

文章编号:1000-2642(2006)05-0756-03

何首乌生根培养因子的优选研究

陈菊, 陈国惠*

(西南大学农学与生命科学学院, 重庆 400716)

摘要:以何首乌嫩茎为外植体,采用正交实验设计进行何首乌生根培养的研究。实验结果表明:影响何首乌生根培养因子的作用大小为培养基>IBA>蔗糖>NAA,诱导何首乌组培苗生根的最佳培养基为:1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 1.0 mg/L+30 g/L蔗糖。

关键词:何首乌;组织培养;正交设计

中图分类号:S 567.23⁹

文献标识码:A

OPTIMIZATION OF THE CULTURE CONDITIONS FOR THE ROOTING OF *POLYGONUM MULTIFLORUM* PLANTLETS

CHEN Ju, CHEN Guo-hui*

(Agronomy and Biotechnology College, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In an experiment with the orthogonal design, young shoots of *Polygonum multiflorum* Thunb were cultured on MS or 1/2 MS medium containing different concentrations of IBA, saccharose and NAA to induce rooting of the explants. Rooting induction was significantly affected by the concentrations of MS and IBA, followed by saccharose and NAA. The optimum combination of the culture condition was 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + IBA 1.0 mg/L + saccharose 30 g/L.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb; tissue culture; orthogonal design

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.) 别名首乌、赤首乌,为蓼科的多年生缠绕草本植物,是常用传统中药,药用部位主要为块根,其主要成分有:大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚蒽酮、二苯乙烯苷、芪类化合物、磷脂类及淀粉类成分。现代药理学研究显示^[1],何首乌具有抗衰老、抗菌、增强机体免疫力、抗癌等功效,营养价值高,可以用作多种美容保健用品的原料。

国内外对何首乌的组织培养与快速繁殖研究已有报道^[2-4],但都缺乏较深入的研究,培养基的筛选主要凭借经验,不但繁琐而且费时,不一定能取得最佳效果,因此制定一个科学的实验方案是相当必要

的,并将起到事半功倍的作用。正交设计是多因素分析的有利工具,它可以很方便的从众多因素中选出主要影响因素及最佳水平组合,能用较少的实验次数获得较多的信息,为组织培养选择最佳培养基提供可靠的方法。本文利用了正交实验的方法对何首乌的生根培养基进行优化选择,从而提高培养基优选的工作效率。

1 材料与方法

1.1 材料

何首乌外植体采自重庆北碚西南大学教学农场,

收稿日期:2006-06-30

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(8024)

作者简介:陈菊(1979-),女,贵州长顺人,西南大学硕士研究生,从事中药材栽培研究。

*为通讯作者。

选取生长健壮的何首乌幼嫩枝条,用自来水冲洗 30 min 后剪去展开的叶片,剪取 1~1.5 cm 大小的带 1~2 个芽的幼嫩茎段,浸入 70% 乙醇中 30~60 s,然后转入 0.1% 升汞溶液中灭菌 8~10 min,无菌水冲洗 5~6 次,用无菌吸水纸吸干表面水,接入附加 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基(糖 30 g/L,卡拉胶 4.6 g/L,pH 5.8~6.0)上,培养温度(22±1)℃,光照 12 h/d,光强 1 500~2 000 lx。将初代培养基上诱导生成的芽转接入继代培养基培养,每 20 d 继代一次,以获得优质健壮小苗,为生根实验作准备。

1.2 研究方法

将何首乌嫩茎接种于不同浓度的 MS 培养基、蔗糖以及不同浓度的生长素配比的生根培养基上,每个因子取 3 个水平。因子水平安排见表 1,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察对何首乌生根率的影响,以筛选最佳生根培养基。30 d 后统计其生根率。每种处理 10 瓶,每瓶 4 株苗,共 90 瓶。

表 1 $L_9(3^4)$ 因子水平表头设计^[5]

Table 1 Factors and levels in orthogonal experiments $L_9(3^4)$

因子水平	因子种类			
	A 培养基	B NAA/ (mg·L ⁻¹)	C 蔗糖/ (g·L ⁻¹)	D IBA/ (mg·L ⁻¹)
1	MS	0.2	15	0
2	1/2 MS	0.5	30	0.5
3	1/4 MS	0.8	45	1.0

1.3 培养条件

培养基 pH 值为 5.8~6.0, 121℃ 下高压灭菌 20 min,培养室的温度控制在 (23±2)℃,每日光照 12 h,光强强度 1 500~2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 统计生根率

接种约 10 d 后,切口处基本愈合,20 d 左右开始发根,30 d 后统计生根率,结果见表 2。

2.2 数据分析

2.2.1 极差分析

对实验结果进行极差分析,结果见表 3。

极差分析结果(表 3)表明,因子 A(基本培养基)和因子 D(IBA)对实验结果影响较大,由 K 值大小看出各因子的主次顺序是:因子 A > 因子 D > 因子 B > 因子 C,这表明了培养基中无机盐浓度对何首乌生根有重要影响,以 1/2 MS 为最佳,IBA 的影响较 NAA

大,蔗糖的影响最小。为了进一步反映各因子之间的差异,以便寻求最佳水平,采用方差分析进行了更进一步的精确分析(见表 4)。

表 2 生根培养基的配方正交表及生根情况

Table 2 Treatments and statistics of orthogonal experiment

试验 代号	因 子				生根 株数 /株	无根 株数 /株	生根 率 /%	平均根 数/(条 ·株 ⁻¹)
	A	B	C	D				
1	1	0.2	15	0	12	24	33.3	4
2	1	0.5	30	0.5	33	3	91.7	4
3	1	0.8	45	1.0	33	3	91.7	3
4	1/2	0.2	30	1.0	33	3	91.7	6
5	1/2	0.5	45	0	21	15	58.3	4
6	1/2	0.8	15	0.5	33	3	91.7	4
7	1/4	0.2	45	0.5	12	24	33.3	2
8	1/4	0.5	15	1.0	15	21	41.7	3
9	1/4	0.8	30	0	3	33	8.3	4

注:表中的 A,B,C,D 分别代表不同的 MS 培养基、NAA、蔗糖和 IBA,下同。

Note: The letters A, B, C, D in the table represent different MS medium, NAA, saccharose and IBA. Respectively. The same below.

表 3 $L_9(3^4)$ 极差分析

Table 3 The analytical results of LSR

	因 子			
	A	B	C	D
K 1	7.22	52.77	55.53	33.30
K 2	80.53	63.90	63.9	72.20
K 3	27.76	63.87	61.10	75.03
R	52.77	11.13	8.37	41.73

注:小写字母为 $\alpha=0.05$ 显著水平,大写字母为 $\alpha=0.01$ 极显著水平。

Note: The small letters stand for significantly differences at 0.05 level, and the capital letters stand for extremely significantly differences at 0.01 level.

2.2.2 方差分析

对表 2 的结果进行方差分析(见表 4)。由表 4 知,因子 A(基本培养基)和因子 D(IBA)作用极显著,因子 B(NAA)和因子 C(蔗糖)作用不显著。

表 4 何首乌试管苗生根率的方差分析表

Table 4 Variance analysis of concerning to *Polygonum multiflorum* Thumb rooting rates

因 子	SS	DF	MS	F
A	0.483 1	2	0.241 5	27.13 **
B	0.024 7	2	0.012 4	1.39
C	0.010 9	2	0.005 4	0.61
D	0.326 3	2	0.163 1	18.33 **
e	0.035 6	9	0.008 9	
Σe	0.844 9	17		

* $F_{0.05}(2,9)=4.26$, ** $F_{0.01}(2,9)=8.02$.

方差分析因子 A, D 都达到极显著水平, 而 B, C 效应均为不显著水平。对 A, D 因子进一步进行 Duncan, s 多重比较(表 3), 结果显示 A_1, A_2 与 A_3 差异显著, A_1 与 A_2 差异显著, 故取 A_2 , 即 1/2 MS; D_2, D_3 与 D_1 达极显著水平, D_2 与 D_3 差异不显著, 结合实际情况, D_3 水平下的生根率高与 D_2 水平的, 故取 D_3 。

2.3 筛选生根培养基

由极差分析和方差分析得出的生根培养基组合是 $A_2B_2C_2D_3$, 即 1/2 MS, NAA 0.5 mg/L, 蔗糖 30 g/L, IBA 1.0 mg/L, 但未在本实验中反映出来。而本实验的实际最优组合是 $A_2B_1C_2D_3$, 即最佳培养基为 1/2 MS, NAA 0.2 mg/L, 蔗糖 30 g/L, IBA 1.0 mg/L, 生根率达 91.7%, 平均发根条数为 6 条(表 2)。这正体现了正交实验的优点, 虽然不可能包含所有处理组合, 但仍可选择较好的处理组合。

3 讨论

本实验采用正交实验分别选取不同的影响因子进行实验, 筛选出诱导何首乌生根培养的最佳培养基为: 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + IBA 1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L, 生根率达 91.7%, 平均发根条数为 6 条(表 2)。实验结果说明, 正交实验设计与数据分析方法在组织培养应用上的优越性, 能大量减少实验次数, 从而节省了大量的人力、物力和财力。本研究若进行全部实验, 必须采用 $3^3 = 27$ 种配方, 而正交实验只需做 9 种, 较少次数的正交实验大体能反映全部组合实验的效果, 这在很大程度上提高了组织培养工作效率与准确性。

不定根的形成是组织培养过程中一个非常关键环节, 它直接影响到组培苗移栽成活率的高低, 关系到组织培养成败。有实验发现^[6], 降低无机盐浓度

有利于生根且发根多。在本实验中也发现采用 1/2 MS 培养基的生根率普遍高于 MS 培养基, 但采用 1/4 MS 培养基的生根率却不及 1/2 MS 培养基高, 显示无机盐浓度过低不一定有利于何首乌生根。组培苗的生根是一个复杂的生理生化过程, 除了受试管苗本身生理生化状态, 基本培养基, 生长调节物质影响外还与外部因素如光照、温度、PH 等有关。有研究发现(胡霓云), 把毛樱桃新梢接入附加 NAA 0.1 mol/L 的 1/2 MS 培养基中, 经 12 d 暗培养后发现经暗处理的生根率比不进行黑暗处理的提高 2%, 而且根出现的时间较对照提前 2 d。本实验仅研究了培养基的筛选, 而对光照和温度的影响没有进一步的研究, 在以后的实验中尚需深入。

参考文献:

- [1] 李玉芳, 何玄华. 何首乌现代研究进展[J]. 中成药, 1997, 16(5): 37-38.
- [2] 杜勤, 符红, 詹若挺, 等. 何首乌组织培养的研究[J]. 中药材, 1998, 21(3): 109-110.
- [3] 杨振德, 何际选, 黄寿先, 等. 何首乌组培快速繁殖技术的研究[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(3): 181-184.
- [4] 赵云峰, 席长法. 组培条件对何首乌愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 曲阜师范大学学报, 2004, 32(2): 80-82.
- [5] 明道绪, 王钦德, 耿社民, 等. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 303-317.
- [6] 罗士伟, 许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 43.

责任编辑: 夏娟