

正交设计在灯盏花组织培养中的应用*

黄平,王荔**,杨艳琼,陈疏影,刘雅婷,杨凯,刘波
(云南农业大学农学与生物技术学院,云南昆明 650201)

摘要: 针对灯盏花自然繁殖率低下的情况,探讨了利用植物组织培养方法解决灯盏花生产中繁殖的问题。按正交实验设计的原则,摸索出建立灯盏花组织培养技术体系的最佳条件;不定芽诱导的培养基是 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,生根培养基是 MS + NAA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L。

关键词: 灯盏花;组织培养;正交设计

中图分类号: S 567.035.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)02-0160-04

Application of Orthogonal Design in Tissue Culture of *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz

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

Abstract: Because the fruiting rate and germinative percentage of *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz are lower, tissue culture was explored to solve the propagating problem in the production. By using the orthogonal experiment design, the experimental result shows that the best culture medium of inducing adventitious bud was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, the best culture medium of root was NAA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz; tissue culture; orthogonal design

灯盏花是菊科短葶飞蓬属植物 [*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz], 又名灯盏细辛、东菊, 是广布于我国西部及西南部中山和亚高山开阔山坡草地和林缘的多年生草本植物^[1], 具有散热解表, 止痛舒筋, 活血治瘫的功效。自 1974 年以来, 灯盏花被云南省制药工业广泛用作制药原料, 灯盏花制剂 20 世纪 70 年代末开始应用于临床上, 主要用于治疗高血压、脑栓塞、多发性神经炎、慢性视网膜炎及脑血管意外所致的瘫痪症^[2-4]。据统计, 云南省每年都要收购 1 200 t 以上的灯盏花药材。近年来, 随灯盏花药材市场需求的扩大, 野生灯盏花采集过度, 导致灯盏花野生资源逐渐枯竭。保护灯盏花野生资源进行合理利用已成为人们普遍关注的焦点。目前, 国内学者针对灯盏花人工驯化繁殖

系数低的问题, 对灯盏花的生物学特性、人工栽培技术^[5-8]、组织培养技术^[9-13]等方面进行了广泛的研究, 但对于灯盏花组培快繁技术体系的建立, 技术还不够完善。本研究旨在利用植物组织培养技术和正交试验设计方法^[14-17], 提高筛选灯盏花组织培养最佳培养基的工作效率。本研究对保护灯盏花野生资源及药用植物种苗工厂化生产具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料选用采自云南省泸西县种植基地的灯盏花, 带土移栽于云南农业大学农学与生物技术学院试验地, 取其叶片作外植体。

收稿日期: 2005-11-03

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (3036122)

** 通讯作者

作者简介: 黄平 (1979-), 男, 湖北天门人, 在读硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究。

1.2 培养基

以 MS 为基本培养基,按不同处理方案添加不同类型的植物激素(见表1,表4),用 0.1N NaOH 和 0.1 N HCl 调节 pH 值为 5.8~6.0,在高压灭菌锅中高温(121℃)灭菌 20 min。

1.3 方法

1.3.1 材料处理

取叶片为外植体,按下列程序进行消毒:取材→自来水冲洗→5%洗衣粉水溶液漂洗3分钟→自来水冲洗干净→75%酒精消毒50秒→0.1%升汞溶液中8分钟→无菌水冲洗5次,然后在无菌工作台中将外植体切成 0.5 cm² 大小,每一处理分别接种 20 瓶,每瓶接种 4 块,置入 26℃ 恒温培养箱中闭光培养,待外植体出现分化芽点时转入(25±2)℃ 培养室进行光照培养,每天光照 10~12 h(光强为 1 500 lx)。

1.3.2 正交试验设计

(1)不定芽的诱导 以 6-BA, NAA 两因素作为参选因素,每因素取 3 个水平,选用 L₉(3⁴) 正交设计表安排灯盏花芽诱导的试验方案(见表1)。芽的诱导率作为统计指标,应用 DPS 3.01 软件进行统计分析。

(2)根的诱导 以 IAA, NAA 两因素作为参选因素,每因素取 3 个水平,选用 L₉(3⁴) 正交设计表安排灯盏花根诱导的试验方案(见表4)。根的诱导率作为统计指标,应用 DPS 3.01 软件进行统计分析。

1.3.3 炼苗和移栽

生根后的小苗长至 5~8 cm 时,打开封口膜进行炼苗,2~3 d 后,移入基质中进行培养,培养两周后,移栽到大棚中。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度配比对不定芽诱导率的影响

外植体接种两周左右,叶片开始膨大,逐渐生长出淡黄色颗粒状的愈伤组织,至 3 周时,长出绿色芽点,接种 4 周生长成不定芽,此时即可统计不定芽诱导率(见表1)。经过 6-BA, NAA 2 种激素 3 个水平 9 个浓度组合的正交试验,用 DPS 3.01 统计软件对试验结果进行直观分析和方差分析,灯盏花的直观分析见表2。极差第 1 列 > 第 2 列,根据极差的大小顺序排出影响芽诱导的因素主次顺序为 BA > NAA。各因素的最优水平分别为第 1 列水

平 1, 第 2 列水平 1, 即 6-BA 1.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L。方差分析结果见表 3, 由 F 值可知:对灯盏花芽的诱导,因子 6-BA 的影响最大,达极显著水平,因子 NAA 的影响小,未达显著水平。显然,方差分析与直观分析的结果是一致的。

表 1 诱导芽的 L₉(3⁴) 正交试验方案与试验及结果

Tab. 1 L₉(3⁴) orthogonal design test plan and result

处理号 No.	6-BA / (mg · L ⁻¹)	NAA / (mg · L ⁻¹)	出芽率 Frequency of bud clump induction
1	1	0.1	0.867
2	1	0.2	0.813
3	1	0.3	0.754
4	2	0.1	0.561
5	2	0.2	0.452
6	2	0.3	0.511
7	3	0.1	0.632
8	3	0.2	0.724
9	3	0.3	0.685

表 2 L₉(3⁴) 直观分析

Tab. 2 Visual analysis

总和 sum	因子 factor	水平 1 level 1	水平 2 level 2	水平 3 level 3
	第 1 列	2.434	1.524	2.041
	第 2 列	2.06	1.989	1.95
均值 average	因子	水平 1	水平 2	水平 3
	第 1 列	0.811 33	0.508	0.680 33
	第 2 列	0.686 67	0.663	0.65
因子 factor	极小值	极大值	极差 R	调整 R'
第 1 列 first line	0.508	0.811 3	0.303 3	0.273 2
第 2 列 second line	0.65	0.686 7	0.036 7	0.033 02

2.2 不同激素浓度配比对根诱导的影响

无根苗接种 1 周后即有白色的根的生长点冒出,至两周后,根长达 2 cm 左右,此时即可统计根诱导率(见表4),经过 IAA, NAA 2 种激素 3 个水平 9 个浓度组合的正交试验,用 DPS 3.01 统计软件对试验结果进行直观分析和方差分析,灯盏花的直观分析见表5。极差第 1 列 > 第 2 列,根据极差的大小顺序排出影响根诱导的因素主次顺序为 NAA > IAA。各因素的最优水平分别为第 1 列水

平3,第2列水平1,即NAA 0.5 mg/L, IAA 0.2 mg/L。方差分析结果见表6,由F值可知:对灯盏花根的诱导,因子NAA的影响最大,达极显著水平,因子IAA的影响小,未达显著水平。显然,方差分析

与直观分析的结果是一致的。

综上所述,筛选出最佳的不定芽诱导的培养基是MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L;最佳的生根培养基是MS+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L。

表3 方差分析
Tab.3 Variance analysis

变异来源 source	平方和 sum of squares	自由度 degrees of freedom	均方 e mean square	F-值 F-value	显著水平 level of significance
第1列 The first line	0.13887	2	0.06944	19.11009	0.00898
第2列 The second line	0.00207	2	0.00104	0.28534	0.76587
误差 Error	0.01453	4	0.00363		
总和 Corrected total	0.15548				

* $F_{0.05}(2,4) = 6.94$, ** $F_{0.01}(2,4) = 18$

表4 诱导根的 $L_9(3^4)$ 正交试验方案与试验及结果

Tab.4 $L_9(3^4)$ orthogonal design test plan and result

处理号 No.	NAA/(mg·L ⁻¹)	IAA/(mg·L ⁻¹)	生根率 frequency of root induction
1	0.1	0.2	0.6
2	0.1	0.5	0.46
3	0.1	1.0	0.553
4	0.3	0.2	0.64
5	0.3	0.5	0.714
6	0.3	1.0	0.586
7	0.5	0.2	0.864
8	0.5	0.5	0.914
9	0.5	1.0	0.953

表5 $L_9(3^4)$ 直观分析

Tab.5 Visual analysis

总和 sum	因子 factor	水平1 level 1	水平2 level 2	水平3 level 3
	第1列	1.613	1.94	2.731
	第2列	2.104	2.088	2.092
均值 Average	因子	水平1	水平2	水平3
	第1列	0.53767	0.64667	0.91033
	第2列	0.70133	0.696	0.69733
因子 Factor	极小值	极大值	极差R	调整R'
第1列 The First line	0.5377	0.9103	0.3727	0.33565
第2列 The Second line	0.696	0.7013	0.0053	0.0048

表6 方差分析

Tab.6 Variance analysis

变异来源 source	平方和 sum of squares	自由度 degrees of freedom	均方 e mean square	F-值 F-value	显著水平 level of significance
第1列 The first line	0.22028	2	0.11014	19.71572	0.00848
第2列 The second line	0.00005	2	0.00002	0.00414	0.99588
误差 Error	0.02235	4	0.00559		
总和 Corrected total	0.24267				

* $F_{0.05}(2,4) = 6.94$, ** $F_{0.01}(2,4) = 18$

3 结论

激素是植物组织培养器官分化的关键因素。器官的形成受制于培养基中不同激素的相对浓度配比,而不是这些物质的绝对浓度^[18]。本研究结果表明:在一定范围内,不同激素浓度配比对灯盏花不定芽和根的分化起着重要的调节作用。应用正交设计进行灯盏花组培快繁技术研究,试验数据经直观分析、方差分析,确立了主要影响因子,对试验的效应做出了准确的综合评价,从而筛选出灯盏花芽、根诱导的最佳培养基。采用正交设计可减少试验次数和试验分析方法的繁杂,克服在培养基配方设计上的盲目性,提高了工作效率和实验的准确性。显然,正交设计及其分析方法是优化灯盏花组织培养系统的有效工具。

[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] 云南省第一人民医院. 治疗瘫痪的中草药——灯盏花[J]. 中草药通讯,1972,3(2):47.
- [3] 赵新杰,夏华玲. 灯盏花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(9):566.
- [4] 云南省卫生厅. 云南省药品标准[M]. 北京:人民卫生出版社,1974.
- [5] YU H Y, CHEN Z L. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus*[J]. Acta Bot Yunnan,2002,24(3):115-120.
- [6] 仲艳丽. 灯盏花的利用及无公害栽培技术初探[J]. 安徽农业科学,2004,32(1):120-121.
- [7] 杨生超,杨忠孝,张乔芹,等. 灯盏花种植技术初探[J]. 中草药,2004,35(3):318-321.
- [8] 李育川. 灯盏花的特征特性及人工种植技术[J]. 云南农业科技,2004,(3):45-46.
- [9] 谢庆华,吴毅歆. 灯盏花茎段的离体培养和植株再生[J]. 植物生理通讯,2004,40(4):467.
- [10] 邱璐,瞿礼嘉,罗春梅,等. 灯盏花遗传转化中组织培养受体系统的研究[J]. 楚雄师范学院学报,2004,19(3):91-95.
- [11] LIN C, LIU H G, SU Y B, et al. A brief report on the rapid propagation of herbal *erigerontis*[J]. J Yunnan Agric Univ,2003,18(3):323-326.
- [12] YANG Y W, QIAN Z G. DUAN M. Primary study on tissue culture of *Erigeron breviscapus*[J]. J Yunnan Coll Tradit chinmed,2002,25(2):12-13.
- [13] 刘成洪,张孟魁,邓华,等. 灯盏花快速繁殖体系的建立[J]. 中草药,2005,36(4):597-599.
- [14] 陆美莲,许新萍,周厚高,等. 均匀正交设计在百合组织培养中的应用[J]. 西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(6):699-702.
- [15] 方开泰,马长久,李久坤. 正交设计的最新发展和应用(II)——均匀正交设计[J]. 数理统计与管理,1999,18(3):43-50.
- [16] 方萍. 实用农业实验设计与统计分析指南[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [17] 杜勤,王振华,张俊容. 正交设计在何首乌组织培养中的应用[J]. 中草药,1999,30(7):537-539.
- [18] 王荔,杨艳琼,杨德,等. 不同激素浓度及培养基对烟草愈伤组织分化的影响[J]. 云南农业大学学报,1999,14(4):371-375.