

应用正交设计方法优化香蕉外植体直接出芽的条件

王昌虎, 马镇荣, 刘卫, 吴坤林, 张奕奇, 凌定厚

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 利用正交设计方法[L₂₇(3¹³)]研究了培养基中的植物生长调节物 BAP、NAA 和 IBA, 以及不同外植体对香蕉(*Musa acuminata* Colla cv. Williams)直接出芽频率的影响。外植体的不同是影响香蕉直接出芽频率的最主要因素, NAA 和 IBA 对实验结果的影响相同, 均弱于 BAP。实验结果的统计分析表明, 诱导香蕉外植体直接出芽的优选培养基为不添加 BAP、NAA 和 IBA 的 MS 基本培养基, 最佳外植体为芽的顶端分生组织部分。

关键词: 正交设计; 香蕉; 直接出芽

中图分类号: Q94-32

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2001)01-0069-06

OPTIMIZATION FOR DIRECT BUDDING FROM EXPLANTS IN BANANA USING ORTHOGONAL DESIGN

WANG Chang-hu, MA Zhen-rong, LIU Wei, WU Kun-lin, ZHANG Yi-qi, LING Ding-hou

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Orthogonal experimental design was adopted to tissue culture in banana (*Musa acuminata* Colla cv. Williams). Effects of BAP, NAA, IBA and different explants on explant direct budding were investigated in banana by using orthogonal design [L₂₇(3¹³)]. Statistic analyses indicated that the main factor which mostly influenced the results was explants. BAP was the second factor, and both NAA and IBA the third. The results showed that the optimal medium was MS basal medium supplemented without the three growth regulators, and the best explant for the medium was the apical meristem of shoots.

Key words: Banana; Orthogonal design; Direct budding

生物学作为一门实验性科学, 其成果的取得在很大程度上依赖于对实验数据的收集、整理、思考和统计学的分析工作。统计学应用的能力业已成为生物学工作者的必备素质之一, 受到了广泛的重视。对实验数据进行科学的符合逻辑的描述、推论和分析越来越依赖于恰当的实验设计的采用和相应数据分析方法的应用, 也是众多(如果不是全部的话)刊物筛选研究论文的前提条件之一。现代的实验设计更多地注重数理统计的要求, 以达到精简实验重复次数的结果。正交设计是多因素多水平分析的有力工具, 特别当要从许多因素中选出主要因素时, 使用正交设计可以方便地用较少的实验次数获得较多的信息^[1]。

收稿日期: 2000-05-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(980484)资助

与统计手段使用较多的其它生物学领域(比如生态科学)相比,组织培养所涉及的因素具有更大的可控性。在离体培养的条件下,温度、光照甚至湿度等因素都可以实现完全人工控制,因而能设计出更符合统计学的要求的实验。正交设计等数学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遗传室等的报道^[2]。后来在延胡索和党参的组织培养实验中也有人利用了正交设计的方法,并取得了良好的实验结果^[3-4]。在香蕉的组织培养实验之中尚未有利用该方法的报道。本实验以香蕉为材料,考察不同外植体、不同植物生长调节剂等因素及其不同浓度的组合对其外植体直接出芽的影响。

1 材料和方法

材料 香蕉(*Musa acuminata* Colla cv. Williams)试管苗由本所植物组织培养技术试验开发中心提供,试管苗自外植体植入至取材经过约四个月,其间继代增殖3次。在无菌条件下,剥取试管苗的茎尖和球茎(此处的“球茎”为沿用快繁所用外植体的说法,与解剖学上的球茎有异,下同)部分,按图1解剖为本实验采用的外植体材料,分为三部分:顶端分生组织、球茎I和球茎II。球茎II是指着生有须根的部分球茎,并有明显的突起物,形态上有黑色易剥除的片状坏死组织包被。球茎I为顶端分生组织与球茎II之间的部分,外表光滑,绿色,为试管苗的特有结构,在自然生长的香蕉幼芽上不存在该结构。此外,顶端分生组织再纵剖为两部分,暴露出生长点,使其可以与培养基充分接触。

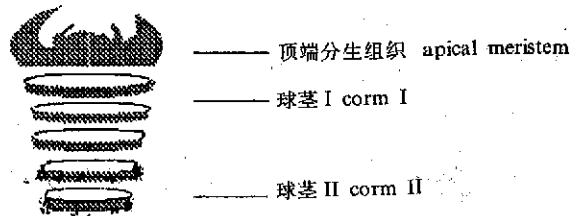


图1 外植体解剖示意图

Fig.1 Schematic diagram of explants dissection

培养基的配制和生长调节剂的选择 配制MS^[5]基本培养基,按照表1附加不同组合的植物生长调节剂BAP、NAA和IBA及各300 mg L⁻¹的水解乳蛋白LH。

表1 因素水平表
Table 1 Levels of factors

水平 Levels	因素 Factors			
	A (BAP) (mg L ⁻¹)	B (NAA) (mg L ⁻¹)	C (IBA) (mg L ⁻¹)	D (外植体 Explant)
1	0	0	1.0	球茎II (Corm II)
2	3	0.1	1.5	球茎I (Corm I)
3	6	0.2	2.0	顶端分生组织 (Apical meristem)

培养条件 将三种不同的外植体(每个三角烧瓶4-5个)分别接入相应的培养基中,培养室温度设置为28±2℃,光照强度约为2000 lx,光照周期为每日12 h。

正交试验设计 按本实验的各因素水平数的要求,拟考察的交互作用为A5B、A5C、A5D和C5D,所需的最小实验次数为(3-1)×4+(3-1)×(3-1)×4+1=25,故正交表选用三水

平的 $L_{27} (3^{13})$ 表, 表头设计如表 2。在表头中列出的其它交互作用列作为参考。

表 2 表头设计
Table 2 Table design

列号 Rank No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
因素 Factors	A	B	A×B	A×B	C	A×C	A×C	B×C	C×D	B×D	A×D	A×D	D

实验结果统计 培养 25 d 后, 统计每个培养瓶中新诱导出的芽的数目相对于植入外植体的比率, 列于正交试验综合试验结果(表 3)的最右栏。

2 结果与分析

正交表 $L_{27} (3^{13})$ 的综合试验结果见表 3。为了能直观地判断所研究的四种因素对实验结果的影响程度的相对大小, 分别计算出各列的水平之和结果相差的最大值—极差(R 值), 得到各因素的主次顺序列。对各考察因素的选择原则是, 极差大的因素(包括交互作用)应选择有利于指标的水平; 而对于极差小的因素, 则可以按照经济方便的原则选取水平。直观上来看, D 因素对实验结果的影响程度最大, 以下依次是 A、B 和 C。参照表 3 的结果, 结论为: $A_1B_1C_2D_3$ 为本实验优化获得的直观培养基配方, 即在 MS 基本培养基中不附加 BAP 和 NAA, 加 IBA 1.5 mg L^{-1} 及使用芽的顶端分生组织为外植体, 可以获得最高的直接出芽比率。

方差分析的结果列于表 4, 表明因素 A、B、C, 交互作用 A×B、A×C、A×D 和 C×D 的效应均达不到显著水平, 而只有因素 D 达到极显著水平 ($\alpha=0.01$)。方差分析的结果显示初步的优化配方为: $A_1B_1C_0D_3$ 。注意到在表 4 中因素 D 和交互作用 A×D 有较大的 F 值, 故考虑降低 α 值再进行比较。当取 $\alpha=0.1$ 的标准时, 查 F 表得到 $F_{0.1}(2,4)=4.32$ 、 $F_{0.1}(4,4)=4.11$, 这样因素 A、D 和交互作用 A×D 均检验出显著性, 余者仍不显著。关于因素 A 和 D 的组合比较的结果显示, A_1D_3 和 A_2D_3 的 K 值最大(等于 1), 因此根据经济的原则取 A_1D_3 。综合以上结果, 确定最终的优化配方为: $A_1B_1C_0D_3$, 即在 MS 基本培养基中不附加 BAP、NAA 和 IBA, 外植体为芽的顶端分生组织。

以此配方为依据, 设计试验验证, 对照设计为 MS 基本培养基附加香蕉快繁使用的 5 mg L^{-1} 的 BAP, 结果处理的成苗率为 100%, 对照只有 25.3%。

3 讨论

芭蕉属的香蕉和大蕉是世界上产量最高的果用作物, 据 FAO 的数据, 其年产量达到 7400 万吨^[6], 是 4 亿人口的主要食物来源, 对发展中国家的食物安全和出口创汇作出了巨大的贡献。传统方式是利用吸芽来繁育香蕉。这是一个耗时耗力的工作, 生产效率低下。最大的问题是田间植株生长周期各异, 不利于大面积的生产和管理。利用快繁技术, 在短期内生产大量生长长期一致的试管苗, 为大规模生产和管理带来了极大的便利, 另外也可以获得脱毒幼苗^[7], 筛选合适的可用于组织培养的组方都是有重要意义的。

正交试验作为一种有效的优选试验条件的手段, 在生物学的其他研究领域, 如营养搭配,

生物反应器条件的决定等, 都起到了很大的作用。但是在组织培养方面的报道并不多^[2-4]。正交试验不仅可以揭示各因素作用的相对大小, 同时还可以研究各因素间交互作用的大小, 对于选择最佳方案和分析实验结果都是十分有效的。进行正交试验, 首先必须确定所要研究的因素及各因素所取的水平。在香蕉的组织培养方面涉及的植物生长调节剂主要有BAP、NAA、IBA、IAA、

表3 正交试验综合试验结果

Table 3 Results from orthogonal experiment

编号 Test No.	1 A	2 B	3 A×B	4 A×B	5 C	6 A×C	7 A×C	8 B×C	9 C×D	10 B×D	11 A×D	12 A×D	13 D	成苗率 Seedling rate
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1/5
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0/5
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4/4
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4/4
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	0/5
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2	0/4
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2	0/4
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3	4/4
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0/4
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4/4
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1	0/4
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2	0/4
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2	0/4
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3	4/4
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1	0/4
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1	0/4
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2	0/4
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	4/4
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	0/4
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3	4/4
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1	0/4
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1	0/4
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	0/4
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3	2/4
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3	2/4
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1	0/4
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2	0/4
K ₁	3.2	3.2	2.7	2.7	2.7	3.2	2.7	2.7	3.2	2.7	3.2	2.2	0.2	
K ₂	3.0	2.5	2.5	3.0	3.0	2.5	2.5	3.0	2.5	2.5	2.0	3.0	0	T = ΣX
K ₃	2.0	2.5	3.0	2.5	2.5	2.5	3.0	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0	8.0	= 8.2
R 值	1.2	0.7	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	0.7	0.5	1.2	0.8	7.8	T ² = 67.24
R value														
主次顺序	2	4	5	5	5	4	5	5	4	5	2	3	1	
Order														
K ₁ ²	10.24	10.24	7.29	7.29	7.29	10.24	7.29	7.29	10.24	7.29	10.24	4.84	0.04	
K ₂ ²	9.00	6.25	6.25	9.00	9.00	6.25	6.25	9.00	6.25	6.25	4.00	9.00	0.00	CT =
K ₃ ²	4.00	6.25	9.00	6.25	6.25	6.25	9.00	6.25	6.25	9.00	9.00	9.00	64.00	T ² /27
ΣK ₁ ²	23.24	22.74	22.54	22.54	22.54	22.74	22.54	22.54	22.74	22.54	23.24	22.84	64.04	= 2.490
Q =	2.582	2.527	2.504	2.504	2.504	2.527	2.504	2.504	2.527	2.504	2.582	2.538	7.116	μ = ΣX/27
(ΣK ₁ ² /9)														= 0.304
s	0.092	0.037	0.014	0.014	0.014	0.037	0.014	0.014	0.037	0.014	0.092	0.048	4.626	

表4 方差分析表
Table 4 Results of ANOVA

方差来源 Source	离均差平方和 Sums of square	自由度 DF	均方 Mean square	F值 F-value	显著性 Significant
A	$S_A=S1=0.092$	2	0.046	6.571	ns
B	$S_B=S2=0.037$	2	0.019	2.714	ns
C	$S_C=S5=0.014$				
D	$S_D=S13=4.626$	2	2.313	330.429	**
A×B	$S_{AB}=S3+S4=0.028$	4	0.007	1.000	ns
A×C	$S_{AC}=S6+S7=0.051$	4	0.013	1.857	ns
A×D	$S_{AD}=S11+S12=0.140$	4	0.035	5.000	ns
C×D	$S_{CD}=S8+S9=0.051$	4	0.013	1.857	ns
e'	$S_{e'}=S10+S5=0.028$	4	0.007		

$F_{0.05}(2,4)=6.94$, $F_{0.05}(4,4)=6.39$; $F_{0.01}(2,4)=19.00$, $F_{0.01}(4,4)=15.98$

**极显著水平 Significant F-test at the 0.01 level; ns=not significant 不显著

2,4-D、Dicamba、Zeatin 和 Paclobutrazo 等^[8-12]。其中 BAP、NAA 和 IBA 常见于器官发生途径的组织培养实验中,一般使用剂量分别为 5 mg L^{-1} 、 0.1 mg L^{-1} 、 $1.0-2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ^[8,10], 本实验选择它们作为考察的三种因素,并选择覆盖其常用剂量的水平。结果表明,上述各因素的选择水平覆盖了最适的不同剂量水平。

本试验的结果显示,外植体的效应是最重要的。其中表现最好的是顶端分生组织部分,成苗率达 89.9%(32/36,表 3)。这种初代培养物中,顶端分生组织具有较高成苗率的现象与他人的研究结果一致^[3]。当然,要获得更多的芽,还需要对初代培养所得的苗作进一步的处理,途径包括将纵剖的分生组织树立于培养基中^[10],或进行连续继代,找到发生丛芽的代数。植物生长调节剂方面,BAP 具有极显著的效应。培养基中细胞分裂素的水平极大地影响新生芽的数目^[3],对叶绿体的发育、养分的运输和分配,以及细胞衰老的抑制等方面都表现显著的效果,它能显著改变植物基因转录的水平,在转录水平或转录后水平上调控植物基因的表达^[14]。在本实验中,BAP 对香蕉顶端分生组织的直接出芽起负面作用,即高浓度的 BAP 抑制出芽。原因在于,BAP 不仅能促进外植体中酚类化合物的合成^[15],而且能刺激多酚氧化酶活性的提高^[16],不稳定的酚在多酚氧化酶催化下,氧化为褐色的醌类物质和水^[17],醌类又会在酪氨酸等酶的催化下,与外植体组织中的蛋白质发生聚合,进一步引起其它酶系统失活,从而导致组织代谢活动紊乱,生长停滞,甚至死亡^[18]。而且香蕉中酚类物质含量比其它植物的高,因而组织褐化在其培养过程中,尤其在具大面积伤口的初代培养中的作用极有可能大于其促进芽产生的作用。交互作用 A×B 和 A×C 对实验结果的影响并未达到显著水平,暗示在香蕉的直接出芽过程中,比率 BAP/NAA 或 BAP/IBA 并不重要。

一般说来,由正交试验得出的最佳条件尚须经过验证。本试验中的结论,在后来的实验中得到验证,最佳条件下的成苗率比对照高出约 3 倍。

香蕉直接出芽实验的另一个潜在的利用价值在于,它可能成为适合于基因枪转化的系统。经过悬浮细胞系或胚性愈伤组织再生植株途径,实验周期长(一般为半年至一年),易产生变

异,增加了实验成本和难度。而利用器官直接发生途径再生植株,省时(40 d左右)省力,更重要的是,这一途径的变异频率相对较低,保证了在导入有利基因的同时,少引入新的变异。缺点是嵌合体的问题,克服的方法是需要进一步的选取阳性组织块作继续出芽,并需多代选择。

参考文献:

- [1] 杜荣寿. 生物统计学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1989, 419.
- [2] 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.
- [3] 张治国, 严霄, 王凤仙, 等. 正交设计在植物组织培养基研究中的应用 [J]. 植物生理学通讯, 1985, (5):46-48.
- [4] 孟玉玲, 谷祝平. 正交设计在诱导植物体细胞胚胎发生中的应用 [J]. 西北植物学报, 1995, 13(1):10-15.
- [5] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15:473-497.
- [6] FAO. Food and agriculture organization of the United Nations [A]. *Production Yearbook 1992* [M]. Rome, Italy. 1993, 265.
- [7] Berg L A, Bustamante M. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas [J]. *Phytopathology*, 1974, 64:320-322.
- [8] 曾碧露, 孙梓建. 香蕉组织培养苗的培育和技术 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1997, 2-4.
- [9] Novak F J, Afza R, Duren M V, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.) [J]. *Bio/Technology*, 1989, 7:154-159.
- [10] Sandra S, Cronauer, Krikorian A D. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture [J]. *Hortscience*, 1984, 19(2):234-235.
- [11] Dhed' a D, Dumortier F, Panis B, et al. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp. ABB group) [J]. *Fruits*, 1991, 46:125-135.
- [12] INIBAP. International Network for the Improvement of Banana and Plantain Annual Report 1998 [C]. 1998, 22.
- [13] Cronauer S S, Krikorian A D. Multiplication of *Musa* from excised stem tips [J]. *Ann Bot*, 1984, 53: 321-328.
- [14] 王兆龙, 曹卫星. 细胞分裂素对植物基因表达的调节 [J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1):82-88.
- [15] Zaid A. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures — A review [J]. *Acta Hort*, 1987, 212:561-566.
- [16] 裘文达, 曹夜义. 植物组织培养实用手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1989, 96-98.
- [17] Loomis W D, Battaile J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes [J]. *Phytochem*, 1966, 5: 423-438.
- [18] Marks T R, Simpson S E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low level of irradiance [J]. *J Hort Sci*, 1990, 65:103-111.