEON H W, CHO J S, PARK E J, et al. Developing xylem-preferential expression of *PdGA20ox1*, a gibberellin 20-oxidase 1 from *Pinus densiflora*, improves woody biomass production in a hybrid poplar [J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(4): 1161-1170. DOI: 10.1111/pbi.12484.
- [22] 郑绪辰, 葛雨萱, 王丽金, 等. 赤霉素、水杨酸、柠檬酸和蔗糖对灰毛黄栌叶色变化的影响[J]. 园艺学报, 2013(11): 2199-2206. ZHENG X C, GE Y X, WANG L J, et al. The effects of several chemicals on leaf color changes of *Cotinus coggygia* var. *cianerea* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013(11): 2199-2206. DOI: 10.3969/j.issn.0513-353X.2013.11.011.
- [23] 张志军. 马铃薯试管薯快繁及其调控机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004. ZHANG Z J. Studies on the microtuber propagation and regulation mechanism in potato [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.
- [24] 张赫岩, 叶冬梅, 白玉娥, 等. 重瓣榆叶梅茎段组织培养体系的建立[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(5): 119-123, 137. ZHANG H Y, YE D M, BAI Y E, et al. Establishment of tissue culture system of stem segment in *Amygdalus triloba* f. *multiplex* [J]. J Central South Univ For Technol, 2019, 39(5): 119-123, 137. DOI: 10.14067/j.cnki.1673-923x.2019.05.017.
- [25] 董玉玲, 陈茂盛, 王秀兰, 等. 木本油料作物美藤果组织培养植株再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 462-470. DONG Y L, CHEN M S, WANG X L, et al. Establishment of *in vitro* regeneration system of woody oil crop *Plukenetia volubilis* [J]. Mol Plant Breed, 2016, 14(2): 462-470. DOI: 10.13271/j.mph.014.000462.

(责任编辑 李燕文)