

DOI:10.11937/bfyy.201524027

铁线莲品种 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 愈伤组织的诱导

马育珠, 李林芳, 马玲玲, 王淑安, 汪庆, 李亚

(江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014)

摘要:以铁线莲 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 优良单株的嫩茎为外植体, 研究了不同灭菌时间、基本培养基类型对 *C. 'Bill MacKenzie'* 愈伤组织诱导的影响, 并在初代愈伤诱导的基础上, 研究了不同外源激素组合对 *C. 'Bill MacKenzie'* 愈伤组织诱导及状态的影响。结果表明:最佳的灭菌时间为 12 min; 基本培养基类型为 MS, 诱导率为 68.4%; 不同的外源激素组合均能诱导出愈伤, 但是愈伤状态不同, 其中 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 时愈伤状态最好。

关键词:铁线莲; 茎段; 愈伤; 诱导

中图分类号:S 682.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0094-04

铁线莲(*Clematis*)属毛茛科(Ranunculaceae)多年生的木质或草质藤本, 观赏价值高, 抗逆性强, 少数为直立灌木^[1]。铁线莲属的栽培品种花大色艳, 花色丰富, 花型多变, 花期长, 观赏价值高, 且园艺用途广泛, 是非常优良的垂直绿化材料, 具有“藤本皇后”的美称^[2]。铁线

莲品种 *Clematis* 'Bill MacKenzie' 属于西藏型铁线莲品种群, 为非常罕见的黄花品种之一。花单瓣, 钟型, 下垂, 黄色, 较大, 直径 6~7 cm。萼片 4, 较宽、厚、肉质, 先端锐尖、翻卷。花丝红棕色、花药棕色。宿存花柱被长柔毛、丝质, 长约 5 cm, 园艺用途广泛。

铁线莲虽然可以扦插繁殖, 但由于对繁殖材料要求高, 导致合适的插穗稀缺, 繁殖基数小、周期长, 且生长不整齐, 往往不能满足研究及大规模推广应用的需, 从而导致市面上铁线莲苗木价格居高不下的现状^[3-5], 而组培苗生产规模大、周期短且生长整齐, 能够较好的解决这一问题。

张徐俞等^[6]对天台铁线莲(*C. patens* ssp. *tiantensis*)

第一作者简介:马育珠(1989-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。E-mail: myz133@163.com.

责任作者:李亚(1969-), 男, 安徽颍上人, 博士, 研究员, 现主要从事观赏植物等研究工作。E-mail: yalicnbg@aliyun.com.

基金项目:江苏省中国科学院植物研究所青年基金资助项目(SQ201301)。

收稿日期:2015-08-19

Effect of SAMDC Gene on *Salvia splendens* Collateral Development

ZHI Liting¹, HONG Peipei², CHEN Hongwei², MA Hongyan¹, ZHANG Haiming¹

(1. Technology Industry Group, Beijing Agricultural University, Beijing 102206; 2. College of Landscape, Beijing Agricultural University, Beijing 102206)

Abstract: Taking *Salvia splendens* 35 and 35-1 as materials, using real-time fluorescence quantitative PCR technology to analysis the S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene relative expression in 35 and 35-1 of different parts and developmental stages. The results showed that in seedling stage, before and after axillary buds formed SAMDC relative expression in 35 was lower than that in 35-1. In vegetative stem, root tips and lateral buds were higher than in 35-1. Difference was significant. It was speculated that SAMDC high expression in seedling bud could promote plant cell division and differentiation to formation lateral bud. In vegetative growth stage, low expression could promote branch and elongation branches growth. This study would help to explore the effect of SAMDC gene in *Salvia splendens* 35 and 35-1 collateral development and built a foundation of *Salvia splendens* morphogenesis studies.

Keywords: *Salvia splendens*; SAMDC; lateral branch; real-time fluorescent quantitative PCR

进行了愈伤组织诱导,发现诱导嫩茎产生愈伤组织的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA;类似的研究还有 C. ‘Gipsy Queen’ 茎节和茎段最适合诱导愈伤组织的培养基为 MS+0.01 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA^[7],诱导率可达 50.0%;东北铁线莲不带芽茎段的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,诱导率为 80.77%^[8]等。

现以铁线莲品种 C. ‘Bill MacKenzie’ 优良单株的嫩茎为外植体,研究了不同的灭菌时间、基本培养基类型和外源激素组合对 C. ‘Bill MacKenzie’ 愈伤组织诱导的影响,以期为进一步建立铁线莲再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用发育正常、生长健壮、无病虫害的 C. ‘Bill MacKenzie’ 的幼嫩茎段为试验材料。所有材料取自江苏省中国科学院植物研究所铁线莲种质资源圃。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 剪取 C. ‘Bill MacKenzie’ 一年生幼嫩枝条,去除叶片,剪成 3~4 cm 长小段,浸泡在含有 2 滴 Tween、0.2%PVP、0.5%多菌灵(含有效成分 50%的可湿性粉剂)浊液中,摇床震荡 1 h,随后用流动自来水冲洗 30 min 以上。在超净工作台上,用 75%乙醇消毒 45 s,无菌水冲洗 2 次,0.1%升汞消毒,无菌水冲洗 6 次,滤纸吸干水分。将茎段接触升汞的两端切去 0.2~0.4 cm,最终切成长 2 cm 左右的茎段。

1.2.2 升汞灭菌时间筛选 设置 5 个升汞(0.1%)处理时间梯度,分别为 5、8、10、12、15 min。将经处理的茎段接入 MS+0.1 mg/L NAA 培养基 15 d 左右,观察其污染率、褐化率,确定最佳灭菌时间。

1.2.3 愈伤组织诱导培养基对愈伤诱导的影响 选择 MS、1/2MS、WPM、B5 4 种基本培养基,并在每种培养基中均加入 1.0 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L NAA。每处理 20 瓶,重复 3 次。30 d 统计褐化率、诱导率及愈伤状态。

1.2.4 不同外源激素和浓度组合对愈伤状态的影响 MS+2.0 mg/L 6-BA 为初代诱导愈伤培养基。将得到的愈伤转接到 MS 培养基上,采用 1.0 mg/L 6-BA、TDZ、ZT 与 IBA(0.2、0.4 mg/L)、NAA(0.2、0.4 mg/L)、2,4-D(0.2、0.4 mg/L)、IAA(0.2、0.4 mg/L)共 24 个处理(表 1)。每处理接 20 瓶,重复 3 次。15 d 继代 1 次,30 d 和 50 d 后分别观察记录其愈伤状态。

1.2.5 培养条件 试验所用培养基中均添加蔗糖 3%、凝胶 0.25%、PVP 1 500 mg/L、pH 5.80~6.00。培养温度(25±1)℃左右,光照强度 2 000~3 000 lx,光照时间 12 h/d。

表 1 24 种不同外源激素和浓度组合

Table 1 24 combinations of exogenous hormones with different concentrations mg/L

处理 Treatment	6-BA	TDZ	ZT	NAA	IBA	2,4-D	IAA
Y1	1	0	0	0.2			
Y2	1	0	0	0.4			
Y3	1	0	0		0.2		
Y4	1	0	0		0.4		
Y5	1	0	0			0.2	
Y6	1	0	0			0.4	
Y7	1	0	0				0.2
Y8	1	0	0				0.4
Y9	0	1	0	0.2			
Y10	0	1	0	0.4			
Y11	0	1	0		0.2		
Y12	0	1	0		0.4		
Y13	0	1	0			0.2	
Y14	0	1	0			0.4	
Y15	0	1	0				0.2
Y16	0	1	0				0.4
Y17	0	0	1	0.2			
Y18	0	0	1	0.4			
Y19	0	0	1		0.2		
Y20	0	0	1		0.4		
Y21	0	0	1			0.2	
Y22	0	0	1			0.4	
Y23	0	0	1				0.2
Y24	0	0	1				0.4

1.3 项目测定

愈伤诱导率(%)=形成愈伤组织的外植体个数/外植体总数×100;污染率(%)=污染的外植体数/接种的外植体数目×100;褐化率(%)=褐化的外植体数目/未污染的外植体数目×100。

1.4 数据分析

试验数据使用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 进行分析和分析。

2 结果与分析

2.1 升汞灭菌时间的筛选

由表 2 可知,不同升汞灭菌时间对外植体的污染率和褐化率的影响较大,处理时间与外植体的污染率和褐化率之间均存在极显著差异。升汞处理 5 min 的外植体污染率最高,褐化率最低,分别为 95.0%和 12.5%。升汞处理 8 min 的外植体的污染率较 5 min 略有减少,但是褐化率明显增加;升汞处理 12 min 的外植体与升汞处理 8、10 min 相比,污染率明显降低至 21.2%,但褐化率增加至 36.8%。升汞处理 15 min 的外植体,污染率最低为 17.2%,褐化率明显升高至 72.3%。

2.2 基本培养基种类对愈伤组织诱导的影响

MS、1/2MS、WPM、B5 4 种基本培养基对 C. ‘Bill MacKenzie’ 茎段诱导率和褐化率均存在极显著差异(表 3)。MS 较其它培养基对愈伤组织的培养效果最好,在

表 2 升汞处理时间对外植体状态的影响

Table 2 The effect of treatment time of HgCl₂ on the states of explants

灭菌时间 Treatment time/min	污染率 Polluted rate/%	褐化率 Browning rate/%
5	95.0±0.5E	12.5±0.1A
8	90.3±0.1D	28.8±0.1B
10	43.2±0.1C	33.3±0.1C
12	21.2±0.1B	36.8±0.1D
15	17.2±0.1A	72.3±0.1E

注:数值为平均数±平均标准误差;同列数据中不同字母表示存在极显著差异($P<0.01$)。下同。

Note: The results represent the mean ± standard error of the mean (SEM); different letters in the same line show highly significant difference at 0.01 level. The same below.

表 3 不同基本培养基对愈伤诱导的影响

Table 3 The effect of different basic mediums on the callus induction

培养基类型 Basic mediums types	褐化率 Browning rate/%	诱导率 Induction rate/%	愈伤状态 Callus status	生长势 Growth potential
1/2MS	11.7±0.0C	58.8±0.0C	黄绿色偏白,松软	+++
MS	10.5±0.0B	68.4±0.0D	绿色,紧实	+++++
B5	13.3±0.0D	33.3±0.0B	黄绿色,较紧实	+++
WPM	9.5±0.0A	23.8±0.0A	黄绿色,松软	++

注:“+”表示生长状况,数量越多表示生长情况越好。

Note: “+” indicates the growth status, the more “+” indicate the better growth situation.

该培养基上,愈伤为绿色,长势快,愈伤组织诱导率高,质量好。因此,后续试验均采用 MS 基本培养基。

2.3 不同外源激素和浓度组合对愈伤状态的影响

表 4 表明,30 d 时,含有 6-BA 的组合可形成较紧实的愈伤;含有 IAA 或 IBA 的激素组合中可出现绿色愈伤;Y3、Y4 为 6-BA 和 IBA 组合,绿色愈伤长势快,愈伤量较大;Y7、Y8 为 6-BA 和 IAA 组合,也出现较紧实的绿色愈伤,但长势一般,愈伤量较小;Y15、Y16 为 TDZ 和 IAA 组合,淡绿色愈伤长势一般且质地松软;Y19、Y20 为 ZT 和 IBA 组合,也出现淡绿色愈伤。50 d 时,含有 2,4-D 的组合诱导的愈伤依然为白色、松软,其它组合诱导出不同程度的绿色愈伤,说明 2,4-D 不适用于 C. ‘Bill MacKenzie’愈伤的诱导;6-BA 和 IBA 组合愈伤状态最佳,Y4 即 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 愈伤状态最好(图 1)。

3 结论与讨论

目前国内外关于铁线莲属组培方面的研究较少,关于铁线莲组培中污染和褐化方面的研究更是鲜有报道。污染和褐化都是植物组培中的难题^[9]。升汞是组织培养中极为常用且效果较好的灭菌消毒剂。如果灭菌处

表 4 不同外源激素组合对愈伤状态的影响

Table 4 The effect of different combinations of exogenous hormone on the callus status

处理 Treatment	愈伤状态 Callus state	
	30 d	50 d
Y1	长势一般,白色,松软	长势较快,黄绿色,较紧实,褐化
Y2	长势一般,白色,松软	长势较快,黄绿色,较紧实,褐化
Y3	长势快,绿色,较紧实	长势较快,深绿色,紧实
Y4	长势快,绿色,较紧实	长势快,深绿色,紧实
Y5	长势慢,白色,松软	长势较快,白色,松软
Y6	长势慢,白色,松软	长势一般,白色,松软
Y7	长势较慢,绿色,较紧实	长势一般,黄绿色,较紧实,略褐化
Y8	长势一般,浅绿,较紧实	长势一般,黄绿色,较紧实,略褐化
Y9	长势慢,白色,松软	长势快,黄绿色,较紧实,褐化
Y10	长势慢,白色,松软	长势快,黄绿色,松软,褐化
Y11	长势慢,白色,松软	长势快,黄绿色,松软,褐化
Y12	长势慢,白色,松软	长势快,黄绿色,松软,褐化
Y13	长势慢,白色,松软	长势一般,白色,松软,褐化
Y14	长势慢,白色,松软	长势一般,白色,松软,褐化
Y15	长势一般,淡绿色,松软	长势一般,黄绿色,较紧实,略褐化
Y16	长势一般,淡绿色,松软	长势一般,黄绿色,较紧实,略褐化
Y17	长势一般,白色,松软	长势快,黄绿色,松软
Y18	长势一般,白色,松软	长势一般,黄绿色,松软
Y19	长势快,淡绿色,松软	长势快,黄绿色,松软,略褐化
Y20	长势快,淡绿色,松软	长势快,黄绿色,松软,略褐化
Y21	长势慢,白色,松软	长势一般,白色,松软,褐化
Y22	长势慢,白色,松软	长势一般,白色,松软,褐化
Y23	长势快,白色,松软	长势好,黄绿色,松软
Y24	长势好,白色,松软	长势好,黄绿色,松软

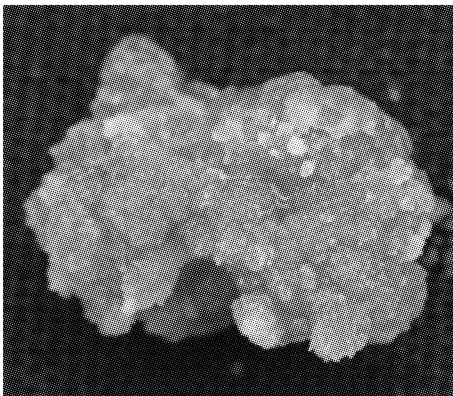


图 1 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 培养基诱导 50 d 时的愈伤

Fig. 1 Callus formation from explants on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA and 0.4 mg/L IBA of 50 days

理时间过短则不能彻底消毒,即抑制、降解嫩茎本身携带的病原菌的作用不明显,外植体污染率就会很高;处理时间过长则会加重对外植体的伤害,导致酚类化合物的分泌,释放或合成酚类氧化酶,特定条件下形成醌类物质,导致外植体褐化,而且使褐色物质扩散到培养基中,危害外植体^[10-13]。因而,筛选出适合的灭菌时间非常必要。该研究表明,最佳的升汞灭菌时间为 12 min,此时的污染率为 21.2%,褐化率为 36.8%。

不同基本培养基对外植体愈伤诱导率及褐化率的影响显著,主要是由于氮源的影响^[14]。有研究表明^[15],还原态 NH_4^+ 不能被硝态氮(NO_3^-)所代替,有利于细胞脱分化形成愈伤组织,当基本培养基中还还原态 NH_4^+ 和硝态氮(NO_3^-)比例合适时,就有利于愈伤组织的形成。该研究表明,MS 为 C. 'Bill MacKenzie' 最适基本培养基,诱导率最高为 68.4%,表明 C. 'Bill MacKenzie' 可能需要的 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比较高。

植物外源激素是组织培养中的关键因素,不同外源激素及浓度的组合在愈伤组织培养中起着极为重要的调节作用。该研究表明 2,4-D 不适用于 C. 'Bill MacKenzie' 愈伤的诱导,与 TAN 等^[16]关于香草兰愈伤诱导的研究相同,但与张涛等^[17]、周琼等^[18]在绿花重瓣铁线莲(*C. florida* 'Plena')上的研究结果相反。6-BA 组合比 TDZ 或 ZT 组合的愈伤状态好,说明 6-BA 的组合更有利于 C. 'Bill MacKenzie' 愈伤的诱导。6-BA 和 IBA 组合愈伤状态最佳,其中 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA 愈伤状态最好。

(本文作者还有王鹏、杨如同,单位同第一作者。)

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,2000:208-209.
- [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] 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.
- [4] 吴荣,林萍,樊国盛,等. 铁线莲 'Gispy Queen' 组织培养与快速繁殖[J]. 亚热带植物科学,2011,40(2):69.
- [5] 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.
- [6] 张徐俞,蒋明,陈彤,等. 天台铁线莲愈伤组织诱导研究[J]. 江西农业科学,2011,39(3):65-66.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 华智锐,李小玲. 激素和蔗糖浓度组合对蕨菜愈伤组织诱导的影响[J]. 江西农业学报,2015,27(2):41-44.
- [10] 张志敏,张颖颖,谢寅峰,等. 青钱柳愈伤组织诱导[J]. 东北林业大学学报,2011,39(9):8-10.
- [11] 马玲玲,王鹏,王淑安,等. 取材时间和激素对“豫楸 1 号”腋芽诱导的影响[J]. 北方园艺,2014(13):84-87.
- [12] WILLIAMS H G, DAVIDSON G W, MAMO J C. Heat-induced activation of polyphenoloxidase in western rock lobster (*Panulirus cygnus*) hemolymph: implications for heat processing[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(6):1928-1932.
- [13] 代小梅,孙振元,韩蕾. 草地早熟禾愈伤组织诱导及柠檬酸对其褐化的抑制效应[J]. 核农学报,2015,29(2):270-277.
- [14] 李琰,王冬梅,姜在民,等. 培养基及培养条件对杜仲愈伤组织生长及次生代谢产物含量的影响[J]. 西北植物学报,2004,24(10):1912-1916.
- [15] 郭勇,崔堂兵,谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [16] TAN B C, CHIN C F, ALDERSON P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 105(3):457-463.
- [17] 张涛,周琼,张丽琼,等. 重瓣铁线莲愈伤组织诱导研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(22):9402-9542.
- [18] 周琼,张丽琼,屈国胜,等. 重瓣铁线莲组织培养研究[J]. 陕西农业科学,2008(5):92-93.

Callus Induction From *Clematis* 'Bill MacKenzie'

MA Yuzhu, LI Linfang, MA Lingling, WANG Shu'an, WANG Qing, LI Ya, WANG Peng, YANG Rutong
(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: Experiment was carried out by using tender stem segments from *Clematis* 'Bill MacKenzie' as explants to evaluate effect of sterilization time and types of basic culture medium on callus induction; based on the primary callus, effect on callus induction and their status under different combinations of exogenous hormones callus were also investigated. The results showed that the best sterilization time was 12 minutes. The basic medium was MS with 68.4% induction rate. All combinations of exogenous hormones could induced callus with different status, the best status was induced with the medium of MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA.

Keywords: *Clematis*; stem segments; callus; induction