

白芨无菌小苗一步成苗培养基优化

邹 晖,李海明,王伟英,戴艺民,林江波

(福建省农业科学院 亚热带农业研究所,福建 漳州 363005)

摘要:为提高白芨组织培养效率,以白芨种子播种的无菌小苗为外植体,利用正交设计法研究了培养基中 6-BA(A)、NAA(B)、香蕉泥(C)和马铃薯提取液(D)4 种因素对株高和假鳞茎粒径的影响。结果表明:4 个因素对株高影响的主次关系为 $B>A>D>C$,对假鳞茎粒径影响的主次关系为 $A>D>B>C$;无菌小苗一步成苗的最佳培养基配方是 $1/2\ MS+1.0\ mg\cdot L^{-1}\ 6-BA+1.0\ mg\cdot L^{-1}\ NAA+50\ g\cdot L^{-1}$ 香蕉泥。

关键词:白芨;组织培养;正交实验

白芨(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f) 是兰科白芨属多年生草本植物,别名地螺丝、连及草和刀口药等,主要分布云南、贵州、安徽等地。白芨花色艳丽,花型优雅,叶态美观,观赏价值高,可用作景观植物。白芨的干燥块茎可以药用,中国药典记载,具有收敛止血,消肿生肌的功能,主要用于治疗咯血、吐血、外伤出血、疮疡肿毒和皮肤皲裂等症^[1]。

白芨种子非常细小,胚发育不全,自然环境下种子萌发需与真菌共生^[2],繁殖困难,由于过度的采挖导致野生资源稀少,濒临灭绝,已被列为国家重点保护野生药用植物之一^[3]。白芨通常采用分株繁殖,繁殖速度慢,无法满足大面积栽培的种苗需求,组织培养技术,可以在短期内生产大量种苗,解决白芨种植种苗缺乏的问题。

白芨 1 个果荚含有上万粒种子,种子组织培养是短时间获得大量种苗的有效途径。白芨种子在无菌萌发的培养基优化、萌发特性等方面已经开展了大量研究,种子萌发率可达 98%^[4-6]。本研究以白芨种子组培播种的无菌小苗为材料,利用正交试验方法研究不同的激素浓度及有机附加物对白芨苗高和假鳞茎形成的影响,旨在探讨利用白芨种子组培播种的无菌小苗一步成苗的组培快繁方法,缩短培养周期,节约培养成本,短期快速提供优质组培苗,为大面积栽培奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为紫花白芨种子,由福建连天福生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌小苗的获得 将未开裂白芨果荚用自来水冲洗干净,在超净工作台上用 0.1% 的 $HgCl_2$ 消毒 8 min。然后用手术刀纵向切开,用镊子夹住蒴果,把种子撒在萌发培养基($1/2\ MS+10\%\ 马铃薯提取液+30\ g\cdot L^{-1}$ 蔗糖+ $6\ g\cdot L^{-1}$ 琼脂粉, pH5.5) 表面,培养 60 d,待种子萌发,长成高约 1 cm 的小苗,进行下一步试验。培养温度 $25\sim 28\ ^\circ C$,光照强度 3 000 lx,每天光照 12 h,下同。

1.2.2 一步成苗法培养基筛选 采用 4 因素 3 水平正交设计法 $L_9(3^4)$ 研究 6-BA、NAA、香蕉泥和马铃薯提取液对株高和假鳞茎粒径的影响(表 1)。选取长势一致、高约 1 cm 的无菌苗,接入不同组合的培养基,每个处理 3 次重复,每个重复接 20 瓶,每瓶接 10 株。培养 90 d 后统计株高和假鳞茎粒径。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

Table 1 The orthogonal design $L_9(3^4)$ factors and levels

水平 Levels	因素 Factors			
	A 6-BA/ ($mg\cdot L^{-1}$)	B NAA/ ($mg\cdot L^{-1}$)	C 香蕉泥/ ($g\cdot L^{-1}$) Mashed banana	D 马铃薯提取液/ ($g\cdot L^{-1}$) Potato extract
1	0	0	0	0
2	0.5	0.5	50	50
3	1.0	1.0	100	100

收稿日期:2018-02-02

基金项目:福建省属公益类科研院所基本科研专项资助项目(2016R1012-8)。

第一作者简介:邹晖(1982-),男,学士,研究实习员,从事植物组织培养研究。E-mail:21880338@qq.com。

通讯作者:林江波(1976-),男,硕士,副研究员,从事农业生物技术研究。E-mail:345953257@qq.com。

1.2.3 数据分析 利用 DPS v7.05^[7] 进行正交试验的方差分析,差异显著性的多重比较采用新复极差法(Duncan 法)。

2 结果与分析

2.1 不同培养基成分对株高的影响

高约 1 cm 的无菌小苗在不同组合的培养基中培养 90 d,株高的平均值在 1.71~4.88 cm,试验结果采用极差方法进行分析(表 2),由 R 值大小可以得出,4 个因素对白芨无菌苗株高影响的主次关系为 B>A>D>C。这说明 NAA 对白芨株高起主要影响,其次是 6-BA、马铃薯提取液,香蕉泥对株高的影响最小。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 The orthogonal design and the experiment result

处理 Treatments	因素 Factors				株高/cm Plant height	粒径/mm Particle size
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	1.71	0.98
2	1	2	2	2	4.88	1.03
3	1	3	3	3	4.39	0.98
4	2	1	2	3	2.01	1.03
5	2	2	3	1	3.10	4.72
6	2	3	1	2	3.41	4.89
7	3	1	3	2	1.86	4.11
8	3	2	1	3	3.18	3.79
9	3	3	2	1	3.32	6.34
R(株高)	0.87	1.86	0.63	0.67		
R(粒径)	3.75	2.03	0.46	2.07		

处理因子各水平的 SSR 检验结果(表 3)表明,4 因素对株高的影响均达到极显著水平。从结果看出,添加 6-BA 对株高起到一定的抑制作用,不添加与添加 0.5 和 1.0 mg·L⁻¹ 的差异达极显著水平;添加 NAA 对株高起到明显的促进作用,添加 0.5 mg·L⁻¹ 和 1.0 mg·L⁻¹ 的差异不显著,但与不添加的差异达到极显著水平;一定浓度的香蕉泥和马铃薯提取液对株高都有促进作用,50 g·L⁻¹ 效果最好。

2.2 不同培养基成分对假鳞茎粒径的影响

由表 2 可以看出,无菌小苗在不同组合培养基下培养 90 d,假鳞茎粒径平均值在 0.98~6.34 mm,采用极差方法对试验结果进行分析,从

极差值 R 大小可以看出,4 个因素对白芨无菌小苗假鳞茎粒径影响的主次关系为 A>D>B>C。对白芨假鳞茎粒径起主要促进作用的是 6-BA,添加马铃薯提取液不利假鳞茎生长,NAA 和香蕉泥对假鳞茎生长也有一定促进作用。

处理因子各水平的 SSR 检验结果(表 3)表明,4 因素对假鳞茎粒径的影响均达到极显著水平。从结果看出,添加 6-BA 明显促进假鳞茎生长,3 个处理水平的粒径差异达极显著水平,添加 1.0 mg·L⁻¹ 效果最好;马铃薯提取液对假鳞茎生长起抑制作用,随着浓度的增加抑制效果越大,3 个处理水平的结果均达到极显著差异,从假鳞茎生长出发,以不添加为好;NAA 对假鳞茎生长也起到明显的促进作用,3 个处理水平的结果均达到极显著差异,添加 1.0 mg·L⁻¹ 效果最好;添加香蕉泥能促进假鳞茎生长,与不添加的差异达极显著,但是添加 50 和 100 g·L⁻¹ 之间差异不显著。

表 3 不同处理因子各水平对株高和粒径影响的 SSR 检验

Table 3 SSR analysis of level of different factor on plant height and diameter

处理 Treatments	株高 Plant height		粒径 Particle size	
	水平 Level		水平 Level	
	水平 Level	均值 Mean	水平 Level	均值 Mean
6-BA	1	3.66 Aa	3	4.75 Aa
	2	2.84 Bb	2	3.55 Bb
	3	2.79 Bb	1	0.99 Cc
NAA	2	3.72 Aa	3	4.07 Aa
	3	3.71 Aa	2	3.18 Bb
	1	1.86 Bb	1	2.04 Cc
香蕉泥 Mashed potato	2	3.40 Aa	3	3.27 Aa
	3	3.12 Bb	2	3.22 Aa
	1	2.77 Cc	1	2.80 Bb
马铃薯提取液 Potato extract	2	3.38 Aa	1	4.01 Aa
	3	3.19 Bb	2	3.34 Bb
	1	2.71 Cc	3	1.93 Cc

不同大小写字母分别代表 0.01 和 0.05 水平差异显著。下同。
Different capital and lowercase letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 level, respectively. The same below.

3 结论与讨论

植物激素是组织培养中的关键物质,通过调节外源生长素和细胞分裂素的配比、可以改变外源激素与内源激素的比例,进而调控植物的生理活动^[8],促进培养物的生长和分化。李川等^[9]研究表明,NAA含量较高不利于白芨种子萌发,6-BA在一定的浓度范围内,形成原球茎的大小与浓度成正比。本研究结果表明:4个因素中NAA对白芨无菌小苗株高起主要促进作用,同时也促进假鳞茎的生长;6-BA对白芨假鳞茎粒径起主要促进作用,但对株高起到一定抑制作用。

香蕉泥、马铃薯提取液和椰子汁等有机添加剂是组织培养,特别是兰科植物组织培养中经常使用的有机附加物。它们富含的维生素、激素、矿物质、酶和氨基酸等多种营养成分,能明显促进培养物细胞的增殖和生长^[10]。香蕉具有较强的缓冲能力,能使培养基的pH保持在5.6左右^[11],这种偏酸的条件有利于兰科植物生长。李慧敏等^[12]研究发现,培养基中添加80 g·L⁻¹香蕉能使白芨的平均粒径显著增加,添加80 g·L⁻¹土豆,假鳞茎平均粒径显著减小。本研究结果也表明,一定浓度的香蕉泥能提高假鳞茎的平均粒径,但马铃薯提取液抑制假鳞茎生长。

综合各因素对白芨株高和假鳞径的影响,白芨无菌小苗一步成苗的最佳培养基配方是1/2 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA+

50 g·L⁻¹香蕉泥,培养90 d,假鳞茎平均粒径最高,植物高度中等,植株粗壮,长势好,有利于后期的炼苗移栽。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:103.
- [2] 张建霞,付志惠,李洪林,等. 白芨胚发育与种子萌发的关系[J]. 亚热带植物科学,2005,34(4):32-35.
- [3] 傅立国. 中国濒危植物红皮书(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1992:494-495.
- [4] 王楷,李玥,张云峰,等. 白芨种子的高效萌发及其无性繁殖体系的构建[J]. 云南师范大学学报(自然科学版),2014,34(4):71-78.
- [5] 丁永电,郑子峰. 白芨种子无菌萌发培养基优化[J]. 宜春学院学报,2016,38(9):74-76.
- [6] 李雨晴,杨嘉伟,王康才,等. 白芨种子无菌萌发特性[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):253-255.
- [7] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002:43-71,94-99.
- [8] 钟士传,郑亚琴,王侠礼,等. 大量元素、激素和糖对大花蕙兰组织培养的影响[J]. 中国农学通报,2000,16(3):48-50.
- [9] 李川,李二星,刘洋,等. 白芨实生种子的快速繁殖技术[J]. 贵州农业科学,2016,44(8):105-108.
- [10] 马生健,覃金芳,曾富华. 有机添加剂对卡特兰组织培养的影响[J]. 中国农学通报,2010,26(1):32-35.
- [11] 朱根发,蒋明殿. 大花蕙兰的组织培养和快速繁殖技术[J]. 广东农业科学,2004(4):36-38.
- [12] 李慧敏,杨冠海,李明静,等. 白芨瓶内假鳞茎诱导研究[J]. 南方农业学,2013,44(10):1607-1612.

Optimization of Mediums on One-step Culture of *Bletilla striata* Aseptic Seedlings

ZOU Hui, LI hai-ming, WANG Wei-ying, DAI Yi-min, LIN Jiang-bo

(Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 363005, China)

Abstract: In order to improve the tissue culture efficiency of *Bletilla striata*, taking aseptic seedlings of *Bletilla striata* as explants, the orthogonal design was used to study the effects of 6-BA (A), NAA (B), mashed banana (C) and potato extract (D) in the culture medium on the plant height and pseudobulb diameter of *Bletilla striata*. The results indicated that the primary and secondary effects of the four factors on plant height were B>A>D>C and the effect on pseudobulb diameter were A>D>B>C. The optimal medium of one-step culture of *Bletilla striata* aseptic seedlings was 1/2 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA+50 g·L⁻¹ mashed banana.

Keywords: *Bletilla striata*; tissue culture; orthogonal test