

正交设计在高氏白澳山龙眼组培快繁中的应用*

范贤熙¹, 邓莉兰², 胡 秀², 王 奇², 段晓梅², 黄美娟², 樊国盛^{2**}

(1. 贵州师范大学 地理与生物科学学院, 贵州 贵阳 550001;
2. 西南林学院 园林学院, 云南 昆明 650224)

摘要:以高氏白澳山龙眼 *Leucadendron galpinii* 幼苗为外植体, 采用正交设计试验, 研究不同因子的不同水平对高氏白澳山龙眼丛芽增殖与生根的影响。结果表明, 外源激素中, 6-BA 对丛芽分化影响最大, 在 0.5~1.0 mg·L⁻¹, 其丛芽分化随 6-BA 浓度的升高而增多, 而在 1.0~2.0 mg·L⁻¹ 则反之; NAA 对丛芽分化影响不明显; 蔗糖、抗坏血酸均随浓度升高丛芽分化增多。经方差分析显示, 最佳丛芽增殖配方为: 1/2MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ + 蔗糖 30 g·L⁻¹ + 抗坏血酸 15 mg·L⁻¹。IBA 对生根培养影响最大。在光照培养条件下, 最佳生根培养配方为: IBA 1.5 mg·L⁻¹ + 改良 MS + 蔗糖 30 g·L⁻¹。

关键词:高氏白澳山龙眼; 生根培养; 丛芽增殖; 正交设计

中图分类号: Q949.739.02; O212.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0457(2007)06-0519-05

Application of orthogonal design in tissue culture of *Leucadendron galpinii**

FAN Xian-xi¹, DENG Li-lan², HU Xiu², WANG Qi², DUAN Xiao-mei², HUANG Mei-juan², FAN Guo-sheng^{2**}

(1. School of Geographical and Biological Sciences, Guizhou Normal University, Guizhou Guiyang 550001, China;
2. Faculty of Landscape Architecture, Southwest Forestry University, Yunnan Kunming 650224, China)

Abstract: The seedlings of *Leucadendron galpinii* were used as the explants and the effects of different levels of the factors on axillary shoot proliferation and rooting were studied with orthogonal design. The results showed that the effect of 6-BA was the biggest among the external hormones. The axillary shoot proliferation increased with the increasing of 6-BA concentrations in the range of 0.5-1.0 mg·L⁻¹ and was contrary in the range of 1.0-2.0 mg·L⁻¹. The effect of NAA was not significant on axillary shoot proliferation. As the concentrations of sucrose and ascorbic acid were increasing, the axillary shoot proliferation increased significantly. According to the results of variance analysis, the optimal medium for axillary shoot proliferation showed as follows: 1/2MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ + sucrose 30 g·L⁻¹ + ascorbic acid 15 mg·L⁻¹. The effect of IBA on rooting was the biggest and the optimal medium for rooting was IBA 1.5 mg·L⁻¹ + modified MS + sucrose 30 g·L⁻¹, under the condition of light.

Key words: *Leucadendron galpinii*; rooting; axillary shoot proliferation; orthogonal design

高氏白澳山龙眼 *Leucadendron galpinii* 是山龙眼科 Proteaceae 银叶树属 *Leucadendron* 低矮直立的常绿灌木, 单叶, 全缘, 互生, 叶及小枝上有银灰色柔毛, 雌雄异株, 花黄色, 花期 10~12 月, 原产南非^[1], 现澳大利亚、新西兰、美国及以色列等国已引种栽培。在国际上, 高氏白澳山龙眼是一种新型的切花资源, 其黄、银灰色的花球及灰绿色的叶片都是极好的装饰材料。为丰富我国切花植物资源, 开发木本切花新产业, 西南林学院已从国外引进本种。

在国外, 高氏白澳山龙眼主要以种子、穗条进行繁殖, 其组织培养快繁的研究, 国内外均未见报道。运用正交设计法对高氏白澳山龙眼进行研究, 一方面可以解决新品种培育的种质保存问题; 另一方面可以在较短的时间内用较少的试验次数找出高氏白澳山龙眼的最佳配方, 得到大量的组培苗, 为引进的材料快速

收稿日期: 2007-06-25; 修回日期: 2007-10-15

基金项目: 国家“948”项目资助(2003-04-20); 西南林学院园林植物与观赏园艺省级重点学科资助(2002C02)

作者简介: 范贤熙(1977-), 男, 贵州锦屏人, 助教, 从事园林教学及规划设计研究工作。

** 通讯作者: E-mail gsfan@public.km.yn.cn.

在中国推广打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验所用材料为引自澳大利亚的高氏白澳山龙眼 *Leucadendron galpinii* 种子,在无菌条件下发芽而得的幼苗。

1.2 试验方法

1.2.1 丛芽增殖 采用文献[2]的正交试验方法。以丛芽数为考察指标,选取 1/2MS 为基本培养基,添加 6-BA、NAA、抗坏血酸,各组均加琼脂 $6.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 6-BA 取 4 水平, NAA、抗坏血酸及蔗糖各取 2 水平。各因素及水平见表 1, 试验组合见表 3。

按表 3 进行培养基的配制,每瓶分装培养基约 40mL。以无菌发芽的健壮幼苗在超净工作台上接种于配制好的培养基上,每瓶接种 3 个幼芽,每个处理 3 次重复。接种好的材料置于室中培养,培养温度为 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照为 $14\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照 + $10\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 黑暗, [光] 照度为 $3\ 000\text{lx}^{[3]}$, 30d 后对丛芽数进行统计分析。

表 1 高氏白澳山龙眼丛芽增殖试验因素及水平

Tab. 1 The factors and levels of axillaries shoot proliferation

代号	因素	水平			
		1	2	3	4
A	6-BA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5	1.0	1.5	2.0
B	NAA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.01	0.10		
C	蔗糖($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	20	30		
D	抗坏血酸($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	10	15		

1.2.2 生根培养 采用文献[2]的正交试验方法。将生根数、根长及苗的生长状况综合为考察目标,30d 后,当苗长至 2~3cm 时,将生长健壮的苗在超净工作台上切下接种于生根培养基上。以生长素 IBA、培养基、抗坏血酸及光照为因素。各组均加琼脂 $6.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。各因素及水平见表 2, 试验组合见表 5。

表 2 高氏白澳山龙眼生根试验因素及水平

Tab. 2 The factors and levels of rooting

代号	因素	水平			
		1	2	3	4
A	IBA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5	1.0	1.5	2.0
B	培养基	1/2MS	改良 MS		
C	蔗糖($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	20	30		
D	光照处理	暗处理	光照培养		

注:改良 MS 为大量元素中磷含量减少 2/3, 钙含量减少 1/3, 其它元素均取 MS 的 1/2; 微量元素、铁盐、微生物均按 1/2MS 量取。

按表 5 配制生根培养基,每瓶分装约 40mL。将健壮的丛芽在超净工作台上切成单芽,接种于已配制的生根培养基上,每瓶接种 3 个幼芽,每处理 3 次重复。已接种的材料,设计为光照培养的各组,置于室中培养,培养温度为 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照为 $14\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照 + $10\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 黑暗, [光] 照度为 $3\ 000\text{lx}^{[3]}$; 设计为暗处理的各组先置于培养箱中进行暗处理 12d, 培养条件为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 14\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ + $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 10\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 然后取出放在培养室中进行光照培养,培养温度为 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照为 $14\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照 + $10\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 黑暗, [光] 照度为 $3\ 000\text{lx}^{[4]}$ 。40d 后,对生根数、根长及根的生长状况进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 丛芽增殖

接种10d后,转接在3、4、7组的幼芽开始萌动,30d后,各组均有丛芽长出(见图1)。由于添加外源激素、糖、抗坏血酸的水平不同,因而各组丛芽数据差异明显。统计丛芽诱导率,对数据进行统计分析^[5],结果如表3。

表3 高氏白澳山龙眼丛芽增殖试验各因素组合及结果

Tab. 3 Different proportions of factors and the results of axillaries shoot proliferation

试验号	因 素				丛芽数
	A(6-BA) (mg·L ⁻¹)	B(NAA) (mg·L ⁻¹)	C(蔗糖) (g·L ⁻¹)	D(抗坏血酸) (mg·L ⁻¹)	
1	0.5 (1)	0.01 (1)	20 (1)	10 (1)	2.5
2	0.5 (1)	0.10 (2)	30 (2)	15 (2)	3.3
3	1.0 (2)	0.01 (1)	20 (1)	15 (2)	4.6
4	1.0 (2)	0.10 (2)	30 (2)	10 (1)	4.9
5	1.5 (3)	0.01 (1)	30 (2)	10 (1)	4.0
6	1.5 (3)	0.10 (2)	20 (1)	15 (2)	3.9
7	2.0 (4)	0.01 (1)	30 (2)	15 (2)	4.3
8	2.0 (4)	0.10 (2)	20 (1)	10 (1)	3.4

注:丛芽数=30d后每个组合总丛芽数/每个组合接种幼芽数;丛芽统计数据为3个重复的平均值。

从表3可看出,4组丛芽增殖率最高,增殖倍数为4.9。各因素水平组合为A₂B₂C₂D₁,即6-BA 1.0mg·L⁻¹,NAA 0.1mg·L⁻¹,蔗糖30g·L⁻¹,抗坏血酸10mg·L⁻¹。经表4极差分析得出,高氏白澳山龙眼丛芽增殖极差大小顺序为RA > RC > RD > RB,从极差大小可得出影响高氏白澳山龙眼丛芽增殖因素的主次顺序依次为6-BA > 蔗糖 > 抗坏血酸 > NAA。各因素的最佳水平为A₂B₂C₂D₂,即6-BA 1.0mg·L⁻¹,NAA 0.10mg·L⁻¹,蔗糖30g·L⁻¹,抗坏血酸15mg·L⁻¹。

对于丛芽增殖,外源激素中6-BA对丛芽分化的影响最大,在0.5~1.0mg·L⁻¹内,随着6-BA浓度升高,丛芽分化增多;在1.0~2.0mg·L⁻¹时,则随浓度升高丛芽分化减少。NAA对丛芽分化影响不明显,在0.01~0.10mg·L⁻¹内随浓度升高丛芽分化增多。蔗糖、抗坏血酸在设计水平范围内均是随着浓度升高丛芽分化增多。

表4 高氏白澳山龙眼丛芽增殖直观分析

Tab. 4 Visualized analysis of axillaries shoots proliferation

因 素	丛 芽 数				R
	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	
A	2.9	4.75	3.95	3.85	1.85
B	3.8	3.88			0.08
C	3.6	4.12			0.52
D	3.7	4.11			0.41

注:k₁、k₂、k₃、k₄为各因素水平1、水平2、水平3、水平4的均值;R为极值。下表同。

2.2 生根培养

转接在生根培养基上的健壮幼苗,16d后4、8组有根萌动。50d后,记录各组根的数量、长度及生长状况(见图2)。在试验中,根的质量、数量直接影响组培苗移栽的成活率,因此对根的分析采用综合评分法。根的生长状况以优、良、中、差进行分级并将之数量化(优:4;良:3;中:2;差:1);根长度乘以5。将数量、长度、生长状况3项值的和作为综合评分值,以综合评分值作为单指标进行分析^[5-6],结果见表5。



图1 丛芽增殖

Fig. 1 Axillary shoot proliferation

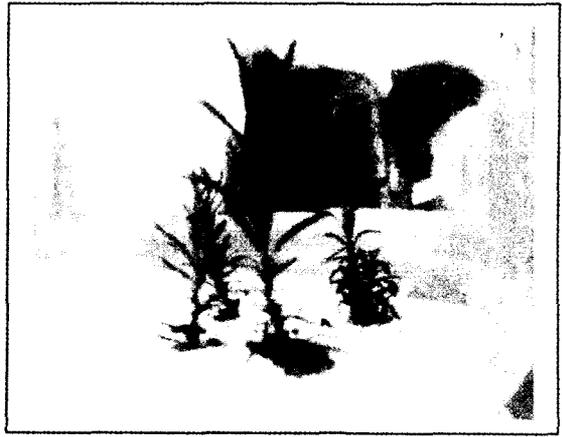


图2 生根培养

Fig. 2 Rooting

从表5的综合评分可以看出,生根试验以第6组为最好,实际观察也是第6组的最好,生根率达到95%。各因素水平组合为 $A_3B_2C_1D_2$,即 $IBA 1.5mg \cdot L^{-1}$,改良MS,蔗糖 $20g \cdot L^{-1}$,光照培养。经表6的极差分析,其极差大小顺序为 $RA > RB > RC > RD$,影响高氏白澳山龙眼生根的各因素主次顺序为 $IBA > 培养基 > 蔗糖 > 光照处理$ 。其生根培养的最佳组合为 $A_3B_2C_2D_1(D_2)$,即 $IBA 1.5mg \cdot L^{-1}$, $1/2MS$,蔗糖 $30g \cdot L^{-1}$,光照培养(或暗处理)。由于在光照培养基上的苗长势比经过暗处理的旺盛,而健壮的生根苗有利于移栽成活,因此从表6还可看出,高氏白澳山龙眼生根最佳组合为 $A_3B_2C_2D_2$,即 $IBA 1.5mg \cdot L^{-1}$,改良MS,蔗糖 $30g \cdot L^{-1}$,光照培养。

表5 高氏白澳山龙眼生根培养各因素组合及数据分析

Tab. 5 Different proportions of factors and the results of rooting

试验号	因素				评分项目			综合评分
	A(IBA) ($mg \cdot L^{-1}$)	B(培养基) ($mg \cdot L^{-1}$)	C(蔗糖) ($g \cdot L^{-1}$)	D(光照处理)	根数 (条)	根长 $\times 5$ (cm)	根质量	
1	0.5 (1)	1/2MS (1)	20 (1)	暗处理(1)	0	0	0	0
2	0.5 (1)	改良MS (2)	30 (2)	光照培养(2)	0.5	0.3 $\times 5$	差:1	3
3	1.0 (2)	1/2MS (1)	20 (1)	光照培养(2)	0	0	0	0
4	1.0 (2)	改良MS (2)	30 (2)	暗处理(1)	6.08	0.6 $\times 5$	良:3	12.08
5	1.5 (3)	1/2MS (1)	30 (2)	暗处理(1)	1.46	0.3 $\times 5$	差:1	3.96
6	1.5 (3)	改良MS (2)	20 (1)	光照培养(2)	7.17	0.8 $\times 5$	优:4	15.17
7	2.0 (4)	1/2MS (1)	30 (2)	光照培养(2)	0.3	0.3 $\times 5$	差:1	2.8
8	2.0 (4)	改良MS (2)	20 (1)	暗处理(1)	0.93	0.4 $\times 5$	中:2	4.93

表6 高氏白澳山龙眼丛芽生根直观分析

Tab. 6 Visualized analysis of rooting

因素	综合评分				R
	k_1	k_2	k_3	k_4	
A	1.50	6.04	9.56	3.86	8.06
B	1.69	8.79			7.1
C	5.02	5.46			0.44
D	5.24	5.24			0

上述4种因素中生长素 IBA 对生根影响最大,其最佳浓度为 $1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,过高或过低都不利于根的分化;培养基以改良培养基为好,1/2MS 培养基上也有根产生,但生根率低,根的质量也没有在改良 MS 上的高;蔗糖以 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 有利于生根,浓度偏低的综合表现不良;光照培养与暗处理极差分析并无区别,但在试验实际观察中,经过暗处理的各组比光照培养的各组生根时间要早,而在后期生长中光照培养的组其根生长反而比经暗处理的各组要好,苗生长也较好。

3 讨 论

3.1 由于高氏白澳山龙眼组培快繁目前国内外尚未见相关报道,所以本次研究在作正交试验设计前对基本培养基、外源激素等因子都进行了试验,筛选出 1/2MS 为最佳增殖培养基,转接在 MS 上的外植体 13d 后均褐化;得出了较适于高氏白澳山龙眼增殖与生根的激素浓度,丛芽增殖用 6-BA 比 KT 效果要好;对于生根,IBA 比 NAA、IAA 效果明显。试验中发现在 1/2MS 上最高生根率较低,仅有 28%,所以对培养基进行改良,更有利于根的分化。

3.2 在得到最适合培养基、激素种类的基础上,应用正交试验,对丛芽增殖及生根的最佳配方进行选择,以最少的试验次数得到了丛芽增殖的最佳配方为 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA} 1.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{蔗糖} 30\text{g}\cdot\text{L}^{-1} + \text{坑坏血酸} 15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;在光照培养条件下,生根培养最佳组合为 $\text{IBA} 1.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{改良 MS} + \text{蔗糖} 30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在上述最佳配方中,高氏白澳山龙眼的增殖、生根均达到了较好的水平。由此可见,正交试验有利于减少试验次数,节约经费,将最优的配方在最短的时间里应用到生产实践中去。

3.3 在生根培养中发现,经暗处理的组合,其根要比未经暗处理的萌动早;但生长到后期,光照处理的各组根的长度、健壮程度则没有太大差别。这可能是暗处理时间稍长,使幼苗的碳水化合物积累受到影响,从而影响根的后期生长。在后续研究中,可以对暗处理时间进行有针对性的试验,促进快繁苗的生根,得到最佳的生根组合,从而缩短快繁时间。

参 考 文 献:

- [1] REBELO, ANTHONY, PROTEAS. A Guide to the Proteas of Southern Africa [M]. Freewood Press [SOUTH AFRICA], 2000:376-392.
- [2] 中国科学院数学研究所数理统计组. 正交试验法[M]. 北京:人民教育出版社,1975:202.
- [3] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999:38-60.
- [4] 刘进平,曹孜义,李 唯,等. 扁桃试管苗生根培养的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2001,36(2):155-159.
- [5] 数理统计编写组. 数理统计[M]. 北京:中国林业出版社,1992:102-150.
- [6] 正交试验法编写组. 正交试验法[M]. 北京:国防工业出版社,1976:75-89.
- [7] 陆美莲,许新萍,周厚高,等. 均匀正交设计在百合中的应用[J]. 西南农业大学学报,2004,26(6):699-702.