

白芨愈伤组织诱导、增殖与分化研究

石云平, 赵志国, 唐凤鸾, 付传明, 黄宁珍*

广西壮族自治区中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006

摘要: 目的 建立白芨愈伤组织诱导、增殖和分化再生体系。方法 以 MS 为基本培养基, 应用正交试验方法设计植物生长调节剂组合和质量浓度配比, 研究不同外植体及植物生长调节剂对白芨愈伤组织形成、增殖和分化的影响。结果 白芨假鳞茎为诱导愈伤组织形成的最佳外植体; 1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 与 2.0 mg/L 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 组合不仅可诱导白芨愈伤组织形成, 还有利于愈伤组织分化成芽。1.0 mg/L 6-BA 与 3.0 mg/L 2, 4-D 的组合促进愈伤组织增殖, 增殖系数为 7.8; 在分化培养基中附加 0.5 mg/L 噻二唑苯基脲 (TDZ), 可提高愈伤组织分化率。结论 白芨愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 2.0 mg/L; 最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 3.0 mg/L; 分化最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L。

关键词: 白芨; 愈伤组织; 诱导; 增殖; 分化; 正交设计

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)03-0349-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.023

Induction, proliferation, and differentiation of *Bletilla striata* callus

SHI Yun-ping, ZHAO Zhi-guo, TANG Feng-luan, FU Chuan-ming, HUANG Ning-zhen

Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China

Abstract: Objective To establish the regeneration system of *Bletilla striata* callus for induction, proliferation, and differentiation. **Methods** MS was selected as the basic medium. To study the effective factors on induction, proliferation, and differentiation of callus of *B. striata* with different explants and to optimize the plant growth regulators, kinds, and concentration ratio of plant growth regulators by orthogonal test design. **Results** The optimal explants were false bulbs of *B. striata*. MS medium added with 1.0 mg/L 6-benzylaminopurine (6-BA) and 2.0 mg/L 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), not only could induce callus formation, but also benefit to the differentiation of callus. MS medium added with 1.0 mg/L 6-BA and 3.0 mg/L 2, 4-D promoted the proliferation of callus, and the proliferation coefficient was 7.8. Adding with 0.5 mg/L thidiazuron (TDZ) to the differentiation medium improved the differentiation rate of callus. **Conclusion** MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2, 4-D 2.0 mg/L is the optimal medium for the induction of callus; MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2, 4-D 3.0 mg/L is the optimal medium for the proliferation of callus; MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2, 4-D 2.0 mg/L + TDZ 0.5 mg/L is the optimal medium for the differentiation of callus.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; callus; induction; proliferation; differentiation; orthogonal design

白芨 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 又名白及, 别名地螺丝、白鸡儿、刀口药、连及草等, 为兰科多年生草本植物^[1]。其花大色艳, 被称为中国洋兰, 具有很高的观赏价值, 常用于花径、花坛及林下的地被植物等。其假鳞茎是我国传统中药, 具有收敛止血、补肺、消肿生肌之功效, 外敷治疗创伤出血、肿痛、烫伤和疮疡, 内治吐血、肺病、咳

血、慢性胃溃疡以及肿瘤等症^[2]。现代研究表明, 白芨还具有较强的抗氧化和抗衰老作用^[3], 可用于保健、护肤及美容养颜^[4]。

白芨在我国长江流域及以南地区均有分布, 生长区域较广。由于多年的掠夺式采挖, 加上生境日益恶化, 使得野生白芨的数量急剧减少, 濒临灭绝边缘, 已被国家列为重点保护的野生药用植物之一。

收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 广西自然科学基金项目“药用植物白芨多倍体育种技术研究”(2011GXNSFA018105); 广西科技攻关项目“广西重要兰科资源植物保护与繁育技术研究”(桂科攻 10100012-5); 桂林科技攻关项目“药用植物白芨种源基地建立与产业化研究”(20120105-11)

作者简介: 石云平(1974—), 女, 广西桂林人, 助理研究员, 硕士, 主要从事生物技术方面的研究工作。E-mail: shi Yunping@163.com

*通信作者 黄宁珍 E-mail: hangnz@gxib.cn

网络出版时间: 2013-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130108.0928.002.html>

白芨应用日益广泛,人工栽培势在必行。虽然白芨组培快繁技术比较成熟^[5-7],但是目前栽培仍以分株繁殖为主,存在产量较低、所需的生长周期长等不利于大规模发展人工栽培的因素。因此,改良白芨品种,提高其产量和品质是大规模栽培的前提。

由于愈伤组织是未分化的具有分生能力的原始细胞团,通过对愈伤组织进行基因转化和化学诱导可较快获得新品种。目前,关于兰科植物愈伤组织诱导的文献报道不多^[8-11],白芨愈伤组织诱导还未见报道。本实验以白芨无菌组培苗为材料,在MS培养基中附加不同种类和质量浓度的植物生长调节剂进行实验,建立白芨愈伤组织诱导与植株再生体系。

1 材料

BBS—DDC型洁净工作台,济南鑫贝西生物技术有限公司;JZ—160型接种器械灭菌器,上海咏星生物科技有限公司。

白芨 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 为广西桂林优良品种,由广西植物研究所刘演研究员鉴定。以白芨种子无菌播种得到白芨组培苗为材料进行实验。植物生长调节剂萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、噻二唑苯基脲(TDZ)均为分析纯,购自Sigma公司。

2 方法

2.1 白芨愈伤组织诱导培养基与最佳外植体的筛选

培养基:以MS为基本培养基;植物生长调节剂2,4-D、NAA和6-BA分别为A、B和C3因素,各取3水平,应用正交表 $L_9(3)^4$ 设计不同因素水平配比的培养基(表1);再加20 g/L白糖和4.5 g/L琼脂;pH值5.8~6.0;121℃、1.1 kg/cm²下灭菌25 min。

外植体及接种培养:在超净工作台中,将白芨无菌组培苗根、假鳞茎和叶分别切成长度为0.5 cm左右的小段,接入各诱导培养基中,在(25±1)℃、光照强度1500 lx、光照时间10 h/d的条件下培养。

2.2 白芨愈伤组织增殖与分化培养基筛选

2.2.1 增殖培养基及增殖培养 根据白芨愈伤组织诱导正交试验结果,设计愈伤组织增殖培养基。以MS为基本培养基,1.0 mg/L 6-BA为固定因素,分别附加0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 2,4-D;再加20 g/L白糖和4.5 g/L琼脂;pH值5.8~6.0;灭菌。将“2.1”项中诱导得到的愈伤组织切成0.3 cm×0.3 cm小块,分别接入增殖培养基中培养,以筛选白芨愈伤组织增殖培养基。

表1 白芨愈伤组织诱导正交设计与结果分析 ($n=3$)

处理	质量浓度 / (mg·L ⁻¹)			愈伤组织诱导率 / %		
	A	B	C	根	假鳞茎	叶片
1	1 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	0.0	0.0	0.0
2	1 (0.0)	2 (1.0)	2 (0.5)	0.0	0.0	0.0
3	1 (0.0)	3 (2.0)	3 (1.0)	0.0	0.0	0.0
4	2 (1.0)	1 (0.0)	2 (0.5)	3.3	30.0	0.0
5	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (1.0)	6.7	16.7	0.0
6	2 (1.0)	3 (2.0)	1 (0.0)	0.0	10.0	0.0
7	3 (2.0)	1 (0.0)	3 (1.0)	23.3	83.3	3.3
8	3 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.0)	3.3	23.3	0.0
9	3 (2.0)	3 (2.0)	2 (0.5)	0.0	0.0	0.0
k_1	0	37.8	11.1			
k_2	18.9	13.3	10.0			
k_3	35.5	3.3	33.3			
R	35.5	24.5	23.3			
F 值	1.938	1.924	1.063			
P 值	0.340	0.342	0.485			

2.2.2 分化培养基及分化培养 根据白芨愈伤组织增殖培养试验,以MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L为固定因素,分别添加0、0.1、0.5、1.0 mg/L TDZ;再加20 g/L白糖和4.5 g/L琼脂;pH值5.8~6.0;灭菌。将愈伤组织切成0.5 cm×0.5 cm小块,接入分化培养基中培养,进一步筛选白芨愈伤组织分化培养基。

以上每个处理3瓶,每瓶10个接种点。每7天观察1次,50 d时记录各处理中诱导出外植体的数目、增殖系数和分化率。

愈伤组织诱导率=产生愈伤组织的外植体数/接入外植体数

愈伤组织增殖系数=培养后愈伤组织体积/接入时愈伤组织体积

愈伤组织分化率=出芽的愈伤组织数/愈伤组织总数

3 结果与分析

3.1 白芨愈伤组织的诱导

3.1.1 最佳外植体的筛选 将白芨无菌组培苗的根、假鳞茎和叶片分别接入按正交设计的9种处理培养基中培养。20 d时,部分根的根尖部位开始膨大;假鳞茎上端组织变得疏松膨大;叶片大部分发黄变黑,小部分保持青色。35 d时,整条根膨大,表面长出黑色的致密愈伤组织;假鳞茎的腋芽点出

现部分淡黄色疏松或致密的愈伤组织；只有一张叶片靠近叶柄部分开始膨大，产生淡青色的愈伤组织。50 d 时，记录诱导出愈伤组织外植体块数，分别统计根、假鳞茎和叶片的愈伤组织诱导率（表1）。

从表1可知，白芨不同的器官在不同植物生长调节剂种类和质量浓度的培养基培养，愈伤组织诱导率有很大差别。叶片只在7号培养基中诱导出愈伤组织，诱导率为3.3%。根在1、2、3、9号培养基中培养变黑死亡，在其余培养基中均有愈伤组织形成；但诱导率仅3.3%~23.3%；其中以7号培养基的愈伤组织诱导率最高，为23.3%。假鳞茎在1、2、3、9号培养基中没有愈伤组织产生，但从腋芽处长芽，其中3号培养基的芽长得最壮；在4、5、6、7、8号培养基中有愈伤组织产生，诱导率10.0%~83.3%；以7号培养基的愈伤组织诱导率最高，为83.3%。总体上看，不同类型外植体愈伤诱导率高低依次为假鳞茎>根>叶。因此，白芨的假鳞茎为愈伤组织诱导的最佳外植体。

3.1.2 植物生长调节剂对白芨愈伤组织诱导的影响
对表1诱导产生的愈伤组织的数量、颜色和质地进行观测发现，根、假鳞茎和叶在7号培养基上愈伤组织产量最高，为黄青色，质地致密，质量较好，利于继续培养（图1）；假鳞茎在6号和8号培养基上诱导出的愈伤组织，呈水渍状，质量差，不利于再次继代。而且，没有添加2,4-D的培养基均无愈伤组织产生，没有添加6-BA的培养基中愈伤组织质量差，添加NAA和6-BA培养基上的假鳞茎上长出的苗很壮。可见，2,4-D为愈伤组织诱导的主导因子，6-BA可提高愈伤组织的质量，NAA则可能具有壮苗作用。

根据表1中白芨假鳞茎的愈伤诱导率进行极差及方差分析，结果发现，2,4-D、NAA和6-BA 3因素对白芨愈伤组织诱导的影响均不显著，但影响

程度略有差异，影响最大是A因素，其次是B因素，影响最小为C因素。2,4-D、NAA和6-BA 3因素和质量浓度水平最佳组合为 $A_3B_1C_3$ ，即MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L为白芨愈伤组织诱导的最佳培养基。

3.2 白芨愈伤组织的继代增殖

白芨愈伤组织在不同质量浓度2,4-D培养基中进行继代增殖（表2），结果发现，培养基中不加2,4-D，愈伤组织基本不增殖，增殖系数为1.1；而且，大部分愈伤组织逐渐变黑并死亡；另有少数愈伤组织分化出芽。当2,4-D为1.0~2.0 mg/L时，愈伤组织质地紧密，呈青黄色，增殖系数约3.0；培养20 d左右，愈伤组织表面出现芽点，之后不断分化出芽。2,4-D为3.0 mg/L时，愈伤组织为淡黄青色、增殖系数最大，达7.8。当2,4-D质量浓度增加到4.0 mg/L时，愈伤组织淡黄色，增殖系数7.3；在随后的培养中，这些愈伤组织表现出分化能力弱、易死亡等现象。综上所述，低质量浓度2,4-D（1.0~2.0 mg/L）有利于白芨愈伤组织的分化，高质量浓度（4.0 mg/L）对愈伤组织有毒害作用，最适质量浓度为3.0 mg/L。因此，白芨最适愈伤增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 3.0 mg/L。

表2 植物生长调节剂对白芨愈伤组织增殖系数的影响 ($n=3$)
Table 2 Effects of plant growth regulators on proliferation coefficients of *B. striata* callus ($n=3$)

培养基	增殖系数	生长状况
MS+6-BA 1.0 mg/L	1.1	—
MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L	2.2	++
MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L	3.0	++
MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 3.0 mg/L	7.8	+++
MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 4.0 mg/L	7.3	+

“—”为愈伤组织出现死亡；“+”越多，说明愈伤组织生长越好

“—” means that callus dead; the more “+”, the better growth of callus

3.3 白芨愈伤组织的分化

根据白芨愈伤组织增殖培养试验，以MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L为固定因素，分别添加0、0.1、0.5、1.0 mg/L TDZ进行芽分化培养。结果发现，在分化培养基中培养15 d后，愈伤组织表面出现青色突起；20 d产生芽点；30 d长芽（图2）；50 d芽长有2~3片叶，株高1~3 cm。分化培养基中的TDZ质量浓度对白芨愈伤组织分化率和产芽数量的影响见表3。结果显示，白芨愈伤组织分



图1 白芨愈伤组织诱导

Fig. 1 Induction of *B. striata* callus

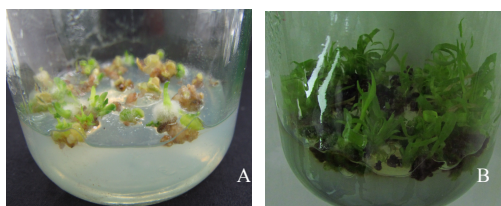


图2 愈伤组织分化成芽 (A) 和丛生芽的生长 (B)

Fig. 2 Callus tissue differentiated buds (A) and cluster buds growth (B)

表3 TDZ对白芨愈伤组织分化的影响 ($n=3$)

Table 3 Effect of TDZ on differentiation of *B. striata* callus ($n=3$)

TDZ / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	分化率 / %	分化芽数
0	83.3	2.1
0.1	93.3	3.3
0.5	100.0	5.3
1.0	100.0	6.2

化率和产芽数均随着 TDZ 质量浓度的增加而增加。当 TDZ 为 0.5 mg/L 时, 分化率达到 100%, 平均每块愈伤组织分化出的芽数为 5.3 个, 芽比较壮; 当 TDZ 为 1.0 mg/L 时, 虽然分化的芽数有所增加, 但芽变细弱, 有小部分芽出现玻璃化现象。因此, 白芨愈伤组织分化最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L。

4 讨论

在植物组织培养过程中, 植物激素对体细胞胚状体的发生与发育有很大影响。在培养初期, 一定量的生长素类物质是诱导脱分化、愈伤组织生长和胚性细胞形成的必要条件, 其中使用最多的是 2, 4-D^[12], 其次是 NAA^[13]。愈伤组织分化培养时期, 必须降低或完全去掉 2, 4-D 等生长素类物质, 才有利于胚状体的形成与发育^[14]。然而本实验发现, 当 2, 4-D 与 6-BA 比例为 2:1 时, 不仅诱导出愈伤组织, 还有利于愈伤组织分化成不定芽, 而且不定芽很快分化成丛生芽。因此, 可以考虑在白芨种苗组培快繁过程中, 在继代培养基中添加适当质量浓度及配比的 2, 4-D 与 6-BA, 以增加丛生芽数量及产率, 提高繁殖系数, 解决种苗快繁过程中繁殖系数低等关键性问题, 推进白芨组培苗工厂化生产进程。

另外, 在白芨愈伤诱导的正交试验中还发现, 在 NAA 与 6-BA 组合的培养基中 (处理 2 和 3),

无愈伤组织产生, 但假鳞茎芽的壮弱与 NAA 质量浓度成正相关, NAA 质量浓度越高芽越壮。在 2, 4-D 与 6-BA 组合的培养基中 (处理 4 和 7), 愈伤组织诱导率比较高, 质地紧密, 这一实验结果与刘艳丽等^[15]诱导盾叶薯蓣愈伤组织结果相同。在 2, 4-D 与 NAA 组合的培养基中 (处理 6 和 8), 愈伤组织诱导率较低, 质地疏松, 呈水渍状。2, 4-D 与 NAA 均为 2.0 mg/L、6-BA 为 0.5 mg/L 的培养基中, 没有愈伤组织形成, 但假鳞茎上长出较壮的小芽。由此可见, 不同生长素种类决定白芨假鳞茎不同的发育路径: 2, 4-D 使白芨假鳞茎脱分化形成愈伤组织, 也是获得高质量愈伤组织的关键因子; 而 NAA 对愈伤组织形成有抑制作用, 但能促进假鳞茎分化成苗, 且壮苗效果显著。

本实验以根、假鳞茎和叶片不同器官为外植体诱导愈伤组织, 以不同种类和质量浓度组合的植物生长调节剂为诱导剂, 统计不同器官的诱导率, 从而得到不同外植体和诱导剂对愈伤组织诱导和分化的影响。结果表明, (1) 假鳞茎易形成愈伤组织, 诱导率为 83.3%; 根的诱导率也有 23.3%, 但诱导出白色疏松的愈伤组织, 在其后的培养中, 分化率低; 叶片诱导愈伤组织较困难, 诱导率只有 3.3%; 因此, 根和叶片不适合作为愈伤组织诱导的外植体。(2) 在愈伤组织诱导的正交试验中, MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 2.0 mg/L 为白芨愈伤组织诱导的最佳培养基。(3) 当 2, 4-D 为 3.0 mg/L 时, 产生的愈伤组织颜色青黄、质地致密, 增殖系数高达 7.8。(4) TDZ 促进白芨愈伤组织分化成不定芽, 分化率为 100%, 产芽数 6.2 个/块, 考虑到生根苗的质量, TDZ 添加以 0.5 mg/L 为宜, 分化最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+2, 4-D 2.0 mg/L+TDZ 0.5 mg/L。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 18 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 广西中药资源普查办公室. 广西中药资源名录 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 1993.
- [3] 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]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2003, 26(4): 94-98.
- [4] 刘广斌, 黄 忠, 黄长干, 等. 天然植物白芨胶的功能及在化妆品中的应用 [J]. 日用化学品科学, 2005, 28(8): 22-24.
- [5] 彭丽丽, 刘祥东, 刘 华, 等. 白芨的组培快繁 (简报) [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 65.

- [6] 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.
- [7] 袁 宁, 何俊蓉, 何 锐, 等. 白芨组培快繁育苗技术研究 [J]. 西南农业学报, 2009, 22(3): 781-785.
- [8] 刘福平, 陈 淳, 许传俊. 过氧化氢与蝴蝶兰胚性细胞愈伤组织诱导 [J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1339-1344.
- [9] 杨玉红, 林 海. 金线兰愈伤组织诱导条件的优化 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3): 28-30.
- [10] 卢毕生. 石斛兰高效再生体系的建立于抗冻蛋白 (AFP) 基因转化的研究 [D]. 广州: 华南热带农业大学, 2005.
- [11] 李姣红, 张崇玉, 罗光琼. 氮磷钾配施对白芨产量和多糖的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1803-1805.
- [12] 郝建平, 徐丽霞, 杨东方. 北柴胡愈伤组织诱导、分化及不定芽增殖条件研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1234-1237.
- [13] 许明子, 李美善, 刘宪虎, 等. 高山红景天愈伤组织诱导及生长的研究 [J]. 延边大学农学学报, 2003, 25(4): 259-263.
- [14] 王 镨, 宋家乡, 付群英. 药用植物决明的愈伤组织诱导与生长增殖的培养条件研究 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 739-742.
- [15] 刘艳丽, 姚家玲, 张友德. 盾叶薯蓣愈伤组织诱导研究 [J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(4): 389-392.