

【生物科学与工程】

四倍体刺槐组培瓶苗生根培养研究

刘丹梅, 衣杰, 孙书伟

(辽东学院 农业与环境学院, 辽宁 丹东 118003)

摘要: 应用正交设计法研究 6-BA, NAA 及琼脂等 3 个因子对四倍体刺槐组培苗生根率的影响, 试验按正交表 L16 (4⁵) 形成 3 因素、4 水平的不同配比。试验结果表明: 最佳的增殖培养基是 1/2MS + 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.1mg/L + 琼脂 6g/L。

关键词: 四倍体; 刺槐; 生根培养; 组织培养; 正交试验

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4939 (2007) 02-0070-03

四倍体刺槐是韩国采取人工诱变育种法培育出的一个高科技刺槐新种, 1996 年北京林业大学率先引入我国实验栽培, 并取得了良好的效果。与普通刺槐相比, 其物候期基本一致, 具有生长迅速, 树干通直, 叶大肥厚, 无刺或少刺; 抗性强, 适应范围广; 对光照及其他生态因子要求不强; 繁殖容易等生物学特性^[1]。但由于四倍体刺槐结实率及发芽率低, 扦插生根缓慢, 且易受季节限制等因素, 在一定程度上限制了其利用。用组织培养的方法进行繁殖, 增殖率高, 生长健壮, 可达到快繁的目的, 且能在一定程度上保持母本的优良性状^[2]。作者采用正交试验设计, 结合四倍体刺槐的离体快繁, 就四倍体刺槐组培苗生根培养阶段进行了研究分析, 解决了其生根缓慢、成活率低等问题, 成功地筛选出生根培养基激素和琼脂的最佳组合, 建立了四倍体刺槐的再生系统。

1 材料和方法

外植体选用室内水培枝和室外枝条的中下部, 试验材料被剪成 1.5~2.0 cm 带腋芽茎段(尖)流水冲去表面污物, 用去污粉浸泡, 同时用毛刷搅动 5~10 min, 自来水冲洗 30 min, 在无菌条件下用 70% 酒精表面消毒 30 s, 用 0.1% HgCl₂ 消毒 8~10 min, 用无菌水清洗 4~5 次, 浸入无菌水中备用,

消毒后切去材料与药液接触伤口, 切分为 2.0 cm 带腋芽茎段或茎尖接种于无菌培养基上。以 MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + GA 0.3 mg/L 培养基作为诱导培养基。培养室温度 24~28 ℃, 空气相对湿度 40%~70%, 光照时间 12 h/d, 光照强度 2 000~3 000 lx^[3]。

将在芽诱导培养基中长出的健壮的四倍体刺槐丛生芽切成带 1 个腋芽的 0.5~1.0 cm 长的切段, 每个培养瓶接种 15 段, 每种培养基接种 10 瓶, 在整个生根培养过程中每隔 5 天观察 1 次, 直到结果稳定^[4]。选用 1/2MS 培养基作为基本培养基, 调节 BA 和 NAA 的激素水平以及琼脂的用量, 按照正交试验方法进行试验设计(见表 1)。另外培养基中填加蔗糖 20 g/L, 活性炭 3 g/L, pH 值调至 5.8。培养条件: 温度 25 ℃, 光照 3 000~5 000 lx, 光照时间 12 h/d。将相同质量的组培苗接种到表 1 的培养基上, 调查生根率和生长情况, 并对所得数据进行统计处理^[5]。

表 1 正交试验因素水平 L16 (4⁵)

| 水平 | A | B | C |
|----|------|-----|----|
| | 6-BA | NAA | 琼脂 |
| 1 | 0 | 0 | 4 |
| 2 | 0.1 | 0.1 | 5 |
| 3 | 0.5 | 0.2 | 6 |
| 4 | 1 | 0.3 | 7 |

基金项目: 丹东市科研基金资助项目 (02127)

收稿日期: 2006-08-20

作者简介: 刘丹梅 (1973—), 女, 辽宁丹东人, 硕士, 主要从事生物技术研究。

2 结果与分析

2.1 统计根数

接种 20 d 左右即可开始观察统计根数, 将每种培养基接种的 10 瓶根数取平均值计算生根率作为原始资料 (见表 2)。

2.2 数据处理

采用极差分析法可以直观地看出各因素的主次顺序, 找出最佳组合 (见表 3)。

由 k 值大小可以求得最佳水平组合为 A3B2C3, 即 6-BA0.5 + NAA0.1 + 琼脂 6, 由三因素的极差值大小可以看出各因素对生根影响的主次关系为 6-BA > NAA > 琼脂。更进一步的精密分析采用方差分析 (见表 4)。方差分析的结果表明, 三个筛选条件中, 6-BA 和 NAA 对生根影响的作用极显著, 琼脂的作用不显著。这个结果与直观分析中影响因素的主次关系是一致的。

表 2 正交试验结果

| 序号 | A | B | C | e | 生根率 (%) |
|----|---|---|---|---|---------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.0 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 12.1 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 15.2 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 0.0 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.0 |
| 6 | 2 | 2 | 3 | 4 | 30.7 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 7.1 |
| 8 | 2 | 4 | 1 | 2 | 0.0 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 36.5 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 95.2 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 85.0 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 13.5 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 10.9 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 38.0 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 13.1 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 0.0 |

表 3 正交试验极差分析表

| 序号 | A | B | C | e |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| K ₁ | 27.3 | 47.4 | 85 | 58.6 |
| K ₂ | 37.8 | 176 | 38.7 | 108 |
| K ₃ | 230.2 | 120.4 | 120.4 | 110.4 |
| K ₄ | 62 | 13.5 | 113.2 | 80.3 |
| k ₁ | 6.83 | 11.85 | 21.25 | 14.65 |
| k ₂ | 9.45 | 44 | 9.68 | 27 |
| k ₃ | 57.55 | 30.1 | 30.1 | 27.6 |
| k ₄ | 15.5 | 3.38 | 28.3 | 20.08 |
| R | 50.72 | 40.62 | 20.42 | 12.95 |

表 4 正交试验方差分析表

| 变异来源 | 平方和 | 自由度 | 方差 | F | F0.05 | F0.01 |
|------|--------|-----|--------|-------|-------|-------|
| 6-BA | 6 774 | 2 | 3 387 | 27 | 4.26 | 8.02 |
| NAA | 3 996 | 2 | 1 998 | 15.93 | | |
| 琼脂 | 1 029 | 2 | 514.5 | 4.1 | | |
| 误差 | 1 129 | 9 | 125.4 | | | |
| 总和 | 12 928 | 15 | 861.87 | | | |

3 讨论

3.1 以往人们主要凭经验来筛选优化培养基, 往往繁琐且费时, 不一定能取得最佳效果, 而实验中多配置一种培养基就增加很大的工作量, 因此制定一个科学的实验方案是相当必要的, 并将起到事半功倍的作用。正交设计是多因素分析的有利工具, 它可以很方便的从众多因素中选出主要影响因素及最佳水平组合, 从而用较少的实验次数获得较多的信息, 为组织培养选择最佳培养基提供可靠的方法。本次试验得到最佳水平组合为 6-BA0.5 + NAA0.1 + 琼脂 6, 而这一水平组合并没有出现在上述 16 次试验中, 这正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, 本次试验若进行全部组合试验, 必须采用 $4^4 = 256$ 种配方, 而利用正交试验只需 16 种配方, 从而节省大量人力、物力、财力, 很大程度上提高了组织培养工作效率与准确性。

3.2 正交试验设计是否能发挥较好的效果, 关键在于参试因子与试验水平范围的正确选择。由试验数据分析按极差大小排出各因素主次顺序, 当某列极差不大时, 不一定说明所排因素不重要, 而只是表明就所选水平变动看, 反映不出该因素的重要性, 因此我们可以肯定极差大的因素是重要因素, 但却不能轻易肯定极差小的因素不重要, 有时也许需要进一步试验。

参考文献:

- [1] 任满田. 四倍体刺槐生物学特性及经济价值 [J]. 山西林业, 2003 (5): 29.
- [2] 栾庆书, 罗凤霞. 刺槐组织培养研究现状 [J]. 辽宁林业科技, 2001 (5): 28-31.
- [3] 郭军战, 舒庆艳, 王丽玲, 等. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究 [J]. 西北林学院学报, 2002, 7 (1): 15-18.

- [4] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 118 - 191.
学出版社. 2000: 26 - 36.

(责任编辑: 龙海波)

- [5] 林维宣. 试验设计方法 [M]. 大连: 大连海事大学出

Rooting Culture of Tetraploid Robinia Pseudoacacia L.

LIU Dan - mei, YI Jie, SUN Shu - wei

(College of Agriculture and Environment, Liaodong University, Dandong 118003, China)

Abstract: In order to analyze the effect of different contents of hormones and agar in the media on the bud rooting of tetraploid Robinia pseudoacacia L., a test with L16 (45) orthogonal design was conducted. The results indicated that the optimized multiplying culture media was composed of 1/2MS, 6 - BA 0.5mg/L, NAA 0.1mg/L, and agar 6g/L.

Key words: tetraploid; Robinia pseudoacacia L; rooting culture; tissue culture; orthogonal design

(上接第 69 页)

Determination of Organochlorine and Pyrethroid Pesticide Residues in Chinese Herbal Medicines by Capillary Gas Chromatography

OU Ying - fu¹, LI Fei², XIN Chun - hong², ZHAO Chun - jie²

(1. Medical College, Liaodong University, Dandong 118002, China;

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Method to determine organochlorine and pyrethroid pesticide residues in Chinese herbal medicines by GC was found. Pesticide residues were extracted from Chinese herbal medicines with acetone and petroleum ether. Liquid - liquid extraction was performed with n - hexane and the clean - up of the extracts were made with alumina neutral - florisil column. Analytical screening was determined by gas chromatography using capillary column equipped with electron - capture detector. The recovery obtained from Chinese herbal medicines samples (n = 3) at three concentration levels was in the ranges of 80.6% - 119.8%, with relative standard deviations of 0.7% - 9.5%. Detection limit was from 0.00005 to 0.0007 mg/kg for organochlorines and 0.005 to 0.008mg/kg for pyrethroids respectively. The results show that this method can be used to determine organochlorine and pyrethroid residues in Chinese herbal medicines.

Key words: organochlorine pesticide; pyrethroid pesticide; Chinese herbal medicine