

灯盏花不定芽无糖生根培养 的微环境调控技术研究*

杨 凯,王 荔**,杨艳琼,陈疏影,黄 平,刘 波
(云南农业大学农学与生物技术学院,云南 昆明 650201)

摘要:以灯盏花组培不定芽为材料,研究探讨了不同处理组合的无糖组织培养微环境调控对灯盏花不定芽的生根率的影响。结果表明:在一定 CO₂ 浓度范围内,通过对各处理间差异显著性 SSR 检验,处理 9 的灯盏花无糖组培苗生根率最高,长势最好,与其它处理组合比较达到显著水平。

关键词:灯盏花;无糖组培;生根率;正交设计

中图分类号:S 567. 239. 035. 3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004 - 390X(2007)03 - 0319 - 04

A Study on Micro-environment Control Technology of Adventitious Bud in Sugar-free Tissue Culture of *Erigeron breviscapus*

YANG Kai, WANG Li, YANG Yan-qiong, CHEN Shu-ying, HUANG Ping, LIU Bo
(Faculty of Agronomy and Biotechnology, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: In this research, adventitious bud of *Erigeron breviscapus* were used as materials. And studied the effect of different Level combination on development of adventitious bud of plant in sugar-free tissue culture of *Erigeron breviscapus*. Results showed that under the conditions of CO₂ concentration, the NO. 9 treatment may has the maximum rooting rate, grow best, and achieve a notability difference than other treatments with the statistic method of SSR.

Key words: *Erigeron breviscapus*; sugar-free tissue culture; rooting rate; orthogonal design

灯盏花 [*Erigeron breviscapus* (Van. .) Hand. Mazz.], 菊科飞蓬属植物, 又名短葶飞蓬、灯盏细辛、双葵花等, 始载《滇南本草》^[1], 全草或花入药, 灯盏花富含焦炔康酸、黄酮、灯盏花甲素、灯盏花乙素等, 可以治疗心血管疾病、脑梗塞及缺血性脑血管疾病^[2,3] 有活络止痛、散寒祛风之功效^[4], 灯盏花主要分布在云南, 资源量约占全国的 98%, 且主要是野生资源。灯盏花乙素是我国珍稀植物药, 云南产量占全国总产量 95% 以上, 但近年来因过度采挖, 野生资源面临枯竭。利用植物组培快繁技术对灯盏花的野生资源进行保护和合理开发利用, 已成为普遍关注的问题。但传统有糖组培技术是以糖作为植物体的碳源进行兼养生长(兼养型), 由

于培养基中糖的存在, 易造成微生物的污染, 植株生根率低, 植物生长发育迟缓或死亡, 过度苗成活率低, 从而造成生产成本高^[5]。严重地制约了微繁殖规模化、商业化生产的发展。

无糖组培快繁技术是日本千叶大学的古在丰树教授发明的一种全新植物组织培养技术^[4], 是环境控制技术和组织培养技术的有机结合。该技术采用 CO₂ 做为植物生长的碳源, 从而降低了在培养过程中的污染问题, 显著提高种苗质量, 缩短培养周期, 提高产苗率, 降低生产成本^[6]。该技术已在康乃馨^[7]、满天星^[8]、非洲菊^[9]、彩色马蹄莲^[10] 等花卉植物产业化生产上凸现了极大的优势。但目前, 该项技术在药用植物方面的应用在国

收稿日期: 2006 - 10 - 28

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30360122)。 ** 通讯作者 E-mail: Wangli5820840@yahoo. com. cn
作者简介: 杨凯(1979 -), 男, 云南大理人, 在读研究生, 主要从事药用植物资源评价与利用研究。

内尚未见报道。本研究通过对不同诱导灯盏花不定芽生根的最佳无糖培养条件的筛选,为探索一条适宜灯盏花无糖组培快繁的途径提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

灯盏花有糖组培产生的不定芽

1.2 方 法

试验设计: 4 个培养因子, A. 光照强度[A_1 : $39.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; A_2 : $56.8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; A_3 : $71.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], B. 激素浓度 (B_1 : NAA

0 mg/L ; B_2 : NAA 0.3 mg/L ; B_3 : NAA 0.6 mg/L), C. 光照时间 (C_1 : 12 h/d ; C_2 : 14 h/d ; C_3 : 16 h/d), D. 培养基质 (D_1 : 漂浮育苗基质; D_2 : 1 蛭石: 1 珍珠岩; D_3 : 草泥炭) 的 3 个处理水平进行正交实验设计 (见表 1), 加营养液 (以 MS 培养基的大量元素、微量元素、铁盐的浓度为准, 不加糖), 得到 9 个水平处理组合, 每个处理接种一盘 (苗盘规格: $50 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$), 每盘接种苗 150 个不定芽。置于组合式无糖培养箱中培养, 培养温度 (24 ± 2) $^\circ\text{C}$, CO_2 浓度 $1\ 000 \sim 1\ 200 \mu\text{L/L}$ 。

表 1 正交实验的因子与水平

Tab. 1 Factors and levels plan of orthogonal design

处理 treatment	A(光照强度) light intensity	B(激素浓度) hormone composition	C(光照时间) Irradiation time	D(培养基质) cultural media	水平组合 level combination
1	1	1	1	1	$A_1 B_1 C_1 D_1$
2	1	2	2	2	$A_1 B_2 C_2 D_2$
3	1	3	3	3	$A_1 B_3 C_3 D_3$
4	2	1	2	3	$A_2 B_1 C_2 D_3$
5	2	2	3	1	$A_2 B_2 C_3 D_1$
6	2	3	1	2	$A_2 B_3 C_1 D_2$
7	3	1	3	2	$A_3 B_1 C_3 D_2$
8	3	2	1	3	$A_3 B_2 C_1 D_3$
9	3	3	2	1	$A_3 B_3 C_2 D_1$

试验设备: 试验中使用特殊的无糖培养装置: 组合式植物光自养组培快繁装置、植物光独立培养微繁殖供气装置、植物光独立培养微繁殖培养箱等 (由协作单位昆明市环境科学研究所提供)。

观察记载: 观察记录灯盏花不定芽生根的起始时间, 培养 15 d 以后, 统计不同处理的生根数, 并使用 DPS 分析软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

培养 15 d 以后对灯盏花不定芽的根系生长情况进行观察统计: 处理 5, 8, 9 的生根率都高于 90%, 处理 1, 2, 3 的生根率都低于 50%。处理 5, 7, 9 的平均生根数在 4.5 根以上; 处理 5, 9 的平均大于 3 cm。

表 2 不同处理组合对灯盏花不定芽的生根率的影响

Tab. 2 Effect of different treatment on rooting rate of adventitious bud of *Erigeron breviscapus*

处理号 number of treatments	培养天数/d Number of treatments	根系生长情况 growth of root		
		根数/根 amount of root	根长/cm length of root	生根率/% rate of rooting
1	15	2.4	1.8	49.333
2	15	2.8	2.1	30.667
3	15	2.7	2.5	42.000
4	15	3.4	2.6	72.667
5	15	4.6	3.0	90.000
6	15	3.5	2.8	68.667
7	15	4.6	2.8	86.000
8	15	4.0	2.5	91.333
9	15	5.2	3.2	98.667

表3 生根率方差分析
Tab.3 Variance analysis of rooting rate

变异来源 origin of variation	平方和 ss	自由度 DF	均方 Ms	F 值 F value	显著水平 level of significance
第1列	4 184.997 23	2	2 092.498 62	1 513.432 94**	0.000 66
第2列*	2.765 23	2	1.382 62		
第3列	42.760 35	2	21.380 17	15.463 55*	0.060 74
第4列	469.421 23	2	234.710 62	169.758 19**	0.005 86
误差	2.765 2	2	1.382 62		
总和	4 699.944 05				

注:第2列F太小,设为空闲因子。note:F in seconal row is useless factor because of too least.

通过对生根率的方差分析,从F值可以看出,不同光照强度对灯盏花生根率的影响最大,达到极显著水平(见表3);不同基质对生根率的影响也达到极显著水平;不同光照时间的影响达到显著水平;不同激素水平的影响不显著。

通过对处理因子各水平的SSR检验,不同光照

强度对灯盏花无糖组培苗生根率的影响显著,71.4 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照强度的效果最好;不同培养基对生根率的影响显著,漂浮育苗基质效果最好;不同光照时间对灯盏花无糖组培苗生根率有影响,16 h/d的光照时间效果最好;不同激素浓度对灯盏花无糖组培苗的生根率的影响不显著(见表4)。

表4 不同处理因子各水平SSR检验
Tab.4 SSR analysis of every level of different factor

处理 treatments	均值 mean value	5%显著水平 5% level of significance	1%极显著水平 1% level of remarkable significance
光照强度 light intensity	3 2 1	92.00000 77.11134 40.66667	a b c
激素浓度 hormone concentration	2 3 1	70.66667 69.77800 69.33334	a a a
光照时间 irradiation time	3 1 2	72.66667 69.77766 67.33366	a ab b
培养基质 cultural media	1 3 2	79.33333 68.66667 61.77800	a b c

通过对各处理间差异显著性SSR检验,处理9的灯盏花无糖组培苗生根率最高,与其它处理组合比较达到显著水平(见表5)。

3 讨论

3.1 不同光照强度对灯盏花无糖组培苗生根率的影响

光环境是影响组培苗光合作用和生长的内在因素。而光照弱是有糖组培苗光合机构功能失常的原因之一,适度提高光照可使桅子组培苗结构发育更好地趋向于光合自养^[11]。MATYSIAK等^[12]

观察到,150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照与50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的相比显著提高了玫瑰组培苗的干重。在烟草组培苗生根阶段进行60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 两种光强处理,发现以光合兼养式,同时提高光强培养利于试管苗的移栽及随后的生长^[13]。增加光照对地黄组培苗也有促进生长的作用^[14]。本研究结果表明:光照强度对无糖组培苗的生根率具有重要的作用,在适宜的培养条件下,一定光照强度范围内,光照强度越高,生根率也越高。

表 5 不同处理组合 SSR 检验
Tab. 5 SSR analysis of different treatment

处理号 number of treatments	均值 mean value	5% 显著水平 5% level of significance	1% 极显著水平 1% level of remarkable significance
9	98.66700	a	A
8	91.33300	b	A
5	90.00000	b	A
7	86.00000	b	AB
4	72.66700	c	BC
6	68.66700	c	C
1	49.33300	d	CD
3	42.00000	e	DE
2	30.66700	f	E

3.2 灯盏花无糖组培苗根际微环境的调控

组培苗的生长不仅受空间环境因素的影响,也受根际环境的影响^[15]。有糖组培中,由于植株是以兼养的方式生长,就必须在培养基中加入蔗糖、激素、维生素等化学物质,由于蔗糖的存在,易造成微生物的污染。为了防止微生物的大量繁殖,就要求有糖组培必须在密封的小容器内进行。而且有糖组培中一般都以琼脂等凝胶剂作为支撑物,植株根系的发育在琼脂中通常是瘦小、脆弱的,当有糖组培苗移栽到土壤中时容易死亡。大量的实验证明,多孔的无机材料如石棉、蛭石、珍珠岩、砂等作为培养基质比凝胶状物质好,因为它们有良好的空气扩散系数,可使培养基中有较高的氧浓度,从而促进植株的根系发育,提高成苗率。而且无机材料的价格便宜,可以反复使用,从而有效的降低生产成本^[5]。本研究表明:以漂浮育苗基质为培养基质,混加营养液(以 MS 培养基的大量元素、微量元素、铁盐的浓度为准,不加糖),附加 0.3 mg/L NAA 的生根效果最佳,组培苗长势最好。

[参考文献]

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第 4 册)[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [2] 卢惠生. 不稳定型心绞痛 CD63, CD62P, C- RP 的变化及灯盏花的影响[J]. 心血管康复医学杂志, 2001, 10(5):415.
- [3] 刘红. 灯盏花注射液抗脑缺血作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(2):96.
- [4] 云南省卫生厅. 云南省药品标准[M]. 昆明:人民卫生出版社, 1974.
- [5] 肖玉兰. 植物无糖组培快繁工厂化生产技术[M]. 昆明:云南科技出版社,2003.
- [6] KOZAI T, KITAYA Y, FUJIWARA K. Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation[J]. Chiba University Press, 1995, (2): 384-568.
- [7] KOZAI T, IWANAMI Y. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon flux on plantlet growth of carnation (*Dianthus tuberosum* L.) in tissue culture during the preparation stage [J]. J. Jap. Soc. Hort. Sci, 1998, 57: 279-288.
- [8] 李宗菊,周应揆,桂明英,等. 满天星无糖组培快繁技术研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21(2):134-138.
- [9] 肖玉兰,张立力,张光怡. 非洲菊无糖组织培养技术的应用研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(4):408-410.
- [10] 屈云慧,熊丽,张素芳,等. 彩色马蹄莲组织苗无糖生根培养的环境控制[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(2):166-169.
- [11] SERRET MD, TRILLAS MI. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured in vitro [J]. International Journal of Plant Sciences, 2000, 161(2): 281-289.
- [12] MATYSIAK B, KUBIK M, PODWYSZYNSKA M, et al. Effect of photon flux density on CO₂ fixation and growth of *Rosa hybrida* White Gem' microcuttings [J]. Acta Horticulture, 1997, 418: 103-106.
- [13] KADLECEK P, TICHA I, HAISEL D, et al. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth [J]. Plant Science, 2001, 161(4): 695-701.
- [14] CUI YY, HAHN EJ, KOZAI T, et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in vitro [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 62(3): 219-226.
- [15] KIZAI T, FUJIWARA K, KITAGA Y. Modeling. Measurement and control in plant tissue culture [J]. Acta Hort, 1993, 343: 68-78.