

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.01.005

# 珍稀药材白及“两段式”组培快繁技术研究

刘春雷, 刘燕琴, 陈艾萌, 刘杰,  
陈玉涵, 李娜, 刘旭

重庆市药物种植研究所, 重庆南川 408435

**摘要:** 为简化白及组培苗生产过程, 提高移栽成活率, 以成熟白及种子为外植体, 采用“两段式”组培法, 通过不同激素配比及  $L_{16}(4^3)$  正交试验优化筛选萌发培养基和鳞茎诱导、壮苗培养基。研究表明: 以萌发时间、苗高、出苗率为指标统计, 白及种子在培养基  $1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+GA_3 0.1 mg/L+白糖 20 g/L$  上的萌发效果最佳; 鳞茎诱导、壮苗培养阶段的最佳培养基为:  $1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 0.8 mg/L+PP 333 0.5 mg/L+香蕉泥 30 g/L+白糖 30 g/L$ , 鳞茎分化时间仅为 20.7 d, 培养 60 d 后, 鳞茎分化率为 91%, 鳞茎直径达 6.91 mm, 组培苗生长健壮, 移栽至大田后成活率为 95%。实现了仅通过两段培养, 即可获得白及优质组培苗, 大大降低了育苗成本。

**关键词:** 白及; 组培快繁; 正交试验

**中图分类号:** S567

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2020)01-0030-07

药用植物白及为兰科白及(*Bletilla striata*)的干燥块茎, 是我国一种珍稀名贵的中药材, 具有收敛止血、消肿生肌的功效, 主治体内外出血等症<sup>[1]</sup>。白及胶还广泛应用于化妆品<sup>[2]</sup>、生物医学材料<sup>[3]</sup>、粘合剂<sup>[4]</sup>等, 具有较高的药用价值及工业价值, 同时白及花十分鲜艳, 也是较好的景观植物, 因此市场需求量极大, 市场价格也是节节攀升。近年来, 由于过度采挖, 白及野生资源濒临灭绝, 已被列为重点保护的药用植物之一<sup>[5-6]</sup>。

白及的种子细小且无胚乳, 在自然情况下难以萌发<sup>[7]</sup>。传统栽培主要靠分株繁殖, 其繁殖周期长、效率低, 且丰产性及抗逆性容易退化。组织培养技术具有繁殖速度快、效率高等优点, 适宜于白及工厂化育苗。许多研究者以白及的块茎、茎尖、芽及根等作为外植体<sup>[8-11]</sup>进行白及组织培养研究, 均获得了组培苗, 但普遍存在诱导分化困难、培养时间长等问题, 而采用白及种子作为外植体进行组培, 消毒方便、操作简单、萌发效率高<sup>[12]</sup>。因此, 目前白及的组织培养以种子作为外植体最为普遍, 其组培流程通常为: 无菌萌发→鳞茎诱导或增殖分化→诱导生根<sup>[13-16]</sup>, 均需至少 3 个步骤才能完成, 培养环节多、成本高, 不利于工厂化生产。如何简化培养过程, 更加快速获得优质的组培苗等问题亟待解决。本研究以白及种子为外植体, 通过无菌萌发后直接进行鳞茎诱导及壮苗培养获得组培苗, 同时采用不同激素配比及正交试验, 筛选培育白及组培苗的最佳条件, 以期建立一套优化的白及快繁体系, 为工厂化大规模生产优质种苗提供理论依据及技术支持。

收稿日期: 2018-06-06

基金项目: 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项资助项目(cstc2016shmszx80044)。

作者简介: 刘春雷(1987-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药资源及良种选育研究。

通信作者: 刘燕琴, 高级农艺师。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

试验采用的是成熟未开裂的白及蒴果(采于重庆市药物种植研究所标本园, 植物分类学研究员刘正宇鉴定为《中国药典》规定的白及种)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 无菌萌发培养基筛选

将成熟未开裂的白及果荚流水洗净, 然后用 75% 的酒精进行表面消毒 1~3 min, 再将果荚置于 0.1% 的升汞中浸泡 15~20 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 用无菌滤纸吸干表面水分以备接种; 在接种盘中采用无菌剪刀将经过消毒的果荚剪开小口, 利用无菌接种环蘸取种子均匀地涂抹在不同激素质量浓度配比的萌发培养基上(表 1), 每瓶播种 50 颗, 每种配方培养 20 瓶, 3 个重复, 以筛选出最佳的萌发培养基。所有培养基 pH 值为 5.8, 白糖 20 g/L, 培养温度为(25±2) °C, 光照强度(1 800±200) lx, 光照时间 12 h/d, 观测种子萌发时间(50% 种子萌发时间), 28 d 后统计苗高、生根率及出苗率。

表 1 白及萌发培养基

组别	培 养 基	组别	培 养 基
1	MS	3	1/2 MS+NAA 0.1 mg/L
2	1/2 MS	4	1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+GA <sub>3</sub> 0.1 mg/L

#### 1.2.2 鳞茎诱导及壮苗培养

白及种子无菌播种 4 周, 苗高 0.7~1.2 cm 时转接培养。采用 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) 正交试验设计, 以 NAA(A), 6-BA(B), PP<sub>333</sub>(C) 为因素, 每个因素设 4 个水平(表 2)。每瓶转接苗数 16 株, 每种配方转接 30 瓶, 3 个重复。所有培养基 pH 值均为 5.8, 活性炭 0.1 g/L、白糖 30 g/L、香蕉泥 30 g/L, 培养温度为(25±2) °C, 光照强度(2 500±200) lx, 光照时间 12 h/d。观测鳞茎分化时间(30% 白及苗分化出鲜茎所需时间), 60 d 后统计鳞茎直径, 鳞茎分化率及苗高。

表 2 试验因素及水平

水平	因 素/(mg·L <sup>-1</sup> )			水平	因 素/(mg·L <sup>-1</sup> )		
	NAA(A)	6-BA(B)	PP <sub>333</sub> (C)		NAA(A)	6-BA(B)	PP <sub>333</sub> (C)
1	0.3	0.2	0.2	3	0.5	0.8	0.8
2	0.4	0.5	0.5	4	0.6	1.2	1

#### 1.2.3 移栽与定植

将组培苗从培养室中移到常温下放置 1 周, 开瓶洗净, 定植到苗床上, 浇上定根水, 并用遮阳率为 40%~60% 的遮阳网遮阳, 每 3~5 d 浇水 1 次, 注意保持湿度。30 d 左右新根及新叶长出, 统计成活率。

### 1.3 数据统计分析

根据苑玉凤<sup>[17]</sup>的多指标正交试验分析方法, 采用排队评分法对正交试验结果进行极差和方差分析。每项指标的最优值定为满分 10 分, 其余指标值按与最优值的差异比例打分, 其中鳞茎分化时间最小值记为 10 分, 最大值记为 1 分; 平均苗高、鳞茎分化率、鳞茎直径的最大值均记为 10 分, 最小值记为 1 分。各试验所有指标的分数之和为综合得分, 综合得分越高, 说明鳞茎诱导和壮苗培养效果越好。试验数据采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 萌发培养基的筛选

将灭菌后的白及种子接种于萌发培养基上, 结果表明 4 种萌发培养基对白及种子的萌发影响均极具有

统计学意义( $p < 0.01$ ). 由表 3 可知, 4 号培养基的萌发启动时间为 13.37 d, 极显著低于其他培养基, 其余培养基的萌发时间依次为  $1 > 2 > 3$ . 4 种培养基的白及苗高和出苗率高低顺序均为  $4 > 3 > 2 > 1$ , 其中 4 号培养基白及平均出苗率达 93.22%, 平均苗高 0.8 cm, 极显著高于其他培养基(图 1, A). 因此, 白及种子萌发的较优培养基为  $1/2 \text{ MS} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg/L} + \text{GA}_3 \text{ } 0.1 \text{ mg/L} + \text{白糖 } 20 \text{ g/L}$ .

表 3 不同配方培养基对白及萌发的影响

编号	培养基	萌发时间/d	苗高/cm	出苗率/%
1	MS	24.43aA	0.31dC	70.22dC
2	1/2 MS	20.03bB	0.50cB	78.00cB
3	1/2 MS+NAA 0.1 mg/L	18.53cC	0.58bB	82.56bB
4	1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+GA <sub>3</sub> 0.1 mg/L	13.37dD	0.80aA	93.22aA
	F	236.36**	113.45**	87.78**

注: “\*\*”表示  $p < 0.01$  水平差异极具有统计学意义.

## 2.2 鳞茎高效诱导及壮苗培养基筛选

在白及鳞茎诱导及壮苗培养过程中, 不同激素组合对白及鳞茎诱导及壮苗影响较大, 其鳞茎分化起始时间、鳞茎直径及分化率等表现出了不同的变化规律, 为了筛选出白及鳞茎诱导及壮苗培养基, 采用排队法对试验结果进行综合评分, 其结果见表 4.

表 4 正交试验结果及评分

编号	试验结果均值				评分结果均值			
	鳞茎分化 时间/d	苗高/ cm	鳞茎分 化率/%	鳞茎直 径/mm	鳞茎分化 时间/d	苗高/ cm	鳞茎分 化率/%	鳞茎直 径/mm
1	51.3	3.58	36.0	2.07	1.0	2.2	1.5	1.5
2	35.7	4.48	53.9	4.40	5.6	5.0	4.3	5.6
3	42.3	4.34	72.4	4.17	3.6	4.6	7.1	5.2
4	46.3	3.92	74.1	4.71	2.5	3.2	7.4	6.2
5	45.3	3.78	53.8	2.15	2.8	2.8	4.3	1.7
6	42.5	4.40	45.8	1.82	3.6	4.7	3.0	1.1
7	34.5	3.64	46.4	2.11	5.8	2.4	3.1	1.6
8	36.5	4.40	64.3	2.16	5.3	4.8	5.9	1.7
9	47.5	4.40	47.3	2.10	2.1	4.7	3.3	1.6
10	35.5	3.68	49.1	1.94	5.6	2.5	3.5	1.3
11	38.0	4.05	52.7	1.88	4.8	3.6	4.1	1.2
12	47.3	4.22	38.9	1.94	7.8	4.2	1.1	1.3
13	49.0	3.53	33.7	2.07	1.6	2.0	1.2	1.5
14	45.5	4.59	69.2	5.06	2.8	5.3	6.6	6.8
15	20.7	6.09	91.0	6.91	10.0	10.0	10.0	10.0
16	37.0	4.47	59.9	2.35	4.9	4.9	5.2	2.0
平均数	40.9	4.22	55.5	2.99				
极大值	51.3	6.09	91.0	6.91				
极小值	20.7	3.53	33.7	1.82				
极差	30.6	2.56	57.3	5.09				

由综合评分结果可知(表 5), 在不同激素配比中白及的生根情况并不一定与综合评分呈正相关, 如 12, 13 号培养基, 可能由于根系生长过于旺盛, 在一定程度上影响了鳞茎分化和生长. 因此, 本研究以鳞茎分化时间、苗高、鳞茎分化率、鳞茎直径的综合评分作为指标, 筛选白及鳞茎诱导及壮苗培养基.

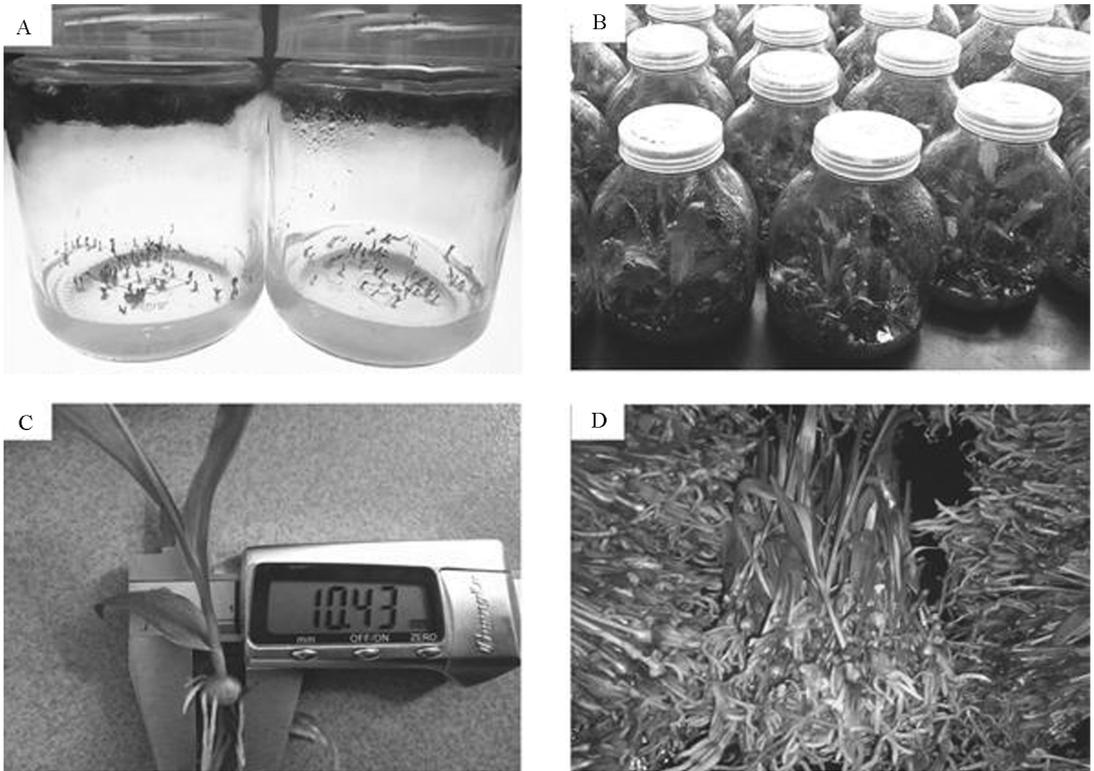
方差分析结果表明, 3 种激素对白及鳞茎诱导及壮苗具有极显著的影响(表 5). 由极差  $R$  决定影响程度, 其次主顺序为  $B > A > C$ , 即激素  $6\text{-BA} > \text{NAA} > \text{PP}_{333}$ , 由此可知激素  $6\text{-BA}$  对白及的鳞茎诱导及壮苗培养起主要作用, 随着  $6\text{-BA}$  质量浓度增加, 综合评分  $K$  值呈先增高后降低的趋势,  $0.8 \text{ mg/L}$  时最高. 适量添加  $\text{NAA}$  和  $\text{PP}_{333}$  对白及的鳞茎诱导及壮苗培养具有促进作用, 其质量浓度分别为  $0.6 \text{ mg/L}$ ,  $0.5 \text{ mg/L}$  时综合评分最高. 在本试验范围内, 得到白及鳞茎诱导及壮苗培养基较优的组合为  $A_4B_3C_2$ , 即  $1/2 \text{ MS} + \text{NAA}$   $0.6 \text{ mg/L} + 6\text{-BA}$   $0.8 \text{ mg/L} + \text{PP}_{333}$   $0.5 \text{ mg/L} + \text{香蕉泥}$   $30 \text{ g/L} + \text{白糖}$   $30 \text{ g/L}$ .

本试验中通过培养基  $1/2 \text{ MS} + \text{NAA}$   $0.6 \text{ mg/L} + 6\text{-BA}$   $0.8 \text{ mg/L} + \text{PP}_{333}$   $0.5 \text{ mg/L}$  进行白及的鳞茎诱导及壮苗培养, 鳞茎分化启动时间仅  $20.7 \text{ d}$ ,  $60 \text{ d}$  后统计鳞茎分化率、平均鳞茎直径、平均苗高分别为  $91.0\%$ ,  $6.91 \text{ mm}$ ,  $6.09 \text{ cm}$ , 均远高于正交设计中的任何一个组合(图 1, B-D).

表 5  $L_{16}(4^3)$  正交试验的极差分析

试验号	因 素			综合评分	根生长情况
	A	B	C		
1	1	1	1	6.2	—
2	1	2	2	20.5	++
3	1	3	3	20.6	+
4	1	4	4	19.3	+
5	2	1	2	11.5	++
6	2	2	1	12.5	+
7	2	3	4	12.9	—
8	2	4	3	17.6	—
9	3	1	3	11.7	++
10	3	2	4	12.9	++
11	3	3	1	13.7	+
12	3	4	2	9.6	++
13	4	1	4	6.3	++
14	4	2	3	21.5	++
15	4	3	2	40.0	++
16	4	4	1	17.1	+
$K_1$	66.6	35.7	49.5		
$K_2$	54.5	67.4	81.6		
$K_3$	47.9	87.2	71.4		
$K_4$	84.9	63.6	51.4		
极差 $R$	37.0	51.5	32.1		
$F$	9.30**	15.54**	8.40**		
最优组合			$A_4B_3C_2$		

注: \*\* 表示  $p < 0.01$  水平差异极具有统计学意义; 根生长情况分级: 生根少—, 根系生长良好+, 根系生长良好且粗壮++.

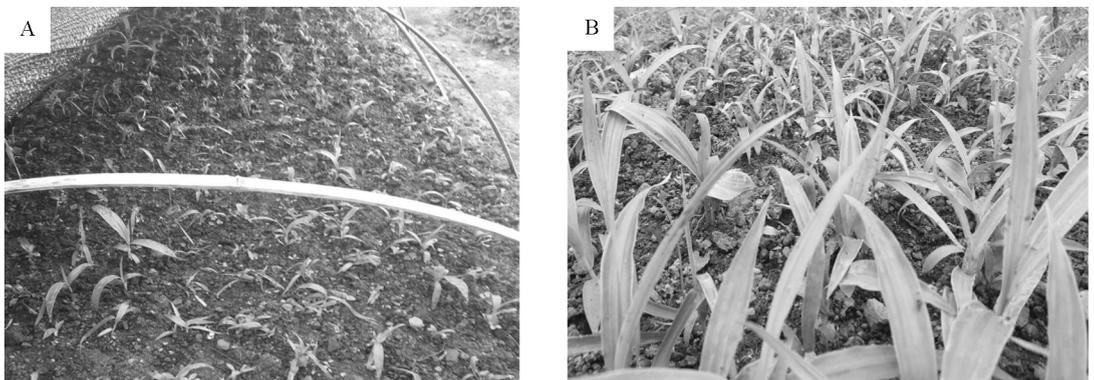


A. 白及种子经最适萌发培养基培养 28 d 后的情况; B. 白及种子萌发转接后经最适鳞茎诱导及壮苗培养基培养 60 d 后的情况; C. 经鳞茎诱导及壮苗后白及单株鳞茎直径; D. 经炼苗清洗后的白及组培苗。

图 1 白及“两段式”组培体系建立

### 2.3 移栽情况

将筛选出的最佳鳞茎诱导及壮苗培养基培养出的白及试管苗, 炼苗 7 d 后移栽至大田, 30 d 后植株健壮, 叶大浓绿, 成活率高达 95% 以上, 长势强, 后期生长良好(图 2)。相比之下, 未经鳞茎诱导及壮苗培养基培养的试管苗, 移栽后生根情况较差, 叶小, 成活率不高。



A. 白及组培苗移栽 30 d 后的生长情况; B. 白及组培苗移栽 6 个月后的生长情况。

图 2 移栽大田后白及生长情况

## 3 结 语

组织培养具有不受季节限制、生长周期短、生长势明显、不易积累病菌等优势。目前, 白及组培苗快繁的体系主要为种子无菌萌发、鳞茎诱导或增殖培养、诱导生根<sup>[18]</sup>, 培养环节多、培养时间长、成本高, 同时存在移栽成活率低等问题。本研究以白及种子为外植体, 通过优化组培技术, 建立了无菌萌发、

鳞茎诱导及壮苗培养两段式快繁体系, 其中萌发培养基为  $1/2$  MS+NAA 0.1 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+白糖 20 g/L, 鳞茎诱导及壮苗最适培养基为  $1/2$  MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 0.8 mg/L + PP<sub>333</sub> 0.5 mg/L+香蕉泥 30 g/L+白糖 30 g/L.

组培基本培养基的种类及成分对植物培养效果有着重要的影响, 在白及组织培养中主要采用的是 MS 和  $1/2$  MS 培养基. 本研究结果表明,  $1/2$  MS 培养基比 MS 更有利于白及种子萌发, 这与喻苏琴等<sup>[19]</sup>、张燕等<sup>[15]</sup>、王楷等<sup>[20]</sup>的研究结果一致, 可能是由于成熟的白及种子本身存储有一定的营养物质, 无需太多营养, 同时  $1/2$  MS 的有机盐质量浓度偏低, 形成的低渗透压环境有机物能够快速分解, 更加有利于白及种子的萌发.

6-BA 为细胞分裂素, 能够促进愈伤组织的诱导及分化, 研究表明低质量浓度的 6-BA 有利于白及种子萌发及芽的增殖, 反之则具有抑制作用<sup>[7,21]</sup>. 在本研究中, 3 种激素对白及鳞茎诱导及壮苗培养均具有极显著的影响, 其中以 6-BA 影响程度最大, 试验结果中随着 6-BA 质量浓度增大, 其综合评分之和呈先升高后降低的趋势, 其中以 6-BA 0.8 mg/L 各性状评分之和最高, 说明 6-BA 有利于白及的鳞茎诱导及生长发育, 但是质量浓度较高则会产生抑制作用.

PP<sub>333</sub> 是一种生长延缓剂, 在组织培养中具有生根壮苗、提高抗逆性的作用<sup>[22]</sup>. 但在白及组培中鲜见应用, 在本研究中 PP<sub>333</sub> 对白及鳞茎诱导及壮苗培养的各性状综合评分之和, 随着 PP<sub>333</sub> 质量浓度增加, 呈先增高后降低的趋势, 表明适当添加 PP<sub>333</sub> 有利于白及假鳞茎的诱导, 培养出健壮的组培苗.

假鳞茎作为营养器官, 对白及组培苗的成活率及后期生长发育有着重要的影响. 研究表明, 白及假鳞茎的形成除与外源激素相关外<sup>[23]</sup>, 还需尽可能延长培养时间<sup>[24]</sup>. 本研究在白及种子萌发转接后, 直接进行鳞茎诱导和壮苗培养, 阻止其分蘖增殖, 减少了白及幼苗的营养消耗, 从而促进其基部膨大形成假鳞茎, 缩短了白及组培育苗周期. 本研究建立的白及“两段式”组培快繁体系, 培养环节少, 90 d 即可获得优质健壮的组培苗, 适宜于白及工厂化育苗.

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 刘光斌, 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.
- [3] 侯绪浩, 刘学蔚, 彭凤梅, 等. 天然药物材料白及胶制备生物支架材料的实验研究 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2230-2233.
- [4] 孙达锋, 史劲松, 张卫明, 等. 白芨多糖胶研究进展 [J]. 食品科学, 2009, 30(3): 296-298.
- [5] 苏钦, 邱斌, 李云. 滇产白及类习用药材资源调查及市场利用评价 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(5): 49-52.
- [6] 周涛, 江维克, 李玲, 等. 贵州野生白及资源调查和市场利用评价 [J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(6): 28-30.
- [7] 李伟平, 田莎莎, 鲁光耀, 等. 利用人工种子技术快速繁殖白芨 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22): 3386-3390.
- [8] 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.
- [9] 余朝秀, 李枝林, 王玉英. 野生白芨组培快繁技术研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2005, 27(5): 601-604.
- [10] 田英翠, 袁雄强. 白芨组织培养快繁技术研究 [J]. 江苏农业科学, 2006, 34(4): 75-77.
- [11] 雷湘, 黄梦瑶, 昌艳霞, 等. 白及幼根组织培养技术研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(4): 613-614.
- [12] 韦卡娅, 刘燕琴, 秦静, 等. 白及组培外植体的筛选研究 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(5): 13-14.
- [13] 石云平, 赵志国, 唐凤鸾, 等. 白芨愈伤组织诱导、增殖与分化研究 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 349-353.
- [14] 张燕, 黎斌, 李汝娟, 等. 白芨种子的无菌萌发过程观察和组培快繁研究 [J]. 北方园艺, 2013(3): 158-160.
- [15] 张燕, 黎斌, 李思锋. 不同培养基上白芨的种子萌发与幼苗形态发生 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(8): 1584-1589.

- [16] 李 芳, 肖小君, 林忠全, 等. 野生红花白芨再生体系的建立和优化 [J]. 植物研究, 2015, 35(6): 825-831.
- [17] 苑玉凤. 多指标正交试验分析 [J]. 湖北汽车工业学院学报, 2005, 19(4): 53-56.
- [18] ZENG S, HUANG X, CHEN Z, et al. Asepsis Sowing and Tissue Culture of *Bletilla striata* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(9): 625-627.
- [19] 喻苏琴, 罗文秀, 张寿文. 不同培养条件对白芨种子萌发效应的研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(16): 8421-8422.
- [20] 王 楷, 李 玥, 张云峰, 等. 白芨种子的高效萌发及其无性繁殖体系的构建 [J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2014, 34(4): 71-78.
- [21] 赵漫丽, 黄春球, 李明静, 等. 添加剂对白芨组培的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2011, 26(6): 821-827.
- [22] 王志敏, 牛 义, 汤青林, 等. 多效唑对生姜试管苗生理特性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31(10): 39-42.
- [23] 李慧敏, 杨冠海, 李明静, 等. 白芨瓶内假鳞茎诱导研究 [J]. 南方农业学报, 2013, 44(10): 1607-1612.
- [24] 张爱丽, 王元忠, 黄衡宇, 等. 白芨人工快繁中有效增殖途径的研究 [J]. 中药材, 2018, 41(2): 266-271.

## Study on the Technology of “Two-Step” Tissue Culture and Rapid Propagation of *Bletilla striata*, a Rare Medicinal Plant

LIU Chun-lei, LIU Yan-qin, CHEN Ai-meng,  
LIU Jie, CHEN Yu-han, LI Na, LIU Xu

Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Nanchuan Chongqing 408435, China

**Abstract:** In order to shorten the formation process and increase the survival rate of *Bletilla striata* plantlets obtained in tissue culture, an L16(43) orthogonal experiment was made with mature seeds of *B. striata* as explants, in which a “two-step” tissue culture method was adopted to optimize the germination, bulb induction and strong plantlet media. The results showed that with germination time, shoot height and emergence rate as indexes, the best medium for *B. striata* seeds was 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+GA3 0.1 mg/L+sugar 20 g/L, and the best medium for bulb induction and strong plantlets was 1/2 MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 0.8 mg/L+PP333 0.5 mg/L+ banana mud 30 g/L+ sugar 30 g/L. The bulb differentiation time was shortened to 20.7 days. After 60 days of culture, the differentiation rate of bulb was 91%, and the diameter of bulb reached 6.91 mm. The tissue-cultured shoots was strong and their survival rate was 95% after being transplanted to the field. In conclusion, good plantlets of *B. striata* can be obtained with the “two-step” tissue culture method, which may greatly reduce the cost.

**Key words:** *Bletilla striata*; tissue culture and rapid propagation; orthogonal experiment