

药用植物单面针离体胚培养的研究

王 平¹, 马英姿¹, 王晓明¹, 左之文², 颜利玲²

(1. 中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004; 2. 株洲千金药业, 湖南 株洲 412003; 3. 湖南林业科学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 为了满足市场对单面针 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl 资源的需求, 解决单面针自然繁殖率低的问题, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计, 以单面针种子胚为外植体进行胚培养. 结果表明: 6-BA、NAA、消毒时间 3 因素的最佳水平组合为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.4 mg/L+消毒时间 8 min, 发芽率可达 86.7%.

关键词: 生物技术; 单面针; 胚; 正交设计; 组织培养; 发芽率

中图分类号: Q943.1; S759.82 **文献标志码:** A

In Vitro Embryonic Culture of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl

WANG Ping¹, MA Ying-zi¹, WANG Xiao-ming³, ZUO Zhi-wen², YAN Li-ling²

(1. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China; 2. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou 412003, Hunan, China; 3. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: In order to satisfy the market's demands for the resources of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl, this paper conducted some research on the problem of its natural propagation, cooperating with Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co. Ltd. Using its embryos as in vitro culture material, orthogonal design $L_9(3^4)$ as the test method, and setting up 6-BA, NAA and disinfected time as the three main factors (every factor having 3 levels). The results indicate that the best level combination is: MS+6-BA 1 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 8 min of disinfected time, the germination rate being 86.7%.

Key words: bio-technology; *Zanthoxylum dissitum* Hemsl; embryo; orthogonal design; tissue culture; germination percentage

单面针 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl 又名蚬壳花椒、大叶花椒、大叶枇杷等, 为芸香科花椒属木本植物, 生于山地林中或路旁, 主要分布在陕西、湖北、湖南、广西、广东及西南等省. 单面针含有多种生物碱成分, 其根、茎、叶均可入药, 具有治牙痛、腰痛、咳嗽、活血化痰、妇女月经过多和产后月经不调等功效^[1,2]. 由于它具有良好的药用价值, 因此在药物生产中被广泛应用, 随着需求量的加大, 野生资源已不能满足市场的需求, 利用生物技术方法对单面针的快速繁殖进行研究, 找出离体胚培养的最佳条件并实现规模化生产将是解决这一矛盾的有效途径. 为此, 笔者查阅相关资料^[3~8], 对单面针离体胚进行培养, 并利用正交实验得出了离体胚的最佳培养条件, 为今后单面针进行规模化生产奠定了理论基础.

1 材料与方 法

1.1 实验材料及其处理

实验材料来自湘西, 单面针种子由千金药业有限公司提供. 用解剖刀切破种壳, 从胚囊中取出胚, 然后用

收稿日期: 2007-03-13

基金项目: 湖南省自然科学基金项目“药用植物单面针的生物学特性研究(07JJ5041)”; 株洲市重点科技项目“药用植物单面针组培技术中试研究及组培苗栽培技术示范”; 株洲千金药业股份公司合作项目“单面针人工快繁技术中试研究”.

作者简介: 王 平(1964-), 男, 湖南澧县人. 教授, 博导, 主要从事生物技术、环境科学方面的教学与科研工作.

70%酒精进行消毒,再用 0.1%氯化汞进行表面消毒,用无菌水漂洗 3~4 次,再用无菌滤纸或纱布吸干,备用^[9]。

1.2 培养基制作

根据培养基的配方制备 MS 培养基,调 pH 值为 5.8~6.0,用 50 mL 三角瓶分装,置于 LDZX-40 II 型自动电热压力蒸汽灭菌锅,于 1.06 kg/cm² 的压力下 121 ℃ 消毒 25 min。

2 结果与分析

2.1 不同种类及质量浓度的激素对离体胚培养的影响

实验以单面针离体胚为外植体,用 MS 固体培养基进行培养,在培养基中添加不同种类及质量浓度的细胞分裂素和生长素,观察离体胚的发芽率和污染率,实验结果见表 1~3。从表 1、表 2 的对比中可以看出,当保持 NAA 质量浓度一致,改变 6-BA 的质量浓度时,平均发芽率为 48%,最高发芽率为 65%;用 KT 作为胚培养激素时,平均发芽率只有 39.2%,最高发芽率为 60%,并且各质量浓度的 6-BA 对芽的诱导率都要比相应质量浓度的 KT 的高,说明各质量浓度的 6-BA 对发芽率的影响要比 KT 的更为明显。当每组 6-BA 的质量浓度保持一致时,取相同质量浓度的生长素 NAA、IBA 作对比实验,从表 1 和表 3 的比较分析同样可以得出,NAA 对发芽率的诱导要比 IBA 的效果好,因此在单面针离体胚培养过程中选用 6-BA 和 NAA 作为单面针离体胚培养激素是比较合适的。

2.2 最佳培养方案的确定

实验选择 6-BA (A)、NAA (B)、消毒时间(C)3 因素,每个因素 3 水平,选用 L₉(3⁴)正交表做正交实验,并对实验数据用 SPSS 统计软件进行方差分析,同时用 LSD 法对每因素各水平之间进行多重比较^[10]。采用 MS 琼脂培养基(7.5 g/L 琼脂,20 g/L 蔗糖,pH5.8),于(25±1)℃、2 000 lx 光照培养,15 d 后统计发芽率,实验结果见表 4 和表 5。

通过对表 4 数据的直观分析可以得出各因素内各水平之间的极差(R)。极差的大小反映了该因素的影响程度,极差大的因素对实验结果的影响也大。从 R 的大小可知,对发芽率影响因素的主次依次是:6-BA>NAA>消毒时间。从表 4 还可得出各因素的最优水平组合为 A₁B₂C₂,即 6-BA 为 1 mg/L,NAA 为 0.4 mg/L,消毒时间为 8 min,该组合对离体胚培养的发芽率可达 86.7%。

表 1 6-BA 与 NAA 的组合

Table 1 The combination of 6-BA and NAA

培养基	6-BA 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	NAA 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数	发芽率 /%	污染率 /%
MS	0	0	30	10.0	10.0
MS	1	0.1	30	23.0	26.7
MS	1	0.2	30	65.0	22.5
MS	2	0.1	30	50.0	23.3
MS	2	0.2	30	54.0	20.0

表 2 KT 与 NAA 组合

Table 2 The combination of KT and NAA

培养基	KT 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	NAA 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数	发芽率 /%	污染率 /%
MS	1	0.1	30	20.0	16.7
MS	1	0.2	30	60.0	20.0
MS	2	0.1	30	40.0	33.3
MS	2	0.2	30	36.7	23.3

表 3 6-BA 与 IBA 组合

Table 3 The combination of 6-BA and IBA

培养基	6-BA 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	IBA 质量浓度 (mg·L ⁻¹)	接种数	发芽率 /%	污染率 /%
MS	1	0.1	30	16.7	33.7
MS	1	0.2	30	46.7	26.7
MS	2	0.1	30	50.0	30.0
MS	2	0.2	30	23.3	36.7

表4 正交实验结果和直观分析

Table 4 The result of orthogonal test and ocular analysis

实验序号	因素A		因素B		因素C		因素D		实验结果		
	水平号	6-BA 质量浓度 / (mg · L ⁻¹)	水平号	NAA 质量浓度 / (mg · L ⁻¹)	水平号	消毒时间 / min	空白列水平号	接种数	发芽数	发芽率 / %	
1	1	1	1	0.2	1	6	1	30	20	66.67	
2	1	1	2	0.4	2	8	2	30	26	86.67	
3	1	1	3	0.6	3	10	3	30	16	53.33	
4	2	3	1	0.2	2	8	3	30	17	56.67	
5	2	3	2	0.4	3	10	1	30	18	60.00	
6	2	3	3	0.6	1	6	2	30	7	23.33	
7	3	5	1	0.2	3	10	2	30	13	43.33	
8	3	5	2	0.4	1	6	3	30	15	30.00	
9	3	5	3	0.6	2	8	1	30	5	16.67	
K ₁		2.066 7		1.670 1		1.200 0		1.433 4			
K ₂		1.403 4		1.766 7		1.603 5		1.533 3		T=4.370 1	
K ₃		0.900 0		0.933 3		1.566 6		1.403 4			
\bar{K}_1		0.688 9		0.556 7		0.400 0		0.477 8			
\bar{K}_2		0.467 8		0.588 9		0.534 5		0.511 1			
\bar{K}_3		0.300 0		0.311 1		0.522 2		0.467 8			
R		1.166 7		0.833 4		0.403 5		0.129 9			

表5 方差分析的结果说明,因素A(6-BA)和因素B(NAA)对胚的发芽率影响显著($p \leq 0.05$).经LSD多重比较得出,因素A的各水平之间存在显著差异($p = 0.02, 0.035, 0.007 < 0.05$);因素B的水平1,2之间无显著差异,2,3之间和1,3之间均存在显著差异;因素C各水平之间无显著差异^[11,12].由此可知,在单面针的离体胚培养过程中,要得到较高的发芽率,6-BA应当选用1 mg/L,生长素NAA质量浓度选用0.2或0.4 mg/L对实验影响不大,消毒时间(6、8、10 min)对结果的影响不明显.从正交实验的方差分析可知,生长素NAA质量浓度在0.2~0.4 mg/L范围都较适合胚的生长,但从苗的生长速度来看,NAA为0.4 mg/L时生长较好(见图1、图2),因而激素NAA选0.4 mg/L较为合适.

表5 L₉(3⁴)实验结果方差分析Table 5 Variance analysis to the results L₉(3⁴)

变异来源	离差平方和	自由度	均方差	均方比	概值
因素A	0.228	2	0.114	73.901	0.013
因素B	0.139	2	0.069	44.838	0.022
因素C	0.033	2	0.017	10.736	0.085
误差	0.003	2	0.002		

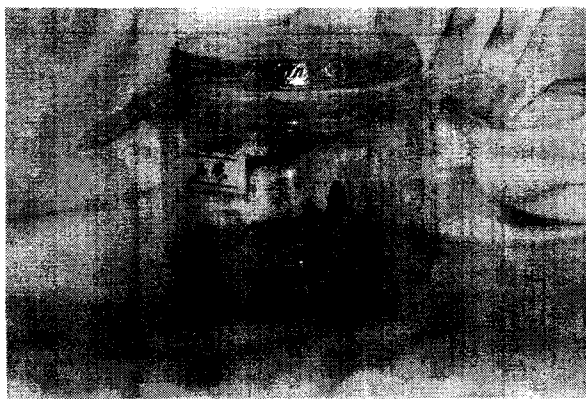


图1 NAA为0.4 mg/L时,20 d后的生长情况
Fig. 1 The growth after 20 days when NAA being at 0.4 mg/L

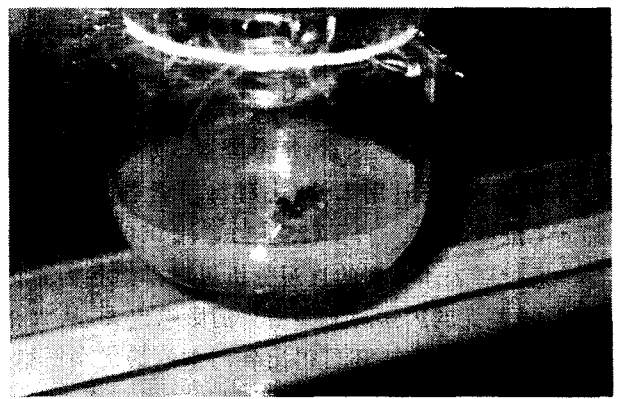


图2 NAA为0.2 mg/L时,20 d后的生长情况
Fig. 2 The growth after 20 days when NAA being at 0.2 mg/L

3 小结

通过实验对适合单面针生长的各种激素进行了筛选,并通过正交实验得出了最佳培养条件.综合正交实验的直观分析和方差分析结果,6-BA、NAA、消毒时间 3 因素的最佳水平组合为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.4 mg/L+消毒时间 8 min,该组合对单面针离体胚培养的发芽率可达 86.7%.这个实验结果为单面针这一紧缺资源的快速繁殖、无性系的建立以及基因转化遗传育种都奠定了良好的基础.

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海:人民出版社,1997.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1975.
- [3] 陈建华,罗丽华,苏冬梅,等. 不同板栗品种的组培技术[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(6):83-87.
- [4] 金晓玲,何平,张日清. 榉树茎尖的培养[J]. 中南林学院学报,2005,25(1):38-41.
- [5] 张进,张燕,吴国良,等. 核桃茎段组织培养[J]. 经济林研究,2005,23(2):36-38.
- [6] 李际红,周庆和,谢会成. 驱蚊香草的组织培养技术[J]. 中南林学院学报,2005,25(2):92-96.
- [7] 郑子成,何淑勤. 大果沙棘组织培养技术[J]. 中南林学院学报,2003,23(4):42-45.
- [8] 李小川,张华通,周丽华,等. 迷迭香带芽茎段的组织培养技术[J]. 经济林研究,2006,24(3):15-20.
- [9] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,1992.
- [10] 庄楚强,吴亚森. 应用数理统计基础[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [11] 林杰斌,陈湘,刘德明. Spss11 统计分析实务设计[M]. 北京:中国铁道出版社,2002.
- [12] 汤绍虎,孙敏,刘照会,等. 采用正交设计快速获得梨无菌外植体的研究[J]. 西南师范大学学报,2004,4(2):282-284.

[本文编校:谢荣秀]

(上接第 129 页)

5 结论与讨论

(1)本文中首先建立了全面的森林火险区划评判因子体系,利用 15 个指标来对森林火险进行区划,并通过 GIS 来对数据进行收集、分析和处理,较前人研究时用 5~7 个指标更具全面性和科学性.

(2)聚类分析法通过研究样本数据间的联系,对所调查的数据进行火险区划分析,使火险相同的地区归为一类,通过分析,共得到 3 大类,即:样地 1、2、3、9 为一类,火险最高;样地 4、7、10、11、15 为一类,火险次之;其余的样地 5、6、8、12、13、14 为一类,火险最低.此种分类的优点是速度快,精度高,方法科学.

(3)利用聚类分析法对森林火险进行区划具有较强的理论基础,但其分类效果还有待于在实践中检验.今后的研究应就同一样本中各因子间的联系进行分析,在保证信息全面的情况下精简分类因子.

参考文献:

- [1] 屈宇,朱宝来,李江,等. 林火生态因子时空动态的研究[J]. 河北林果研究,2001,(1):21-25.
- [2] 郑焕能. 我国森林火险区划的研究[J]. 森林防火,1993,(1):14-16.
- [3] 张贵,刘峰,杨志高. 基于 RS 和 GIS 的广州市森林火险区划研究[J]. 中南林学院学报,2003,23(4):62-65.
- [4] 边馥苓. 地理信息系统原理和方法[M]. 北京:测绘出版社,1996.
- [5] 唐季林. RS 及 GIS 进行林业局森林火险区划的研究[J]. 北京林业大学学报,1996,(1):86-90.
- [6] 廖应华. 云南省县级森林火险区划的研究[J]. 森林防火,1991,(3):8-10.
- [7] 许歌辛. 城市近郊人口与森林火险等级的划分[J]. 林业科技,1993,18(4):28-33.
- [8] 徐振帮,金淳浩,娄元仁. X^2 距离系数和 φ^2 距离系数尺度在聚类分析中的应用中国数学地质(1)[M]. 北京:地质出版社,1986.
- [9] Anderson T W. Wiley Series in Probability and Statistics: An Introduction to multivariate statistical analysis (3rd edn)[M]. New York: John Wiley and Sons, 2003.
- [10] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2006.

[本文编校:胡曼辉]