

# 均匀设计在植物组织培养中的应用

徐华松<sup>1</sup> 唐 巍<sup>2</sup>

(1 华南农业大学生物技术学院, 广州, 510642; 2 中山大学数学系)

**摘要** 采用均匀设计及其分析方法来确定万利包心生菜器官发生的培养基配方, 在参选因素、水平数较多的情况下获得较理想的结果, 并得出各激素浓度、外植体成熟度的最佳组合为: MS+NAA 0.88 mg/L+BA 0.1 mg/L, 种子萌发 5 d 时的下胚轴上段(0.5 cm)。

**关键词** 均匀设计; 组织培养; 莴苣; 激素; 外植体

中图分类号 S 188

在植物组织培养中, 植物激素的种类、浓度以及外植体的部位、年龄等等的选择对植物的愈伤组织诱导和植株再生影响很大, 并且各因素之间取怎样的组合效果最佳是人们期待的。70 年代我国已把正交设计应用于植物的离体培养(广东省植物研究所遗传室, 1976), 从此, 正交设计成为植物组织培养研究的主要设计方法。随后, 孙洪涛等(1988)用多因子的方差分析、洪树荣等(1990)用正交拉丁方实验来筛选培养基, 均获得了较理想的效果。但是, 在参选的因素、水平数较多时, 正交设计及其它较流行的方法往往要求做较多的试验。方开泰(1994)正是为了解决多因素、多水平问题而提出了均匀设计。因此, 作者采用均匀设计方法对万利包心生菜的器官发生培养基中 NAA 浓度、BA 浓度以及外植体的年龄进行选择, 旨在找出最佳组合, 同时, 又能大大减少试验次数。

## 1 材料与方法

### 1.1 外植体

试材用莴苣(*Lactuca sativa* L.)万利包心生菜种子(由广州市蔬菜研究所提供)浸入体积分数为 70%乙醇中 30 s, 再用质量分数为 0.2%的升汞浸泡 5 min, 立即用无菌水清洗 4 次, 接种于已消毒的质量分数为 0.6%琼脂固化的基质上, 培养至一定天数, 在超净工作台上, 切取下胚轴上段(约 0.5 cm)为外植体, 接种于已消毒的各种 NAA、BA 浓度组合的 MS 培养基上。

### 1.2 培养条件

培养室温度控制在(25±2)℃, 光强为 1 500~2 000 lx, 每天照光 16 h, 培养室湿度保持在 70%左右。

### 1.3 均匀设计

1.3.1 因素、水平数的选定 选取 NAA、BA 的不同浓度及种子的萌发天数作为参选因素, 分别记为 A、B、C 三因素, 水平数分别选取如下: A 代表 NAA 浓度(mg/L),  $A_1=0.2$ ,  $A_2=0.4$ ,  $A_3=0.6$ ,  $A_4=0.8$ ,  $A_5=1.0$ ,  $A_6=1.2$ ; B 代表 BA 浓度(mg/L),  $B_1=0.1$ ,  $B_2=0.2$ ,  $B_3=0.3$ ,  $B_4=0.6$ ,  $B_5=0.8$ ,  $B_6=1.0$ ; C 代表种子萌发天数(d),  $C_1=5$ ,  $C_2=7$ ,  $C_3=9$ 。

1.3.2 均匀设计表的确定 实验设计时先不考虑因子间的交互作用,根据方开泰和王元(1994)的均匀设计表,选  $A_{2.69} U_6(6^2 \times 3^1)$  表,故得设计表(见表1)。

每种组合接种12瓶,每瓶接种3块外植体,两次重复.每种组合的芽数为该种组合中的平均芽数,即:该种组合的平均芽数=该种组合的总芽数/该种组合的瓶数.

以此方法确定适合芽再生的基本培养基.

表1  $A_{2.69} U_6(6^2 \times 3^1)$

试验组数	A	B	C
1	$A_2$	$B_3$	$C_3$
2	$A_4$	$B_6$	$C_2$
3	$A_6$	$B_2$	$C_1$
4	$A_1$	$B_5$	$C_3$
5	$A_3$	$B_1$	$C_2$
6	$A_5$	$B_4$	$C_1$

## 2 结果与分析

### 2.1 培养28d进行统计

培养28d的统计结果见表.

### 2.2 逐步回归分析

由于C因子的实验数值相对于A、B等因子的数值显得过大,因此,对C因子进行平移压缩处理使之和A、B的变化范围相适,对C的处理方法为:处理后  $C = (\text{处理前 } C - 4.5)/5$ , 以下C均指变换后的C.

表2 用均匀设计得出的莴苣再生芽数

芽数/(个·瓶 <sup>-1</sup> )	C/d	A/(mg·L <sup>-1</sup> )	B/(mg·L <sup>-1</sup> )
7.91	5	1.2	0.2
6.6	5	1.0	0.6
3.92	7	0.8	1.0
9.4	7	0.6	0.1
6.67	9	0.4	0.3
3.67	9	0.2	0.8

因为实验设计时,作者假定各因子是互相独立的,没有考虑因子间的交互作用,所以在分析结果时必须考虑到各因子间的交互作用.由于因子间的一级交互作用是主要的交互作用,故主要考虑  $C \times A$ ,  $C \times B$ ,  $A \times B$  的交互作用,即考虑二次逐步回归模型,模型表达式为:

$$N = \alpha_1 \cdot A + \alpha_2 \cdot A^2 + \alpha_3 \cdot B + \alpha_4 \cdot B^2 + \alpha_5 \cdot C + \alpha_6 \cdot C^2 + \alpha_7 \cdot C \cdot A + \alpha_8 \cdot B \cdot C + \alpha_9 \cdot A \cdot B + \alpha_{10},$$

其中  $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_{10}$  为待估参数,  $\alpha_{10}$  为常数项.

由植物组织培养可知,在无激素的情况下是没有再生芽产生,即:  $A=0, B=0, N$  (芽数)  $=0$ , 那么  $\alpha_{10}=0$ , 即模型常数项等于零.

虽然模型有9个参数,大于实验组数(6),但由于采用逐步回归方法,并非所有变量同时能入选方程,只有达到一定显著水平的参数才能入选.故模型可以有少于6个变量入选,使方程存在一个唯一解,否则无解.

用SAS对上述模型进行逐步回归分析(入选水平为0.15、剔除水平为0.15)得如下结果( $A, A^2, A \cdot B$  依次进入模型),见表3、表4.

表3 回归效果

效果	自由度	平方和	均方	F	P>F
回归	3	266.86	88.95	316.03	0.0003
误差	3	0.84	0.28		
总估	6	267.7			

表4 回归参数

参数	参数估计	F	P>F
A	25.03	331.11	0.0004
NN	-13.85	135.43	0.0014
$A \cdot B$	-8.51	83.04	0.0028

由结果分析可知:  $R^2=0.997$ . 回归效果(Regression)的  $F=316.03, R^2=0.997$ , 说明方

程的回归效果很好.

$A, A^2, B \times B$  参数的显著性检验大于 0.997, 说明参数效果也很好. 得出回归方程为:  
 $N = 25.033 A - 13.85 A^2 - 8.51 A \times B$ . 说明上述模型合理.

### 2.3 基本培养基的确定

由上述方程可知, 当  $B$  取最小值(0.10)时,  $N$  最大. 用微分法:  $dN/dA = 25.03260867 - 2 \times 13.8524205 \times A - 0.850554328 = 0$ . 求解, 得:  $A = 0.88$ .

或用网格法求上述方程的最大值, 得:  $B = 0.1, A = 0.88, N = 10.55$ .

由于上面方程跟时间( $C$ )无关, 故  $C$  可为任意值, 但选 5 d 以下的芽为材料较难, 故由上面分析的最佳组合为:  $C = 5, A = 0.88, B = 0.1$ , 在该组合下估计:  $N$  (芽数) = 10.55 (个).

### 2.4 试验验证

按上述分析得出的最佳组合: MS+NAA 0.88 mg/L+BA0.1 mg/L, 取萌发了 5 d 的万利包心生菜下胚轴上段(约 0.5 cm)为外植体, 进行一次试验, 每瓶接 3 块外植体, 共接 12 瓶. 5~7 d 即有愈伤组织形成, 培养 15 d 左右有绿芽产生, 且长势逐渐见好, 28 d 后取无污染的瓶统计分析, 得: 每瓶平均芽数 = 总芽数/总瓶数 = 10.363 (个). 显然, 与预测值(10.55)很吻合.

## 3 讨论

植物组织培养工作中, 激素的种类、浓度以及外植体的情况等诸多因素影响着植物的愈伤组织诱导和植株再生. 尤其在多因素、多水平参选的情况下, 如何得出它们之间的最佳组合, 用正交设计无能为力. 在本试验中, 用正交设计( $6^2 \times 3^1$ )至少同时应做 36 组试验, 而采用均匀设计仅做 6 组试验, 大大减少了实验次数, 而且, 从作者对用均匀设计得出的最佳组合进行的验证试验中可知: 效果很好.

显然, 均匀设计及其分析方法在植物组织培养中对选择最佳实验方案和配方是相当有效的工具, 其最大优点是大大地节省了试验次数及分析准确性好, 而且, SAS 分析已有现成的软件, 为科学工作者提供了极大的方便.

目前, 我国的植物组织培养研究领域中, 工作量相当繁重, 花费不少人力和物力, 如果能在我国广泛推广均匀设计及其分析方法, 可以预料, 将会大大提高工作效率及实验的准确性.

### 参 考 文 献

- 广东省植物研究所遗传室. 1976 用正交与平衡不完全区组试验法提高籼稻花药培养成功率. 广东师范学院学报, 2(1): 100~112
- 方开泰, 王元. 1994. 均匀设计与均匀设计表. 北京: 科学出版社, 12~15
- 孙洪涛, 曲家祥, 傅卫东. 1988 应用多因子试验的方差分析筛选亚麻花药培养基. 植物学通报, 5(3): 176~181
- 洪树荣, 钟扬, 傅俊. 1990 正交拉丁方实验在猕猴桃组织培养中的应用. 武汉植物学研究, 8(2): 171~177

(下转第 53 页)

Birdsell D G, Cota — Robles E H. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and Etylenedi-aminetetraacetate—lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*. J Bacteriol (1): 427 ~ 437

Fodor K, Alföldi L. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaerium*. Pro Natl Acad Sci USA, 73(9): 2147 ~ 2150

Nanne N. 1985. Molecular cytology of *Echerichia coli*. London; Academic Pr, 108 ~ 110, 215 ~ 226

Joshus L, Clari J S. 1957. Protoplasts and L—type growth of *Escherichia coli*. J Bacteriol 75: 143 ~ 159

Schaeffer P B, Hothkiss R D. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA, 3(6): 2151 ~ 2155

## STUDIES ON SPHEROPLAST FORMATION AND REGENERATION OF *Escherichia coli* O<sub>2</sub>(Nor<sup>r</sup>, Chl<sup>s</sup>) AND O<sub>78</sub>(Chl<sup>r</sup>, Nor<sup>s</sup>) STRAINS

Ren Tao Huang Qinyun Ou Shoushu  
(Dept. Of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

### Abstract

With *Escherichia coli* O<sub>2</sub>(Nor<sup>r</sup>, Chl<sup>s</sup>) and O<sub>78</sub>(Nor<sup>s</sup>, Chl<sup>r</sup>) the two most important *E. coli* serotypes in poultry colibacillosis as parental strains, spheroplasts were prepared with EDTA and lysozyme, and all conditions affecting spheroplast formation were studied in detail. The rate of cells converted to spheroplasts 90.0% more, and the regeneration efficiency was 50.0% ~ 60.0%. This fusion technique may be a new way for cultivating high efficiency and divalent divalent vaccines.

**Key words** *Escherichia coli*; spheroplast

(上接第 23 页)

## USE OF UNIFORM DESIGN IN PLANT TISSUE CULTURE

Xu Huasong<sup>1</sup> Tang Wei<sup>2</sup>

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642; 2 Dept. of Mathematics, Zhongshan Univ.)

### Abstract

To investigate the best combination of hormone and explant during organogenesis of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Wan Li Bao Xin), the upper part of the hypocotyl (about 0.5 cm) of sterilized seedlings grown for 5 days was used as explant and MS added NAA 0.88 mg/L plus BA 0.1 mg/L, and the optimal medium determined by employing uniform design analysis.

**Key words** uniform design; lettuce; hormone; tissue culture; explant