

均匀设计法优化人参叶片愈伤组织诱导培养基

齐海军, 高 慧, 陈芬芬, 金东淳

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以人参叶片为试材, MS 为基本培养基, 采用均匀设计和 DPS 软件分析的方法, 研究了 2,4-D、KT、NAA、6-BA 等 4 种不同激素组合对人参愈伤组织诱导的影响, 以期筛选出诱导人参叶片愈伤组织的最佳激素组合。结果表明: 人参叶片愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+2,4-D $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。验证试验表明, 在添加最佳激素组合的 MS 培养基中接种新的叶片外植体, 30 d 后愈伤组织诱导率为 93%, 单个叶片外植体上愈伤组织小块平均数达 1.82。

关键词:人参叶片; 愈伤组织; 均匀设计; 最佳培养基

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0106-04

人参(*Panax ginseng* G. A. Meyer)是我国传统名贵中药材, 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^[1]。由于其具有广泛的药理活性, 近年来受到广泛关注, 关于它的药理活性效果和活性成分组成鉴定的大量研究现在仍在进行^[2]。随着社会发展, 国内外对于人参的需求量不断增加, 对其品质的要求也逐渐提高。但人参的生产技术繁杂, 开花周期长, 后代扩繁困难等问题都严重限制了人参的大量生产和优良品种的选育工作^[3-5]。

鉴于人参繁殖及育种的难题, 国内外研究人员试图通过生物技术及转基因技术摆脱人参生产及育种上的困境^[6]。如通过建立人参的组织快速培养体系, 大量繁殖人参苗来缓解生产上的需求, 或在组培体系基础上利用转基因技术对现有的品种进行改良, 亦或通过调控光、温、激素等来促使试管苗开花结实来缩短其育种周期等。虽然已有很多关于人参组织培养方面的报道, 但尚鲜见有稳定的体系在育种及生产上应用, 因此有必要建立一套有效的人参组培体系, 以期为人参育种的后续研究奠定理论基础。

在植物组织培养中, 植物激素的种类、浓度以及外植体选择对植物的愈伤组织诱导和植株再生影响很大。人参的根、茎、叶、花、胚、花粉等都可作为外植体在组培

中应用, 国内外的报道中以根和茎居多^[7-8]。此外, 国内外也有通过人参胚培养研究人参的开花习性^[9], 子叶培养获得体细胞胚^[10], 花粉培养获得单倍体^[11]等报道。除研究不同外植体在组培中的生理变化外, 国内外大量的研究集中在各种生长调节剂在人参愈伤组织及器官发生等阶段的作用上。大量的研究资料显示, 适宜浓度的 2,4-D 在人参愈伤组织的诱导中起着关键作用^[12], KT 虽不能直接促进愈伤组织形成, 但适宜浓度的 KT 能增加愈伤组织的活性^[13-15]。此外, 国内也有使用 KT、NAA、6-BA 配合 2,4-D 来诱导人参愈伤组织的报道, 如王建华等^[16]利用人参实生苗茎段作为外植体采用多因子正交实验研究了不同激素组合对愈伤组织诱导的影响, 提出了愈伤组织诱导的最佳激素组合为 2,4-D $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。徐亚维等^[17]以无菌实生苗的叶片为外植体, 对人参的快繁体系进行了优化, 得出以人参无菌苗叶片为外植体诱导愈伤组织的最佳培养基是 MS+KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

综上所述, 国内外已经有一些关于人参组培体系建立的报告, 其中提到的各种激素浓度为人参组培的进一步研究提供了参考。但目前发现的报告中, 多采用单因素研究的方法, 这种方法有可能会漏掉一些较优的组合。而使用正交设计的方法则因处理数据过于庞大, 在试验中很难实际操作。使用均匀设计恰好能规避以上 2 种方法的不足, 既能够保证试验的均匀性和准确性, 又能大大减少试验次数^[18-20], 且目前尚鲜见采用均匀设计优化人参组织培养中激素配比的相关报道。

均匀设计(uniform design)是方开泰等^[21]为了解决多因素、多水平高科技难题而提出的一种试验设计。基

第一作者简介:齐海军(1989-), 男, 山西孝义人, 硕士研究生, 研究方向为生物技术在作物遗传育种中的应用。E-mail:649052084@qq.com

责任作者:金东淳(1963-), 男, 吉林图们人, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术在作物遗传育种中的应用。E-mail:jdc1200@ybu.edu.cn

收稿日期:2016-04-15

于试验点在整个试验范围内是均匀散布的,从均匀性角度出发,大大减少了试验次数,并且分析准确性好;能从全面试验点中挑选出部分代表性的试验点,这些试验点在试验范围内充分均衡分散,但仍能反映体系的主要特征。它与其它试验设计法的最大不同之处就在于能从尽可能少的试验次数中揭示出因素对指标的影响大小和规律,能够以最少的次数,从多个因素中找出影响试验结果的各因素的主次和最优结果,并且可以进行优化拟合设计。

该试验以 MS 为基本培养基,大田生长的人参叶片为试材,采用均匀设计方法设计不同浓度、不同种类的激素组合,探讨并筛选了人参叶片愈伤组织诱导的最佳培养基,以期为后续分化试验奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从大田中采摘人参叶片,经流水冲洗干净,吸干表面水分,用 75% 酒精消毒 1 min,无菌水洗涤 1 次,捞出后浸入 1% 升汞溶液中 5 min,再用无菌水漂洗 3 次,每次 5 min,滤纸吸干叶片表面水分,将其切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,接种于预先配制好的培养基中,每瓶接种 6 枚外植体。

1.2 试验方法

以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g · L⁻¹,琼脂 8 g · L⁻¹,pH 5.8。将 2,4-D、6-BA、NAA、KT 等 4 种激素,参照均匀设计 U₅(5⁴)^[20],每种因素为 5 水平,其中 KT、6-BA、NAA 的各浓度梯度为 0、0.25、0.50、0.75、1.00 mg · L⁻¹,2,4-D 的各浓度梯度为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 mg · L⁻¹,见表 1,每处理 10 瓶,每瓶 6 枚外植体,重复 2 次。30 d 后统计愈伤组织诱导率及单个外植体上愈伤组织小块数。通过分析得到最佳激素组合后,在添加有最佳激素组合的培养基中接种同样数量的叶片外植体进行验证。

表 2

人参叶片愈伤组织诱导试验结果

Table 2

The result of *Panax ginseng* leaves' callus induction

试验号 Test number	叶块数 Explant number	出现愈伤组织的叶片数 Callus leave number	愈伤组织小块数 Callus number	愈伤组织诱导率(Y ₁) Induction rate/%	单叶愈伤组织小块数(Y ₂) Callus per explant
1	60	26	48	43	0.80
2	60	0	0	0	0
3	60	22	28	36	0.46
4	60	40	60	66	1.00
5	60	20	30	33	0.50

2.2 偏最小二乘回归建模分析结果

使用 DPS 6.0 中的偏最小二乘回归分析程序对试验数据进行分析,参考 PRESS 统计量以及误差统计量的下降趋势,选择 2 个潜变量个数,建立二次多项式回归模型,得到了各因子与 2 个指标间的主效应标准回归系数(表 3)。其中,KT(X₁)和 2,4-D(X₃)对愈伤组织诱

表 1 人参叶片组织培养试验方案

Table 1 The experiment plan of tissue culture for

<i>Panax ginseng</i> leaf					mg · L ⁻¹
试验号 Test number	激动素 KT(X ₁)	萘乙酸 NAA(X ₂)	2,4-二氯苯氧乙酸 2,4-D(X ₃)	6-苄氨基嘌呤 6-BA(X ₄)	
1	0	0.25	3.0	0.75	
2	0.25	0.75	0	0.50	
3	0.50	0	4.5	0.25	
4	0.75	0.50	1.5	0	
5	1.00	1.00	6.0	1.00	

1.3 项目测定

将接种后的外植体培养在 25 °C 的黑暗条件下,产生愈伤组织后将其置于强度为 1 000 lx、周期为 12 h · d⁻¹ 的日光灯下培养。测定愈伤组织诱导率和单个外植体上愈伤组织小块数,其中,愈伤组织诱导率(%)=(产生愈伤组织的叶块数/总叶块数)×100;单个外植体上愈伤组织小块数=愈伤组织小块数/总外植体数。

1.4 数据分析

采用 Excel 软件对数据进行整理,DPS 6.0 软件对数据进行偏最小二乘回归(PLS)分析。

2 结果与分析

2.1 人参叶片诱导愈伤组织的试验结果

接种后,每 3 d 观察 1 次愈伤组织的诱导情况,30 d 时统计愈伤组织的诱导情况。通过观察,以人参叶片作为外植体诱导愈伤组织,培养 15 d 开始有零星愈伤组织出现。30 d 后统计各处理产生愈伤组织的叶片数、愈伤组织小块数(图 1)。从表 2 可知,4 号处理的人参叶片愈伤组织诱导率最高为 66%,其次为 1 号 43%,3 号 36%,5 号 33%,而 2 号处理的人参叶片没有产生愈伤组织。单个叶片外植体上产生的愈伤组织小块数最多的是 4 号,其次为 1 号、5 号、3 号和 2 号处理,其单个外植体上愈伤组织小块平均数分别为 1.00、0.80、0.50、0.46、0。

导率(Y₁)和单个外植体上愈伤组织小块数(Y₂)的影响为正效应,NAA(X₂)及 6-BA(X₄)对愈伤组织诱导率(Y₁)和单个外植体上愈伤组织小块数(Y₂)的影响为负效应。

经 DPS 分析软件对所得数据进行偏最小二乘多项式回归分析,拟合出的二次多项式回归模型如下:

表 3

各因素对相应指标的标准回归系数

Table 3

Standard regression coefficients of various factors on each indicator

考察指标 The index of evaluation	因素 Factor													
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_1^2	X_2^2	X_3^2	X_4^2	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_1 X_4$	$X_2 X_3$	$X_2 X_4$	$X_3 X_4$
Y_1	0.139 0	-0.139 3	0.130 1	-0.148 1	0.089 0	-0.104 2	-0.331 8	0.331 6	0.141 3	-0.265 6	-0.169 5	0.157 6	-0.045 7	0.148 3
Y_2	0.136 8	-0.141 0	0.128 0	-0.149 7	0.087 3	-0.105 7	-0.333 0	0.329 5	0.138 9	-0.267 5	-0.171 7	0.155 0	-0.047 9	0.145 9

$Y_1 = 0.341\ 437\ 1 + 0.149\ 737X_1 - 0.083\ 746X_2 + 0.121\ 431X_3 - 0.715\ 932X_4 + 0.177\ 556X_1^2 - 0.207\ 921X_2^2 - 0.018\ 399X_3^2 + 0.661\ 847X_4^2 + 0.263\ 834X_1X_2 - 0.082\ 664X_1X_3 - 0.258\ 341X_1X_4 + 0.040\ 053X_2X_3 - 0.085\ 284X_2X_4 + 0.046\ 148X_3X_4$; $Y_2 = 0.533\ 782\ 1 + 0.255\ 390X_1 - 0.122\ 259X_2 + 0.198\ 983X_3 - 1.146\ 710X_4 + 0.282\ 906X_1^2 - 0.342\ 360X_2^2 - 0.029\ 963X_3^2 + 1.067\ 297X_4^2 + 0.420\ 897X_1X_2 - 0.135\ 092X_1X_3 - 0.424\ 796X_1X_4 + 0.063\ 913X_2X_3 - 0.145\ 242X_2X_4 + 0.073\ 655X_3X_4$ 。

由表 4 可知,提取不同潜变量个数增加时,标准化后的数据模型误差平方和及 PRESS 统计量呈下降趋势,且潜变量个数为 2 时, Y_1 、 Y_2 的误差平方和分别为 0.048 0 和 0.047 6,小于 0.05,表明分析具有显著性,相应的决定系数分别为 0.988 0、0.988 1,说明潜变量对因变量的解释能力很强,回归模型的拟合效果较好(决定系数是回归平方和与总离差平方和的比值, R^2 接近 1,说明潜变量对因变量的解释能力越强,回归模型拟合效果越好)。

在 DPS 软件中设定需要的优化条件为 Y_1 、 Y_2 取最大值,对以上 2 个模型进行优化,得到各因素的最优值:当 X_1 (KT)为 $1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 X_2 (NAA)为 $0.66\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 X_3 (2,4-D)为 $2\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 X_4 (6-BA)为 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,有

表 4 数据标准化后的模型误差平方和及决定系数

Table 4 Error sum of squares and determination coefficient of standardized model

潜变量个数 Number of latent variables	误差平方和 Error sum of squares		决定系数 R^2 Coefficient of determination R^2		残差 Residuals
	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1 Y_2
1	0.183 1	0.153 8	0.954 2	0.961 6	3.613 7 3.579 9
2	0.048 0	0.047 6	0.988 0	0.988 1	2.326 6 2.177 3

最优目标函数值,其中 $Y_1 = 94\%$ 、 $Y_2 = 1.9$ 。

2.3 验证试验结果

在添加最佳激素组合的 MS 中接种叶片外植体,30 d 后愈伤组织诱导率达 93%,单个外植体上愈伤组织小块数达 1.82(表 5),与模型预测值十分接近,表明由模型预测出的最佳激素组合符合实际操作中人参叶片愈伤组织诱导的要求,结果比较满意。上述愈伤组织小块及继代产物如图 2、3 所示。

表 5 人参叶片愈伤组织诱导的验证试验结果

Table 5 The callus induction validation test of *Panax ginseng* leave

外植体数 Explant number	产生愈伤组织叶片数 Callus leave number	愈伤组织小块数 Small callus number	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	单个外植体愈伤组织小块平均数 组织小块平均数 Callus per explant
60	56	109	93	1.82

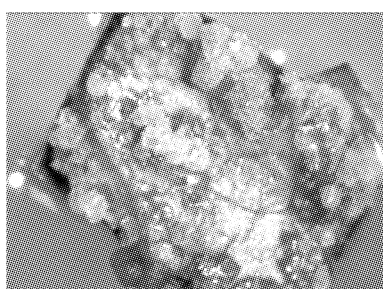


图 1 人参叶片上的愈伤组织
Fig.1 Callus on *Panax ginseng* leaves

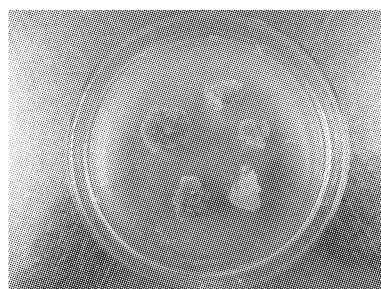


图 2 继代后的人参愈伤组织
Fig.2 Callus of *Panax ginseng* after subculture



图 3 继代后的人参愈伤组织
Fig.3 Callus of *Panax ginseng* after subculture

3 讨论与结论

从人参叶片愈伤组织诱导的试验结果可以看出,2 号处理的激素组合中 2,4-D 的含量为 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,愈伤组织诱导率也为 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而通过偏最小二乘回归分析得到 2,4-D 在人参叶片诱导中起正效应,说明 2,4-D

为人参愈伤组织诱导中的必需激素。1 号处理中 KT 为 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,仍有愈伤组织产生,由此可知 KT 不是人参愈伤组织诱导的必需激素。结合偏最小二乘回归分析中给出的标准回归系数可知,KT 在愈伤组织诱导中起正效应,说明在 2,4-D 存在的情况下,KT 能够促进愈伤

组织的形成。3号处理中NAA为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,同样产生了愈伤组织,结合DPS分析可知,NAA单独存在时对愈伤组织诱导有抑制效应,但与其它激素互作时对愈伤组织的形成有促进作用。4号处理中6-BA为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,此时的愈伤组织诱导率和单个外植体上的愈伤组织小块数达最大值,结合DPS的分析可以看出,6-BA对人参叶片愈伤组织诱导有抑制作用。

当在DPS软件中设定需要的优化条件为 Y_1 (愈伤组织诱导率), Y_2 (单个外植体上的愈伤组织小块数)取最大值时,对经DPS拟合出的2个模型进行优化,得到各因素的最优值,即:当 X_1 (KT)为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 X_2 (NAA)为 $0.66\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 X_3 (2,4-D)为 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 X_4 (6-BA)为 $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,有愈伤组织诱导率(Y_1)及单个外植体上的愈伤组织小块数(Y_2)的最大值,其中 $Y_1=94\%$, $Y_2=1.9$ 。在含有经DPS软件分析给出的最佳激素组合的MS培养基上接种人参叶片进行试验验证,30d后愈伤组织的诱导率达93%,单个外植体愈伤组织小块平均数达1.82,与模型预测值十分接近,表明由模型预测出的最佳激素组合符合实际操作中人参叶片愈伤组织诱导的要求。同时,使用含有最佳激素组合的MS培养基对试验中获得的愈伤组织小块进行了继代,使愈伤组织小块增殖,为后续分化试验奠定理论基础。

参考文献

- [1] 黎阳,张铁军,刘素香,等.人参化学成分和药理研究进展[J].中草药,2009,40(1):164-166.
- [2] WU J,ZHONG J J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture;current technological and applied aspects[J]. Journal of Biotechnology,1999,68:89-99.
- [3] 任跃英.人参育种目标的若干问题分析[J].中药材,2006,29(8):867-870.
- [4] 赵亚会,赵寿经,李方元.人参育种研究进展[J].吉林农业大学学报,1996(18):142-144.
- [5] 刘云章,王荣生.我国人参育种的当务之急[J].特产研究,1991(4):22-24.
- [6] 侯春喜,赵寿经,梁彦龙,等.人参的遗传改良[J].中国生物工程杂志,2009,29(9):91-96.
- [7] 左北梅,高文远,董艳艳,等.药用植物人参的组织培养研究进展[J].中国现代中药,2012,14(1):34-37.
- [8] 刘贤旺.人参组织培养研究的进展[J].江西中医学院学报,1993,5(2):51-53.
- [9] CHAN M C,CHUNG Y Y,JO J S. Characteristics of *in vitro* flower emergence in embryo culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer[J]. Korean J Bred,1995,27(4):398-403.
- [10] CHOI Y E,SOH W Y. Origin of somatic embryo induced from cotyledons of zygotic embryos at various developmental stages of ginseng[J]. Plant Biol,1994,37(3):365-370.
- [11] LEE H Y,ALTANZUL K,SUN M S,et al. Plant regeneration from anther culture of *Panax ginseng*[J]. Korean J Plant Res,2013,26(3):383-388.
- [12] 朱蔚华,张萌麟,李新兰,等.人参愈伤组织培养的初步研究[J].药学报,1979,14(9):541.
- [13] CHOI K T,KIM M W,SHIN H S. Root and shoot formation in explant and callus derived from root and cotyledon of *ginseng*[J]. Korean J Ginseng Sci,1981,5(1):35-40.
- [14] YANG D C,PARK J C,KWON W S,et al. Antioxidative activity callus cultures of Ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer)under various culture conditions[J]. Korean J Plant Tissue Culture,1996,23(4):211-215.
- [15] AHN I O,CHOI K T,KIM B D. Relationship between somatic embryo genesis and anthocyanin aynthesis in callus cultures of *Panax ginseng* [J]. Korean J Plant Tissue Culture,1991,1(8):227-232.
- [16] 王建华,王义,孙国伟,等.人参组织培养的多因子正交实验研究[J].吉林农业大学学报,2006,2(2):648-651.
- [17] 徐亚维,魏健,于子明.高丽人参快繁条件的优化[J].安徽农业科学,2009,37(5):1924-1926.
- [18] 胡慧露,蔡新玲.均匀设计优化银杏培养基配比[J].林业科学,2006,42(10):39-42.
- [19] 张佳,金东淳,金海林,等.均匀设计法优化北五味子愈伤组织诱导培养基[J].安徽农业科学,2011,39(12):6977-6978.
- [20] 徐华松,唐巍.均匀设计在植物组织培养中的应用[J].华南农业大学学报,1998,19(1):21-23.
- [21] 方开泰,马长兴.正交与均匀试验设计[M].北京:科学出版社,2011.

The Optimum Callus Induction Media for *Panax ginseng* Leaf Callus Induction by Using Uniform Design

QI Haijun,GAO Hui,CHEN Fenfen,JIN Dongchun
(College of Agriculture,Yanbian University,Yanji,Jilin 133002)

Abstract: Taking *Panax ginseng* leaf as material,with MS as basic medium,the effects of 2,4-D,KT,NAA and 6-BA on callus induction were tested by using the uniform design. Then using the DPS software analyzed the data and find out the optimum callus induction media for callus induction. The results showed that the optimum induction media was MS+2,4-D $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.66\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Verification test indicated the callus induction rate was up to 93% after 30 days culture on the optimum media,and the callus average value on single leaf explant was 1.82.

Keywords: *Panax ginseng* leaf;callus;uniform design;optimum media