

## 二次正交旋转组合设计对马占相思 组培增殖培养基的优化

徐位力<sup>1</sup>, 罗焕亮<sup>2</sup>, 范恩友<sup>3</sup>, 邵志芳<sup>4</sup>, 叶淑春<sup>5</sup>

(1. 广州市林业科学研究所, 广州同和 510515; 2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州五山 510641;  
3. 深圳市林外林园林工程公司, 广东深圳 518000; 4. 深圳市莲花山公园管理处,  
广东深圳 518000; 5. 台山市园林绿化管理处, 广东台山 529200)

**摘要:** 在马占相思组织培养初步取得成功的基础上, 采用二次正交旋转组合设计对马占相思增殖培养基进行优化, 建立增殖率( $Y$ )对  $Ca^{2+}$  浓度( $X_1$ )、6-BA 浓度( $X_2$ )及 NAA 浓度( $X_3$ ) 3 个试验因子的正交回归模型:  $y = 2.280 - 0.168X_1 - 0.259X_2 + 0.185X_1^2 - 0.210X_2^2 + 0.167X_3^2 + 0.326X_1X_2$ , 从模型推知, 当  $Ca^{2+}$  浓度为 0.58 倍常规 MS 培养基浓度, 6-BA 为 0.76 mg/L, NAA 为 0.16 mg/L 时, 增殖率达最大值为 4.321, 与事实实验结果相符。

**关键词:** 马占相思; 正交旋转组合设计; 培养基; 优化

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)06-0517-04

## Optimize the multiplication medium of *Acacia mangium* through the quadratic orthogonal rotation combination design

XU Wei-li<sup>1</sup>, LUO Huan-liang<sup>2</sup>, FAN En-you<sup>3</sup>,  
SHAO Zhi-fang<sup>4</sup>, YE Shu-chun<sup>5</sup>

(1. *Guangzhou Forestry Research Institute*, Guangzhou 510515, China; 2. *Food & BioTechnical College*, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 3. *Shenzhen Forestry Park Engineering Co. LTD*, Shenzhen 518000, China; 4. *Shenzhen Lianhuashan Garden*, Shenzhen 518000, China;  
5. *Taishan Garden & Forestry Administer*, Taishan 529200, China)

**Abstract:** Based on the primary studies on tissue culture of *Acacia mangium*, the multiplication medium of *Acacia mangium* was optimized with quadratic orthogonal rotation combination design. The quadratic orthogonal resursive model of multiplication rate( $Y$ ) to three concentration factors of  $Ca^{2+}$  ( $X_1$ ), 6-BA( $X_2$ ) and NAA( $X_3$ ) was established as  $y = 2.280 - 0.168X_1 - 0.259X_2 + 0.185X_1^2 - 0.210X_2^2 + 0.167X_3^2 + 0.326X_1X_2$ . It was concluded from the model that when the concentration of  $Ca^{2+}$  ( $X_1$ ), 6-BA( $X_2$ ) and NAA ( $X_3$ ) was 21.46 mg, 0.76 mg and 0.16 mg respectively, the multiplication rate( $Y$ ) was the max(4.321), which was consistent with the validate experiment result.

**Key words:** *Acacia mangium*; orthogonal rotation combination design; medium; optimization

收稿日期: 2001-06-11

作者简介: 徐位力(1972-), 男, 广东梅州市人, 工程师, 主要从事植物遗传、植物化学研究工作。

基金项目: 广州市科委资助项目(ZB02-98-Z-002-01)

马占相思 (*Acacia mangium*) 是我国引进的相思类造林树种, 其抗性强, 生物量大, 生长迅速, 纤维含量高, 用途广泛, 是目前最具发展前途的树种之一, 并成为南方用材、燃料、肥料、道路绿化和混交的良好树种<sup>[1,2]</sup>, 现已在华南地区广为种植, 面积达 6.67 万  $\text{hm}^2$ , 其中广东 2.33 万  $\text{hm}^2$ , 随着林业及其相关产业的发展, 势必对该树种进行大面积的推广, 因而, 其种苗的来源问题亟待解决, 目前, 马占相思多以种子繁殖, 但其树形、生长量、抗逆性受种源的严重影响, 同一种源, 用种子繁殖分离亦很严重<sup>[1,2]</sup>, 因此, 在一定程度上影响了对它的开发利用。为了克服这些问题, 必须实行无性系造林, 通过组织培养技术建立马占相思优良单株的无性繁殖体系。有关马占相思的组织培养, 国内外已有较多研究, 主要是以幼苗茎段作为外植体, 通过腋芽增殖或愈伤组织的器官发生途径进行快速繁殖<sup>[3~12]</sup>, 张宏伟等<sup>[13]</sup>还直接选用林间成年的优树, 以茎段作为外植体进行腋芽诱导培养, 以期快速繁殖, 尽管如此, 目前国内尚未有马占相思优良无性系在生产上应用的报道, 为了尽早实现马占相思优良无性系苗在生产上的应用, 我们结合马占相思抗寒性的选育(另文报道), 直接选用在小气候相对低温的环境中生长的 7~8 年生成年优树进行无性快繁, 已成功建立了优良单株的无性繁殖体系, 为了进一步提高繁殖速度, 本文采用二次正交旋转组合设计对马占相思增殖培养基进行优化。

二次正交旋转组合设计是正交回归试验设计的一种, 它既能分析各处理因子的影响, 又能建立定量的数学模型, 属更高级的试验设计技术<sup>[14]</sup>。本文采用的二次正交旋转组合设计具有两个突出的特点, 第一, 它牺牲部分正交性而获得旋转性, 并基本保留回归正交设计试验次数少, 计算简便以及部分消除回归系数之间的相关性等特点; 第二, 它有助于克服在回归正交设计中二次回归预测值  $y$  的方差依赖于试验点在因子空间中的位置这个缺点, 即它能有效地克服二次回归正交设计由于无旋转性, 能根据预测值直接寻求最优区域的优点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

以腋芽为外植体进行马占相思组织培养, 外植体采用国营增城林场白水工区 1989 年造林的 9 年生林间优树单株, 编号为 44, 基本培养基为改良 MS 培养

基, 增殖培养基优化试验材料为 44 号无菌培养物。

### 1.2 实验方法

二次正交旋转组合设计的试验方案及其结果分析均在 DPS 数据处理软件上运行<sup>[14]</sup>。芽数统计: 每块材料有一单芽, 再带有大于 2 mm 的小芽则统计为 2, 不足 2 mm 的芽点突起不计; 增殖率的确定: 增殖率以继代 30 d 的芽数与继代当天的芽数比值求得, 每次取 30 块统计增殖率。

$$\text{增殖率} = \frac{\text{继代 30 d 芽数}}{\text{继代当天的芽数}}$$

## 2 结 果

### 2.1 二次正交旋转组合设计方案

根据对 44 号组织培养的实验结果(另文介绍)和前人的经验, 马占相思培养物的增殖与 BA、NAA 的浓度及两者的配比关系密切, 同时也受到  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响, 因此, 确定 BA、NAA 及  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 3 个试验因子进行组合设计, 根据经验确定其零水平及其变化区间如下:  $\text{Ca}^{2+}$  浓度以常规 MS 培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的 1 倍为零水平, 以常规浓度的 1/4 为变化区间; BA 零水平为 1.6 mg/L, 变化区间为 0.5; NAA 零水平为 0.5 mg/L, 变化区间为 0.2, 经 DPS 数据处理平台运行, 得如下试验方案(表 1)。

### 2.2 各组试验的增殖率获得

根据表 1 中各组试验 3 个因子的不同浓度, 配成相应的培养基, 将 44 号中部繁殖体继代, 30 d 后统计芽数并计算增殖率, 得出如表 1 结果。

### 2.3 试验结果分析

将表 2 的试验结果在 DPS 数据处理平台上运行, 得出实验结果的方差分析表(表 2), 剔除  $\alpha = 0.10$  的不显著项后, 建立增殖率对 3 个试验因子的回归方程, 对 3 个试验因子与增殖率的关系进行模拟, 结果如下, 再根据回归方程进行模拟寻优, 从回归模型中推导、筛选出最佳的措施和策略, 当 3 个因子的编码值均取 -1.682 时, 增殖率  $y$  可达最大值 4.32, 从回归模型还可推出各个试验因子的作用效应, 即当其他因子为零水平时, 分析单一因子对试验结果有影响, 其结果如表 3。

以下是  $\alpha = 0.10$  显著水平剔除不显著项后, 简化后的回归方程:  $Y = 2.276 - 0.168X_1 - 0.259X_2 + 0.184X_1^2 - 0.210X_2^2 + 0.167X_3^2 + 0.326X_1X_2$ 。最高值的各个因素组合为  $X_1: -1.682; X_2: -1.682; X_3: -1.682; Y_{\max}: 4.32$ 。

表 1 二次正交旋转组合设计试验方案及各组方案相应的增殖率  
Table 1 The test scheme and its corresponding multiplication rate in the quadratic orthogonal rotation combination design

No.	x(1)	x(2)	x(3)	x(1)	x(2)	x(3)	实验增殖率 Multiplication rate
1:	1	1	1	1.25	2.10	0.70	2.10
2:	1	1	-1	1.25	2.10	0.30	1.95
3:	1	-1	1	1.25	1.10	0.70	2.31
4:	1	-1	-1	1.25	1.10	0.30	2.40
5:	-1	1	1	0.75	2.10	0.70	1.73
6:	-1	1	-1	0.75	2.10	0.30	1.70
7:	-1	-1	1	0.75	1.10	0.70	3.15
8:	-1	-1	-1	0.75	1.10	0.30	3.55
9:	1.682	0	0	1.42	1.60	0.50	2.40
10:	-1.682	0	0	0.58	1.60	0.50	2.95
11:	0	1.682	0	1.00	2.44	0.50	1.68
12:	0	-1.682	0	1.00	0.76	0.50	1.45
13:	0	0	1.682	1.00	1.60	0.84	2.55
14:	0	0	-1.682	1.00	1.60	0.16	2.70
15:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
16:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
17:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
18:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
19:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
20:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
21:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
22:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15
23:	0	0	0	1.00	1.60	0.50	2.15

表 2 实验结果方差分析表  
Table 2 Variance analysis of the test result

变异来源 Source of variance	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	比值 F F value	显著水平 P Distant value P
	119.153 2	1	119.153 2	1 385.008 1	0.000 00
X <sub>1</sub>	0.385 7	1	0.385 7	4.482 9	0.054 09
X <sub>2</sub>	0.919 1	1	0.919 1	10.683 9	0.006 11
X <sub>3</sub>	0.023 1	1	0.023 1	0.269 1	0.612 66
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.543 1	1	0.543 1	6.313 4	0.025 96
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.702 7	1	0.702 7	8.167 6	0.013 45
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.443 6	1	0.443 6	5.156 3	0.040 81
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.851 5	1	0.851 5	9.897 8	0.007 73
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.023 1	1	0.023 1	0.268 7	0.612 94
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.056 1	1	0.056 1	0.652 2	0.433 84
回归/Orthogonal	3.938 5	9	0.437 6	F <sub>2</sub> = 5.087	0.009 78
剩余/Residual	1.118 4	13	0.086 0		
失拟/Simulant	1.057 2	5	0.211 4	F <sub>1</sub> = 27.660	0.000 08
误差/Error	0.061 2	8	0.007 6		
总和/Sum	5.056 9	22			

从单因子效应结果可知,在试验因子设置的范围内, X<sub>1</sub> (Ca<sup>2+</sup>) 的变化导致增殖率在 2.276~3.052 之间变动, 变幅达 0.806; X<sub>2</sub> (6-BA) 对增殖率影响变幅为 1.108(2.353~1.245); X<sub>3</sub> (NAA) 对增殖率

影响的变幅为 0.473(2.749~2.276), 从单因子作用效应的角度, 6-BA 的浓度最为重要, Ca<sup>2+</sup> 的浓度次之, 而 NAA 的影响不及前两者明显, 当 3 个因子均取 -1.682 的编码值时, 即 [Ca<sup>2+</sup>] = 0.58 倍 MS 培

培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,  $[6\text{-BA}] = 0.76 \text{ mg/L}$ ,  $[\text{NAA}] = 0.16 \text{ mg/L}$  时, 增殖率达最大值 4.32。

#### 2.4 回归模型的实例验证

根据回归模型模拟寻优的结果, 配制 2.3 中得出的最优组合的改良 MS 培养基, 接种马占相思 44 号培养物继代, 统计结果得: 继代当天芽数为 30, 继代 30 d 的芽数为 122, 增殖率  $(y) = 122/30 = 4.06$ , 与回归模型寻优的理论值(432)基本相符, 贴度为 94.1%。

表 3 单因子效应分析(其他因子为零水平)  
Table 3 Effective analysis of single factor  
(other factors is zero level)

水平/Level	$X_1$	$X_2$	$X_3$
-1.682	3.082	2.118	2.749
-1.341	2.834	2.246	2.576
-1.000	2.629	2.325	2.443
-0.500	2.406	2.353	2.318
0.000	2.276	2.276	2.276
0.500	2.238	2.094	2.318
1.000	2.293	1.806	2.443
1.341	2.383	1.550	2.576
1.682	2.516	1.245	2.749

### 3 讨 论

二次正交旋转组合试验设计是正交回归试验设计的一种, 它具有试验次数较少, 计算简便, 且能根据预测值直接寻求最优区域的优点, 经精心设计、实施的回归设计, 可提供大量的信息, 可以从许多角度对模型进行模拟分析, 以充分发掘模型所提供的信息。本文通过二次正交旋转组合设计, 根据对马占相思优良单株组织培养的经验, 安排 3 个因子作二次正交回归试验, 获得马占相思增殖率对 3 个试验因子的正交回归模型。通过对正交回归模型的模拟寻优, 获得最高增殖率的试验因子的理论组合, 再根据该组合安排实验进行事实验证, 得出比较相符的结果, 贴度达 94%, 从而使马占相思增殖培养基得到优化, 由此说明, 利用二次正交旋转组合设计对马占相思增殖培养基的优化是可行的, 可取得令人满意的结果。

从回归模型的单因子效应分析可知,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对实验结果的影响较明显, 低浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  有利于中间繁殖体的分化增殖, 这一结果与作者等在桉树组织培养中得到的结果相符, 在桉树组织培养基中, 为促进中间繁殖体的增殖分化, 将  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下调到常

规浓度的 1/3, 据以上事实, 是否可以推断, 在对木本植物的无性快繁中, 调低  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可促进其中间繁殖体的分化增殖。

根据回归模型及其单因子效应分析, 6-BA 及 NAA 对试验结果有明显影响, 但以 6-BA 有影响最为明显, 这可能是由于 6-BA 浓度的变化区间设置过大所致。植物组织培养的增殖速度不仅仅取决于细胞分裂素及生长素两者自身的浓度, 也与两者的浓度比值密切相关, 本文结果表明, 当 6-BA 为 0.76 mg/L, NAA 为 0.16 mg/L, 两者的比率为 4.75 时, 取得最佳的增殖效果, 这一结果与周志坚等<sup>[4]</sup>的结果较为接近, 但张宏伟等<sup>[13]</sup>马占相思丛生芽诱导的培养基为 MS+10  $\mu\text{mol/L}$  BA+0.5  $\mu\text{mol/L}$  IBA, 细胞分裂素与生长素的比例达 50 倍, 其所用的 6-BA 浓度也较高, 换算成 mg/L 计为 2.25 mg/L, 这与本文的结果相差较大, 这可能由于所采用的生长素种类不同, 导致其与 6-BA 有不同的互作关系, 也可能由于马占相思的种源不同, 对不同的外源激素有不同的需求所致。

马占相思在推广种植过程中, 普遍存在抗寒性较差的缺点, 在气温低于 2.4  $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 便可出现较严重的冻害, 为此, 建立马占相思无性系繁殖体系, 必须考虑到其抗寒性选育的因素, 基于以上认识, 我们选择在小气候条件下偏低温的增城林场白水工区生长的马占相思 9 年生成年大树, 进行林间单株选优, 作为无性繁殖的母株, 这对今后马占相思无性系的推广有更为深刻的意义。

#### 参考文献:

- [1] 杨民权, 曾育田. 马占相思种源试验[J]. 林业科学研究, 1989, 2(2): 113.
- [2] 曾育田, 杨民权. 大叶相思种源试验[J]. 广东林业科技, 1990, 5(2): 23.
- [3] 广东林科所林木组织培养课题组. 用组织培养法快速繁殖大叶相思[J]. 热带林业科技, 1982, 3(2): 45-47.
- [4] 周志坚, 翟应昌, 李倘弟. 马占相思的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1983, 1(3): 47.
- [5] 谢声信. 大叶相思组织培养[J]. 植物, 1982, 3(6): 8.
- [6] 翟应昌, 周志坚, 李倘弟. 金合欢属组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1984, 2(4): 32.
- [7] 颜慕勤, 陈平. 大叶相思的组织培养和植株再生(下转第 508 页 Continue on page 508)

- barbiturates on fern spore germination and gametophyte development[J]. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 1991, **19**(3): 308—315.
- [30] 鲍敏, 吴学明, 丁莉. 蔗糖和生长辅助物质对蕨孢子人工繁殖的影响[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2000, **3**: 39—43.
- [31] Miller JH. Inhibition of fern spore germination by lipophilic solvents[J]. *American Journal of Botany*, 1987, **74**(11): 1706—1708.
- [32] Raghavan V. Chloroplast activities of dark-imbibed and photoinduced spores of the fern *Onoclea sensibilis*[J]. *Protoplasma*, 1993, **175**: 75—84.
- [33] Raghavan V. Gene activity during germination of spores of the fern, *Onoclea sensibilis*-Cell-free translation analysis of messenger-RNA of spores and the effect of Alpha-Amanitin on spore germination[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1992, **140**(4): 434—440.
- [34] Furuya-Masaki, Kanno-Misao, Okamoto-Haruko, et al. Control of mitosis by phytochrome and a blue-light receptor in fern spores[J]. *Plant Physiology Rockville*, 1997, **113**(3): 677—683.
- [35] Miller JH. Asymmetric cell-division and differentiation-fern spore germination as a model; 1. Physiological aspects[J]. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section-Biological Sciences*, 1985, **86**: 213.
- [36] Bassel AR. Asymmetric cell-division and differentiation-fern spore germination as a model; 2. Ultrastructural studies[J]. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section-Biological Sciences*, 1985, **86**: 227.
- [37] Huckaby CS, Miller JH. Spore germination and rhizoid differentiation in *Onoclea sensibilis*: A two dimensional electrophoretic analysis of the extant soluble proteins[J]. *Plant Physiologist*, 1984, **74**(3): 656—662.
- [38] Miura M, Koshiha T, Minamidawa T. Characterization and role of RNAs synthesized during early spore germination of the fern *Cyathea*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1986, **123**(5): 487—495.
- [39] Demaggio AE, Greene C, Stetler D. Biochemistry of fern spore germination: Glyoxylate and glycolate cycle activity in *Onoclea sensibilis* L [J]. *Plant Physiol*, 1980, **66**: 922—924.

( 上接第 520 页 Continue from page 520 )

- [J]. 植物生理学通讯, 1983, **3**(1): 29.
- [8] Ahmad D H. Multiplication of *Acacia mangium* by Stem Cutting and tissue culture technique. *Advances in Tropical Acacia Research: Proceedings of an international workshop held in Bangkok, Thailand, 11—15 February*[J]. *ACIAR Proceeding No.* 1991, **35**: 32—35.
- [9] Galiana A, Tibok A, Duhoux E. In vitro propagation of the nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd[J]. *Plant and Soil*, 1991, **135**: 151—159.
- [10] Mittal A, Agarwal R, Gupta S C. In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*-a leguminous trees, *Plant Cell*[J]. *Tissue and Organ Culture*, 1989, **19**: 65—70.
- [11] Ranga Rao G V, Prasad M N V. Plantlet Regeneration from the Hypocotyl Callus of *Acacia auriculiformis*—Multipurpose Tree Legume[J]. *J. Plant Physiol.*, 1991, **137**: 625—627.
- [12] Semsuntud N, Nitiwattanachai W. Tissue culture of *Acacia auriculiformis*, *Advances in tropical Acacia Research: Proceeding of an international workshop held in Bangkok*[J]. *Thailand, 11—15 February, ACIAR Proceedings No.* 1991, **35**: 39—42.
- [13] 张宏伟, 黄学林, 傅家瑞, 等. 大叶相思、马占相思腋芽培养和植株再生[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, **3**(3): 62—68.
- [14] 唐启义, 冯光明. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 77—91.