

王跃华,陈 燕,刘 曼,等. 培育优质白芨苗条件筛选研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):165-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.042

培育优质白芨苗条件筛选研究

王跃华¹, 陈 燕^{1,2}, 刘 曼¹, 刘媛媛¹, 罗晴方¹, 唐金容¹

(1. 成都大学药学与生物工程学院, 四川成都 610106; 2. 成都大学四川抗菌素工业研究所, 四川成都 610052)

摘要:为了探究白芨组培苗快速增殖、生根壮苗与移栽驯化的最佳方案。选取优质的白芨组培苗,探究不同浓度的 N -苯基- N' -1,2,3-噁二唑-5-脲(TDZ)、活性炭及马铃薯泥组合对其增殖的影响,并进一步通过 $L_{16}(4^3)$ 正交试验探究吲哚丁酸(IBA)、吲哚乙酸(IAA)和活性炭对白芨组培苗生根的影响,最后探究不同处理方式对白芨移栽的影响。结果表明,白芨苗增殖最佳培养基为 $1/2\ MS + 1.5\ mg/L\ TDZ + 3.0\ g/L\ 活性炭 + 50.0\ g/L\ 马铃薯泥 + 30.0\ g/L\ 糖$,最大增殖倍数达 10.0 倍;白芨生根的最佳培养基为 $MS + 0.5\ mg/L\ IBA + 0.1\ mg/L\ IAA + 2.0\ g/L\ 活性炭$,且影响生根的主要因素是 IBA,其次是活性炭,影响最小的是 IAA;白芨组培苗移栽的最佳处理方式为将白芨组培苗根浸泡在 30% 的生根剂中 15 min 后移栽,可有效地缩短长出新根的时间和提高侧芽萌发率。

关键词:白芨;组培苗;增殖;生根;正交试验

中图分类号: S567.23+9.04+3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2018)20-0165-03

白芨 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 别称冰球子、地螺丝、利知子、连及草等,为兰科白芨属多年生草本植物,具有收敛止血、消肿生肌的功效,主要用于咳血、吐血、外伤出血、疮疡肿痛、皮肤皲裂^[1]。现代研究表明,白芨具有愈合伤口、抗溃疡、止血、细胞毒性、抗微生物、抗炎、抗氧化、免疫调节、抗纤维化、抗衰老、抗过敏、抗瘙痒等药理作用^[2]。

随着时代的发展,作为传统中草药、观赏植物以及化妆品原料的白芨需求量剧增,加之野生白芨被过度滥采乱挖,白芨种子自然萌发率极低,繁殖困难,再加上传统的人工栽培通常采用分株繁殖,繁殖效率低,周期长,因而白芨资源日益匮乏^[3]。近年来,研究人员不仅对白芨资源的遗传多样性进行研究,还进行了离体快速繁殖研究,取得了一定的成果,且明确利用快速繁殖技术规模化生产白芨种苗是缓解白芨资源紧缺的有效方式之一^[4-5]。而在白芨快速繁育技术研究中,种苗的健壮程度与根系的发达程度严重影响种苗移栽的成活率,是制约人工苗产业化的关键。

本研究通过对白芨优质种苗增殖、生根壮苗、移栽炼苗 3 个生长阶段的研究,获得对实际生产具有指导意义的种苗培育方案,旨在优化快速繁殖白芨种苗的培养条件,为白芨苗大规模人工培育提供技术支持,以缓解白芨药材的紧缺及更有效地保护白芨资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验地点

试验材料来自成都大学生物技术实验室,选取继代 1 次

且株高为 3~4 cm 的单株优质白芨组培苗作为研究材料。试验于 2016 年 10 月至 2017 年 3 月在成都大学实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 白芨苗的快速增殖生长研究 为探寻白芨苗快速增殖生长的最佳方案,本试验研究不同浓度的 N -苯基- N' -1,2,3-噁二唑-5-脲(TDZ)、活性炭、马铃薯泥等对白芨苗增殖生长的影响,具体设计 $1/2\ MS + (0.0, 1.0, 1.5, 2.0\ mg/L)\ TDZ + (0.0, 3.0\ g/L)\ 活性炭 + (30.0, 50.0\ g/L)\ 马铃薯泥 + 30.0\ g/L\ 糖$ 的 A1、A2、A3、A4、A5、A6 共 6 个不同培养基,培养 60 d 后统计白芨无根苗的增殖倍数。

1.2.2 白芨无根苗的生根培养研究 采用 3 因素 4 水平的试验,正交表选用 $L_{16}(4^3)$ 表头设计。选取吲哚丁酸(IBA)、吲哚乙酸(IAA)、活性炭等 3 个因素,各水平见表 1。研究白芨无根苗的生根情况,培养 25 d 后统计生根率。

表 1 不定根诱导因子水平

水平	试验因素		
	A:IBA 浓度(mg/L)	B:IAA 浓度(mg/L)	C:活性炭用量(g/L)
1	0.0	0.0	0.0
2	0.1	0.1	2.0
3	0.5	0.3	4.0
4	1.0	0.5	6.0

1.2.3 白芨组培苗移栽 将生长健壮组的组培苗取出,洗去基部的培养基,按表 2 中的 4 种不同方式处理后再移栽至疏松透气富含腐殖质的土壤。

表 2 白芨组培苗移栽处理方法

编号	处理方式
B1	将组培苗直接移栽至土壤中
B2	将组培苗根浸泡在含 30% 生根剂的水溶液中处理 15 min
B3	将组培苗根浸泡在含 30% 的 50% 多菌灵可湿性粉剂的水溶液中处理 15 min
B4	将组培苗根浸泡在含 30% 的 70% 甲基硫菌磷可湿性粉剂的水溶液中处理 15 min

收稿日期:2017-05-18

基金项目:四川省科技支撑计划(编号:2015SZ0034)。

作者简介:王跃华(1963—),女,四川成都人,硕士,教授,主要从事药用植物生物技术研究。E-mail:1961689636@qq.com。

通信作者:陈 燕,女,硕士研究生,主要从事药用植物生物技术研究。E-mail:15281060260@163.com。

1.2.4 试验数据统计 采用正交助手Ⅱ完成正交试验的设计和数据分析。各试验每组接种 20 瓶,每瓶 5 株,重复 3 次。增殖倍数 = 增殖后无根苗数/接种无根苗数;生根率 = 生根的幼苗数/接种的无根苗数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同浓度激素和添加物对白芨无根苗增殖生长的影响

将健壮白芨幼苗接入不同培养基中培养 60 d,无根苗增殖结果见表 3。从表 3 可以看出,TDZ、活性炭和马铃薯泥组合会更有利于白芨幼苗的增殖和生长。在没有添加 TDZ 的 A1 培养基中,培养 60 d 后,白芨组培苗的增殖倍数仅为 1.1 倍,为 6 种配方中最低;在添加相同种类、浓度的激素与马铃薯泥的条件下,添加了活性炭比未添加活性炭组的增殖倍数明显增加;改变马铃薯泥的含量对白芨苗的平均增殖倍数也有一定的影响。TDZ 浓度在 0.0 ~ 1.5 mg/L 时,白芨苗增殖倍数随其浓度增大而提高,当 TDZ 浓度为 1.5 mg/L 时,增殖倍数最大,高达 10.0 倍。通过 A3 与 A6 比较可以看出,当 TDZ 浓度升高到 2.0 mg/L 时,增殖倍数有所下降。活性炭的添加对白芨苗增殖有一定影响,添加了活性炭的 A3 组增殖倍数明显高于未添加活性炭的 A5 组,且活性炭除了对白芨苗增殖倍数有影响,还对白芨苗的生长有明显影响,通过观察发现,A3 与 A5 比较,叶片颜色更绿、茎更加粗壮。马铃薯泥的添加对白芨苗的增殖倍数也有一定的影响,添加 50.0 g/L 马铃薯泥的 A4 增殖倍数高于添加 30.0 g/L 马铃薯泥的 A3,马铃薯泥与活性炭相似,除了对增殖倍数有影响外,不同的马铃薯泥含量对白芨苗的生长状况也有较为明显的影响。通过观察发现,A4 与 A3 相比,A4 的白芨苗叶片更大,茎更加粗壮,原球茎直径也更大,因此添加 50.0 g/L 马铃薯泥更有利于白芨苗的增殖和生长。因此,设计的 6 个方案中,A4 组为白芨无根苗增殖最佳方案,即白芨无根苗最佳增殖培养基为 1/2 MS + 1.5 mg/L TDZ + 3.0 g/L 活性炭 + 50.0 g/L 马铃薯泥 + 30.0 g/L 糖。

表 3 不同浓度激素和添加物对白芨幼苗增殖生长的影响				
编号	TDZ (mg/L)	活性炭 (g/L)	马铃薯泥 (g/L)	幼苗增殖倍数 (倍)
A1	0.0	3.0	30.0	1.1
A2	1.0	3.0	30.0	3.7
A3	1.5	3.0	30.0	8.3
A4	1.5	3.0	50.0	10.0
A5	1.5	0.0	30.0	7.4
A6	2.0	3.0	30.0	6.9

2.2 白芨无根苗的生根诱导研究

植物激素的种类、浓度以及活性炭对于白芨生根起着十分重要的作用。为了探究激素和活性炭对白芨生根的影响,本试验以 MS 培养基为基础,分别添加不同浓度和配比的 IBA、IAA、活性炭等 3 种物质,组合成 16 种不同的培养基,培养 25 d 后统计结果。从表 4 可以看出,白芨无根苗在 16 种不同培养基中均可诱导生根,但其生根率差异明显。在 9 号培养基中,白芨无根苗诱导生根率最高,达 100.00%,而 1 号培养基的白芨无根苗生根诱导率最低,仅为 24.69%。R 代表各因素每个水平的平均值,R 值越大,代表该因素此水平越

好。从各水平的平均值可以看出,白芨生根的最佳培养基为 A₃B₂C₂。经验证得出,最佳培养方案条件下培养 25 d 后白芨无根苗的生根率达 100.00%,与同等条件下 9 号培养方案培养的白芨苗相比,新生根的条数更多、长度相当,且更有粗壮,更有利于后期移栽,因而最终确定白芨无根苗生根的最佳培养基为 MS + 0.5 mg/L IBA + 0.1 mg/L IAA + 2.0 g/L 活性炭。极差值 R 越大表明此因素越重要,通过极差分析可知,3 种因素对白芨无根苗生根诱导率的影响表现为 A > C > B,即 IBA 浓度 > 活性炭用量 > IAA 浓度。说明培养基中 IBA 浓度对无根苗诱导生根的影响最大,其次是活性炭用量,影响最小的是 IAA 浓度。

表 4 不定根诱导试验结果					
编号	水平			误差	生根率 (%)
	A	B	C		
1	1	1	1	1	24.69
2	1	2	2	2	62.87
3	1	3	3	3	49.35
4	1	4	4	4	50.63
5	2	1	2	3	88.64
6	2	2	1	4	84.81
7	2	3	4	1	89.63
8	2	4	3	2	90.31
9	3	1	3	4	100.00
10	3	2	4	3	98.97
11	3	3	1	2	87.37
12	3	4	2	1	97.65
13	4	1	4	2	86.64
14	4	2	3	1	92.25
15	4	3	2	4	85.27
16	4	4	1	3	87.35
k ₁	46.89	74.99	71.06	76.06	
k ₂	88.35	84.73	83.61	81.80	
k ₃	96.00	77.91	82.98	81.08	
k ₄	87.88	81.49	81.47	80.18	
R	49.11	9.73	12.55	5.74	

2.3 方差分析

为了进一步比较各因素对生根诱导的影响和探究 3 个因素之间的联系,在极差分析的基础上进行了方差分析。从表 5 的方差分析结果可知,本研究 3 个因素中只有因素 A 对试验结果有显著影响。其中因素 A 检验值 $F = 3.51, F_{0.05}(3, 3) = 3.49, F_{0.01}(3, 3) = 5.95, F_{0.05} < F < F_{0.01}$,因此因素 A 对白芨无根苗生根影响显著(0.01 < P < 0.05);因素 B 检验值 $F = 0.16, F_{0.05}(3, 3) = 3.49$,检验值 $F < F_{0.05}$,说明因素 B 对白芨无根苗生根无显著影响;同理可知因素 C 无显著影响。可以说明影响白芨无根苗生根的最主要因素为 IBA 浓度,而 IAA 浓度和活性炭用量对白芨无根苗生根影响不显著。

表 5 不定根诱导结果方差分析						
因素	偏差平方和	自由度	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}	显著性
A	5 735.55	3	3.51	3.49	5.95	*
B	261.36	3	0.16	3.49	5.95	
C	461.40	3	0.28	3.49	5.95	
误差	71.52	3	0.04	3.49	5.95	

注:“*”表示该因素的显著性为显著(0.01 < P < 0.05)。

2.4 炼苗和移栽

选取生长健壮的组培苗,洗去基部的培养基,按不同处理方式处理后移栽至土壤中,观察新根的生长情况,并在培养 30 d 后统计侧芽萌发率。从表 6 可以看出,将白芨组培苗浸泡在 30% 的生根剂中处理 15 min 后移栽最快长出新根,说明生根剂对白芨生根有正向的影响。且 B2 组移栽 30 d 后,侧芽萌

发率最高,达 86.12%,明显高于其他处理方式。桂炳中指出甲基硫菌磷内吸性较强,会随液流向植株顶部进行传导,影响细胞分裂^[6]。本试验 B4 组使用甲基硫菌磷的侧芽萌发率最低可与其相佐证。综合白芨组培苗移栽后的生根与侧芽萌发情况,B2 是白芨组培苗移栽的最佳处理方案,即将组培苗根浸泡在 30% 的生根剂中 15 min 后移栽至土壤中。

表 6 不同处理方式对白芨幼苗生长的影响

编号	组培苗的处理方式	长出新根时间 (d)	侧芽萌发率 (%)
B1	将组培苗直接移栽至土壤中	11 ~ 13	40.62
B2	将组培苗根浸泡在含 30% 生根剂的水溶液中处理 15 min	9 ~ 12	86.12
B3	将组培苗根浸泡在含 30% 的 50% 多菌灵可湿性粉剂的水溶液中处理 15 min	15 ~ 17	36.00
B4	将组培苗根浸泡在含 30% 的 70% 甲基托布津可湿性粉剂的水溶液中处理 15 min	16 ~ 18	33.83

3 讨论与结论

3.1 白芨幼苗的增殖

TDZ 为人工合成的苯基脲衍生物,如今被广泛应用于植物组织培养中,是一种高效生物调节剂,它具有生长素和细胞分裂素的双重作用,且活性比一般细胞分裂素类高几十至几百倍。目前在白芨组培中对 TDZ 运用较少,多数白芨幼苗的研究使用的是一般常见植物激素,如石云平等认为 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)是白芨苗增殖的良好激素^[7-8]。而余朝秀等的研究表明,激动素(KT)更有利于白芨苗的增殖,在 MS + 4.0 mg/L KT + 0.2 mg/L 萘乙酸(NAA)培养基中培养 40 d 后,增殖率可达 450%^[9]。本试验结果表明,TDZ 有利于白芨不定芽的分化,以 1.5 mg/L TDZ 效果最好,增殖倍数最高达 10.0 倍,与杨海芸在研究蝴蝶兰的离体培养中得到的结果^[10]一致。

活性炭作为吸附能力极强的一种无机吸附剂,在植物离体培养中,能吸附培养基中自身含有或植物生长过程中释放的有害物质。王红梅指出,适量的添加活性炭可以抑制白芨组培苗褐化,这是因为活性炭吸附了部分酚类、醌类等有害物质,使多酚氧化酶与过氧化物酶失活,从而有效地防止组培苗褐变,并且活性炭还能吸附琼脂中所含的杂质以及蔗糖在高压下消毒产生的 5-羟甲基糠醛^[11]。本研究低浓度的活性炭与 TDZ 联合使用达到了很好的增殖效果,究其原因,一方面活性炭吸附了培养基中的有害物质与部分 TDZ,从而优化了白芨苗的生存环境,另一方面活性炭不断吸附植物生长过程中产生的生长抑制物质。因此活性炭有利于白芨苗的增殖和生长,且与 TDZ 联合使用更加有利于白芨苗的增殖和生长。

3.2 白芨生根与移栽炼苗

白芨苗生根情况的好坏直接影响着后期移栽的成活率,在整个快速繁育体系中占据至关重要的地位。林伊利等都是以 NAA 作为诱导激素且诱导效果较好^[12-13]。本研究通过正交试验表明 IBA 对白芨苗生根诱导的影响较大,且是影响白芨苗生根的显著性因素。后期在探究白芨苗的不定根诱导时可以着重比较一下 IBA、NAA 以及两者组合使用的诱导效果。

白芨组培苗炼苗的土质是一个重要因素,已有众多学者探讨了土质对白芨组培苗的影响,如邹娜等研究发现,蛭石作为试管苗的移栽基质效果最好,幼苗生长能力强,且存活率高

达 95% 以上^[14]。本研究表明移栽时对白芨苗的处理也是一个重要因素,试验中将白芨组培苗根浸泡在 30% 生根剂中 15 min 后移栽,有利于新根的生长和侧芽的萌发。而经过甲基托布津处理后,新根生长与侧芽萌发均不理想,说明在移栽白芨组培苗时生根剂类物质会使白芨组培苗更快生根且更易存活下来,而甲基托布津类物质会抑制白芨组培苗的生长。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:103.
- [2] He X R, Wang X X, Fang J C, et al. *Bletilla striata*: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 195(4): 20-38.
- [3] Diao H J, Li X, Chen J N, et al. *Bletilla striata* polysaccharide stimulates inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression in macrophages [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(2): 85-89.
- [4] 植爽,杜明林,贾黄,等. 白芨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] 高龙梅,胡振兴,刘小英,等. 白芨组织培养研究进展[J]. 南方农业, 2017, 11(1): 74-76.
- [6] 桂炳中. 多菌灵、苯菌灵和甲基托布津的科学使用[J]. 科学种养, 2008(2): 7.
- [7] 石云平,李锋,凌征柱. 白芨组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(11): 1408-1410.
- [8] 田英翠,袁雄强. 白芨组织培养快繁技术研究[J]. 江苏农业科学, 2006(4): 75-77.
- [9] 余朝秀,李枝林,王玉英. 野生白芨组培快繁技术研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(5): 601-604.
- [10] 杨海芸. 蝴蝶兰离体快繁体系建立及形态发生途径的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2006: 24-25.
- [11] 王红梅. 活性炭在植物组织培养中的应用[J]. 上海农业科技, 2011(4): 19, 21.
- [12] 林伊利,李伟平,马丹丹,等. 白及组培快繁的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 336-339.
- [13] 付志惠,张建霞,李洪林,等. 白及种子萌发与快速繁殖技术的研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 80-82.
- [14] 邹娜,李意,连芳青. 优良观赏药用地被植物——白芨组织培养及快速繁殖研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(5): 950-955.