

正交设计筛选通关藤增殖培养基的研究

韩俊¹, 王建军^{1*}, 龙光强¹, 沈雪梅², 余珊¹

(1. 云南农业大学, 云南昆明 650201; 2. 昆明市农业科学研究所, 云南昆明 650034)

摘要 [目的]应用正交试验设计方法, 筛选通关藤增殖培养基。[方法]以通关藤的诱导苗为试验材料, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案研究培养基、6-BA(细胞分裂素)、NAA(萘乙酸)及不同接种部位4个试验因子对通关藤增殖苗生长状况和增殖率的影响。[结果]筛选出通关藤最佳增殖培养基方案为MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+25 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂+茎尖。[结论]该研究为通关藤规模化生产提供一定的技术支持。

关键词 通关藤; 增殖培养基; 组织培养; 激素; 正交试验

中图分类号 S567 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)13-0163-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.050



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Screening of Proliferation Medium of *Marsdenia tenocissima* by Orthogonal Design

HAN Jun, WANG Jian-jun, LONG Guang-qiang et al (Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract [Objective] The orthogonal experiment design method was used to screen the proliferation medium of *Marsdenia tenocissima*. [Method] The induced seedlings of *Marsdenia tenocissima* were used as experimental materials, and the effects of four test factors of 6-BA (cytokinin), NAA (naphthaleneacetic acid) and different inoculation sites on the growth status and proliferation rate of proliferation seedlings of *Marsdenia tenocissima* were studied by $L_9(3^4)$ orthogonal design. [Result] The optimal proliferation medium of *Marsdenia tenocissima* was MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+25 g/L sucrose+7 g/L agar+stem tip. [Conclusion] This research provides certain technical support for scale production of *Marsdenia tenocissima*.

Key words *Marsdenia tenocissima*; Proliferation medium; Tissue culture; Hormone; Orthogonal text

通关藤(*Marsdenia tenocissima* (Roxb) Wight et Arm)为萝藦科牛奶藤属多年生攀援木质藤本植物, 广泛分布于热带及亚热带地区的云南、广东、福建、台湾、贵州等地, 又名乌骨藤、奶浆藤、通光散等, 为傣族、壮族、苗族常用药物^[1]。通关藤始载于《滇南本草》, 其味苦, 性微甘, 具有消炎止痛、清热解毒、止咳平喘等作用^[2]。通关藤中含有机酸、多糖、生物碱、树脂、色素及甾体苷等化学成分, 其中 C_{21} 甾体类是其主要的化学成分, 被现代医学认为是具有抗肿瘤作用的最为主要的活性物^[3-4]。现代研究表明, 通关藤还具有清热、消炎、止咳、降压、保肝、抗癌等功效^[5]。临床采用通关藤总苷片及通光素, 通关藤苷元甲治疗慢性气管炎^[6]。目前通关藤在食管癌、宫颈癌、急性白血病等多种癌症的治疗方面也具有独特优势^[7]。

通关藤市场需求量大, 生产上的原材料仅来自于野生资源和自然繁育, 加上通关藤自身花多果少的生物特性导致的较低自然繁殖力, 致使通关藤资源的日渐枯竭。现多采用萌发通关藤种子与扦插的方法缓解该困境。但通关藤种子外围有一层坚硬的种皮, 萌发前需要浸种处理, 但浸种时间过长可能会使种子的细胞壁过分吸水, 使得种子内水分过多而引起一些活力较差的种子因为缺氧而腐烂, 进而导致发芽率和发芽势都明显下降^[8], 而且通过种子繁育得到的实生苗品种易退化, 并存在生长周期长、结实率低的弊端。其次在扦插繁育方面, 采用河沙+泥炭+珍珠岩(3:4:3)的基质的办法

来解决扦插时通关藤对保水性^[9]、透气性和保温性的要求很不便捷, 虽然有成活率较高的优点, 但后期感病严重, 因此难以满足市场需要。因此寻求一种便捷、适宜规模化生产的通关藤繁育方法具有很强的现实性和长远意义。组织培养技术是一种快速而又易于操作的人工繁育手段, 为解决当前的通关藤野生资源枯竭提供了一条解决途径。该试验通过正交试验设计方案, 通过基本培养基、6-BA、NAA及不同部位外植体对通关藤增殖苗生长状况及增殖率影响的研究, 筛选出通关藤的最佳配方, 以期为大规模的工厂生产提供一定的技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料 通关藤试验材料取于云南农业大学农学与生物技术学院组培室培育的健壮诱导苗。

1.2 试验方法 采用正交试验方法设计基本培养基、6-BA、NAA及不同部位外植体4个试验因子, 每个因子3个水平共9个处理。以 B_5 、MS、1/2MS为基本培养基, 以2.5%(25 g/L)蔗糖为碳源, 以7%(7 g/L)琼脂固化, 加热至沸腾后加入6-BA与NAA, 定容至1 L后调试pH为5.8; 分装完毕后在温度121℃、压强103.4 kPa下消毒30 min, 30 min后转入无菌接种室, 静置3~5 d备用。接种前4 h打开接种室紫外灯消毒, 接种前佩戴口罩、实验服、拖鞋并进行全身消毒; 操作前对操作台及试验器皿进行消毒处理, 选取健壮无菌通关藤诱导苗茎段为接种材料, 自基部将诱导苗茎段按梢部、中部、基部剪为带一个芽的茎段; 分别将接种材料垂直插入培养基中; 每个处理重复5瓶, 每瓶接种3个。在温度(25±2)℃、12 h/d光周期、12 h/d暗周期、2 000~2 500 lx光照强度下培养, 培养50 d观察并记录茎粗、茎高及芽的生长状况。

1.3 数据统计 运用SPSS正交设计软件对试验数据进行

基金项目 国家自然科学基金项目(81660636); 云南省科技计划项目(2016RA009)。

作者简介 韩俊(1972—), 女, 云南砚山人, 讲师, 硕士, 从事中药功效及药用植物生理生化研究。*通信作者, 副教授, 硕士, 硕士生导师, 从事药用植物生理生化研究。

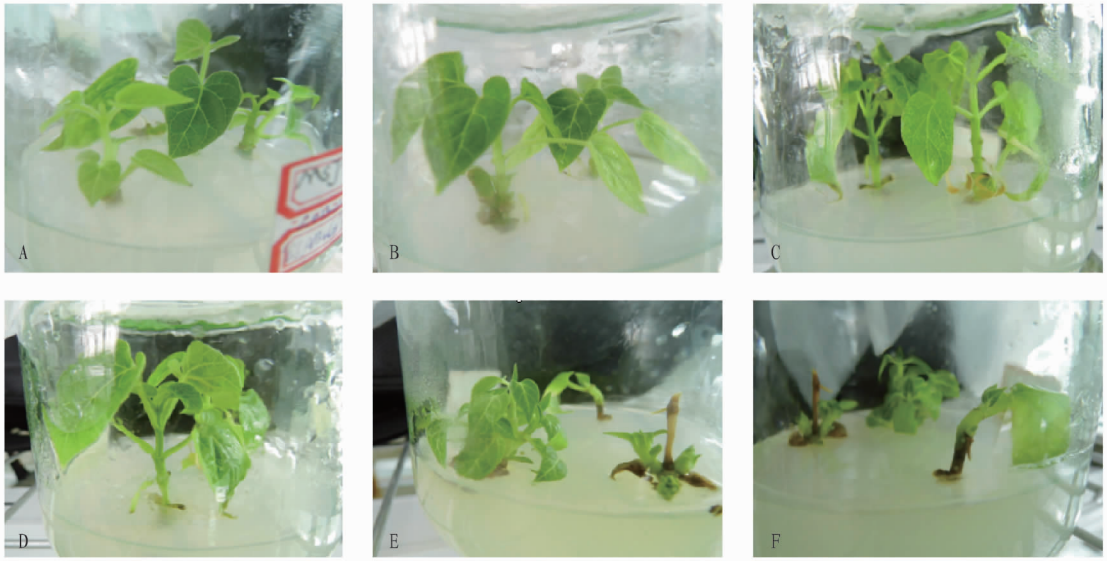
收稿日期 2019-02-22; 修回日期 2019-03-11

方差分析,运用SSR法进行多重比较。

2 结果与分析

通关藤增殖苗不定芽培养7~10 d均开始萌发,长出嫩黄绿色的小叶,以后随着培养时间的增加逐渐转为绿色。随着茎不断地长长、长粗,形成新的枝条。在培养过程中每5 d对增殖苗的长势及叶子颜色变化进行描述记录。到50 d时测量茎粗、茎高,计算增殖率,并进行综合评定,结果见表1~2和图1。

从表2可以看出,第4个处理($A_2B_1C_2D_1$)无论是平均芽粗、平均芽高和增殖率都是相对最高的,芽叶的颜色也是最为嫩绿的,整个芽生长状况的综合评价都是优。其次是第5个处理($A_2B_2C_3D_2$)和第3个处理($A_1B_3C_3D_3$),无论是平均芽粗、平均芽高和增殖率都较好,其余综合评价较差。



注:A、B为优;C、D为良;E、F为差

Note: A, B. Excellent; C, D. Good; E, F. Poor

图1 综合评定

Fig. 1 Comprehensive assessment

2.1 方差分析 经方差分析,培养基(A)、6-BA(B)、NAA(C)、外植体(D)对增殖苗的芽粗、芽高和芽的增殖率均存在极显著的相关性,A、C、D对芽粗和增殖率生长影响均比较大,B的影响最小;A、B、D对芽高生长影响较大,C的影响最小。A、B、C、D 4个因子的主效应差异均达到极显著水平,即每个因子的各个水平间对平均芽粗、平均芽高、增殖率都是存在极显著差异。其中4个因子对通关藤芽生长状况的平均芽粗和增殖率影响大小依次是A>D>C>B;对通关藤的生长状况芽高影响大小依次是A>D>B>C。

2.2 主效应的多重比较 结果表明, A_2 即基本培养基(MS)对平均芽粗、平均芽高和增殖率有极显著差异,优于 A_1 和 A_3 ; B_2 即1.0 mg/L 6-BA对平均芽粗、平均芽高和增殖率有极显著差异,优于 B_1 和 B_3 ; C_3 即0.5 mg/L NAA对平均芽粗、平均芽高和增殖率有极显著差异,优于 C_1 和 C_2 ; D_2 即茎段中部对芽粗、芽高和增殖率有极显著差异,优于 D_1 和 D_3 。

2.3 各处理间多重比较 方差分析结果显示9个处理间

表1 通关藤在不同培养基上的培养结果(50 d)

Table 1 Culture results of Marsdenia Tenocissima in different proliferating medium (50 d)

处理 Treatment	增殖苗生长状况 Growth status of proliferation seedlings			综合评定 Comprehensive assessment
	植株粗细 Plant thickness	植株高矮 Plant height	芽叶颜色 Bud color	
1	芽细	矮	偏黄	差
2	芽细	矮	偏黄	差
3	芽较粗	较高	浅绿	良
4	芽粗	高	较绿	优
5	芽粗	高	深绿	优
6	芽较粗	较高	较绿	良
7	芽细	较高	较绿	良
8	芽细	矮	偏黄	差
9	芽细	矮	偏黄	差

效应差异极显著,各个处理间对芽粗、芽高和增殖率影响的多重比较具有统计学意义,可从各处理间找出最优组合。从9个处理间效应的多重比较(表2)可以看出,第4个处理 $A_2B_1C_2D_1$ (MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+茎尖+25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂)无论在芽粗、芽高和增殖率都是最高,并且综合评价为优;这与各因子主效应的多重比较结果一致。第5个处理 $A_2B_2C_3D_2$ (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+茎中+25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂)无论在芽粗、芽高和增殖率都仅次于处理4,优于其他处理,综合评价也为优。

3 讨论与结论

试验结果表明最佳培养配方为第4个处理 $A_2B_1C_2D_1$ (MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+茎尖+25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂),其次是第5个处理 $A_2B_2C_3D_2$ (MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+茎中+25 g/L蔗糖+7 g/L琼脂),2个处理不管是在芽粗、芽高、增殖率和综合评价都是相对较高的。其中综合评价为优的第5个处理在配方中外植体选用的部

表 2 正交设计试验方案及试验结果($n=9$)Table 2 Orthogonal design test scheme and the test results($n=9$)

处理 Treatment	A (培养基 Medium)	B (6-BA//mg/L)	C (NAA//mg/L)	D (外植体 Explant)	芽粗 Bud thick (cm)	芽高 Bud height (cm)	增殖率 Proliferation rate//%
1	1(B ₅)	1(0.5)	1(0.1)	1(茎尖)	0.91	2.60	25.36
2	1	2(1.0)	2(0.3)	2(茎中)	0.93	2.64	57.91
3	1	3(1.5)	3(0.5)	3(茎基)	1.01	2.71	79.45
4	2(MS)	1	2	1	1.31	3.91	90.79
5	2	2	3	2	1.16	2.84	83.95
6	2	3	1	3	1.01	2.76	78.20
7	3(1/2MS)	1	3	1	0.84	2.68	63.88
8	3	2	2	2	0.82	2.64	54.53
9	3	3	1	3	0.78	1.66	42.62
芽粗 Bud thick	k_1	0.95 B	0.97 B	0.91 B	1.29 B		
	k_2	1.16 A	1.02 A	1.00 A	1.64 A		
	k_3	0.81 C	0.93 C	1.00 A	1.35 B		
芽高 Bud height	k_1	2.65 B	2.74 B	2.66 B	5.46 B		
	k_2	3.17 A	3.06 A	2.73 A	6.07 A		
	k_3	2.33 C	2.38 C	2.73 A	4.98 B		
增殖率 Proliferation rate	k_1	54.24 B	65.46 A	52.70 C	3.13 B		
	k_2	84.31 A	60.01 B	63.77 B	3.67 A		
	k_3	53.68 B	66.75 A	75.76 A	3.14 C		

注:同列数据后不同大写字母表示处理间差异极显著($P<0.01$)

Note: Different capital letters after the same column data indicate that the difference between treatments is extremely significant ($P<0.01$)

位是茎稍的中部,这一结果与许多的植物组培^[10-14]不一致,可能的原因之一是通关藤的根、茎、叶中均含有丰富的乳汁,会造成褐变;其次的原因是通关藤叶表面密生灰白色的柔毛,在转接的过程中容易黏附空气中没有杀灭的细菌和病毒而造成污染,这些问题都需要进一步的研究。其次配方中培养基选用 MS 为基本培养基,MS 最适宜通关藤的顶芽与侧芽生长,无论在芽粗、芽高、增殖率及芽生长状况影响都是最大,1/2MS 培养基对通关藤顶芽和侧芽的芽粗、芽高和芽的增殖率影响次之,B₅ 培养基对通关藤顶芽和侧芽的芽粗、芽高及芽的增殖率影响最小。再次配方中 6-BA 的浓度在 0.5~1.0 mg/L 对通关藤生长不管在芽粗、芽高及芽的增殖率方面的影响都是随着质量浓度的增加而增加,之后又逐渐降低,在 1.0 mg/L 时增殖效果最好。配方中 NAA 对通关藤的增殖率和生长状况影响作用也是随着质量浓度的增加而增加的,可见 NAA 在较低质量浓度时对通关藤所表现出来的激素效应就很明显。这一结果与前一阶段进行的通关藤诱导培养相一致^[15]。NAA 是否一直是随着浓度的增加而对通关藤的生长呈正相关值得进一步研究。

正交试验设计分析统计方法作为一种广泛应用的科学研究方法,在复杂繁琐的农学类研究中具有无可比拟的优势。此次试验所选用的 9 个处理在实际生产中具有较高的代表性,但是基于试验时间仓促,所筛选出的配比方案在实际生产中可以将植物激素的种类和浓度水平的范围进行适当的调整,进而选出最优最好的培养配方。此外,通关藤作为一种广泛分布于热带、亚热带的植物,除了此次试验中探究的 4 个试验设计因子外,光周期和昼夜温差也对通关藤的

生长具有重要影响,值得进一步的研究。

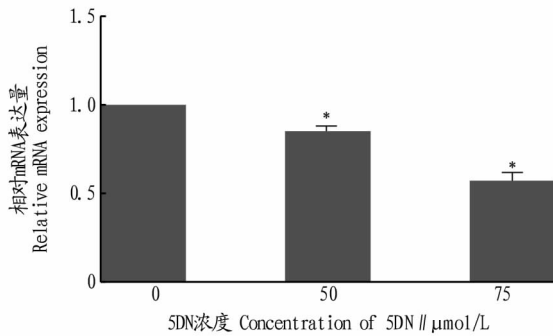
该试验以云南农业大学农学与生物技术学院组培室培育出的诱导无菌苗为转接材料,以 L₉(3⁴)正交试验设计 4 个试验因子,即基本培养基、6-BA、NAA 及不同部位转接材料对增殖苗的芽粗、芽高和增殖率影响的研究,试验设计组培苗培养到 50 d 时测量其苗的芽粗、芽高和增殖率并进行统计分析,发现 4 个试验设计因子对增殖苗的生长状况及增殖率均具有极显著的影响,最终筛选出通关藤增殖培养的最优配方为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+茎尖+25 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第 63 卷[M]. 北京:科学出版社,2004:463.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1977:243-249.
- [3] 冷彩云,张慧,乔佳,等. 通关藤及其混淆品的鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(4): 874-875.
- [4] 张全昌,张慧,康廷国. 中药乌骨藤化学成分及质量控制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2014,32(4): 751-753.
- [5] 张贵君. 现代中药材商品通鉴[M]. 北京:中国中医药出版社,2001: 1200.
- [6] 罗思齐,徐光漪,易大年,等. 通关藤中一个新 C₂₁ 甾族化合物的化学结构测定[J]. 化学学报,2013,44(4): 321-324.
- [7] SINGHAL S, KHARE M P, KHARE A. Cissogenin, a pregnane genin from *Marsdenia tenacissima*[J]. Phytochemistry, 1980, 19(11): 2427-2430.
- [8] 肖雪峰,刘丽,郭巧生,等. 通关藤种子萌发条件的研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 746-748.
- [9] 孟衡玲,杨生超,张薇,等. 不同基质和激素对通关藤扦插生根的影响[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(4): 540-543.
- [10] 冯亦平,张利平,王岩花,等. 金线莲外植体的筛选及不定芽诱导的研究[J]. 种子, 2009, 28(10): 19-22.

(下转第 170 页)

外试验结果为 5DN 的体内抗肿瘤活性研究以及进一步应用于临床治疗奠定了试验基础,也为寻找有效治疗前列腺癌的药物提供了新思路。



注: *表示在 0.05 水平差异显著

Note: * indicates significant differences at the 0.05 level

图6 PC3 细胞经 5DN 处理后的基因 *c-Myc* 的 mRNA 的转录

Fig. 6 Transcription of the mRNA of the gene *c-Myc* after treatment with 5DN in PC3 cells

参考文献

- [1] TANEJA S S. Urological oncology: Prostate cancer[J]. Journal of urology, 2014, 191(3): 656.
- [2] GILES G G. Prostate cancer[M]//QUAH S R. International encyclopedia of public health. 2nd edition. Oxford: Academic Press, 2017: 51-59.
- [3] ZHANG K, BANGMA C H, ROOBOL M J. Prostate cancer screening in Europe and Asia[J]. Asian J Urol, 2017, 4(2): 86-95.
- [4] LOU D Y, FONG L. Neoadjuvant therapy for localized prostate cancer: Examining mechanism of action and efficacy within the tumor[J]. Urologic oncology, 2016, 34(4): 182-192.
- [5] FARHAT A, JIANG D, CUI D, et al. An integrative model of prostate cancer interaction with the bone microenvironment[J]. Mathematical biosciences, 2017, 294: 1-14.
- [6] ZHANG H, XI W P, ZHOU Z Q, et al. Bioactivities and structure of polymethoxylated flavones in citrus[J]. Journal of food agriculture & environment, 2013, 11(2): 237-242.
- [7] 张元梅, 周志钦. 柑橘生物活性物质及其心血管疾病防治作用研究进展[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1799-1804.
- [8] 靖丽, 周志钦. 柑橘果实生物活性物质与糖尿病防治研究进展[J]. 果树学报, 2011, 28(2): 313-320.
- [9] ZOU Z, XI W P, HU Y, et al. Antioxidant activity of Citrus fruits[J]. Food chemistry, 2016, 196: 885-896.
- [10] MANTHEY J A, GUTHRIE N, GROHMANN K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation[J]. Current medicinal chemistry, 2001, 8(2): 135-153.
- [11] ZHANG J Y, LI N, CHE Y Y, et al. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011, 56(5): 950-961.
- [12] XIAO H, YANG C S, LI S M, et al. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis[J]. Molecular nutrition & food research, 2009, 53(3): 398-406.
- [13] QIU P S, DONG P, GUAN H S, et al. Inhibitory effects of 5-hydroxy polymethoxyflavones on colon cancer cells[J]. Molecular nutrition & food research, 2010, 542(S1): 244-252.
- [14] SERGEEV I N, HO C, LI S, et al. Apoptosis-inducing activity of hydroxylated polymethoxyflavones and polymethoxyflavones from orange peel in human breast cancer cells[J]. Molecular nutrition & food research, 2007, 51(12): 1478-1484.
- [15] CHEN Y K, WANG H C, HO C T, et al. 5-Demethylnobiletin promotes the formation of polymerized tubulin, leads to G2/M phase arrest and induces autophagy via JNK activation in human lung cancer cells[J]. Journal of nutritional biochemistry, 2015, 26(5): 484-504.
- [16] SONG M Y, WU X, CHAROENSINPHON N, et al. Dietary 5-demethylnobiletin inhibits cigarette carcinogen NNK-induced lung tumorigenesis in mice[J]. Food & function, 2017, 8(3): 954-963.
- [17] LI Z Q, ZHAO Z Y, ZHOU Z Q. Simultaneous separation and purification of five polymethoxylated flavones from "Dahongpao" tangerine (*Citrus tangerina* Tanaka) using macroporous adsorptive resins combined with prep-HPLC[J]. Molecules, 2018, 23: 1-17.
- [18] GAO Z, GAO W, ZENG S L, et al. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones[J]. Journal of functional foods, 2018, 40: 498-509.
- [19] ZHU W B, XIAO N, LIU X J. Dietary flavonoid tangeretin induces reprogramming of epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Oncology letters, 2018, 15(1): 433-440.
- [20] CHANG L, GRAHAM P H, NI J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance[J]. Critical reviews in oncology hematology, 2015, 96(3): 507-517.
- [21] CHEN J C, CREED A, CHEN A Y, et al. Nobiletin suppresses cell viability through AKT Pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells[J]. BMC pharmacology & toxicology, 2014, 15: 1-10.
- [22] 张永亮, 陈修煦, 来茂德. 化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡和相关因子的调控[J]. 国外医学(遗传学分册), 2002, 25(3): 121-126.
- [23] 王德成, 高洪. 细胞凋亡信号转导途径及调控的研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, 24(6): 4-7.
- [24] 赵岩, 孙健, 吴影, 等. 结直肠癌中 Survivin、Caspase 9 和 Ki-67 表达的相关性及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4): 435-438.
- [13] 梅兴国, 董妍玲, 潘学武. 红豆杉细胞继代培养防褐变措施的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(4): 8-11.
- [14] 罗虹, 陈汝民. 墨兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 436-437.
- [15] 韩俊, 杨生超, 王自林, 等. SAS 正交设计筛选通关藤组培诱导培养基的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17): 98-99. 149.

(上接第 165 页)

- [11] 祁永琼, 王丽莉, 罗瑞芳, 等. 金线莲不同外植体组织培养成苗技术探讨[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 57-59.
- [12] 张卫芳, 高疆生, 欧勇慧, 等. 抑制核桃组培中的褐化现象初探[J]. 落叶果树, 2003, 35(3): 4-7.