

应用正交设计优选花叶开唇兰初代培养基

李 光 龚 宁 周伟香 郑继军

(贵州省山地环境信息系统与生态环境重点实验室/贵州师范大学生物技术与工程学院 贵阳 550001)

摘要:利用正交设计 $L_9(3^3)$ 考察3种植物生长物质对花叶开唇兰 (*Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl.) 初代培养的影响,得到花叶开唇兰茎段培养的最佳培养基为:MS + BA 3 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 30 g/L;花叶开唇兰根状茎培养诱导腋芽的最佳培养基为:MS + BA 1.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L。

关键词 正交设计 花叶开唇兰 组织培养

花叶开唇兰 (*Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl.) 即金线兰,为兰科开唇兰属植物,全草入药,是民间珍稀名贵的中草药^[1]。同时也是一种观赏价值较高的室内观叶植物,具有广阔的开发利用前景。由于花叶开唇兰种子自然发芽率不到千分之一,分根法或直接扦插方式繁殖,则需时甚长且繁殖倍率不高^[2],再加上近年来的大量采集,导致花叶开唇兰野生资源日趋枯竭,保护野生花叶开唇兰已经到了刻不容缓的地步。

组织培养是保护濒危植物的有效技术手段,可在极短的时间里繁殖出大量新生植株。然而在组织培养中,初代培养将直接影响到组织培养的成败。本试验首次应用正交试验法对花叶开唇兰初代培养基进行了筛选,对解决花叶开唇兰自然资源的保护和合理利用之间的矛盾具有一定的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料采自贵州荔波县翁昂乡,经由贵州师范大学王承录副教授鉴定,为兰科花叶开唇兰。

1.2 消毒方法

先用洗衣粉浸泡1 h,然后自来水冲洗2 h,剪去叶片(保留叶鞘),然后在超净工作台上用75%酒精浸泡30 s,蒸馏水冲洗1次,再放入升汞(加入吐温-20 数滴)12 min,并且不断搅拌,最后用无菌水清洗5次。

收稿日期:2006-08-05。

基金项目:贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字(2005)2040号);贵州省高校发展专项资金自然科学类重点项目(黔教科2004110)

作者简介:李 光(1980~),男,在读硕士研究生;主要从事植物生理生态学研究。

1.3 试验方法

1.3.1 茎段培养

采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交试验,以 MS 为基本培养基,光照12 h,光强2000 lx,蔗糖30 g/L,考察3种植物生长物质及其浓度对花叶开唇兰茎段培养的影响(见表1)。

表1 茎段正交试验设计因素浓度

浓 度	因 素 (mg/L)		
	BA	KT	NAA
1	1	0	0.1
2	2	0.25	0.3
3	3	0.5	0.5

1.3.2 根状茎培养

采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交试验,以 MS 为基本培养基,光照12 h,光强2000 lx,蔗糖30 g/L,考察3种植物生长物质及其浓度对花叶开唇兰根状茎培养的影响(见表2)。

表2 正交试验设计因素浓度

浓 度	因 素 (mg/L)		
	BA	KT	NAA
1	0.5	0	0.5
2	1	0.25	1
3	1.5	0.5	1.5

2 结果与分析

2.1 不同植物生长物质浓度对花叶开唇兰茎段培养的影响

在超净工作台上,用解剖刀把消毒好的茎段切成包含一个节,长约1.5 cm的小段,接种采取茎段直立插入培养基的方式,接种30 d后,统计诱导率(见表3)。

表3 花叶开唇兰茎段组培 $L_9(3^3)$ 试验结果

代号	因素(mg/L)			接种外植体数量	诱导芽数	诱导率(%)
	BA	KT	NAA			
1	1	0	0.1	22	8	39
2	1	0.25	0.3	28	4	14
3	1	0.5	0.5	16	0	0
4	2	0	0.3	24	6	25
5	2	0.25	0.5	20	0	0
6	2	0.5	0.1	28	2	14
7	3	0	0.5	20	10	50
8	3	0.25	0.1	28	4	14
9	3	0.5	0.3	24	8	33

对花叶开唇兰茎段组培的结果进行极差分析和方差分析,结果见表4、5。

表4 极差分析

K_{ij}	腋芽诱导率(%)		
	BA	KT	NAA
K_1	17.667	38.000	22.333
K_2	13.000	9.333	24.000
K_3	32.333	15.667	16.667
R	19.333	28.667	7.333

表5 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	F临界值	显著性
A(BA)	610.667	2	3.192	6.940	
B(KT)	1360.667	2	7.111	6.940	*
C(NAA)	88.667	2	0.463	6.940	
空白	294.000	2	1.537	6.940	
误差	382.67	4			

注:*表示在 $\alpha=0.05$ 浓度具显著性。

由表4和表5可知,KT对腋芽的诱导作用达到显著,BA和NAA对腋芽的诱导作用不显著,3种植物生长物质作用强弱依次是:KT>BA>NAA,它们的最佳浓度为 $A_3B_1C_2$,故花叶开唇兰茎段培养的最佳培养基为:MS+BA 3 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L。

2.2 不同植物生长物质浓度对花叶开唇兰根状茎培养的影响

在超净工作台上,用解剖刀把消毒好的茎段切成包含一个节,长约1.5 cm的小段,接种采取根状茎段直立插入培养基的方式,接种60 d后,统计诱导率(见表6)。

表6 花叶开唇兰根状茎 $L9(3^3)$ 试验结果

代号	因素(mg/L)			接种外植体数	诱导芽数	诱导率(%)
	BA	KT	NAA			
1	0.5	0	0.5	17	0	0
2	0.5	0.25	1	18	4	22
3	0.5	0.5	1.5	20	8	40
4	1	0	1	16	2	13
5	1	0.25	1.5	22	4	18
6	1	0.5	0.5	20	0	0
7	1.5	0	1.5	18	6	33
8	1.5	0.25	0.5	20	2	10
9	1.5	0.5	1	20	4	20

对花叶开唇兰茎段根状茎组培的结果进行极差分析和方差分析,结果见表7、8。

表7 极差分析

K_{ij}	腋芽诱导率(%)		
	BA	KT	NAA
K_1	20.667	15.333	3.333
K_2	10.333	16.667	18.333
K_3	21.000	20.000	30.333
R	10.667	4.667	27.000

表8 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	F临界值	显著性
A(BA)	220.667	2	3.079	6.940	
B(KT)	34.667	2	0.484	6.940	
C(NAA)	1098.000	2	15.321	6.940	*
空白	108.667	2	1.516	6.940	
误差	143.33	4			

注:*表示在 $\alpha=0.05$ 浓度具显著性。

由表7和表8可知,NAA对根状茎腋芽的诱导作用达到显著,BA和KT对根状茎腋芽的诱导作用不显著,3种植物生长物质作用强弱依次是: NAA>BA>KT,它们的最佳浓度为 $A_3B_3C_3$,故花叶开唇兰根状茎培养诱导腋芽的最佳培养基为:MS+BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L。

3 讨论

本试验按照正交设计进行了9组试验,发现3种植物生长物质对于花叶开唇兰腋芽的诱导作用差异很大。通过分析得出结论,花叶开唇兰茎段培养的最佳培养基为:MS+BA 3 mg/L+NAA 0.3 mg/L+蔗糖 30 g/L。细胞分裂素与生长素的比例为10:1。在国内其他学者的研究中,生长物质比例多为(4~6):1,与我们的结论有较大差别。只有毛碧增^[2]等认为花叶开唇兰培养的最佳植物生长物质比例是10倍,但其配方(MS+BA 1.5 mg/L+NAA 0.15 mg/L),与我们的相差较大;另外,我们通过试验得到花叶开唇兰根状茎诱导腋芽的最佳培养基:MS+BA 1.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+蔗糖 30g/L,为首次报道。

正交试验法要求任意因素都是全面试验,而且试验点的分布也是均衡的。本试验考察了3种植物生长物质3个浓度组合的9组试验,每组试验都有很强的代表性,能够比较全面地反映优选区内的大致情况。在只有一两个因素起主要作用,而试验之前又不知道哪个因素起主要作用的情况下,正交试验法能保证主要因素的各个可能搭配都不会漏掉^[3]。同时也说明,正交试验设计与数据分析方法对于选择最佳试验方案,是十分有效的工具,其优越性在于能大量减少试验次数,本研究若进行全部试验,必须采用 $3^3=27$ 种配方,而利用正交试验法只需做9组,节省了2/3的工作量。由于相互间浓度搭配得均衡,因此较少次数的正交试验大体能反映全部组合试验的效果,可见正交试验法是一种高效、快速、经济的试验设计方法。

参考文献

- 1 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志(第17卷). 北京: 科学出版社, 2000, 17: 220.
- 2 黄德贵, 陈振东. 花叶开唇兰组织培养与人工栽植研究[J]. 福建热带科技, 1994, 19(1): 1~10.
- 3 毛碧增. 花叶开唇兰的快速繁殖[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, 25(5): 527~528.
- 4 中国科学院数学研究所数理统计组编. 正交试验法[M]. 北京: 人民教育出版社, 1961, 78.

在温室中根据出叶数鉴定杂交水稻种纯度的试验初报

陈恩瑞 周国富

(贵州省黔南州农业科学研究所 贵定 551300)

摘要:简介鉴定依据的基本原理;试验初步研究的杂交水稻种及对应不育系10~11月在温室中幼苗出叶数上的差异。认为在本地利用温室种植可以在短期内鉴定水稻杂交种的纯度,但这种鉴定方法仅实用于杂交种与对应不育系总叶片数相差 ≥ 5 ,生育期相差 ≥ 30 d的杂交稻组合。

关键词 温室 出叶数 鉴定 纯度

水稻杂交种纯度鉴定最准确可靠且普遍采用的方法是海南小区种植鉴定,但这种传统鉴定方法鉴定周期长、费用高,且应用起来有时间限制性,主要是不能尽早(在公历年前)得到纯度鉴定结果,不利于经营者及时作出经营决策,在短期内(≤ 50 d)得到纯度鉴定结果,是诸多种业公司的共同愿望。

试验通过对水稻杂交种及对应不育系在幼苗期出叶数差异的详细观察和记载,发现在温室中播种50 d左右,杂交种及对应不育系的出叶数有2~3片的差异,这为识别杂交种、不育系(保持系)植株提供了可能。

笔者认为,产生出叶数差异的基本原理是:水稻原产于高温、短日、多湿的热带地区,在系统发育中,形成要求高温、短日、多湿气候条件的遗传特性。栽培稻在适宜生存的生态条件范围内,短日、高温可使其生育期缩短,反之则延长,尤其迟熟类型更为突出。不同品种(组合)有不同的感光、感温性,因此其生育期延长(或缩短)的程度不一,而且生育期延长(或缩短)只能在营养生长期,这就使不同品种(组合)在同一生态条件下出叶速度产生差异。

1 材料与方 法

1.1 材 料

水稻杂交种选用本所自育组合黔南优2058($K_{22}A \times QN 2058$)、K优2020($K_{17}A \times QN 2020$)、金优404($金_{23}A \times QN 404$),不育系材料为 $K_{22}A$ 、 $K_{17}A$ 、 $金_{23}A$,为保证采用材料的纯度,种子均为人工套袋杂交所得。

1.2 方 法

对黔南优2058、K优2020、金优404、 $K_{22}A$ 、 $K_{17}A$ 、 $金_{23}A$ 六个材料种子进行精选,每个材料选出健康且饱满种子100粒,浸种催芽至露白时播种,杂交种与其对应的不育系相邻种植,每个材料播100粒,按8 cm $\times$ 8 cm的规格播,试验在本所温室中进行。床土下铺15 cm厚马厩肥,播后起拱盖膜以利升温,温度控制在25~30℃,水分管理以床土达饱和持水量为度。第1次试验在2004年进行,于10月1日播种。重复试验在2005年进行,也是10月1日播种;同时对我所2006年生产、示范用种实施鉴定验证(温室种植鉴定与海南小区种植鉴定对比)。试验在床土、播期、温湿度、管理等一致的条件下进行,出苗3叶期后每隔7 d观察并记载各材料每株的出叶数(叶龄),并统计不同时期叶龄植株的百分率。

2 试验结果与分析

试验结果见表1、2和表3。

2.1 播后16天或17天,幼苗3~4叶时,杂交种与对应不育系的出叶数均表现出了差异。3个杂交种第4片展开叶株率已达到69%~81%,而3个不育系第4片展开叶株率为11%~17%。

收稿日期:2006-08-05。

作者简介:陈恩瑞(1956~),男,农艺师;主要从事玉米、水稻新组合选育及推广。