

红籽鸢尾高频离体再生条件的初步筛选

张永侠¹, 原海燕², 顾春笋², 黄苏珍^{2,①}

[1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 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]

Preliminary selection of high frequency *in vitro* regeneration condition of *Iris foetidissima* ZHANG Yongxia¹, YUAN Haiyan², GU Chunsun², HUANG Suzhen^{2,①} (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(1): 116-118

Abstract: Taking stem tips of *Iris foetidissima* Linn. as explants, effect of different phytohormone combinations on its callus and adventitious bud inductions and effect of different basic media and mass concentrations of NAA on rooting were studied, the high frequency *in vitro* regeneration condition of *I. foetidissima* was selected preliminarily. Results show that the optimum callus induction medium of *I. foetidissima* is MS medium containing $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, its callus induction rate is high to 77.27%. The optimum adventitious bud induction medium is MS medium added with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, with adventitious bud induction rate of 72.22%. The optimum rooting medium is MS medium added with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, its rooting rate reaches to 100.00%. The survival rate of plantlets after transplanted is also high with a value of above 95%.

关键词: 红籽鸢尾; 离体培养; 再生条件

Key words: *Iris foetidissima* Linn.; *in vitro* culture; regeneration condition

中图分类号: Q943.1; S682.1⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)01-0116-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.01.20

红籽鸢尾(*Iris foetidissima* Linn.)为鸢尾科(Iridaceae)鸢尾属(*Iris* Linn.)多年生草本植物,原产于西欧和非洲北部。该种的叶鞘呈深绿色剑形,蒴果饱满且蒴果成熟开裂后露出红、橙黄和白等不同色泽的种子并一直垂挂到翌年春天,集观花、观叶和观果为一体,观赏价值较高。另外,该种还具有耐寒性好、在长江中下游地区四季常绿、适应性强及耐粗放管理等优点,是一种优良的常绿地被植物。

鸢尾属植物通常以种子和分株方式进行繁殖,繁殖率较低,难以满足生产需求^[1-3]。虽然红籽鸢尾的结实率相对较高,但由于种子休眠期较长且休眠时间不等,使其发芽率低、出苗不整齐,自然繁殖系数仅为5~8,极大地限制了该种的推广和应用。

组织培养方法是解决鸢尾属植物快速繁殖的有效途径之一^[4-6],但关于红籽鸢尾的组织培养研究还未见报道。作者以红籽鸢尾茎尖为外植体,对其愈伤组织和不定芽诱导以及生根培养基中的适宜激素组合进行筛选,初步建立红籽鸢尾的高效再生体系,为其种苗的规模化生产、推广应用以及转基因育种等工作奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试红籽鸢尾于2010年引自法国,现定植于江苏省·中国科学院植物研究所鸢尾属植物种质圃。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 红籽鸢尾植株用清水冲洗,去掉根和叶,保留2 cm茎尖作为外植体。将外植体置于体积分数10%洗涤液中浸泡10~15 min,流水冲洗干净后吸干表面水分;在无菌超净工作台上用体积分数75%乙醇浸泡45 s后,经无菌水浸泡并冲洗2次;再用质量体积分数0.1% HgCl₂消毒10~12 min,无菌水再次冲洗5次,最后用无菌滤纸吸干表面水分,备用。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基筛选 将已灭菌的外植体切成2 mm×2 mm×2 mm的小块,分别接种于6组含不同质量浓度2,4-D和6-BA的MS培养基(含30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8)中,并置于温度(25±2)℃、光照时间12 h·d⁻¹、

收稿日期: 2013-07-08

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2012349)

作者简介: 张永侠(1987—),女,安徽阜阳人,硕士,主要从事观赏植物遗传育种研究。

①通信作者 E-mail: hsz1959@163.com

光照度 3 000 lx 的条件下进行愈伤组织诱导培养。其中,2,4-D 质量浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg · L⁻¹,6-BA 质量浓度分别为 0.1、0.2 和 0.3 mg · L⁻¹。每处理 5 瓶,每瓶接种 6 个外植体,并设置 3 次重复。每天观察并记录在不同培养基上愈伤组织的诱导状况,30 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导率=(诱导愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100%。

1.2.3 不定芽诱导培养基筛选 在筛选出的最适愈伤组织诱导培养基上继代培养 2~3 次后,将长势良好且一致的愈伤组织接种到 5 组含有不同质量浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基(含有 30 g · L⁻¹蔗糖和 6 g · L⁻¹琼脂,pH 5.8)上,并置于温度(25±2)℃、光照时间 12 h · d⁻¹、光照度 3 000 lx 条件下进行不定芽诱导培养。6-BA 质量浓度分别为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg · L⁻¹,NAA 质量浓度分别为 0.2、0.3 和 0.5 mg · L⁻¹。每处理 5 瓶,每瓶接种 6 块愈伤组织,并设置 3 次重复。每天观察并记录在不同培养基上不定芽诱导以及愈伤组织褐化状况,30 d 后统计不定芽诱导率及愈伤组织褐化率。不定芽诱导率=(诱导出不定芽的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100%;愈伤组织褐化率=(褐化的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100%。

1.2.4 生根培养基筛选 选择高 3~5 cm 且长势健壮的不定芽分别转接于含 0.2、0.5、1.0 和 1.5 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 和 1/2MS 培养基(含 30 g · L⁻¹蔗糖和 6 g · L⁻¹琼脂,pH 5.8)上,并于温度(25±2)℃、光照时间 12 h · d⁻¹、光照度 3 000 lx 的条件下进行生根培养。每处理 3 瓶,每瓶接种 10 个不定芽,并设置 3 次重复。每天观察并记录不同培养基上不定芽的生根状况,30 d 后统计不定芽的生根率;同时,观察并统计根的颜色、数量和长度,并根据组培苗生长状况和叶的发黄枯萎程度对组培苗长势进行分级(分为 I 级、II 级、III 级和 IV 级)。生根率=(生根的不定芽数/接种的不定芽数)×100%。

1.2.5 炼苗与移栽 将生根的组培苗放在室内炼苗 2~3 d,然后置于温室内炼苗 2~3 d;选取生长健壮的植株,洗净根部培养基,移栽到装有栽培基质[V(田土):V(泥炭):V(珍珠岩):V(河沙)=2:1:1:1]的穴盘里,浇透水并置于温室内培养。每天定时喷水,5 周后统计组培苗成活率。成活率=(成活植株数/移栽植株数)×100%。

1.3 数据统计与分析

使用 EXCEL 2007 统计分析软件对实验数据进行整理,并采用 SPSS 19.0 统计分析软件对相关数据进行方差分析和 Duncan's 多重比较。

2 结果和分析

2.1 不同激素组合对愈伤组织诱导的影响

实验过程中,红籽鸢尾茎尖外植体接种在愈伤组织诱导培养基上 7 d 后出现膨大现象,10 d 后陆续有淡绿色或黄色愈

伤组织出现。表 1 结果表明:在添加 1.5 mg · L⁻¹2,4-D 和 0.1 mg · L⁻¹6-BA 的 MS 培养基上,红籽鸢尾愈伤组织诱导率最高,达到 77.27%,与其他 5 组培养基差异显著(P<0.05),愈伤组织的生长状况也最好,呈淡绿色或黄色且生长旺盛。

表 1 在添加不同激素组合的培养基上红籽鸢尾茎尖愈伤组织诱导状况比较($\bar{X}\pm SD$)

Table 1 Comparison on callus induction status from stem tip of *Iris foetidissima* Linn. on media added with different phytohormone combinations ($\bar{X}\pm SD$)

激素添加量/mg · L ⁻¹ Adding amount of phytohormone		诱导率/% ¹⁾ Induction rate ¹⁾	生长状况 ²⁾ Growth status ²⁾
2,4-D	6-BA		
0.5	0.1	32.40±5.67c	-
1.0	0.1	58.23±4.97b	+
1.5	0.1	77.27±3.93a	++
1.5	0.2	62.73±1.43b	+
2.0	0.1	60.63±7.55b	+
2.5	0.3	58.40±5.86b	+

1) 同列不同的小写字母表示差异显著(P<0.05) Different small letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05).

2) -: 大量愈伤组织褐化 Much callus browning; +: 愈伤组织淡绿色或黄色,少量褐化 Light green or yellow callus and a little callus browning; ++: 愈伤组织淡绿色或黄色,生长旺盛 Light green or yellow callus and grows well.

2.2 不同激素组合对不定芽诱导的影响

实验过程中,红籽鸢尾的愈伤组织在转接到不定芽诱导培养基上 10 d 左右开始变绿,21 d 左右出现绿色芽点,28 d 后可看到明显的不定芽。表 2 结果表明:除添加 0.5 mg · L⁻¹6-BA 和 0.2 mg · L⁻¹NAA 的培养基外,其余 4 组培养基上不定芽的诱导率都很高,均在 68% 以上,最高达到 75.56%;愈伤组织褐化率却较低,均低于 15%;并且这 4 组培养基上不定芽的诱导率和愈伤组织的褐化率与前者均差异显著(P<0.05),但这 4 组培养基 2 个指标间的差异不显著。从表 2 还可见:培养基中 6-BA 添加量低于 1.0 mg · L⁻¹时,不定芽长势健壮;而 6-BA 添加量高于 1.0 mg · L⁻¹时,红籽鸢尾不定芽生长细密且长势较弱。另外,在 6-BA 添加量为 1.0 mg · L⁻¹时,添加

表 2 在添加不同激素组合的培养基上红籽鸢尾不定芽诱导率及愈伤组织褐化率比较($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

Table 2 Comparison on induction rate of adventitious bud and browning rate of callus of *Iris foetidissima* Linn. on media added with different phytohormone combinations ($\bar{X}\pm SD$)¹⁾

激素添加量/mg · L ⁻¹ Adding amount of phytohormone		不定芽诱导率/% Induction rate of adventitious bud	愈伤组织褐化率/% Browning rate of callus
6-BA	NAA		
0.5	0.2	30.00±6.67b	25.55±6.94a
1.0	0.2	72.22±8.39a	11.11±1.92b
1.0	0.3	68.89±10.18a	14.44±5.09b
1.5	0.3	73.33±8.82a	12.22±1.92b
2.0	0.5	75.56±11.71a	10.00±3.33b

1) 同列不同的小写字母表示差异显著(P<0.05) Different small letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05).

0.2 或 0.3 mg · L⁻¹ NAA, 不定芽诱导率差异不显著。

2.3 基本培养基类型和 NAA 添加量对不定芽生根的影响

由统计结果(表3)可见,不论是以 MS 还是 1/2MS 为基本培养基,随着 NAA 添加量的提高,红籽鸢尾不定芽的生根率和生根质量均逐渐下降。NAA 添加量较高(1.0 ~ 1.5 mg · L⁻¹)

时,不定芽上萌出的不定根短小、数量多且较细密,对组培苗的生长有一定的影响;当 NAA 添加量为 0.2 mg · L⁻¹ 时,不定芽的生根率显著高于其他处理组,生根数为 3 ~ 6 条,且根系粗壮。在 NAA 添加量相同的条件下,以 MS 为基本培养基,组培苗的生长状况优于以 1/2MS 为基本培养基。

表3 基本培养基类型及 NAA 添加量对红籽鸢尾不定芽生根的影响($\bar{X} \pm SD$)

Table 3 Effect of basic medium type and NAA adding amount on rooting of adventitious bud of *Iris foetidissima* Linn. ($\bar{X} \pm SD$)

基本培养基类型 Basic medium type	NAA 添加量/mg · L ⁻¹ NAA adding amount	生根率/% ¹⁾ Rooting rate ¹⁾	根特征 Root character			组培苗长势 ²⁾ Growth vigor of tissue culture seedling ²⁾
			颜色 Color	数量 Number	长度/cm Length	
MS	0.2	100.00±0.00a	白色 White	3-6	2.0	I
	0.5	79.43±5.08c	白色 White	1-3	0.5	I
	1.0	62.13±5.25d	黄色 Yellow	5-15	0.2	II
	1.5	53.53±3.75e	黄色 Yellow	5-15	0.2	III
1/2MS	0.2	89.23±2.68b	白色 White	3-6	1.5	III
	0.5	55.90±5.05de	白色 White	1-4	0.5	III
	1.0	42.70±6.70e	黄色 Yellow	5-15	0.2	IV
	1.5	10.17±1.67g	黄色 Yellow	5-15	0.2	IV

¹⁾ 同列不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

²⁾ I: 生长旺盛,叶色深绿 Grows well with dark green leaves; II: 生长正常,10% ~ 20% 的叶片发黄干枯 Grows normally with 10% ~ 20% leaves browning and dried; III: 生长弱,30% ~ 40% 的叶片发黄干枯 Grows weakly with 30% ~ 40% leaves browning and dried; IV: 生长弱,50% ~ 60% 的叶片发黄干枯 Grows weakly with 50% ~ 60% leaves browning and dried.

2.4 组培苗的成活率统计

统计结果表明,经培养室和温室炼苗后,移栽到栽培基质中的红籽鸢尾组培苗的成活率较高,均达到 95% 以上。

3 讨论和结论

研究表明:在 MS 培养基中添加 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA 和 1.5 mg · L⁻¹ 2,4-D 对红籽鸢尾茎尖愈伤组织的诱导效果最好,诱导率达 77.27%;并且愈伤组织的生长状况也最好,呈淡绿色或黄色且生长旺盛。综合考虑不定芽诱导率、愈伤组织褐化率及培养成本,确定红籽鸢尾茎尖不定芽诱导的最适培养基为添加 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 和 0.2 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 培养基,诱导率为 72.22%;最适生根培养基为添加 0.2 mg · L⁻¹ NAA 的 MS 培养基,生根率达 100.00%。

与其他研究者^[2-3]有关鸢尾属植物组织培养的研究结果相比,作者筛选出的红籽鸢尾茎尖愈伤组织诱导培养基的诱导率较高,这可能与外植体不同有关。实验结果表明:6-BA 添加量为 1.0 ~ 2.0 mg · L⁻¹,红籽鸢尾茎尖不定芽诱导率都很高,均在 68% 以上;但当 6-BA 添加量高于 1.0 mg · L⁻¹ 时,不定芽诱导率虽未明显下降,但不定芽生长不良。鸢尾属植物的组培苗生根相对比较容易,作者筛选出的红籽鸢尾组培苗的生根培养基配方与毕晓颖等^[6]的筛选结果明显不同,但与

徐立军等^[7]的研究结果相似,表明鸢尾属不同种类适宜的生根培养基有一定差异。

参考文献:

- [1] BOLTENKOV E V, MIRONOVA L N, ZAREMBO E V. Effect of phytohormones on plant regeneration in callus culture of *Iris ensata* Thunb. [J]. Biology Bulletin, 2007, 34(5): 446-450.
- [2] 吴月燕,毛军平,周倩倩. 路易斯鸢尾组织培养过程中愈伤组织的诱导和芽的分化[J]. 浙江农业科学, 2009(1): 86-89.
- [3] 王文元,王文和,周文强,等. 花菖蒲类鸢尾组培愈伤组织诱导及芽的分化研究[J]. 北方园艺, 2012(21): 92-94.
- [4] BOLTENKOV E V, ZAREMBO E V. *In vitro* regeneration and callogenesis in tissue culture of floral organs of the genus *Iris* (Iridaceae) [J]. Biology Bulletin, 2005, 32(2): 138-142.
- [5] ISHMURATOVA M M, RAKHIMOVA A F. The use of *in vitro* culture for propagation of the *Iris* L. hybrids [J]. Rastitel' Nye Resursy, 1999, 35(4): 74-78.
- [6] 毕晓颖,陈晨,郑阳,等. 野鸢尾的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(10): 1007.
- [7] 徐立军,管耀义,张建佐. 有鬣鸢尾“爱抚”的组培快繁研究[J]. 河北林业科技, 2005(4): 79.

(责任编辑: 佟金凤)