

正交实验法优化铁皮石斛生根培养体系

刘太林¹, 刘瑞凤², 桂毓³, 李黎¹, 马仲强¹

(1. 天津天狮学院 生物与食品工程学院, 天津 301700; 2. 天津韩家墅海吉星农产品物流有限公司, 天津 300401;

3. 天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384)

摘要:以铁皮石斛丛生芽为试材,通过三因素三水平正交实验方法优化生根培养体系,研究了不同添加物浓度对生根的影响,以筛选最适的铁皮石斛生根培养基。结果表明:香蕉泥对铁皮石斛生根有极显著的促进作用,培养基成分为 $1/2MS + 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 香蕉泥时,生根率可达到 100%,为最佳的生根培养基。

关键词:铁皮石斛;生根培养;正交实验

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0102-03

铁皮石斛为多年生附生兰科珍贵的药用植物^[1],具有一定的提高细胞免疫功能的作用^[2]。但其自然生长速度缓慢,繁殖率低,因而产量极少,导致国内外市场供应紧缺^[3]。

利用组织培养技术,对铁皮石斛进行集约化人工栽培,是保护和利用铁皮石斛资源的最为有效的途径^[4-5]。为保证铁皮石斛幼苗的存活率和移栽驯化期正常生长,生根培养至关重要^[6-7]。已有研究表明,1/2MS 培养基是在铁皮石斛幼苗的生根培养中使用较多的。NAA、IBA、香蕉泥等对铁皮石斛生根培养有促进作用,并且添加一定量活性炭也有益于石斛苗的生根^[9-11]。现利用经过伸长培养的铁皮石斛丛生芽进行诱导生根,并采用正交实验,研究了不同生长激素 NAA(萘乙酸)、IBA(吲哚丁酸)和果蔬类添加物香蕉泥对诱导生根的影响,以明确生根理想的培养基配方,从而解决铁皮石斛繁殖系数低和移栽成活率低等问题,进而为工厂化育苗提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试铁皮石斛组培芽取自天津天狮学院生物工程实验楼培养室及天津市北辰区董新房子村仙草园

培养室。选取茎粗约 0.1 cm,高度 2~3 茎节,叶片呈浓绿色,长势一致的铁皮石斛丛生芽作为试材。原铁皮石斛种子购于浙江省乐清市海上名山铁皮石斛种植专业合作社。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制备 试验用培养基按配方配制后,分装入培养瓶后经高压湿热(压力 0.12 MPa、温度 121 °C)灭菌 20 min,备用。

1.2.2 生根培养 选取长势一致的铁皮石斛组培丛生芽接入培养瓶,每瓶接种 3~5 株,每种培养基接种 5 瓶,重复 3 次。培养条件为温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度 1 500~2 000 lx,湿度控制在 60%~75%,光照 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。培养时间约 35 d,每 5 d 观察 1 次铁皮石斛根系生长情况。计算生根率,生根率(%) = 生根的丛生芽数/接种的丛生芽数 $\times 100$ 。

1.2.3 单因素试验 采用 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度的 NAA($0 \sim 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、IBA($0 \sim 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和不同量的香蕉泥($0 \sim 180 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)进行生根培养,研究 3 种因素对铁皮石斛生根率的影响。

1.2.4 正交实验设计 在前期单因素试验的基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,试验因素及水平见表 1。

1.2.5 验证试验 通过正交实验确定最佳生根培养基配比,再将最佳试验处理进行 3 次重复试验,检验该培养基在诱导生根培养时的可靠性。

1.3 项目测定

按照铁皮石斛的生根率占 50 分,根长度占

第一作者简介:刘太林(1983-),男,硕士,讲师,现主要从事药用植物栽培育种与生物技术与教学等工作。E-mail: huajizi83@126.com.

基金项目:国家星火计划资助项目(S2012A100014)

收稿日期:2016-09-26

表 1 正交实验的因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	NAA/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)	香蕉泥 Banana puree/(g·L ⁻¹)
1	1.5	1.0	90
2	2.0	1.5	120
3	2.5	2.0	150

30 分,根粗占 20 分不同权重,比较不同处理的生根情况,给出生根综合评价分。

1.4 数据分析

采用 Excel 2010 软件统计试验数据,并用 SPSS 22.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 正交实验

由表 2 可知,在添加 2.0 mg·L⁻¹ NAA, 1.5 mg·L⁻¹ IBA 和 150 g·L⁻¹ 香蕉泥的 1/2MS 培养基上,即试验 4 获得最高评分 98 分。说明影响铁皮石斛生根的主次因素为 C>A>B,即香蕉泥添加物>NAA>IBA。极差分析得出,铁皮石斛生根的最佳工艺条件为 A₃B₂C₃,即 2.5 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ IBA+150 g·L⁻¹ 香蕉泥添加物。

由表 3 可知,香蕉泥添加物对铁皮石斛生根影响在 0.01 水平下显著;NAA 对铁皮石斛生根影响在 0.05 水平下显著;IBA 对铁皮石斛生根的影响效果较小,这与极差分析方法结果一致。

2.2 验证试验

根据正交实验结果,准确地 1/2MS 培养基中添加 2.5 mg·L⁻¹ NAA、1.5 mg·L⁻¹ IBA、150 g·L⁻¹

香蕉泥进行重复试验。其生根率均为 100%,根长平均为 5.7 cm,生根数量较多,根粗壮(图 1)。说明该试验结果较稳定,生根率高,该培养基为最佳培养基。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验编号 Test number	A	空白 Blank	B	C	综合评价分 Comprehensive evaluation
1	1	1	1	1	59
2	1	2	2	2	81
3	1	3	3	3	86
4	2	1	2	3	98
5	2	2	3	1	67
6	2	3	1	2	79
7	3	1	3	2	90
8	3	2	1	3	89
9	3	3	2	1	82
K ₁	2.26		2.27	2.08	
K ₂	2.44		2.61	2.50	
K ₃	2.61		2.43	2.73	
k ₁	0.736		0.773	0.790	
k ₂	0.949		0.870	0.856	
k ₃	0.756		0.796	0.793	
R	0.35		0.34	0.65	

因素(主→次)

C>A>B

Factor(major→minor)

优方案 Optimal method

C₃A₃B₂

表 3 正交实验方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 Source of variance	SS	df	MS	F	显著性 Significance
A	0.020 42	2	0.010 21	9.19	*
B	0.019 29	2	0.009 64	8.68	
C	0.072 42	2	0.036 21	32.59	**
误差 Error	0.022 22	2	0.001 11		

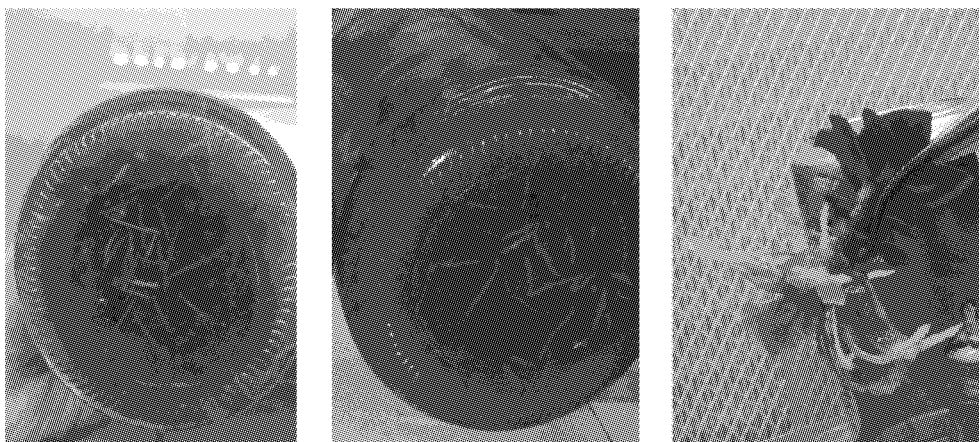


图 1 验证试验生根情况

Fig. 1 Rooting condition of verification test

3 讨论与结论

该试验通过正交实验研究了激素、有机添加物对石斛根部的影响,结果表明 NAA 和香蕉泥对铁皮石斛生根有较大的影响,这与邵世光等^[10]的研究结果相近。其中香蕉泥对生根的影响最显著,说明香蕉泥中所含的营养成分有利于铁皮石斛丛生芽分化出根。获得适合铁皮石斛生根的培养基,即 1/2MS 附加 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 香蕉泥。

试验结果表明,上述生根培养基配方对铁皮石斛生根具有较好的效果,可用于铁皮石斛组培生根的生产。但还可进一步设计试验,研究不同因素的交互作用,进一步用科学的方法计算出最佳配比,从而寻找生根的最优培养基配方,此种方法比单纯的观察和测量更加精确,也更具说服力。并且据报道铁皮石斛组培苗移栽成活率较低可能与缺少共生菌根有关^[12]。后续研究中可以把不同的真菌接入铁皮石斛试管苗中进行筛选,建立与铁皮石斛共生关系的真菌从而形成菌根。以便提高移栽铁皮石斛苗的吸收营养能力,提高铁皮石斛人工栽培效率。

参考文献

- [1] 邵华,张玲琪,李俊梅. 铁皮石斛研究进展[J]. 中草药,2004,35(1):109-112.
- [2] 张书萍,白石,陈丽静. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖[J]. 辽宁农业科学,2008(6):12-15.
- [3] 李燕,王春兰,王芳菲,等. 铁皮石斛化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2010,35(13):1715-1719.
- [4] 白美发,黄敏. 铁皮石斛组培技术研究[J]. 安徽农业科学,2008(36):15802-15803.
- [5] 刘世平. 不同培养基及培养环境对铁皮石斛幼苗生长的影响试验[J]. 林业调查规划,2012(3):39-42.
- [6] 黄万琳. 不同培养基激素配比及营养因子对云南热区铁皮石斛苗的影响[J]. 曲靖师范学院学报,2013(3):60-63.
- [7] 李宏杨,陈冠铭,杨志娟,等. 铁皮石斛组培苗生根条件优化研究[J]. 南方农业学报,2012(11):1668-1671.
- [8] 宋顺,许奕,王必尊,等. 不同培养基成分对铁皮石斛组织培养的影响[J]. 中国农学通报,2013(5):133-139.
- [9] 何俊平,涂小云. 不同培养基配方对铁皮石斛生根培养的影响[J]. 江苏农业科学,2013(2):57-59.
- [10] 邵世光,侯北伟. 基于正交实验法的铁皮石斛原球茎分化和生根条件研究[J]. 南京师大学报,2009(4):12-20.
- [11] 肖昌泰,毛昆明,杨自琼,等. 不同基质对铁皮石斛组培苗成活和生长的影响[J]. 现代农业科技,2012(4):147-149.
- [12] 伍建榕,韩素芬. 春兰与丝核菌共生菌根及结构研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(4):105-108.

Optimization of Rooting Culture for *Dendrobium candidum* Based on Orthogonal Experiment

LIU Tailin¹, LIU Ruifeng², GUI Yu³, LI Li¹, MA Zhongqiang¹

(1. Bioengineering and Food Engineering College, Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700; 2. Tianjin Hanjiashu Hlgreen Agricultural Products Logistics Co. Ltd., Tianjin 300401; 3. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: *Dendrobium candidum* multiple shoots were used as materials. Orthogonal experiment of three factors and three levels was used to optimize rooting culture system. The results showed that banana puree had a very significant promoting for rooting. With 1/2 MS + $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ banana puree medium, the rooting rate could reach 100%, which was the best medium for rooting.

Keywords: *Dendrobium candidum*; rooting culture; orthogonal experiment