

寒兰组培苗生根培养的多因子正交试验研究

黄 闽 敏, 刘 晓 芳, 曹 青 爽

(新疆林业科学院测试中心 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要:应用正交试验设计对寒兰组培苗的生根培养进行研究。结果表明:寒兰组培苗生根的最佳培养基为花宝 2 号培养基+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+香蕉 50 g/L,其中培养基种类和天然复合物对其影响最大,通过方差分析达到了极显著水平。

关键词:寒兰;生根培养;正交试验

中图分类号:S 682.31;S 603.6 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2009)04-0053-03

寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)属兰科兰属,在我国主要分布在福建、浙江、江西、湖南、广东等地,四川及云贵高原时有发现。寒兰是珍贵的观赏花卉,由于在自然状态下繁殖困难,故传统栽培靠分株繁殖,周期长,繁殖率低^[1]。从 1960 年 Morel^[2] 开创兰花快速组织培养技术以来,兰花的快速繁殖尤其在中国兰的组织培养方法上有许多突破。以往关于国兰的快繁研究多集中在对春兰、剑兰、蕙兰和墨兰等组织培养,并且建立了相应的离体快繁技术体系,有关寒兰的组织培养却鲜有报道。该试验通过对无毒寒兰苗培养基中不同激素配比生根壮苗影响的研究,筛选出有利于生根壮苗的培养基

配方,为逐步建立稳定的高频再生系统、实现无毒工厂化、规模化快速培育优良种苗提供科技支撑。

1 材料与方法

1.1 材料的获取

1.1.1 材料 寒兰(紫燕品种)无根组培苗。

1.1.2 获取的方法 利用植物组织培养技术,经过继代培养后获取。继代培养:MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L,培养基中加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 值调至 5.8。将初代培养后的小苗在无菌条件下转接到继代培养基中进行继代培养;在培养 40 d 后,苗高达 3~5 cm,叶浓绿,长势良好,符合生根要求,可以进行生根培养。

1.1.3 实验地点 在新疆林业科学研究院植物组织培养实验室。

1.2 试验方法

第一作者简介:黄闽敏(1980-),女,乌鲁木齐人,助理研究员,现主要从事植物生理生态等研究工作。

基金项目:国家“948”计划资助项目(20040423)。

收稿日期:2008-11-02

Change in Pectin Decomposition Enzyme During Storage of Pear Fruits

PIAO Yi-long, ZHAO Lan-hua, WU Rong-zhe

(Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China)

Abstract: Compared the variety of pectin decomposition enzyme during fruit softening stage in two ‘Pingguoli’ and ‘Niitaka’ species that have different storage potential and investigated the activity change in pear pectin decomposition enzyme during storage stage. The results showed that the polygalacturonase (PG) activity was increased in two species during fruit softening and to the end of storage PG activity in ‘Niitaka’ was significantly ($P<0.01$ =higher than ‘Pingguoli’; β -Galactosidase (β -Gal) activity was lower and reduced during storage in high storage potential ‘Pingguoli’, in contrast, β -Gal activity in low storage potential ‘Niitaka’ was significantly ($P<0.01$) higher than ‘Pingguoli’ and the highest activity represented with increasing soluble pectin content; the activity of pectin methyl esterase (PME) was increased during end of storage stage in ‘Pingguoli’, however, reduced in ‘Niitaka’. Several evidences indicated that both PG and β -Gal play role in fruit softening during storage stage and β -Gal more important; the activity of PME variety depended species during storage stage and not strongly influence storage potential.

Key words: Pear fruit; After harvest; Pectin decomposition enzyme

1.2.1 试验设计 选用 $L_9(3^4)$ 设计进行四因素三水平的正交试验, 查阅相关文献资料, 确定各参试的因素及水平(见表 1)。

表 1 正交试验因素水平

水平 Level	因素 Factor			空列 Empty row
	A: 培养基种类 Culture medium types	B: 激素 NAA(IBA)Hom- ene NAA(IBA)/mg · L ⁻¹	C: 香蕉 Banana /g · L ⁻¹	
1	1/2MS 培养基	0.1(0.5)	0	1
2	花宝 1 号培养基	2(0)	30	2
3	花宝 2 号培养基	0.5(0)	50	3

1.2.2 培养基和试验因素的选择 该研究通过在不同的培养基中加入不同浓度的生长激素和天然复合物香蕉的试验, 研究分析其对寒兰组培苗生根的影响, 以此寻求寒兰生根培养基的最佳水平组合。试验共做了 9 组培养基, 每组对应培养基的试验重复取样 6 次, 每瓶接 10 株苗, 要求接种到 6 瓶中的小苗其长势、苗高要基本相同, 诱导培养 50 d。观察记载试验过程中的各种现

象与有关的数据, 以此来统计分析比较各种培养基条件下的生根情况, 确定出最合适的激素种类与天然复合物的配比。

1.2.3 测定指标 培养 50 d 后, 将培养瓶置于温室中, 自然光下练苗 1 周, 开盖取出洗净, 根部晾干, 统计其生根数。

1.2.4 培养条件 培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; 每天光照 12~16 h; 光照强度 3 000 lx 左右; 培养室湿度 60%~70%。

1.2.5 数据分析 采用 DPS3.01 版统计软件对数据进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

为得到寒兰生根培养基的最优配方, 采用三组因子选择 $L_9(3^4)$ 正交表得到试验结果见表 2。该试验为非区组设计的有重复试验, 由表 2 知 处理数 $n=9$ 实用列 $m=4$ 其中第 4 列为空列, 用以估计误差模型, 表中数据重复次数 $X=5$ 。

表 2 生根条件正交试验结果

Orthogonal experimental results of rooting conditions											
试验号 No.	A 培养基种类 Caltare medium types	B 激素 NAA+IBA Homene NAA+ IBA/ mg · L ⁻¹	C 香蕉 Banana /g · L ⁻¹	D	生根数(重复) Roots number						
					X1	X2	X3	X4	X5	\bar{X}	
1	1	1	1	1	3.40	2.60	2.25	1.75	2.25	2.45	
2	1	2	3	2	3.40	3.00	2.60	2.00	2.50	2.70	
3	1	3	3	3	3.57	3.33	1.50	2.83	2.67	2.78	
4	2	1	2	3	4.00	4.00	3.83	3.83	3.80	3.89	
5	2	2	3	1	4.60	3.40	3.40	5.00	3.8	4.04	
6	2	3	1	2	3.17	3.67	3.00	3.40	1.60	2.97	
7	3	1	3	2	5.29	4.57	4.71	4.50	4.00	4.61	
8	3	2	1	3	4.50	2.14	3.57	4.29	3.57	3.61	
9	3	3	2	1	4.63	3.75	3.71	3.71	3.86	3.93	

表 3 直观分析结果

Result of Visual analysis				
因子 Factors	A 培养基种类 Caltare medium types	B 激素 NAA+IBA Hormene NAA+ IBA/ mg · L ⁻¹	C 香蕉 Banana /g · L ⁻¹	D
K 1	47.59	65.75	54.19	62.5
K 2	65.4	62.13	63.15	61.7
K 3	72.96	58.08	68.61	61.7
K 1	2.644	3.653	3.01	3.47
K 2	3.633	3.451	3.508	3.43
K 3	4.054	3.227	3.812	3.43
R	1.41	0.426	0.801	0.05

2.1 正交试验结果及其直观分析

因素的主次是以极差(R)的大小来衡量。极差(R)大, 表明此因素对试验的产生与结果影响大, 即此因素比较重要, 反之, 极差(R)小, 则表明其对试验的影响小, 即此因素相比较为次要^[3]。不同处理对寒兰生根条数影响的直观分析见表 2。从寒兰组培苗平均生根数和各因素的 K 值及极差(R)值的结果可以看出: 该试验因素 A 培养基种类的 R 值最大, 为 1.41, 因素 C 香蕉次之, 为 0.801, 然后是因素 B 激素, R 值为 0.426, 说明参试因素中因素 A 对寒兰生根的效应最大, 因素 C 次之, 最后是激素。因此, 因素影响顺序为: A>C>B。

由图 1 可见最佳表现组合为 A 3B 1C 3。直观分析法简单, 计算量小, 但不能给出误差大小的估计, 也就不能知道分析的精确度。为了弥补这些缺陷, 可采用方差分析的方法对试验结果进行处理^[3]。

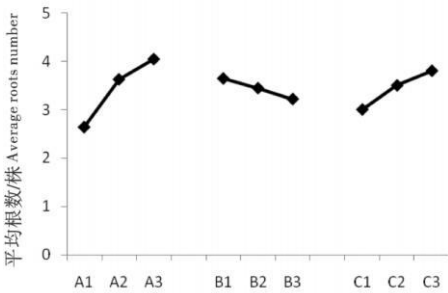


图 1 因素与指标趋势图

Fig.1 Trend chart of factors and levels

2.2 方差分析

方差分析结果见表 3。由表 3 可以看出, 培养基种类对寒兰生根的诱导影响最大, 通过方差分析显示, 培养基种类和香蕉对其生根的影响都达到了极显著水平 ($P<0.01$)。激素的影响最小, 但也达到了显著水平

($P<0.05$)。这说明在生根过程中,培养基种类对其的影响占主导作用,然后是天然复合物香蕉、激素。方差分析的结果与直观分析的结果一致。

表 4 方差分析结果

Table 4 Result of Variance analysis					
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
Source	SS	df	Ms		Significant level
区组 Block	5.083	5	1.017		
A	18.86	2	9.432	38.79 **	0
B	1.635	2	0.817	3.361 *	0.0448
C	5.895	2	2.947	12.12 **	8E-05
x(4)D	0.025	2	0.013	0.052	0.9495
误差 Error	9.727	40	0.243		
总和 Total	41.23				

注“**”代表极显著水平;“*”代表显著水平。
Note: “**”and “*” indicate the obviously significant differences and significant differences respectively.

2.3 主效应因素的多重比较

对 A、B、C 三个因子的各个水平进行差异显著性比较,结果(见表 5)表明, A 因素不同水平中 A2 和 A3 相对于 A1 对寒兰生根效应有明显提高,在方差分析水平上均达到极显著水平($P<0.01$),而 A3 也显著高于 A2,且达到了显著水平($P<0.05$)。这说明花宝二号相对于其余 2 种培养基更有利于寒兰的生根。B 因素不同水平中 B1 略高于 B2,未达到显著水平,但显著高于 B3,达到了显著水平($P<0.05$),表明在 3 种激素组合中, B1 水平即激素 0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA 对促进寒兰生根效应最大。C 因素不同水平随着天然复合物香蕉含量的增大,生根数呈增大多的趋势,通过方差分析结果显示,因素 C2、C3 显著高于 C1,且 C3 达到极显著水平($P<0.01$)。

表 5 A、B、C 因子各水平的差异显著性

Table 5		The significant of A、B and C													
因素	A 均值	$P_{0.05}$		$P_{0.01}$		B 均值	$P_{0.05}$		$P_{0.01}$		C 均值	$P_{0.05}$		$P_{0.01}$	
Factor	A means					B Means					C means				
1	2.644	c		B		3.653	A	A			3.01	b		B	
2	3.633	b		A		3.451	Ab	A			3.508	a		AB	
3	4.054	a		A		3.227	B	A			3.812	a		A	

2.4 最优培养基的筛选

经直观分析、方差分析和多重比较,确定寒兰组培

苗生根的最优培养基为 A3B1C3,即花宝 2 号培养基+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+香蕉 50 g/L。

3 讨论

植物生长调节物质对植物组织和细胞的增殖、分化起着关键的作用^[4]。正交设计是多因素分析的有力工具,在植物组织和细胞培养中,必须进行激素种类和浓度的配比试验,工作量相当大。运用正交设计可以精简试验次数、克服在培养基配方设计上的盲目性、大大提高工作效率和试验的可靠性。正交设计等统计方法应用于植物离体培养的研究,国内最早见于广东省植物研究所的报道^[5],后来相继应用于许多植物的离体培养,并取得良好的试验效果,该试验研究采用多指标的正交设计方法进行的 4 因素 3 水平试验,在综合评定的基础上筛选出了适合寒兰无根组培苗生根的最优生根培养基。

由极差分析与方差分析的结果可看出,在参试的 3 种因素中,以培养基种类对组培苗生根的影响为大,天然复合物香蕉次之,激素组合最小。

从试验得到寒兰组培苗生根培养基,其培养基花宝 2 号培养基+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L+香蕉 50 g/L,这一水平组合并没有出现在上述 9 次试验中,体现了正交试验的优点,可以通过较少次数的试验取得最佳水平组合。如全面实施,要配制 3⁴(81)种培养基,而利用正交设计,只用了 9 种试验组合,通过统计学分析,明确了寒兰组培苗生根的主要因素,同时优化筛选了最佳培养基,简化了研究方案,节省了大量的实验量,提高了组织培养的工作效率和准确性。

参考文献

[1] 李子红, 贾燕. 珍品兰花快速繁殖与养护[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 249-256.
[2] MORELG. Producing Virus-free Cymbidiums[J]. Am Orchid SocBull 1960(29): 495-497.
[3] 王钦德, 杨坚. 食品试验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 349-361.
[4] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 28-29.
[5] 广东省植物研究所遗传室, 广东师范学院数学系. 用正交与不完全区组试验法提高籼稻花药培养成功率[J]. 广东师范学院学报, 1976(1): 100-112.

Study on Root Induction Culture of *Cymbidium* by Applying Orthogonal Design

HUANG Min-min, LIU Xiao-fang, CAO Qing-shuang
(Xinjiang Academy of Forestry, Xinjiang Urumqi, 830000, China)

Abstract: Applying the orthogonal experiment design, the root induction culture of *Cymbidiumkanran* was studied. The experimental results showed that Hyponex 2 medium+0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA was suitable for root induction of *Cymbidiumkanran*. Statistic analysis indicated that the main factor which influenced were medium types and natural complex. And the root induction was markedly increased.

Key words: *Cymbidiumkanran*; Root induction culture; Orthogonal experiment