

杨利平,陈乃明,王鹏良,等. 铁线莲 Inspiration 组培继代培养基的筛选与优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(14):83-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.14.013

铁线莲 Inspiration 组培继代培养基的筛选与优化

杨利平¹, 陈乃明¹, 王鹏良², 陈丽文¹, 杨 琼¹, 李芳菲¹, 何贵整¹

(1. 钦州市林业科学研究所, 广西钦州 535099; 2. 北部湾大学, 广西钦州 535011)

摘要:以三年生铁线莲 Inspiration 当年萌发的新芽为外植体获得无菌芽,从 MS 营养成分及植物生长调节剂 2 个方面探究最适宜铁线莲 Inspiration 继代增殖的培养基组成。结果表明,大量元素对继代培养的影响最大,铁盐次之,微量元素影响最小,铁元素浓度低于 MS 全量时,铁线莲 Inspiration 继代苗叶片发黄,继代培养基营养成分最优组合为 1/2 大量元素 + 1/4 微量元素 + 1/3 有机物 + 3/2 铁盐;6-BA 与 NAA 间存在互作关系,浓度比值在 3~6 之间时,丛生芽的增殖效果最好,增殖系数在 2.5 以上,经筛选优化,最优激素配比组合为 6-BA 0.4 mg/L + NAA 0.1 mg/L。最优营养元素和最优激素的组合可使得铁线莲 Inspiration 继代增殖系数达到 2.76。

关键词:铁线莲 Inspiration;继代培养;筛选;优化

中图分类号:S687.304+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)14-0083-04

铁线莲为毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属(*Clematis* L.)植物,是一种观赏价值高、抗逆性强的藤本花卉,该物种共有 300 余种原生种,广泛分布于各大洲,其中以北半球的亚热带和温带地区为多^[1-3];我国有近 50% 原生种,分布范围北至吉林省,南至云南省^[4]。该物种花大叶美,主要用于庭院绿化和园林造景,被誉为“攀缘植物皇后”,另外根和全草可供药用,根具有通经络、解毒、祛瘀之效,可治疗痛风和虫蛇咬伤,具有重要的药用价值。

铁线莲品种 Inspiration 的花瓣呈深粉红色,轮转形排列,雄蕊呈黄色,花色美丽,花期较长,非常适合依托针叶和落叶灌木生长,是一个理想的盆栽品种。铁线莲属植物存在结实少,种子发芽率低,栽培品种大多为杂交种,种子繁殖无法保证其品种的特性^[5],分株繁殖速度较慢等特点;通常铁线莲繁殖方式以扦插繁殖为主,但扦插繁殖系数较低,且不易生根,品种易退化^[6-7]。这就导致了种苗不够充足,无法满足市场需求。

目前,花卉企业的铁线莲属植物多以进口为主,且苗木价格普遍偏高^[8-9]。因此建立铁线莲的

组培快繁技术体系可有效解决以上种苗繁育过程中存在的问题。目前相关文献对铁线莲组培体系的建立主要通过愈伤组织实现,容易造成突变^[4,8],但极少采用以芽繁芽方式,采用以芽繁芽方式获得的苗木能较好地保持品种的稳定性。本研究首先采用腋芽为外植体获得无菌芽,进而进行继代培养基营养成分和激素配比的筛选及优化,旨在提高铁线莲 Inspiration 的繁殖效率,为该品种产业化提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以三年生的铁线莲 Inspiration 植株为材料,以其当年生带芽茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌芽的获得 春季晴天从三年生铁线莲品种 Inspiration 健壮无病虫害的当年新生枝条上剪取带芽茎段,去除叶片,并将茎段剪成 8~10 cm 长度,放入容器内用洗洁精水溶液浸泡 5 min,用软毛牙刷刷洗后,用清水清洗 5~6 次,沥干后,置超净台上备用。将表面清洗过的外植体用 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 7~12 min 后,用灭菌水清洗 5~6 次,在超净台上切成 2 cm 左右的茎段,每个茎段保留 1~2 个腋芽,将处理后的茎段接种到继代培养基上,为防止交叉污染,每瓶培养基接种 1 条茎段,培养基选用未添加任何激素的 MS 培养基,待萌出新芽后,转至 MS + 0.5 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA) +

收稿日期:2019-07-29

基金项目:钦州市科学研究与技术开发计划(编号:201616802)。

作者简介:杨利平(1984—),女,河南许昌人,硕士,高级工程师,主要从事花卉的种苗繁育及栽培技术研究。E-mail:278291930@qq.com。

通信作者:何贵整,高级工程师,主要从事林木、花卉的育种、育苗及栽培产业化技术研究。E-mail:13807776795@163.com。

0.05 mg/L 萘乙酸 (NAA) 的培养基上进行增殖培养。

1.2.2 增殖培养基营养成分的筛选 试验选用 MS 培养基为基本培养基,大量元素 (D)、微量元素 (W)、有机成分 (Y)、铁盐 (F) 为试验因子,进行四因素三水平的正交试验,忽略因子间交互作用,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计,各因子水平及浓度配比见表 1、表 2,培养基附加:蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L,6-BA 0.5 mg/L,NAA 0.05 mg/L,培养基 pH 值为 5.8~6.0。每个处理 5 瓶,每瓶接种 5 株外植体,3 个重复。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验的因子及水平

水平	D	W	Y	F
A1	1/3	1/4	1/4	1/2
A2	1/2	1/3	1/3	1
A3	1	1/2	1/2	3/2

注:表中数据为试验用培养基中的元素浓度与 MS 培养基中元素浓度的比值。表 2 同。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验 MS 培养基成分浓度配比

培养基	D	W	Y	F
M1	1/3	1/4	1/4	1/2
M2	1/3	1/3	1/3	1
M3	1/3	1/2	1/2	3/2
M4	1/2	1/4	1/3	3/2
M5	1/2	1/3	1/2	1/2
M6	1/2	1/2	1/4	1
M7	1	1/4	1/2	1
M8	1	1/3	1/4	3/2
M9	1	1/2	1/3	1/2

1.2.3 组培继代苗激素组合的优化 本试验采用二因素完全随机设计,选用“1.2.2”节中获得的最优营养元素组合培养基,将长势基本一致的不定芽从基部切下,接种于添加不同浓度 6-BA (0.20、0.40、0.60 mg/L) 和 NAA (0.05、0.10、0.20 mg/L) 的培养基中,每个处理接种 5 瓶,每瓶接种 5 个芽,4 个重复。

1.2.4 培养条件 培养条件:温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 60%~70%,光照度 1 500~2 000 lx,光照时间 $12\text{ h/d}^{[10]}$ 。

1.2.5 数据统计与分析 试验过程中每 1 周观察 1 次芽诱导情况,继代苗接种 4 周后观察并记录数据。增殖系数 = 增殖后不定芽总数/接种的不定芽总数。采用高级版 DPSv17.10 对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 无菌芽的获得

将铁线莲 Inspiration 外植体消毒后接种至培养基上,7 d 后腋芽开始萌动 (图 1),培养至 14 d 时大部分茎段的腋芽已萌动。待腋芽逐渐伸长至 3~5 cm 后,去除顶端优势,转至增殖培养基上,培养 28 d 左右形成丛生芽 (图 2)。试验过程中发现,虽在培养室中培养,但冬季 Inspiration 的增殖效果较春、夏、秋季依然略低,这可能与铁线莲属多年生草本植物在自然条件下冬季落叶有关。



图1 铁线莲 Inspiration 腋芽开始萌动

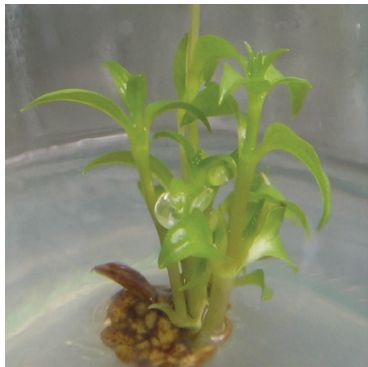


图2 铁线莲 Inspiration 丛生芽

2.2 MS 培养基营养成分的差异比较

由表 3 可见,在正交试验的试验组合中,MS 培养基中大量元素及铁盐浓度对铁线莲 Inspiration 继代增殖存在影响, P 值均小于 0.01,达到极显著性水平,这说明 MS 培养基的大量元素和铁盐对铁线莲品种 Inspiration 的生长有极显著影响,而微量元素及有机物浓度影响则不显著。从表 4 可以看出,大量元素浓度为基础 MS 培养基的 1/2 时,铁线莲 Inspiration 继代增殖效果最佳,增殖系数达到 2.33,且与 1/3 浓度水平差异极显著;而铁盐浓度为培养基浓度的 3/2 时对铁线莲 Inspiration 继代增殖的效果最好。

表 3 正交设计方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
D	1.105 4	2	0.552 7	7.864 3	0.003 5
W	0.098 9	2	0.049 4	0.703 6	0.507 9
Y	0.105 9	2	0.053 0	0.753 5	0.485 0
F	1.032 8	2	0.516 4	7.347 6	0.004 6
误差	1.265 1	18	0.070 3		
总和	3.608 1				

表 4 LSD 法对大量元素与铁盐的多重比较

变异来源	水平	增殖系数
D	1/3	1.84B
	1/2	2.33A
	1	2.16AB
F	1/2	1.96B
	1	1.98B
	3/2	2.39A

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。表 5、表 7 同。

表 5 继代微型芽条培育的极差分析

培养基	因素				增殖系数	生长状况
	D	W	Y	F		
M1	1	1	1	1	1.70C	芽弱,叶色偏黄,舒张不佳
M2	1	2	2	2	1.76BC	芽健壮,叶色绿,舒展
M3	1	3	3	3	2.07BC	芽健壮,叶色浓绿,舒展
M4	2	1	2	3	2.74A	芽健壮,叶色浓绿、舒张
M5	2	2	3	1	2.16ABC	丛生芽叶色偏黄、舒张
M6	2	3	1	2	2.07BC	芽健壮,叶色绿、舒展
M7	3	1	3	2	2.12BC	芽健壮,叶色绿、舒展
M8	3	2	1	3	2.33AB	芽健壮,叶色浓绿、舒展
M9	3	3	2	1	2.03BC	丛生芽叶色偏黄,舒张
R_{\max}	2.331	2.197	2.188	2.389		
R_{\min}	1.843	2.057	2.034	1.963		
R	0.488	0.140	0.153	0.426		
最优水平	D ₂	W ₁	Y ₂	F ₃		
影响主次	D>F>Y>W					

注:极差 R 为增殖系数的直观分析。

2.3 不同激素水平对铁线莲 Inspiration 继代增殖影响的差异比较

双因素方差分析结果(表 6)显示,6-BA 浓度(A 因素)、NAA 浓度(B 因素)对铁线莲 Inspiration 继代增殖系数均产生显著影响,且 6-BA 和 NAA 之间存在显著互作关系。随着 6-BA 浓度增加,增殖系数有增加的趋势(表 7),但当 6-BA 浓度达到 0.6 mg/L 时,丛生芽虽多但细弱,不利于后续生根

由表 5 分析可知,繁殖系数在不同组合间差异较大,繁殖系数最高为 2.74,最低为 1.70,二者差异极显著;由极差 R 值的大小顺序可知,4 个因子的主次顺序为 D>F>Y>W,即大量元素对铁线莲 Inspiration 的继代增殖影响最大,铁盐次之,微量元素影响最小。铁盐浓度低于基本 MS 培养基时,导致铁线莲 Inspiration 继代苗叶色偏黄。综上所述,培养基营养成分最优组合为 D₂W₁Y₂F₃,即 1/2 大量元素+1/4 微量元素+1/3 有机物+3/2 铁盐。

从表 5 还可以看出,大量元素浓度降低至基础 MS 培养基的 1/3 时,铁线莲 Inspiration 继代增殖系数明显降低,且与 1/2 浓度和全量浓度水平产生较大差异,说明大量元素在铁线莲 Inspiration 继代增殖过程中起关键作用。微量元素及有机物浓度在 1/4~1/2 之间变化时,铁线莲 Inspiration 继代增殖系数变化未表现出明显规律性。同时,表 5 中反映出随着铁盐浓度的升高,增殖系数有增加的趋势。

表 6 方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A 因素	0.323 0	2	0.161 5	15.034	0.000 1
B 因素	0.231 9	2	0.115 9	10.793	0.000 8
A×B	0.163 7	4	0.040 9	3.810	0.020 5
误差	0.193 3	18	0.010 7		
总变异	0.911 9	26			

注: $P<0.01$ 表示极显著。

表 7 不同浓度 6-BA 和 NAA 对丛生芽诱导的影响

试验号	浓度 (mg/L)		增殖系数	生长状况
	6-BA	NAA		
1	0.20	0.05	2.21D	芽叶色绿、舒展
2	0.20	0.10	2.20D	芽健壮,叶色绿、舒展
3	0.20	0.20	2.33BCD	芽健壮,叶色绿、舒展
4	0.40	0.05	2.30BCD	芽叶色绿、舒展
5	0.40	0.10	2.76A	芽健壮,叶舒展,叶色绿
6	0.40	0.20	2.51ABC	芽健壮,叶舒展欠佳,叶色绿
7	0.60	0.05	2.47BCD	芽细弱,叶色浅,舒展欠佳
8	0.60	0.10	2.52ABC	芽细弱,叶色浅、舒展欠佳
9	0.60	0.20	2.63AB	芽细弱,叶色浅、舒展欠佳

诱导。6-BA 与 NAA 浓度比值在 3~6 之间时,丛生芽的增殖效果最好,增殖系数在 2.5 以上。综合对比不同激素配比下丛生芽的增殖系数及生长状况发现,最优激素配比组合为 6-BA 0.4 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

3 结论与讨论

目前对铁线莲组培体系的建立主要通过愈伤组织实现^[4,6],铁线莲组培苗增殖系数因品种差异在 2.0~4.18 间浮动^[8-9,11]。本研究从 MS 营养成分及植物生长调节剂 2 个方面探究了最适宜铁线莲 Inspiration 继代增殖的培养基组成,结果表明,培养基营养成分影响继代苗增殖系数及长势,其中大量元素的影响最大,铁盐次之,微量元素影响最小;植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 存在互作关系,随着 6-BA 浓度的增加,继代增殖系数有增加趋势,但当 6-BA 浓度浓度到达 0.6 mg/L 时,丛生芽细弱,不利于后续培养。本研究筛选并优化出了最适宜铁线莲 Inspiration 继代增殖的培养基,为 1/2 大量元素 + 1/4 微量元素 + 1/3 有机物 + 3/2 铁盐的改良 MS 培养基并添加 0.4 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA,该组合下增殖系数可达到 2.76,且丛生芽长势健壮。

本研究发现,铁线莲 Inspiration 对铁元素的需求量较大,铁盐浓度低导致铁线莲 Inspiration 继代苗叶片发黄,当铁盐浓度达到 MS 全量浓度的 1~3/2 时,这种情况会明显改善。这可能与铁元素参与叶绿素生物合成有关,铁元素虽然不是叶绿素的组成成分,但影响光能吸收和光合电子传递,是多种酶的组成成分,因此,叶绿素合成过程中必须有铁元素^[12]。报道显示,在多种植物必需矿物元素中,铁是需求量最大的,它在多种生化反应中起重

要作用^[13]。虽然在一定程度上组培育苗较传统繁殖方式更容易控制环境条件,但在研究过程中发现,铁线莲 Inspiration 在培养室中冬季的长势不及春、夏、秋季,冬季的增殖系数较低,且叶的长势欠佳,这可能与铁线莲属多年生草本植物在自然条件下冬季落叶有关。

参考文献:

[1] 巫建新,王 磊. 铁线莲品种物候期调查及分析[J]. 江苏林业科技,2013,40(2):23-25.

[2] 吴 荣. 铁线莲里昂城的组织培养研究[J]. 现代农业科技,2013(17):186,188.

[3] 管开云,李志坚,李景秀,等. 铁线莲属植物的引种栽培研究初报[J]. 云南植物研究,2002,24(3):392-397.

[4] 吴 荣,樊国盛,王 锦,等. 铁线莲愈伤组织及不定芽诱导试验[J]. 广东农业科学,2014,41(9):48-50,封3.

[5] 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.

[6] 黄 婧,张 敏,周 鹏,等. 铁线莲“Avant-Garde”组织培养及快速繁殖试验[J]. 江苏林业科技,2018,45(2):21-24.

[7] 杨璧嘉,吴玉兰,保智娟,等. 粗齿铁线莲扦插繁育条件初探[J]. 湖北农业科学,2014,53(7):1579-1582.

[8] 张启香,方炎明,吕 梅,等. 铁线莲‘Multi-Blue’不定芽及体细胞胚发生的初步研究[J]. 园艺学报,2007,34(2):465-468.

[9] 王 非,成 璐. 褐毛铁线莲茎段诱导丛生芽的研究[J]. 北方园艺,2014(7):86-90.

[10] 徐玲玲,丁朵朵,陶贵荣,等. 不同光照强度和光质对铁线莲品种繁星(Clematis ‘Nelly Moser’)不定芽诱导和生长的影响[J]. 光子学报,2013,42(6):715-720.

[11] 袁 佳,胡恒康,方炎明,等. 不同培养条件对铁线莲不定芽增殖及玻璃化的影响[J]. 西北植物学报,2011,31(2):401-406.

[12] 周晓今,陈茹梅,范云六. 植物对铁元素吸收、运输和储存的分子机制[J]. 作物研究,2012,26(5):605-610.

[13] 杨 进,靳杏子. 切花月季营养元素缺乏或过剩现象及其胜利意义[J]. 北方园艺,2014(2):191-195.