昆明学院学报　2019，41（6）：67～70　ISSN 1674－5639　CN 53－1211/G4
Journal of Kunming University

小白及组培快繁技术研究

靳　松，莫丽玲，陈泽斌，尹利方，苏　源*，文林琴
（昆明学院 农学与生命科学学院，云南 昆明 650214）

摘要：为保护野生药用植物资源，建立小白及组培快繁体系．以小白及种子为外植体，探讨了不同培养基组合对小白及种子萌发、继代培养和生根的影响．结果表明：小白及种子萌发的最佳培养基为 MS＋1.0 mg/L 6-BA＋2.0 mg/L NAA，采用该培养基则种子萌发较早且幼苗生长健壮；从经济的角度考虑，可选用 1/2MS 或 N6 作为小白及继代培养基；最佳生根培养基为 1/2MS＋0.1 mg/L NAA，平均生根数为 7.58 条．

关键词：小白及；培养基；快繁；种子
中图分类号：S567.239　**文献标识码**：A　**文章编号**：1674－5639（2019）06－0067－04
DOI：10.14091/j.cnki.kmxyxb.2019.06.013

Study on Technology of Tissue Culture and Rapid Propagation of *Bletilla formosana*

JIN Song，MO Liling，CHEN Zebin，YIN Lifang，SU Yuan*，WEN Linqin
（College of Agriculture and Life Sciences，Kunming University，Kunming，Yunnan，China　650214）

Abstract：In order to protect the wild and medicinal plant resources，the system of tissue culture and rapid propagation of *Bletilla formosana* was set up．Seeds of *Bletilla formosana* were used as explants to study impacts of different combined culture medium on their seed germination，subculture and rooting．The results showed that the optimal culture medium for seed germination of *Bletilla formosana* was found to be MS＋1.0 mg/L 6-BA＋2.0 mg/L NAA，with which seeds germinate relatively early and young plants grow vigorously．From the point of economy，1/2MS or N6 may be chosen as subculture medium of *Bletilla formosana*．1/2MS＋0.1 mg/L NAA was the optimal culture medium and rooting with 7.58 average number of roots．

Key words：*Bletilla formosana*；culture medium；rapid propagation；seed

小白及（*Bletilla formosana*（Hayata）Schltr.）为兰科白及属多年生草本植物，多分布于云南、贵州等省[1]．白及属植物在中国分布有 4 个种，分别为白及（*Bletilla striata* Rchb. f.）、黄花白及（*Bletilla ochracea* Schltr）、小白及和华白及（*Bletilla sinensis*（Rolfe）Schltr.）[2]．苏钛等[3]通过研究滇产习用白及类中草药的药性发现，小白及与白及在药材性状、药用功效等方面无较大差异，其主要差别在于白及有复粒淀粉粒，而小白及无淀粉颗粒．此外，在云南、贵州等地，民间常将小白及充当“白及”药材使用[4]．

现代医学证明，白及除具有收敛止血、消肿生肌等功效外[2]，其提取物还可用于药用辅料、保健和护肤等方面[5-7]．而白及属植物种子细小且无胚乳，在自然状况下很难萌发和生长[8]．目前，虽有研究者对白及的植物组织培养开展了许多研究工作，但有关小白及组培研究的报道却为数不多．因此，为保护野生资源，满足市场需求，本试验拟以小白及种子为材料，对小白及组培快繁体系的建立进行探讨，旨在为规模化生产小白及种苗提供技术支撑．

收稿日期：2019－07－09
基金项目：昆明学院科学研究资助项目（XJZD1605）．
作者简介：靳松（1984—），男，云南昆明人，讲师，硕士，主要从事药用植物资源研究．
*通讯作者：苏源（1974—），男，云南昆明人，讲师，博士，主要从事植物生理学研究，E-mail：suyuankm@163.com.

1 材料与方法

1.1 材料

试验以云南本地野生小白及种子为外植体.

1.2 方法

1.2.1 无菌材料获取

取小白及蒴果，用洗衣粉水刷洗蒴果表面，流水冲洗 30 min，然后在超净工作台上用体积分数为 75% 的乙醇消毒 30 s，无菌水冲洗 5 次，再采用 0.1% 升汞溶液消毒 10 min，并不断摇动，用无菌水冲洗 5 次，最后用无菌吸水纸吸干表面水分，待用.

1.2.2 种子萌发

无菌条件下剖开蒴果，把种子接种于以 MS 为基本培养基，附加不同激素组合的培养基上（表 1），进行种子萌发试验. 每个处理接种 3 瓶，重复 3 次，30 d 后调查种子萌发情况.

表 1 种子萌发试验

处理	激素组合/(mg·L^{-1})	
	6-BA	NAA
1	0	0
2	1	1
3	0	1
4	1	0
5	1	2
6	2	1

1.2.3 继代培养

试验采用 $L_9(3^3)$ 正交设计（表 2）. 选取生长健壮的丛生苗切分为单株小苗接种于培养基上，进行继代培养. 每个处理接种 3 瓶，重复 3 次，50 d 后调查培养情况.

表 2 继代培养正交试验 $L_9(3^4)$

水平	A（基本培养基）	B[(6-BA)/(mg·L^{-1})]	C[NAA/(mg·L^{-1})]
1	MS	0	0
2	1/2MS	1	1
3	N6	2	2

1.2.4 生根培养

试验选取生长良好的丛生苗，将其切分为单株小苗接种于生根培养基上（表 3），进行生根诱导试验. 每种培养基接种 3 瓶，重复 3 次，50 d 后调查生根诱导情况.

表 3 生根培养试验

处理	培养基
1	1/2MS
2	1/2MS + 0.1 mg/L IBA
3	1/2MS + 0.5 mg/L IBA
4	1/2MS + 0.1 mg/L NAA
5	1/2MS + 0.5 mg/L NAA

1.2.5 培养条件

以上各培养基均附加蔗糖 30 g/L 和琼脂 6.2 g/L，pH 均为 5.8，在室温（25 ± 2）℃、光照强度 2 000 lx 和光照时间 12 h/d 的条件下进行培养.

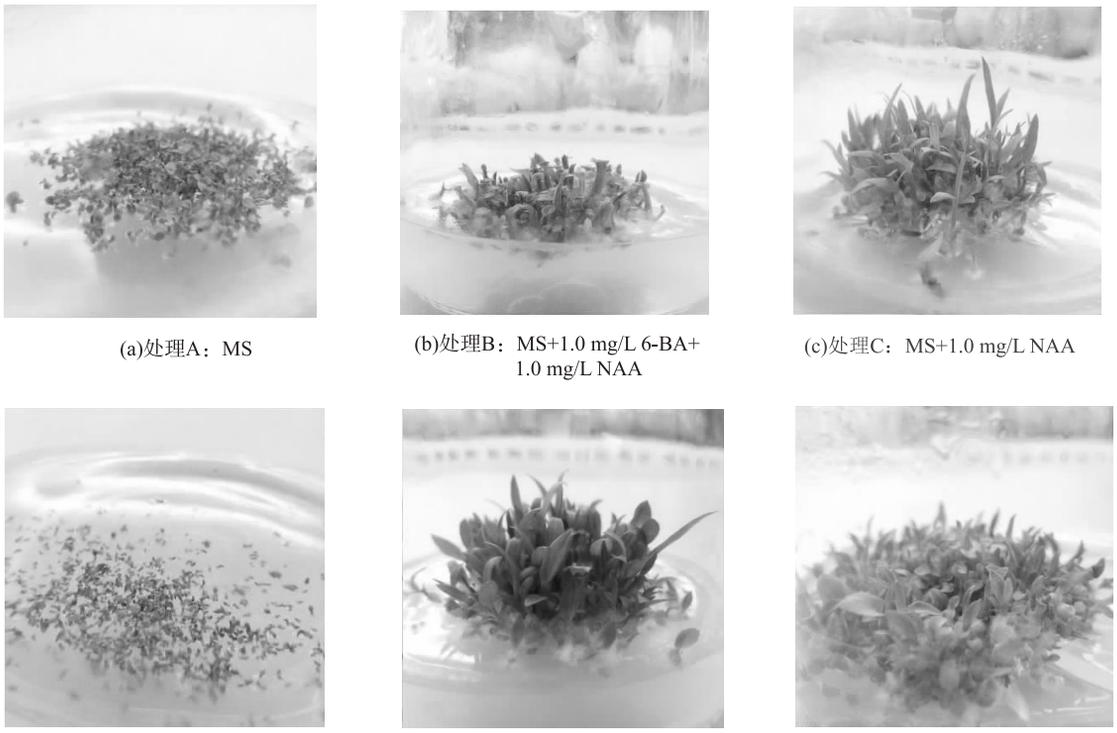
2 结果与分析

2.1 不同激素组合对小白及种子萌发的影响

无菌条件下将小白及种子播种于不同处理的培养基上，7 d 后种子陆续开始萌动，呈点状，浅绿色，少数可见绒毛，其中处理 C 和处理 E 种子萌发数最多. 播种后 40 d，各处理中幼苗生长表现出明显差异（图 1）. 处理 A 苗高 1 mm 左右，可见到 1 片真叶展开，叶小，卵形；处理 B 苗高 5 mm 左右，可见到 1 片真叶展开；处理 C 苗高 10 ~ 20 mm，可见到 2 片真叶展开，叶长，剑形；处理 D 为苗点状；处理 E 苗高 5 ~ 10 mm，多数可见到 1 片真叶展开，少数可见到 2 片真叶，叶宽，剑形；处理 F 苗矮壮，可见到 2 片真叶展开. 因小白及种子极其细小，试验未对萌芽率进行准确的统计. 但从试验结果来看，各处理种子的萌发率均大于 90%. 结合萌发时间，从各处理幼苗的生长表型来看，在本试验条件下，小白及种子萌发以处理为 E 为最佳，其种子萌发较早且幼苗生长健壮，处理 C 次之，处理 D 最差.

2.2 不同培养基组合对小白及幼苗继代培养的影响

小白及种子播种后 40 d，幼苗高 5 ~ 10 mm 时，将幼苗转接至继代培养基中，培养 50 d 后观察记录幼苗生长情况. 通过对丛生芽增殖系数进行极差分析可以看出（表 4），影响丛生芽增殖系数的因素依次为：基本培养基 > NAA > 6-BA. 随着基本培养基盐的质量浓度降低和 6-BA 的质量浓度增加，增殖系数呈现上升的趋势；随着 NAA 的质量浓度增加，增殖系数呈现下降趋势. 根据极差分析可得出，最佳基本培养基为水平 2 和水平 3，即 1/2MS 和 N6；最佳 6-BA 添加质量浓度为水平 2，即 1.0 mg/L；最佳 NAA 添加质量浓度为水平 1，即 0 mg/L.



(a)处理A：MS　(b)处理B：MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA　(c)处理C：MS+1.0 mg/L NAA

(d)处理D：MS+1.0 mg/L 6-BA　(e)处理E：MS+1.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA　(f)处理F：MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA

图1　不同激素组合对小白及种子萌发的影响

表 4　不同培养基对小白及幼苗继代培养的影响

处理	A（基本培养基）	B[(6-BA)/(mg·L^{-1})]	C[NAA/(mg·L^{-1})]	增殖系数
1	MS	0	0	1.32
2	MS	1	1	1.37
3	MS	2	2	1.30
4	1/2MS	0	1	1.60
5	1/2MS	1	2	1.70
6	1/2MS	2	0	1.88
7	N6	0	2	1.79
8	N6	1	0	1.77
9	N6	2	1	1.63
K_1	3.99	4.70	4.98	
K_2	5.18	4.85	4.60	
K_3	5.19	4.81	4.78	
k_1	1.33	1.57	1.66	
k_2	1.73	1.62	1.53	
k_3	1.73	1.60	1.59	
R	0.40	0.05	0.13	
最优组合	A3B2C1 或 A2B2C1			

注：表中 K_1，K_2 和 K_3 表示各因素结果之和；k_1，k_2 和 k_3 表示各因素结果之和的均值；R 为极差值.

2.3　小白及继代培养增殖系数方差分析

由方差分析可以看出（表 5），3 因素中基本培养基对小白及继代培养增殖系数具有显著影响，而 6-BA 和 NAA 对其影响未达到显著水平，这可能与 6-BA 和 NAA 这 2 个因素之间有交互作用有关. 通过 F 值比较，3 因素中对小白及继代培养增殖系数影响的主次关系是：基本培养基 > NAA > 6-BA.

对 3 因素各水平间进行多重比较可知（表 6），基本培养基水平 2 和水平 3 间差异无统计学意义，而 2 者与水平 1 差异有统计学意义；6-BA 与 NAA 这 2 个因素各水平间差异无统计学意义. 因此，从经济的原则考虑，可选用 1/2MS 或 N6 作为小白及继代培养基.

表 5　小白及继代培养增殖系数方差分析

源	III 型平方和	*df*	均方	*F*	*Sig.*
校正模型	2.076	6	0.346	2.359	0.045
截距	137.473	1	137.473	937.457	0.000
基本培养基	1.912	2	0.956	6.520	0.003
BA	0.023	2	0.011	0.078	0.925
NAA	0.141	2	0.070	0.480	0.622
误差	6.892	47	0.147		
总计	146.441	54			
校正的总计	8.968	53			

表 6 增殖系数多重比较

均值	A(基本培养基)	B(6-BA)	C(NAA)
k_1	1.33 b	1.57 a	1.66 a
k_2	1.73 a	1.62 a	1.53 a
k_3	1.73 a	1.60 a	1.59 a

2.4 不同培养基对小白及生根的影响

当小苗长至 4 cm 左右时，将丛生芽分为单株转接至生根培养基，培养 50 d. 从表 7 可以看出，随生长素质量浓度的增加，小白及生根数呈现出先促进后抑制的趋势，而小白及根长未呈现规律性变化. 从小白及生根数情况看，处理 2、处理 3 与处理 4 或处理 1、处理 5 间差异无统计学意义，处理 4 对小白及生根数的影响显著高于处理 1 和处理 5. 因此，在本试验条件下，小白及最佳生根培养基为 1/2MS +0.1 mg/L NAA，平均生根数为 7.58 条.

表 7 不同培养基对小白及生根的影响

处理	IBA/(mg·L^{-1})	NAA/(mg·L^{-1})	平均根数/条	平均根长/cm	根的形态
1	0.0	0.0	5.04 ±1.40 b	1.82 ±0.33 a	根细且较长，黄绿色，根毛少
2	0.1	0.0	6.50 ±1.80 ab	1.39 ±0.31 a	根较细且长，绿色，根毛较少
3	1.0	0.0	5.80 ±1.07 ab	1.67 ±0.51 a	根粗且长，绿色，根毛多
4	0.0	0.1	7.58 ±2.21 a	1.68 ±0.36 a	根粗且长，淡绿色，根毛多
5	0.0	1.0	5.41 ±1.31 b	0.56 ±0.16 b	根较粗且短，乳白色，根毛较多

3 讨论

种子萌发过程受激素影响较大，管常东等[8]认为，在无菌播种时，NAA 能有效促进白及种子的萌发，但 6-BA 的作用存在一定争议. 本试验采用成熟度一致的小白及蒴果为材料进行探讨，结果表明，激素对小白及种子萌发率影响较小，6 个处理的种子萌发率均高于 90%. 此外，激素对原球茎分化影响较大，NAA 有利于幼苗叶片伸长，6-BA则起到抑制作用，因此添加适宜比例的激素处理较未添加激素处理更有利于幼苗的生长.

植物组织培养中使用的培养基与大田作物栽培的土壤相似，它包含了培养材料生长发育所需的各种必须营养元素，因不同培养物对营养元素的需求有所差异，所以筛选出适合的培养基，更有利于壮苗的培养. 本试验继代培养阶段采用正交试验设计，研究了基本培养基、NAA 和 6-BA 这 3 因素对小白及增殖系数的影响，结果表明，在本试验条件下，仅基本培养基对小白及继代培养增殖系数的影响达到显著水平，1/2MS 和 N6 较 MS 更利于小白及的增殖培养，由此可见，铵态氮含量较低的培养基更适合小白及的继代培养.

本试验通过诱导丛生芽增殖途径对小白及进行增殖培养，但在试验条件下，9 个处理的增殖系数仅达 1.6 左右. 而转接丛生芽时，因幼苗茎短缩，导致切分丛生芽费工费时，且小苗损耗率较高. 基于小白及种子数量巨大这一优势，本文认为，在生产上可选择原球茎直接诱导分化成苗，简化培养工序，提高生产效率，从而有效降低培养成本.

[参考文献]

[1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志：第 14 卷［M］. 北京：科学出版社，2003.

[2] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志：第 18 卷［M］. 北京：科学出版社，1999.

[3] 苏钛，李学芳，邱斌，等. 滇产习用白及类药材的生药学研究［J］. 现代中药研究与实践，2015，29（6）：18－21.

[4] 朱兆云. 云南天然药物图鉴：第 1 卷［M］. 昆明：云南科技出版社，2003：139.

[5] 李伟平，何良艳，丁志山. 白及的应用及资源现状［J］. 中华中医药学刊，2012，30（1）：158－160.

[6] 张卫明，蒋建新. 特种植物胶资源高效利用进展［J］. 中国野生植物资源，2003，22（5）：4－5.

[7] 芮海云，吴国荣，陈景耀，等. 白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究［J］. 南京师大学报（自然科学版），2003，26（4）：94－98.

[8] 管常东，叶静，郑晓君，等. 白芨组织快繁育苗技术研究进展［J］. 云南大学学报（自然科学版），2010，32（S1）：416－421.