

# 铁线莲‘Utopia’无菌外植体的建立

王 磊, 史 俊, 周余华, 李祖祥

(江苏农林职业技术学院 园林系, 江苏 句容 212400)

**摘 要:**以 *Clematis* ‘Utopia’ 为材料, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 设外植体(A: 分别为叶片、带一对侧芽茎段和不带侧芽茎段)、消毒时间(B: 消毒时间分别为 3、5、7 min)和培养基(C: 分别为培养基: MS+0.75 TDZ+0.1 NAA、MS+0.75 TDZ+1.0 2,4-D 和 MS+0.5 TDZ+1.0 2,4-D)3 因素, 每因素设 3 个水平。外植体经表面消毒后, 接种在 MS 琼脂培养基中, 于  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 2 000 lx 光照培养, 25 d 后统计成活率。结果表明: 最优水平组合为  $A_1B_1C_2$ 。

**关键词:**‘Utopia’; 外植体; 正交设计

**中图分类号:** Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)05-0156-02

铁线莲属(*Clematis*)植物野生资源丰富, 在全世界约有 300 余种, 我国约有 110 种, 栽培品种更是多达数百种以上, 花型变化多, 花朵色彩艳丽, 具有极高的观赏价值<sup>[1]</sup>。铁线莲除了拥有吸引人的花朵外, 许多品种的果球还颇具观赏性, 这些为改善景观效果提供了无尽的美化空间。近年来, 由于城市空间的日益拥挤, 垂直绿化越来越受到人们的重视, 作为为数不多且开花大而艳丽的藤本铁线莲属植物的应用价值越来越受到人们的青睐, 有关铁线莲应用研究的文章也在不断增多<sup>[2-4]</sup>, 为加快铁线莲属植物在园林上的应用, 满足市场需求, 对其繁殖应用方面的研究仍需广泛进行。

*Clematis* ‘Utopia’ 是由波兰引进的一个著名的铁线莲属栽培品种, 有较高的观赏价值, 其有性繁殖较困难且难以保持母本的优良性状。

组织培养是建立在无菌操作基础之上的专门技术, 因此, 在进行植物组织培养时, 必须选择合适的外植体并进行有效的灭菌和接种, 才能确保组织培养工作的顺利进行<sup>[5]</sup>。正交设计是一种高效、快速的多因素试验方法<sup>[6]</sup>。现以‘Utopia’为研究对象, 采用正交设计法, 探索获得组织培养中有效无菌材料的途径和方法, 为进一步研究和生产提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

铁线莲(*Clematis* ‘Utopia’)取自河北农林职业技术学院园林系试验园。

第一作者简介: 王磊(1963-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事园林植物教学与引种研究工作。

基金项目: 镇江农业计划资助项目(NY2008046)。

收稿日期: 2009-12-22

### 1.2 试验方法

剪取当年生枝条幼嫩部分, 分别以枝条上的幼叶、带芽茎段和不带芽茎段为外植体材料, 洗涤剂刷洗干净, 流水冲洗 2 h 后, 将幼叶、带芽茎段和不带芽茎段分别装入无菌瓶, 带入无菌工作室, 在超净工作台上, 用 70%酒精浸润 10 s, 无菌水冲洗 1 次, 用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 对外植体进行表面消毒, 并为每种外植体设置 3、5、7 min 的消毒时间梯度, 消毒后无菌水冲洗 4 次, 然后分别接种在含有不同的激素种类和水平的 MS 琼脂培养基中(含 7 g/L 琼脂, 30 g/L 蔗糖, pH 5.8), 于  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 2 000 lx 光照培养, 25 d 后统计成活率(褐化及污染材料不计在内)。采用 3 因素 3 水平试验, 正交表选用  $L_9(3^4)$ <sup>[7]</sup> (见表 1)。

表 1 正交试验  $L_9(3^4)$  设计

水平	因 素		
	外植体(A)	消毒时间(B)/min	培养基配比(C)/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	幼叶	3	MS+0.75 TDZ+0.1 NAA
2	带芽茎段	5	MS+0.75 TDZ+1.0 2,4-D
3	不带芽茎段	7	MS+0.5 TDZ+1.0 2,4-D

## 2 结果与分析

采用  $L_9(3^4)$  正交设计进行铁线莲外植体的无菌培养, 结果见表 2。

表 2 正交设计  $L_9(3^4)$  试验结果

处理	接种外植体数	无菌外植体数	无菌率/%
1(A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> )	40	27	67.50
2(A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> )	40	26	65.00
3(A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> )	40	27	67.50
4(A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> )	40	25	62.50
5(A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> )	40	21	52.50
6(A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> )	40	16	40.00
7(A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> )	40	20	50.00
8(A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> )	40	15	37.50
9(A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> )	40	26	65.00

### 2.1 试验结果的直观分析

因素内水平极差( $R$ )的大小,说明该因素对试验结果的影响程度(表3)。参试三因素对‘Utopia’无菌外植体影响的主次关系是  $A > B$  且  $C > B$ ,说明外植体种类和培养基的种类同样重要,其次是消毒时间。根据各因素水平均值( $K_i$ )的大小,可得最优水平组合为:  $A_1 B_1 C_2$ 。

表3  $L_9(3^4)$ 试验结果的直观分析

因素水平	因素		
	A	B	C
$K_1$	66.67	60.00	48.33
$K_2$	51.67	51.67	64.17
$K_3$	50.83	57.50	56.67
$R$	15.84	8.33	15.84

### 2.2 试验结果的方差分析

用SPSS 11.5统计软件对试验结果进行方差分析,从表4可知,3种外植体间的  $F=3.147, P=0.241 > 0.05$ , 3种消毒时间的  $F=0.725, P=0.580 > 0.05$ , 3种培养基间的  $F=2.486, P=0.287 > 0.05$ ,表明3个因素对无菌率的影响都不显著。

综合直观分析与方差分析结果可知,在‘Utopia’组培中,为了迅速获得无菌外植体,应当首选用  $A_1$ (叶片)为试材,消毒时间  $B_1$ 的长短以3 min最佳,培养基  $C_2$ 为最佳。为了快速获得更多的无菌外植体,  $A, B, C$ 三因素的最佳水平组合为:  $A_1 B_1 C_2$ ,即:以叶片为外植体,用0.1%  $HgCl_2$ 消毒3 min,培养基  $MS+0.75 mg/L TDZ+1.0 mg/L 2,4-D$ 。

表4  $L_9(3^4)$ 试验结果的方差分析

变异来源	SS	DF	MS	F	P
A	476.389	2	238.194	3.147	0.241
B	109.722	2	54.861	0.725	0.580
C	376.389	2	188.194	2.486	0.287
误差	151.389	2	75.694		
总变异	1113.889	8			

## 3 讨论

在植物组织培养中,外植体接种是组培的前提条

件。外植体接种成功与否,主要取决于外植体的选取和消毒时间。该试验发现,‘Utopia’的外植体用0.1%升汞消毒处理试验发现,所选取的外植体不同,适宜的消毒时间也不同。消毒时间长短对叶片污染率影响不大,但消毒时间7 min叶片变褐最少;对于带节茎段消毒时间对组织变褐影响较小,但随着消毒时间的延长污染率反而增加,消毒3 min污染率最低;而对于不带节茎段随着消毒时间的延长变褐增加,污染率减少。因此,在‘Utopia’组培中,应当首选叶片为外植体建立无性系,消毒时间为3 min,培养基  $MS+0.75 TDZ+1.0 2,4-D$ 为最佳培养基,最佳组合为  $A_1 B_1 C_2$ 。但研究也发现用叶片作为外植体形成愈伤组织转化时间较长,繁殖系数高;用带侧芽外植体诱导后,侧芽萌发直接形成幼苗,转化时间短但繁殖系数低。

该试验采用正交设计的方法,仅用较少的试验组合,通过统计学分析,明确了‘Utopia’建立无菌苗体系的关键因素,同时优化筛选了建立无菌苗体系的最佳条件,大大提高了试验效率,有效获得了‘Utopia’愈伤组织和侧芽的大量无菌外植体,已经用于诱导其脱分化和再分化。为‘Utopia’无性系建立及基因转化奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 龙雅宜.“攀缘植物皇后”铁线莲[J].中国花卉盆景,2002(6):4-6
- [2] 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):392-396.
- [3] 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.
- [4] 张启香,仲磊,方炎明,等.外源激素对铁线莲扦插生根的效应研究[J].北方园艺,2007(1):101-103.
- [5] 徐石,陆秀君,李天来.天女木兰组织培养中有效获得无菌外植体的研究[J].西北林学院学报,2008,23(3):127-129.
- [6] 张文彤.SPSS11统计分析教程[M].北京:北京希望电子出版社,2002:21-24.
- [7] 盖钧镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000:382.

## Studies on Getting Bacteria-free Explants of ‘Utopia’ by Applying Orthogonal Design

WANG Lei, SHI Jun, ZHOU Yu-hua, LI Zu-xiang

(Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400)

**Abstract:** The Clematis ‘Utopia’ was used as test material, test method was orthogonal design  $L_9(3^4)$ . Three factors were explants(A), sterilizing times (B) and culture medium (C). Explants were leaves stem with axillary buds and stem without axillary buds. Sterilizing times were 3 min, 5 min and 7 min. Culture medium were  $MS+0.75 TDZ+0.1 NAA$ ,  $MS+0.75 TDZ+1.0 2,4-D$  and  $MS+0.5 TDZ+1.0 2,4-D$ . Explants were inoculated on MS base medium (supplied with 7 g/L agar and 30 g/L sucrose, pH 5.8) after them were sterilized, and cultured under  $(25 \pm 1) ^\circ C$  and 2 000 lx conditions, then the explants were compiled surviving rate after cultured 25 days. The results showed that the best level combination was  $A_1 B_1 C_2$ .

**Key words:** ‘Utopia’; explants; orthogonal design