

人参组织培养的多因子正交试验研究*

王建华¹, 王 义¹, 孙国伟², 张美萍^{1**}

(1. 吉林农业大学生物技术学院, 长春 130118; 2. 长春市朝阳区富锋镇农业站, 长春 130103)

摘 要: 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计分析比较了 2,4-D, BA, NAA, KT 4 种激素浓度及其组合对人参组织培养的影响。经直观分析、方差分析和多重比较进行综合评价, 确定人参愈伤组织诱导的最优培养基为 MS + 2,4-D 3 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L, 人参愈伤组织生长的最优培养基为 MS + 2,4-D 3 mg/L + KT 1 mg/L, 人参不定芽发生的最优培养基为 MS + BA 1 mg/L。

关键词: 人参; 正交设计; 组织培养

中图分类号: S567.51

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2006)06-0648-04

Study on Tissue Culture of *Panax ginseng* by Applying Orthogonal Design

WANG Jian-hua¹, WANG Yi¹, SUN Guo-wei², ZHANG Mei-ping¹

(1. College of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Agrotechnical Experiment Farm, Fufeng Town, Chaoyang District, Changchun 130103, China)

Abstract: The effects of 2,4-D, BA, NAA and KT in different combinations and different concentrations on callus induction, growth and shoot propagation of *Panax ginseng* were studied by using orthogonal design $L_9(3^4)$. The data subjected to visual analysis, variance analysis and multiple comparison. The results indicated the optimum media were: MS + 2,4-D 3 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L for callus induction, MS + 2,4-D 3 mg/L + KT 1 mg/L for callus growth and MS + BA 1 mg/L for shoot propagation.

Key words: *Panax ginseng*; orthogonal design; tissue culture

人参是我国传统的名贵中药材,其有效成分为人参皂苷,具有补气、益肺、强壮、滋补、抗疲劳等功效。随着社会的发展,人参市场需求量日益增加。目前,可通过细胞工程技术人为调节人参细胞培养物生长量及皂苷产量来缓解人参的供需矛盾。但是要获得优质高产的细胞培养物,对培养条件必须进行筛选,而且筛选的工作量较大。正交设计是一种高效、快速的多因素试验方法,早在 20 世纪 70 年代,我国就将正交设计应用于植物组织培养^[1],现在正交设计在多种植物的细胞培养条件筛选中已得到广泛应用^[2-8],但在人参的组织培养中尚未见报道。本试验应用正交设计探讨不同植物生长调节物质及其不同浓度组合对人

参愈伤组织的诱导、生长及不定芽发生的影响,从而对其培养条件进行筛选,旨在为优化人参培养体系、进行大规模生产人参细胞培养物及人参皂苷提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

将人参 10 日龄实生苗(大田培育),流水冲洗干净,1 g/L $HgCl_2$ 浸泡 8 min。无菌水漂洗 5 次,取茎切成 1.0~1.5 cm 茎段,每瓶接种 5~6 段。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 采用 4 因素 3 水平即 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,各因素水平见表 1。

* 基金项目: 吉林省科技发展计划资助项目(20051113)

作者简介: 王建华(1979-),女,在读硕士,研究方向:药用植物细胞工程。

收稿日期: 2005-11-18 修回日期: 2006-04-16

** 通讯作者

1.2.2 培养基和试验因素的选择 以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L,pH 值调到 6.0(灭菌前)。根据经验选择 2.4-D(A),BA (B),NAA(C),KT(D) 4 种激素。按 $L_9(3^4)$ 正交实验方案添加到基本培养基中。每处理 10 瓶,重复 2 次。

表 1 因素与水平
Table 1. Factors and level mg/L

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
1	1	0	0	0
2	2	0.5	0.5	0.5
3	3	1	1	1

1.2.3 培养条件 培养温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,愈伤组织诱导为暗培养,愈伤组织生长与不定芽发生条件为光照 1 500 ~ 2 000 lx,光照周期为 14 h。

1.2.4 测定指标 在正交试验 $L_9(3^4)$ 中,外植体经过一定时期的培养,分别计算愈伤组织诱导率、愈伤组织生长率及不定芽增殖系数^[8]。

2 结果与分析

接种 1 个月后,统计愈伤组织诱导率,将愈伤组织继代于相同的培养基。继代 1 个月后统计愈伤组织的生长情况。再经过 2 个月,统计不定芽的数量。试验结果见表 2(表中数据为 2 次重复的平均值)。对数据进行直观分析、方差分析和多重比较。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验方案及试验结果
Table 2. $L_9(3^4)$ orthogonal design test and result

处理号 No.	因素 Factor				愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	愈伤组织生长率/% Callus growth rate	不定芽增殖系数/% Shoot propagation
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	0	0.19	0
2	1	2	2	2	51.4	0.89	3.1
3	1	3	3	3	46.7	1.33	4.6
4	2	1	2	3	77.0	3.04	1.7
5	2	2	3	1	80.9	2.05	3.0
6	2	3	1	2	83.9	2.31	3.6
7	3	1	3	2	92.5	3.64	1.7
8	3	2	1	3	96.8	4.07	2.9
9	3	3	2	1	96.8	3.07	3.9

2.1 直观分析

2.1.1 愈伤组织诱导率 人参愈伤组织诱导率的直观分析见表 3。根据极差的大小顺序:RA > RB > RC > RD 排出影响愈伤组织诱导率的因素主次顺序为 2.4-D > BA > KT > NAA,各因素的最优水平为 A_3 , B_2 , C_2 , D_2 , 即 2.4-D 3 mg/L, BA 0.5 mg/L, NAA 0.5 mg/L, KT 0.5 mg/L。

2.1.2 愈伤组织生长 由表 3 可知,4 因素的极差大小顺序为 RA > RD > RC > RB,因此,排出对愈伤组织生长影响作用的大小顺序为 2.4-D > KT > NAA > BA。各因素最优水平为 A_3 , B_2 , C_3 , D_3 , 即 2.4-D 3 mg/L, BA 0.5 mg/L, NAA 1 mg/L, KT 1 mg/L。

表 3 直观分析结果
Table 3. Result of Visual analysis

因素 Factor	愈伤组织诱导率 Callus induction rate				愈伤组织生长率 Callus growth rate				不定芽增殖系数 Shoot propagation			
	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	R	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	R	$\bar{A}_1$	$\bar{A}_2$	$\bar{A}_3$	R
A	32.67	80.57	95.35	62.68	0.80	2.46	3.59	2.79	2.57	2.73	2.78	0.21
B	56.48	76.33	75.77	19.85	2.29	2.33	2.23	0.10	1.12	2.97	4.00	2.88
C	60.22	75.05	73.32	14.82	2.19	2.33	2.34	0.15	2.13	2.88	3.07	0.94
D	59.22	75.88	73.48	16.66	1.77	2.29	2.81	1.04	2.27	2.77	3.05	0.78

注: $\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ 分别为各因素水平 1、水平 2、水平 3 的均值, R 为极差

Note: $\bar{A}_1, \bar{A}_2, \bar{A}_3$ indicate the average of level 1, level 2 and level 3, respectively; R indicates range

2.1.3 不定芽增殖 由表3可知,不定芽增殖率的极差大小顺序为 $RB > RC > RD > RA$ 。由极差大小排出影响不定芽发生因素主次顺序为 $BA > NAA > KT > 2.4-D$ 。各因素最优水平为 A_3, B_3, C_3, D_3 , 即 $2.4-D$ 3 mg/L, BA 1 mg/L, NAA 1 mg/L, KT 1 mg/L。

2.2 方差分析

方差分析结果见表4。由表4可知: $2.4-D$ 对人参愈伤组织的诱导影响最大, $2.4-D$ 与 BA 都达到了极显著水平($P < 0.01$)。 NAA 的影响最小,

但也达到了显著水平($P < 0.05$)。各因素的影响显著性依次为 $2.4-D, BA, KT, NAA$ 。对愈伤组织生长的影响以 $2.4-D$ 的作用最大,达到极显著水平($P < 0.01$), KT 次之,达到显著水平($P < 0.05$), BA 和 NAA 的影响不明显。各因素影响显著性依次为 $2.4-D, KT, NAA, BA$ 。对不定芽的发生 BA 影响最大,达到极显著水平($P < 0.01$)。 $2.4-D, NAA$ 和 KT 的影响不大,均未达显著水平($P > 0.05$),其中 NAA 影响稍大一些。各因素的影响显著性依次为 $BA, NAA, KT, 2.4-D$ 。方差分析的结果与直观分析的结果一致。

表4 方差分析结果

Table 4. Result of variance analysis

变异来源 Source	愈伤组织诱导率 Callus induction rate				愈伤组织生长率 Callus growth rate				不定芽增殖系数 Shoot propagation			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
A	12 884.32	2	6 442.16	104.58**	23.60	2	11.80	42.91**	0.16	2	0.08	0.19
B	1 532.39	2	766.20	12.44**	0.03	2	0.015	0.05	25.61	2	12.81	29.79**
C	789.29	2	394.65	6.47*	0.09	2	0.045	0.16	2.94	2	1.47	3.49
D	974.16	2	487.08	7.91*	3.27	2	1.635	5.95*	1.89	2	0.945	2.20
误差 Error	492.79	8	61.60		2.20	8	0.275		3.43	8	0.43	
总变异 Total	16 764.06	17			29.36	17			34.15	17		

注:“*”代表极显著水平;“**”代表显著水平

Note: “*” and “**” indicate the obviously significant differences and significant differences, respectively

2.3 主效应因素的多重比较

2.3.1 人参愈伤组织诱导 本试验结果表明, A 因素不同水平对愈伤组织的诱导差异显著。 A_2 的愈伤组织诱导率显著地高于 A_1 , 而 A_3 的愈伤组织诱导率极显著地高于 A_1 和 A_2 。由此可见, 无 $2.4-D$ 时愈伤组织的诱导受到抑制, $2.4-D$ 的浓度变化对愈伤组织诱导的影响很大。较高浓度的 $2.4-D$ 有利于人参愈伤组织的诱导。

2.3.2 人参愈伤组织生长 试验结果表明, $2.4-D$ 的有无及浓度变化使愈伤组织增重的差异达极显著水平。其中 A_2 浓度的 $2.4-D$ 愈伤组织的诱导率极显著地高于 A_1 浓度的 $2.4-D$ 的诱导率, 而 A_3 浓度的 $2.4-D$ 又极显著地高于 A_2 浓度的 $2.4-D$ 诱导率。这说明, 无 $2.4-D$ 时愈伤组织的生长受到显著的抑制, 随 $2.4-D$ 浓度的提高愈伤组织的生长显著地提高, 因此, 较高浓度的 $2.4-D$ 有利于人参愈伤组织的生长。

2.3.3 不定芽的发生 试验结果表明, B_3 浓度

的 BA 对芽的诱导率极显著地高于 B_1 浓度的 BA 对芽的诱导率, B_2 极显著高于 B_1 的诱导率, B_3 显著高于 B_2 的诱导率。由此可见, 无 BA 时不定芽的发生受到极显著的抑制, 随着 BA 浓度的提高, 不定芽显著增加。因此, 较高浓度的 BA 有利于不定芽的发生。

2.4 最优培养基的筛选

经直观分析、方差分析与多重比较, 确定人参愈伤组织诱导的最优培养基为 $MS + 2.4-D$ 3 mg/L + BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L; 人参愈伤组织生长的最优培养基为 $MS + 2.4-D$ 3 mg/L + KT 1 mg/L; 人参不定芽发生的最优培养基为 $MS + BA$ 1 mg/L。

3 讨论

植物生长调节物质对植物组织和细胞的增殖、分化起着关键的作用^[9]。在植物组织和细胞培养中, 必须进行激素种类和浓度的配比试验, 工

作量相当大。正交设计可以精简试验次数、克服在培养基配方设计上的盲目性、大大提高工作效率和试验的可靠性。正交设计等统计方法应用于植物离体培养的研究,国内最早见于广东省植物研究所的报道^[3],后来相继应用于许多植物的离体培养,并取得良好的试验效果,但在人参组织培养中尚未见到用该方法的报道。本试验采用正交设计的方法,仅用较少的试验组合,通过统计学分析,明确了人参愈伤组织的诱导、生长及不定芽增殖的主要因素,同时分别优化筛选了最佳培养基,简化了研究方案,加快了研究进程。当然,正交设计是一种均一性设计,不可能包含所有处理组合,所以得到的最佳配方在实际中的表现不一定是最好的。

本试验结果表明,在人参愈伤组织的诱导中各激素都产生了十分明显的影响,并且均随浓度的增加而加强。其中,以 2.4-D、BA 的作用最为显著,都达到了极显著水平,因此有必要对更低水平的 2.4-D 浓度或通过提高 BA 浓度来取代 2.4-D 做进一步的研究,以减少产物中 2.4-D 的含量及降低成本。在人参不定芽的发生中,BA 起了主导作用,但在实践当中,NAA 的添加对不定芽的发生也具有十分重要的作用,不定芽发生的关键在于两者的配比,而在分析当中 NAA 的影响并未达到显著水平,可能是由于激素间交互作用较大。另外,从理论和实践上讲,各激素在植物离体培养

中的作用都有一个随浓度增加而加强、达到最高值后再随浓度增加而减弱的过程,而本试验各项结果均未出现下降现象,可能是由于各激素所取浓度范围较小的原因,因此应扩大激素浓度范围,再做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 广东省植物研究所遗传室,广东师范学院数学系.用正交与不完全区组试验法提高籼稻花药培养成功率[J].广东师范学院学报,1976(1):100-112.
- [2] 汤绍虎,孙敏,周启贵,等.“雪青”梨的愈伤组织诱导研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2005,30(3):529-531.
- [3] 李成慧,蔡斌,单丽丽,等.应用正交设计法探讨蝴蝶兰叶片类原球茎的诱导[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2004,25(2):76-78.
- [4] 宋莉英,谭净,高峰.苦瓜愈伤组织诱导的多因子正交试验研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2004,29(3):462-465.
- [5] 陆美莲,许新萍,周厚高,等.均匀正交设计在百合愈伤组织培养中的应用[J].西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(6):699-702.
- [6] 郑启发,胡桂兵,陈大成,等.荔枝龙眼细胞悬浮培养和转基因研究[J].果树学报,2005,22(2):125-128.
- [7] 谢莉娟,韩蕾,钱永强,等.爆仗竹组培快繁 6-BA 与 NAA 组合浓度配比优化分析[J].核农学报,2005,19(3):181-185.
- [8] 徐晓峰,黄学林.应用正交设计建立青花菜植株的再生体系[J].广西植物,2002,22(6):513-516.
- [9] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学工业出版社,2003:28-29.
- [9] Sankar A A, Moore G A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 206.
- [10] 陈瑛.实用中药种子技术手册[M].北京:人民卫生出版社,1999:262.
- [11] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1999:598.
- [12] Yang X, Quiros C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers[J]. Theor Apple Genet, 1993, 86: 205.
- [13] 邱英雄,傅承新,孔航辉.杨梅不同品种的 ISSR 分析[J].农业生物技术学报,2002,10(4):343.

(上接第 647 页)