



钟程,田鑫,王天钊,等.白及愈伤组织诱导及 EMS、NaN<sub>3</sub> 诱变对其干旱胁迫响应的影响[J].黑龙江农业科学,2022(2):63-68,69.

# 白及愈伤组织诱导及 EMS、NaN<sub>3</sub> 诱变对其干旱胁迫响应的影响

钟程,田鑫,王天钊,陈约约

(凯里学院 大健康学院,贵州 凯里 556011)

**摘要:**为促进白及耐旱种质的选育,确定白及愈伤组织 EMS、NaN<sub>3</sub> 诱变处理的最佳条件,本研究以白及种子为材料,诱导愈伤组织,分别用 EMS 和 NaN<sub>3</sub> 对愈伤组织进行复合诱变后用 PEG 胁迫研究其干旱胁迫响应。结果表明:种子出芽最佳配方为 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA;诱导愈伤组织最佳配方为 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA;愈伤组织增殖最适配方为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA;当 EMS 为 0.6%,NaN<sub>3</sub> 浓度为 6 mmol·L<sup>-1</sup>,诱变 6 h 时,愈伤组织达到半致死,即最佳诱变效果。EMS 诱变植株细胞膜在干旱胁迫下受损更为严重,EMS 和 NaN<sub>3</sub> 均能提高酶活性,但在渗透调节上,NaN<sub>3</sub> 诱变提升较大,因此 NaN<sub>3</sub> 诱变效果优于 EMS。

**关键词:**白及;EMS;NaN<sub>3</sub>;抗旱指标

白及 [*Bletilla striata* (Thund.) Reichb. f.] 是兰科(Orchidaceae)白及属(*Bletilla striata*)多年生草本植物<sup>[1]</sup>,具有一定的观赏价值,其干燥块茎可入药,具有收敛止血,清热解毒,消肿生肌之功效<sup>[2-3]</sup>。白及野生资源丰富,主要分布于贵州、云南和湖南等省<sup>[4]</sup>。但因其种子微小,无胚乳提供发芽所需养分,在自然状态下极少萌发成苗<sup>[5]</sup>,加之白及用途广,需求量极大,人们长期掠夺式的采挖,导致野生资源遭到严重的破坏,濒临灭绝<sup>[6]</sup>。现亟待解决白及生产数量和质量问题。目前,国内外学者对白及的研究主要在育种、药理性质及所含物质等方面,对其诱变方面鲜见报道。

诱变育种简便、安全、经济和突变率高,且产生的变异稳定,可在短时间内育出新品种<sup>[7]</sup>。诱变剂含有活跃的烷基,能转移到电子密度较高的分子中去,置换其他分子中的氢原子而使碱基改变<sup>[8]</sup>,从而产生突变体。常用化学诱变剂有秋水仙素、EMS(甲基磺酸乙酯)、NaN<sub>3</sub>(叠氮化钠)等<sup>[9]</sup>。EMS 在植物研究中最适浓度为 0.2%~0.6%、2~6 h,郑文娟等<sup>[10]</sup>处理越橘得到抗旱株,薛惠丹等<sup>[11]</sup>处理花椒愈伤组织得到外观变异

的植株,罗静等<sup>[12]</sup>处理草莓愈伤组织得到抗性植株,王瑾等<sup>[13]</sup>处理小麦花药愈伤组织、幼胚愈伤组织均得到抗旱品种,王朝雯<sup>[14]</sup>处理寒兰根尖发现酶活性显著增加,崔广荣等<sup>[15]</sup>用其处理文心兰原球茎也成功获得突变体植株;NaN<sub>3</sub> 在以往研究中最适浓度为 3~6 mmol·L<sup>-1</sup>、2~6 h,吴正景等<sup>[16]</sup>对玉扇愈伤组织诱变得到突变植株,何克勤等<sup>[17]</sup>处理甜叶菊试管苗也得到变异植株,马玉涵等<sup>[18]</sup>诱变蝴蝶兰类原球茎得到突变体,崔广荣<sup>[19]</sup>以蝴蝶兰类原球茎薄片为材料筛选出浓度分别为 12 mmol·L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>(2 d)、0.8% EMS 2~4 d 的突变株,但诱变育种在白及育种上鲜见报道。本研究通过诱变选育,诱导白及愈伤组织,用 EMS 和 NaN<sub>3</sub> 对愈伤组织进行复合诱变后用 PEG 胁迫研究其耐旱力,以期对白及育种提供新途径、新方法,丰富白及种质资源,为后续白及育种提供理论依据。另外,诱变育种还可以丰富白及的外观形态,提高园林观赏价值,采用抗性筛选提高其逆境生存能力,从而提高白及产量奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2018 年 9 月 11 日,白及种子购于重庆市綦江区郭扶镇平等村为远药材种植基地,2018 年 7 月 3 日在上海百思一基生物耗材店购买 NAA、6-BA、EMS(甲基磺酸乙酯)、NaN<sub>3</sub>(叠氮化钠)和 PEG-6000(聚乙二醇 6000)。

收稿日期:2021-10-19

**基金项目:**贵州省教育厅青年人才项目(黔教合 KY 字[2020]188);凯里学院校级规划课题(Z1702);凯里学院博士专项课题(BS201403,BS201812);凯里学院大学生创新项目(202010669008,202010669054);凯里学院贵州省省级一流本科专业(园艺);凯里学院一流学科(园艺学)。

**第一作者:**钟程(1985—),女,博士,副教授,从事植物遗传育种研究。E-mail:zhongcheng@163.com。

1.2 方法

1.2.1 种子萌发试验 随机选取白及种子用纱布包好捆紧,用清水洗净,75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2 次,2%次氯酸钠溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 4 次,用无菌滤纸吸干种子表面水分播于培养基上,按表 1 中 8 种配方配制培养基,每个配方 15 瓶,加入蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂 5 g·L<sup>-1</sup>,pH5.8。

表 1 白及种子萌发试验配方设计

编号	MS	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	1/2	0	0
2	1/2	1.0	0
3	1/2	0	1.0
4	1/2	1.0	5.0
5	1	0	0
6	1	1.0	0
7	1	0	1.0
8	1	1.0	5.0

暗培养直至种子萌发后转为光照强度 800~1 200 lx,12 h·d<sup>-1</sup>进行培养,30 d 后统计其污染率(污染率=污染数/总数)、萌芽率及观察萌发形态。

1.2.2 萌发后的愈伤组织增殖 待愈伤组织直径达 1 cm 左右时将其转入表 2 中 9 种配方培养基中进行增殖培养。每个处理接 10 瓶,每瓶 3 个。统计污染率、褐化率(褐化愈伤数/愈伤总数)及增殖倍数(增殖前愈伤直径/增殖后愈伤直径)。

表 2 愈伤组织增殖试验配方设计

编号	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	0	5.0
2	0.5	5.0
3	1.0	5.0
4	0	5.5
5	0.5	5.5
6	1.0	5.5
7	0	6.0
8	0.5	6.0
9	1.0	6.0

1.2.3 诱变剂处理 取直径 1 cm 左右的愈伤组

64

织为诱变材料,将其转入含 EMS 或 NaN<sub>3</sub>的增殖培养基中,裸露部分覆盖含相同浓度诱变剂的无菌脱脂棉进行诱变处理,每个处理 20 瓶,每瓶接种 3 个,处理完成后转入上述所得的增殖培养基中,对其污染率及死亡率进行统计记录。死亡率=死亡愈伤组织数/诱变的愈伤数。其中 EMS(磷酸缓冲液溶解)浓度分别为 0.2%、0.4%和 0.6%,每个浓度处理 4、6 和 8 h,用等量的磷酸缓冲液作为对照处理。NaN<sub>3</sub>(单蒸水溶解)的浓度为 2、4 和 6 mmol·L<sup>-1</sup>,处理时长 4、6 和 8 h,用等量的单蒸水作为对照。

1.2.4 PEG 胁迫处理 将处理后的愈伤组织恢复生长后(7 d)转入含有 20%的聚乙二醇(PEG)<sup>[20]</sup>的培养基中分别培养 4、8 和 12 h,用未经诱变的愈伤组织进行相同处理作为对照,每个处理 20 瓶,处理结束进行抗旱指标测定。

1.2.5 抗旱指标的测定 过氧化物酶(POD)活性测定参照张志良<sup>[21]</sup>的方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原法测定<sup>[22]</sup>;脯氨酸(Pro)采用酸性茚三酮染色法测定<sup>[23]</sup>;可溶性糖用蒽酮比色法测定<sup>[24]</sup>。

1.2.6 数据分析 数据统计和分析采用 Excel 2013 和 SPSS 22.0 进行处理。

2 结果与分析

2.1 培养基配方对白及发芽率及萌发形态的影响

由表 3、图 1 可知,培养基为 1/2MS,6-BA(1.0 mg·L<sup>-1</sup>),NAA(0 和 5.0 mg·L<sup>-1</sup>)时,种子萌发为愈伤组织,但当 NAA 浓度为 5.0 mg·L<sup>-1</sup>时,发芽率较浓度为 0 时高,此时为白及愈伤诱导的最适浓度;没有 6-BA 的培养基中种子则萌发为芽。当基本培养基为 MS 时,各处理白及种子均萌发为芽,但发芽率因 NAA 和 6-BA 的配比而不同。1/2MS 和 MS 培养基中均是 NAA 为 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,6-BA 为 0 时,发芽率最高。6-BA 虽有利于愈伤的产生但基本培养基的差异对白及种子萌发形态有一定的影响,1/2MS 有利于种子产生愈伤,而 MS 则形成芽。因此,白及种子发芽的最佳培养基为 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA,综合平均污染率结果发现诱导愈伤组织的最佳配方为 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA。

表 3 培养基配方对白及发芽率及萌发形态的影响					
基本培养基	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均污 染率/%	平均发 芽率/%	萌发 形式
1/2MS	0	0	13	45.57 b	芽
	0	1.0	13	47.32 b	愈伤
	1.0	0	0	90.49 a	芽
	5.0	1.0	20	69.40 ab	愈伤
MS	0	0	13	60.37 ab	芽
	0	1.0	13	33.81 b	芽
	1.0	0	27	70.18 ab	芽
	5.0	1.0	20	59.68 ab	芽

注:不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平差异显著。下同。



图 1 种子发芽状态

2.2 培养基配方对白及愈伤组织增殖的影响

由表 4 可知,当培养基不含 NAA 时,愈伤组织增殖系数低于含 NAA 的培养基。在同等条件下,6-BA 浓度会影响愈伤增殖,6-BA 为 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 时,增殖系数较高。当 6-BA 为 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,NAA 为 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 时,增殖系数达 6.8,显著高于其他配方。因此愈伤增殖最适配方为 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

表 4 培养基对白及愈伤组织增殖的影响				
6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均污 染率/%	平均褐 化率/%	平均增 殖系数
0.5	0	11.11	4.44	1.0 f
	0.5	0	13.33	1.3 f
	1.0	0	17.78	2.0 e
1.0	0	4.44	0	3.6 cd
	0.5	8.89	4.44	6.8 a
	1.0	0	8.89	4.2 bc
1.5	0	0	17.78	3.0 d
	0.5	0	11.11	3.8 bc
	1.0	6.67	0	4.5 b

2.3 不同浓度 EMS 和 NaN<sub>3</sub> 对白及愈伤组织的影响

从表 5、表 6 和图 2 可知,随着 EMS、NaN<sub>3</sub> 浓度的升高,且随处理时间增加,死亡率均逐渐升高。在 EMS 浓度为 0.6%,诱变时间为 6 h 时,愈伤死亡率在 50% 左右,达到半致死状态。因此,EMS 浓度为 0.6%,诱变 6 h 为最佳诱变条件。NaN<sub>3</sub> 浓度为 6 mmol·L<sup>-1</sup> 处理 6 h 时,死亡率接近 50%,此时为半致死率,也是其最佳诱变条件。观察发现第 7 天时,愈伤组织成活率仅有 20% 左右,说明该条件大部分愈伤不能正常生长,存活的植株具有一定的抗旱性。PEG 胁迫后由愈伤组织长成芽及生根情况详见图 3。

表 5 不同浓度 EMS 对白及愈伤组织的影响			
EMS 浓度/%	诱变时间/h	平均污染率/%	平均死亡率/%
0.2	4	3.33	26.67
	6	0	33.33
	8	8.33	41.67
0.4	4	13.33	35.00
	6	15.00	40.00
	8	5.00	46.67
0.6	4	8.33	45.00
	6	6.67	52.67
	8	16.67	55.00
CK	4	5.00	3.33
	6	3.33	8.33
	8	0	1.67

表 6 不同浓度 NaN <sub>3</sub> 对白及愈伤组织的影响			
NaN <sub>3</sub> 浓度/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	诱变时 间/h	平均污 染率/%	平均死 亡率/%
2	4	10.00	18.33
	6	3.33	21.67
	8	11.67	30.00
4	4	15.00	28.33
	6	16.67	33.33
	8	8.33	45.00
6	4	13.33	40.00
	6	5.00	53.33
	8	0	63.33
CK	4	0	3.33
	6	6.67	10.00
	8	0	6.67



图2 EMS诱变处理后半致死的白及愈伤组织

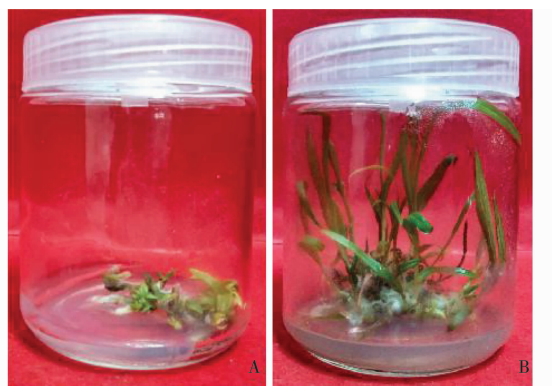


图3 PEG胁迫后由愈伤组织长成芽(A)及生根情况(B)

## 2.4 PEG胁迫后诱变植株抗旱指标的变化

**2.4.1 SOD活性** 如图4A所示,CK在干旱处理前后SOD活性无明显变化,在0和4 h,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变植株与对照植株的SOD活性无显著差异,而在8和12 h,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变植株与对照(CK)的SOD活性均存在极显著差异。说明诱变处理对白及干旱胁迫下的SOD活性有显著影响。PEG胁迫后, $\text{NaN}_3$ 诱变植株SOD活性随干旱胁迫时间延长呈先升后降趋势,胁迫达8 h时,SOD活性最高,而EMS诱变植株SOD活性随干旱胁迫时间延长呈逐渐升高趋势。干旱条件下SOD活性提升水平为 $\text{EMS} > \text{NaN}_3 > \text{CK}$ 。

**2.4.2 POD活性** 如图4B所示,CK在干旱胁迫前后POD活性无明显变化,EMS和 $\text{NaN}_3$ 诱变处理植株在干旱胁迫0 h时POD活性与CK无显著差异。随干旱胁迫时间延长,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变的POD活性极显著高于CK,但二者无显著性差异且随时间延长POD活性逐渐升高,EMS诱变植株POD活性在8 h达到最高水平后缓慢降

低, $\text{NaN}_3$ 诱变植株POD活性呈逐渐上升的趋势。说明正常水分条件下,EMS、 $\text{NaN}_3$ 对POD活性均无提升作用;干旱条件下对照植株POD活性提升水平为 $\text{EMS}、\text{NaN}_3 > \text{CK}$ 。

**2.4.3 CAT活性** 如图4C所示,CK在干旱处理前后CAT活性无明显变化,在干旱胁迫0 h时,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变植株与对照植株的CAT活性无显著差异,而在干旱胁迫4、8和12 h,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变植株与CK的CAT活性均存在极显著差异。且在4和8 h时,EMS诱变植株CAT活性极显著高于 $\text{NaN}_3$ 诱变植株,说明诱变处理对白及干旱胁迫下的CAT活性有显著影响。PEG胁迫后,EMS诱变植株的CAT活性随时间延长呈先升后降的趋势,胁迫达8 h时,CAT达到最高水平而后开始下降,而 $\text{NaN}_3$ 诱变植株的CAT活性随时间延长呈逐渐升高趋势,在12 h时CAT活性极显著高于EMS。干旱条件下CAT活性提升水平为 $\text{NaN}_3 > \text{EMS} > \text{CK}$ 。

**2.4.4 可溶性糖含量** 如图4D所示,CK在干旱处理前后可溶性糖含量无明显变化,在干旱胁迫0 h时,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变植株和CK的可溶性糖含量无显著差异。干旱胁迫4 h时, $\text{NaN}_3$ 诱变和CK植株的可溶性糖含量差异显著,二者极显著低于EMS处理,8 h时,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变的可溶性糖含量差异显著,二者极显著高于CK,12 h时, $\text{NaN}_3$ 和EMS诱变植株的可溶性糖含量极显著高于CK。综上所述,正常水分条件下,诱变处理对可溶性糖含量无显著影响,干旱处理EMS诱变植株短期内的可溶性糖含量呈现波动变化,但最终回归胁迫前的水平,而 $\text{NaN}_3$ 诱变植株的可溶性糖含量始终处于较高水平。干旱条件下可溶性糖含量提升水平为 $\text{NaN}_3 > \text{EMS} > \text{CK}$ 。

**2.4.5 Pro含量** 如图4E所示,CK在干旱处理前后Pro含量无明显变化,在0 h时,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变和CK植株的Pro含量无显著差异,干旱胁迫4 h时, $\text{NaN}_3$ 诱变和CK植株的Pro含量差异显著,二者与EMS差异极显著,8 h时,EMS、 $\text{NaN}_3$ 诱变的Pro含量有显著差异,且二者极显著高于CK,12 h时, $\text{NaN}_3$ 诱变的Pro含量极显著高于EMS和CK,而EMS和CK也存在显著差异,但未达到极显著水平。综上所述,正常

水分条件下,诱变处理对提高 EMS、NaN<sub>3</sub> 的 Pro 含量无影响,干旱处理 EMS 诱变植株在短期内的 Pro 含量呈现波动变化,但最终回归胁迫前的水平,而 NaN<sub>3</sub> 诱变植株的 Pro 含量始终处于较高水平。干旱条件下 Pro 含量提升水平为 NaN<sub>3</sub> > EMS > CK。

2.4.6 MDA 含量 如图 4F 所示,CK 在干旱处理 12 h 后 MDA 含量略有提升,在 0 和 4 h, EMS、NaN<sub>3</sub> 诱变植株与对照植株的 MDA 含量无显著差异,而在 8 和 12 h 时,EMS、NaN<sub>3</sub> 诱变

植株与 CK 的 MDA 含量均存在极显著差异。且在 12 h 时 EMS 诱变植株的 MDA 含量极显著高于 NaN<sub>3</sub> 诱变植株。MDA 含量反映膜脂过氧化水平,表明细胞膜受损程度,说明干旱处理对白及的细胞膜有所损伤。PEG 胁迫后,EMS 和 NaN<sub>3</sub> 诱变植株的 MDA 含量均随时间延长呈逐渐升高的趋势。EMS 诱变植株的 MDA 含量在 12 h 时远远超过 NaN<sub>3</sub>。干旱条件下膜脂过氧化水平为 EMS > NaN<sub>3</sub> > CK。

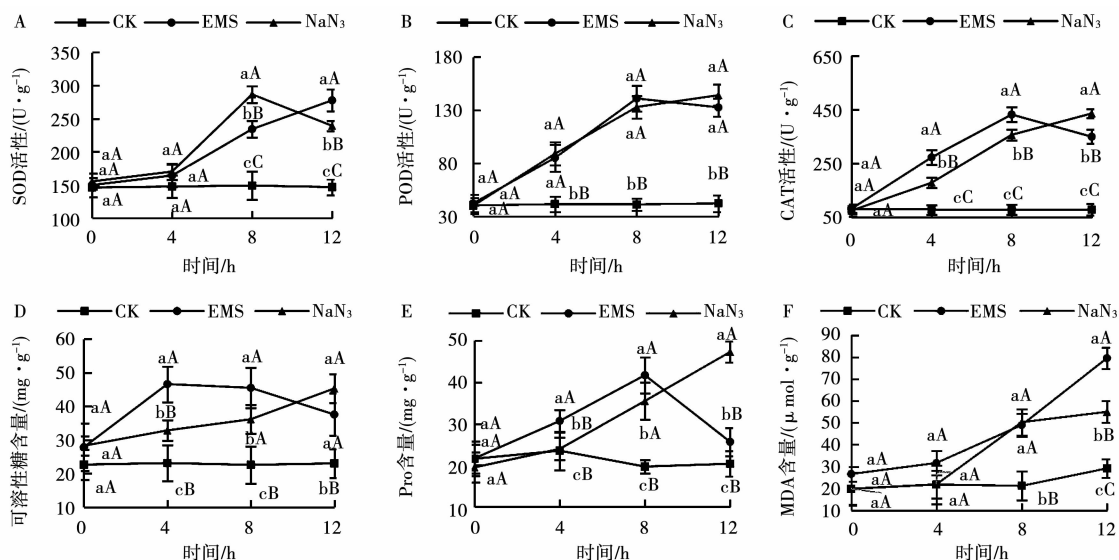


图4 PEG胁迫后诱变植株抗旱指标的变化

注:不同大小写字母分别表示在  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$  水平差异显著。

### 3 讨论

本研究采用  $1/2MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 有利于白及种子萌发后形成愈伤组织,  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 加快愈伤组织增殖,与崔瑞勤等<sup>[25]</sup>的结果一致,诱变剂处理的时间及浓度对不同植物的不同部位效果不一,浓度过高及时间过长均会导致植物体死亡,过低诱变效果不佳。郑文娟等<sup>[10]</sup>诱变越橘,周玉丽等<sup>[26]</sup>诱变甜叶菊的组培苗茎段,薛惠丹等<sup>[11]</sup>诱变花椒愈伤组织,罗静等<sup>[12]</sup>以草莓愈伤组织等均获得突变体,EMS 处理的浓度在 0.5%~3.0%,在本试验中 EMS 为 0.6%处理 6 h, NaN<sub>3</sub> 为  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 6 h 时,愈伤达到半致死,因此,该浓度即为最佳诱变浓度。

干旱胁迫对植物的功能分子具有一定的破坏性,与此同时,细胞也会形成清除该类物质的保护

体系,致使植物体内保护性质的酶 POD、SOD 等分泌加快,提高植物体内酶的活性,也就是说酶的活性越高植物的耐受力越强;植物糖代谢可以提高细胞保水能力,产生保护性物质和能源以促进其更好地在逆境中生存,糖含量增高保水力也增强;脯氨酸是一种渗透调节物质,可提高溶质浓度和降低水势,维持细胞渗透压,使细胞继续从外界吸取水分以保证植物的正常生长。MDA 是通过膜脂过氧化水平反映细胞膜的受损程度,MDA 含量越高,细胞膜受损越严重。诱变处理对植株有损伤作用,诱变后立即对植株进行干旱胁迫不利于植株的恢复及生存,损失潜在变异材料,因此本研究在诱变处理后恢复 7 d,经测定各项指标与对照均无显著差异,表明存活植株的生理功能基本恢复正常,此时进行 PEG 处理,诱变白及细胞膜受损严重,EMS 处理受损程度较 NaN<sub>3</sub> 重,CK

受损程度较小,表明诱变使其细胞膜在干旱胁迫下更易受损,也有可能是诱变所产生的潜在损伤并未完全恢复,其真实抗旱性需在其子代进行鉴定。SOD、POD、CAT 的活性提升很可能是由膜脂过氧化水平的升高导致,可溶性糖及脯氨酸等渗透调节物质也相应提高以降低干旱损伤。综合各指标可知 EMS 诱变对白及损伤较大,抗氧化酶活性 EMS 和  $\text{NaN}_3$  两者相近,而渗透调节物质的含量 EMS 却低于  $\text{NaN}_3$  诱变,表明  $\text{NaN}_3$  诱变很可能在渗透调节物质特别是脯氨酸代谢上有重要作用。

#### 4 结论

本研究得出  $1/2\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 能促进白及种子尽快萌发, $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 有利于白及愈伤组织增殖,EMS 为 0.6% 处理 6 h,  $\text{NaN}_3$  为  $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理 6 h 时,愈伤达到半致死,诱变率较高,成活率较高,采用 PEG 干旱胁迫处理后,MDA 含量与 SOD 活性均表现为  $\text{EMS}>\text{NaN}_3>\text{CK}$ ,CAT 活性、Pro 含量和可溶性糖含量表现为  $\text{NaN}_3>\text{EMS}>\text{CK}$ ,POD 活性提升水平为  $\text{EMS},\text{NaN}_3>\text{CK}$ 。由此可见 EMS 诱变植株在干旱胁迫下受损更为严重,EMS 和  $\text{NaN}_3$  均能提高酶活性,但在渗透调节上, $\text{NaN}_3$  诱变提升较大,因此  $\text{NaN}_3$  诱变效果优于 EMS。

#### 参考文献:

- [1] 吴德喜,赵明富,杨永红,等. 白及药材中氨基酸和元素含量测定[J]. 中兽医医药杂志,2015(1):51-53.
- [2] 张建霞,付志惠,李洪林,等. 白及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] 陶刚,朱英,刘作易,等. 野生黄花白及的组织快繁及分子鉴定[J]. 种子,2008,27(8):22-24.
- [4] 植爽,杜明林,贾黄,等. 白及组织培养快繁技术研究综述[J]. 安徽农学通报,2014,20(10):23-24.
- [5] 袁宁,何俊蓉,何锐,等. 白及组培快繁育苗技术研究[J]. 西南农业学报,2009,22(3):781-785.
- [6] 李伟平,田莎莎,鲁光耀,等. 利用人工种子技术快速繁殖白

及[J]. 中国中药杂志,2012,22(2):3386-3390.

- [7] 马爽,李文建,周利斌,等. 观赏植物诱变育种的研究现状和展望[J]. 核农学报,2007,21(4):378-382.
- [8] 陈丽霞,杜吉到,费志宏,等. 诱变育种技术在大豆育种中的应用[J]. 大豆科学,2008,27(5):874-878.
- [9] 颜志勤. 三种化学诱变剂在杉木育种中的应用研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [10] 郑文娟,石佳,任广炼,等. EMS 诱变越橘的研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2012,37(2):102-108.
- [11] 薛惠丹,李周岐. 花椒愈伤组织 EMS 诱变及变异研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(2):98-101.
- [12] 罗静,周厚成,王永清,等. EMS 离体诱变及抗草莓灰霉病愈伤组织的筛选[J]. 核农学报,2009,23(1):90-94.
- [13] 王瑾,刘桂茹,杨学举. EMS 诱变小麦愈伤组织选择抗旱突变体的研究[J]. 中国农学通报,2005,12(21):190-193.
- [14] 王朝雯. EMS 和秋水仙素对寒兰根状茎化学诱变的研究[D]. 南昌:南昌大学,2012.
- [15] 崔广荣,张子学,张从宇,等. 文心兰  $\text{NaN}_3$  离体化学诱变及 RAPD 检测[J]. 广西植物,2011,31(6):836-843.
- [16] 吴正景,张菊平,时灿辉,等. 叠氮化钠诱变玉扇愈伤组织的研究[J]. 植物生理学通讯,2010,46(12):1247-1250.
- [17] 何克勤,胡能兵,吴海东,等. 甜叶菊  $\text{NaN}_3$  离体诱变技术体系的建立[J]. 热带作物学报,2012,33(11):2024-2029.
- [18] 马玉涵,赵岩,张强,等. 叠氮化钠诱变对离体蝴蝶兰类原球茎生理的影响[J]. 核农学报,2010,24(2):411-414.
- [19] 崔广荣. 蝴蝶兰、文心兰离体培养及其化学诱变研究[D]. 南京:南京农业大学,2009.
- [20] 郭晋隆. PEG 胁迫下的甘蔗 RNA-Seq 定量分析与差异表达基因鉴定[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [21] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2009.
- [22] 许凯,秦樊鑫,耿丹. 汞胁迫对大豆幼苗 SOD 和 CAT 活性的影响[J]. 种子,2013,32(8):37-41.
- [23] 王小华,庄南生. 脯氨酸与植物抗寒性的研究进展[J]. 中国农学通报,2008,24(11):398-402.
- [24] 植菊芳. 甘蔗离体培养 EMS 诱变与抗旱诱变体鉴定的研究[D]. 南宁:广西大学,2014.
- [25] 崔瑞勤,陈科力,徐雷. 基于组培快繁技术的白及种子萌发和幼苗形态观察[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):238-240.
- [26] 周玉丽,崔广荣,胡能兵,等. 甜叶菊甲基磺酸乙酯离体诱变及耐盐变异体的 SRAP 检测[J]. 中草药,2014,45(24):3612-3617.

## Induction of the Callus of *Bletilla* and the Effect of EMS and $\text{NaN}_3$ Mutagenesis on Its Response to Drought Stress

ZHONG Cheng, TIAN Xin, WANG Tian-zhao, CHEN Yue-yue

(College of Comprehensive Health, Kaili University, Kaili 556011, China)





夏九成,郑毅,代钦川. 铁皮石斛的组培技术研究[J]. 黑龙江农业科学,2022(2):69-74.

# 铁皮石斛的组培技术研究

夏九成,郑毅,代钦川

(攀枝花学院 生物与化学工程学院/干热河谷特色生物资源开发高校重点实验室,四川 攀枝花 617000)

**摘要:**为了研究铁皮石斛最佳的组织培养方法,本试验以铁皮石斛带节茎段作为外植体,探寻铁皮石斛的最佳基本培养基,最优消毒时间,以及不同浓度的 NAA 和 6-BA 对腋芽诱导、丛芽增殖、生根壮苗的影响。结果表明:以铁皮石斛带节茎段作外植体时,最佳的基本培养基是 1/2MS 培养基,在 1% HgCl<sub>2</sub> 中浸泡消毒的最优时间为 10 min;诱导腋芽时以 1/2MS+10 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 为最佳培养基;诱导丛芽增殖的最佳培养基为 1/2MS+0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA;诱导生根的最佳培养基为 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> IBA+0.9 mg·L<sup>-1</sup> NAA。

**关键词:**铁皮石斛;茎段;培养基;组织培养

铁皮石斛又名黑节草,是兰科石斛属典型的多年生附生型草本植物,具有很高的药用价值<sup>[1-3]</sup>。全世界约有1 500余个原生种,多生于温凉高湿的岩层峭壁或密林的树干上,由于本身特殊的生物学及生态学特性限制,其自然繁殖力极低且生长缓慢,生境十分狭窄,多年来对其野生资源的毁灭式采集,试管苗的移栽成活率低等原因,造成了铁皮石斛药源供需之间的紧张<sup>[4-7]</sup>。早在1987年,我国就将铁皮石斛列入国家重点保护的野生药材物种名录当中,1991年出版的《中国植物红皮书》更是将铁皮石斛收载为濒危植物<sup>[8]</sup>。目前,规模化的人工栽培是保护野生铁皮石斛资

源,确保其可持续利用的主要手段<sup>[9-11]</sup>。

利用植物组织培养技术获得试管苗,并用其代替野生植物资源成为药源,是实现野生铁皮石斛资源可持续利用的有效方式之一,这对保存和开发野生铁皮石斛资源有着极其重要的意义。铁皮石斛现有的组培快繁技术主要有3种途径:种子的无菌萌发、原球茎再增殖分化和外植体诱导<sup>[12-14]</sup>。其中,种子的无菌萌发中,种子的收集受到季节的限制、消毒灭菌的程度难以掌握、基本培养基筛选困难;原球茎再增殖分化在启动阶段较为棘手,对培养基营养成分具有较高要求,绝大部分需要附加物(如土豆汁、苹果汁、椰子汁),提高了实验成本,且容易感染细菌,加大了实验难度,不适合实验条件一般的实验室进行推广研究;而外植体诱导中,外植体有多种选择,如茎尖、根兜、带芽茎段等,不受自然条件限制,技术较为成熟稳定<sup>[15-16]</sup>。

收稿日期:2021-10-23

基金项目:四川省干热河谷特色生物资源开发高校重点实验室开放基金项目(GR-2019-E-02)。

第一作者:夏九成(1976—),男,博士,副教授,从事植物组织培养。E-mail:xjch1818@vip.163.com。

**Abstract:** In order to promote the breeding of drought tolerant *Bletilla* germplasm, the best conditions for EMS and NaN<sub>3</sub> mutagenesis of the *Bletilla* callus were determined. In this study, the *Bletilla*'s seeds as materials to induce the callus tissue, and the drought tolerance of callus tissue was studied by PEG stress after combined induction with EMS and NaN<sub>3</sub>, respectively. The results showed that the optimal formulation for seed budding was 1/2 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The optimal formula for inducing callus was 1/2 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA; The optimal formula for inducing callus was 1/2 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA; The optimal formulation for callus proliferation was MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA. When the concentration of EMS was 0.6%, NaN<sub>3</sub> was 6 mmol·L<sup>-1</sup>, and the mutagenesis was 6 h, the callus tissue reached half death, that was the optimal mutagenesis effect. The *Bletilla*'s cell membrane induced by EMS are more seriously damaged under drought stress. Both EMS and NaN<sub>3</sub> can improve enzyme activity, but in terms of osmotic regulation, NaN<sub>3</sub> mutation increased greatly, and the mutagenic effect of NaN<sub>3</sub> is better than EMS.

**Keywords:** *Bletilla*; EMS; NaN<sub>3</sub>; physiological index