

应用正交设计优化金线莲继代增殖和生根培养的研究

黄 敏, 梁 春 辉, 李 秀 平, 叶 建 荣, 揭 漫

(广东农工商职业技术学院 热作系, 广东 广州 510507)

摘 要:以金线莲试管苗为试材,应用 $L_9(3^4)$ 正交实验法研究不同因子对金线莲茎段继代增殖的影响及生根效果的影响,筛选出适宜于金线莲茎段增殖及生根的理想培养基。结果表明:试验因子对金线莲增殖系数的影响顺序为:6-BA>蔗糖>香蕉泥>NAA,适合金线莲茎段增殖的培养基为:MS+2.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+75 g/L 香蕉泥+28 g/L 蔗糖,增殖系数为 2.725;各因素对金线莲生根系数的影响程度大小依次为:基本培养基>6-BA>活性炭>IBA,适合金线莲组培苗生根的培养基为 1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+5 mg/L IBA+2 g/L 活性炭,平均生根数为 2.405。

关键词:金线莲;增殖;生根;正交设计

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0096-03

金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)属兰科开唇兰属多年生草本植物,别名金线兰、金丝草、金线入骨消等,是我国传统的珍贵药材,通常生长在荫蔽阔叶林下的肥沃腐叶土中,其全草均可入药,有清凉解毒、滋阴降火、消炎止痛等功效,且无毒副作用,在民间素有“药王”的美誉^[1-2]。金线莲种子较小,自然萌发率和繁殖率都极低^[3-4],野生金线莲无法满足市场需求,而植物组培是解决金线莲繁殖率低的重要手段。但目前在金线莲组培快繁生产种苗方面,仍存在着生长周期较长、增殖系数不高问题^[5]。现以金线莲组培苗为试材,采用正交实验的方法对其增殖培养基和生根培养基进行了筛选,旨在找出具有最佳组合效果的培养基,以为金线莲组培苗的高质优产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为经过初代培养的金线莲试管苗,挑选生长一致、健壮整齐的植株作为试材。

1.2 试验方法

将金线莲试管苗切成带有 1 个节的茎段,按照试验设计接种到相应培养基中。试验采用 4 因素 3 水平的

正交设计 $L_9(3^4)$ (表 1),共 9 个处理,各处理均以 MS 为基本培养基,琼脂粉 6.8~7.0 g/L, pH 5.8~6.0。接种后置于温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度 1 000~2 000 lx、光照时间 16 h/d 的环境中进行培养。每个处理接种 20 瓶,每瓶接 3 个茎段,接种 30 d 后观察不定芽的增殖状况。

表 1 金线莲增殖培养 $L_9(3^4)$
正交实验因素与水平

Table 1 Factor and level of $L_9(3^4)$ of
Anoectochilus roxburghii proliferation

水平 Level	因素 Factor			
	A 6-BA/(mg·L ⁻¹)	B NAA/(mg·L ⁻¹)	C 香蕉泥/(g·L ⁻¹)	D 蔗糖/(g·L ⁻¹)
1	1.5	0.25	25	25
2	2.0	0.5	50	28
3	2.5	1.0	75	30

挑选生长良好、植株健壮的金线莲组培苗,将其置于黑暗条件下预处理 48 h 后转接至生根培养基中,培养基配方按表 2 进行设计,每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 3 株苗,接种后置于温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度 1 000~2 000 lx、光照时间 16 h/d 的环境中进行培养。接种 30 d

表 2 金线莲生根培养 $L_9(3^4)$
正交实验因素与水平

Table 2 Factor and level of $L_9(3^4)$ of
Anoectochilus roxburghii root induction

水平 Level	因素 Factor			
	A MS	B 6-BA/(mg·L ⁻¹)	C IBA/(mg·L ⁻¹)	D 活性炭/(g·L ⁻¹)
1	1	0.1	1	1
2	1/2	0.25	2.5	2
3	1/10	0.5	5	3

第一作者简介:黄敏(1987-),女,硕士,助理实验师,现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail:huangmin0102@163.com.

基金项目:亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题资助项目(SKL-CUSAb-2013-08);国家自然科学基金资助项目(31371642);广东农工商职业技术学院科研重点资助项目(xyzd1308)。

收稿日期:2014-11-04

后统计生根情况。

2 结果与分析

2.1 试验因素对金线莲茎段增殖的影响

从表 3 增殖培养基的正交实验的水平和水平均值可以看出,在所选择的 4 个因子中,随着 6-BA 浓度的上升,增殖系数呈上升的趋势,且 3 个水平差异明显。随着 NAA 的浓度的上升,增殖系数呈先下降后上升的趋势,但 3 个水平差异并不明显。随香蕉泥的含量的上升,增殖系数呈先下降后上升的趋势,差异不明显;随蔗糖水平的上升,增殖系数也呈上升的趋势,且在 3 个水平上差异较大。由此可看出培养基的不同组分对金线莲增殖系数的影响是不同的。从表 3 还可以看出,不同试验因子对金线莲增殖系数的极差 R 顺序为:6-BA>蔗

糖>香蕉泥>NAA,因此在 4 个因子中,6-BA 对金线莲茎段增殖效果的影响最大,而 NAA 的影响最小。从试验结果看出,组合 7 的增殖效果最佳,增殖系数达 2.725。

2.2 试验因素对金线莲生根的影响

由表 4 可知,9 种处理中 5 号组合的生根效果最好,平均生根数达 2.405。随着 MS 和 IBA 浓度的升高,植株的生根数也随之提高(由相应 K 值可看出这一变化),而随着 6-BA 和活性炭浓度的升高,生根系数呈现先升高后下降的趋势,这也说明不同因子对金线莲生根的影响趋势是不同的。由表 4 的 R 值判断各因素对金线莲生根系数的影响程度大小依次为:基本培养基>6-BA>活性炭>IBA。

表 3 不同增殖培养基的增殖系数极差分析

Table 3 Range analysis on multiplying coefficient of different subculture mediums

组合号 Combination number	因子种类及代号 Codes of factors				增殖系数 Multiplication coefficient
	6-BA 6-Benzylaminopurine/(mg · L ⁻¹)	NAA 1-naphthleetic acid/(mg · L ⁻¹)	香蕉泥 Mashed banana/(g · L ⁻¹)	蔗糖 Sucrose/(g · L ⁻¹)	
1	1.5(1)	0.25(1)	25(1)	25(1)	1.258
2	1.5(1)	0.5(2)	50(2)	28(2)	1.500
3	1.5(1)	1.0(3)	75(3)	30(3)	1.937
4	2.0(2)	0.25(1)	50(2)	30(3)	2.250
5	2.0(2)	0.5(2)	75(3)	25(1)	1.667
6	2.0(2)	1.0(3)	25(1)	28(2)	2.044
7	2.5(3)	0.25(1)	75(3)	28(2)	2.725
8	2.5(3)	0.5(2)	25(1)	30(3)	2.533
9	2.5(3)	1.0(3)	50(2)	25(1)	1.900
K_1	4.687	6.233	5.835	4.825	
K_2	5.961	5.700	5.650	6.269	
K_3	7.158	5.881	6.329	6.720	
k_1	1.565	2.078	1.945	1.608	
k_2	1.987	1.900	1.883	2.090	
k_3	2.386	1.960	2.110	2.240	
R	0.821	0.178	0.227	0.632	

注:括号内数字表示激素含量水平,下同。

Note:Data in parentheses shows hormone levels,the same follow.

表 4 不同生根培养基的生根效果极差分析

Table 4 Range analysis on multiplying coefficient of different rooting mediums

组合号 Combination number	因子种类及代号 Codes of factors				平均生根数 Mean number of rooting
	基本培养基 Basic culture medium	6-BA 6-Benzylaminopurine/(mg · L ⁻¹)	IBA Indole-3-Butytric acid/(mg · L ⁻¹)	活性炭 Activated carbon/(g · L ⁻¹)	
1	1MS(1)	0.1(1)	1(1)	1(1)	1.267
2	1MS(1)	0.25(2)	2.5(2)	2(2)	2.083
3	1MS(1)	0.5(3)	5(3)	3(3)	1.630
4	1/2MS(2)	0.1(1)	2.5(2)	3(3)	1.667
5	1/2MS(2)	0.25(2)	5(3)	1(1)	2.405
6	1/2MS(2)	0.5(3)	1(1)	2(2)	2.152
7	1/10MS(3)	0.1(1)	5(3)	2(2)	2.222
8	1/10MS(3)	0.25(2)	1(1)	3(3)	2.222
9	1/10MS(3)	0.5(3)	2.5(2)	1(1)	2.267
K_1	4.980	5.156	5.641	5.939	
K_2	6.224	6.710	6.017	6.457	
K_3	6.711	6.049	6.257	5.519	
k_1	1.660	1.719	1.880	1.980	
k_2	2.075	2.237	2.006	2.152	
k_3	2.237	2.016	2.086	1.840	
R	0.577	0.518	0.206	0.312	

3 讨论与结论

培养基是金线莲组培苗的主要营养来源,培养基的因素和因素水平很大程度上决定了组培苗的生长情况及繁殖系数。而培养基的选择是一项繁琐而复杂的工作,若漫无目的地去寻找,将花费大量的人力和物力,且常常事倍功半。因此,采用科学的方法开展这项工作显得尤为重要,在筛选培养基时,使用正交实验设计,能大幅度减少了试验次数,节省成本^[6]。

该试验选择 6-BA、NAA、香蕉泥和蔗糖作为金线莲增殖培养的关键试验因素,探索和优化金线莲茎段继代增殖培养体系。试验结果表明,对金线莲茎段增殖起主要作用的是 6-BA,其次是蔗糖和香蕉泥,NAA 对金线莲茎段增殖的影响较小。在植物组织培养中,6-BA 作为最常用的细胞分裂素在植物组培中起着极其重要的作用,其主要生理功能是促进细胞分裂和分化,促进不定芽的生长,抑制顶端优势及显著改变其它激素等作用。在该试验中,6-BA 对金线莲茎段增殖的影响最大,充分发挥了其生理功能,增殖系数随着其浓度的升高而显著提高,这一结果与魏翠华等^[7]的研究结论一致,而对于 6-BA 与 NAA 的协同关系还有待进一步探究。从该试验中筛选出金线莲茎段增殖的最佳培养基配方为:MS+2.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+75 g/L 香蕉泥+28 g/L 蔗糖,增殖系数达 2.725。

生根培养是组培苗生产的重要阶段,该试验以基本培养基、6-BA、IBA 及活性炭作为试验因子,研究不同因子对金线莲组培苗生根的影响,从而筛选金线莲

最佳生根培养基,结果表明 4 个因子中,对金线莲生根效果影响从大到小依次为:基本培养基>6-BA>活性炭>IBA,筛选出金线莲最优生根培养基为:1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+5 mg/L IBA+2 g/L 活性炭。可见基本培养基对金线莲组培苗的生根是极其重要的,该试验中采用的是 MS、1/2MS、1/10MS 这 3 个水平,试验发现 1/2MS 是最利于金线莲生根的基本培养基,这与冉彩虹^[8]在金线莲生根的研究结果一致。MS 为高盐培养基,其钾盐、铵盐及硝酸盐含量均较高,在组培中应用最广,而其高盐含量并不利于生根,该研究也发现降低盐度的 1/2MS 更利于金线莲的生根。

参考文献

- [1] 马志杰,胡宏友. 民间药材金线莲研究动态[J]. 亚热带植物科学, 2002(31):27-31.
- [2] Fan Z N, Xiao H S, Fan X H, et al. Study on tissue culture of *Anoectochilus roxburghii* [J]. Journal of Fujian Teachers University, 1997, 13(2): 82-87.
- [3] 陈裕,管其宽. 金线莲生物学特性及生境特点的研究[J]. 亚热带植物通讯, 1994, 23(1):18-24.
- [4] 罗安雄,孟志霞,陈晓梅,等. 福建金线莲种子萌发及幼苗培养研究[J]. 中国药学杂志, 2012(15):11-13.
- [5] 周玉美,陈丽,崔永一,等. 台湾金线莲(*Anoectochilus formosanus*)快繁体系的构建[J]. 东北林业大学学报, 2009(12):43-47.
- [6] 刘瑞江,张业旺,闻崇伟,等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理, 2010(9):52-55.
- [7] 魏翠华,秦建彬,谢宇,等. 应用正交设计法优选台湾金线莲快繁培养基[J]. 中国农学通报, 2013(4):114-117.
- [8] 冉彩虹. 台湾金线莲组培苗生根培养研究[J]. 福建林业科技, 2009(4):158-160.

Study on Optimization of Proliferation and Root Induction Technique of *Anoectochilus roxburghii* by Orthogonal Design

HUANG Min, LIANG Chun-hui, LI Xiu-ping, YE Jian-rong, JIE Man

(Department of Tropical Crops, Guangdong Agricultural-Industrial-Business Polytechnic College, Guangzhou, Guangdong 510507)

Abstract: Taking the test-tube seedling of *Anoectochilus roxburghii* as material, the optimization of culture medium for adventitious buds proliferation and rooting of *Anoectochilus roxburghii* were studied by orthogonal design $L_9(3^4)$. The results showed that, the effect for proliferation culture was in the order of 6-BA>sucrose>mashed bananas>NAA, the optimizing medium for proliferation culture was MS+2.5 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA+75 g/L mashed bananas+28 g/L sucrose with the multiplication coefficient of 2.725. The effect of the factor for root induction as follow; the basic culture medium>6-BA>activated carbon>IBA, the optimizing medium for rooting culture was 1/2MS+0.25 mg/L 6-BA+5 mg/L IBA+2 g/L activated carbon and the number of roots per plantlets of 2.405.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii*; proliferation; root induction; orthogonal design