

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.08.008

芒种子诱导愈伤组织的多因子正交试验研究^①

杨宇晨, 陈智勇, 蒋建雄, 于肖寒, 易自力

湖南农业大学 生物科学技术学院, 长沙 410128

摘要: 以 3 种不同基因型的芒为材料, 通过设计各激素不同浓度配比方案, 对 3 种材料进行试验, 采用与试验设计相应的统计、分析方法, 探索以芒种子为外植体诱导愈伤组织的最佳方案. 结果表明: 芒种子诱导愈伤时, 培养基中添加激素的适宜浓度范围为: 2,4-D: 4.021~4.339 mg/L, 6-BA: 0.846~1.032 mg/L, KT: 0.281~0.311 mg/L.

关键词: 芒; 种子; 愈伤诱导

中图分类号: Q949.94 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2014)8-0051-06

芒属植物(*Miscanthus Anderss*)是禾本科的一类多年生高大草本纤维植物, 因其具有野生资源丰富、适应性广、抗逆性强、产量高、净能产出高、生物质品质好、转化利用途径广、生态价值好等特点^[1], 是极具开发潜力的能源植物之一^[2]. 而芒(*M. sinensis*)作为芒属中的一个种, 不但具有上述芒属植物的优势, 还因其具有株型紧凑、冬季枯黄的特性, 而受到高度关注. 进行芒属植物的多倍体育种、转基因研究时, 需要大量芒的愈伤组织为材料, 通常用于诱导愈伤组织的外植体有幼穗、顶芽^[3]等, 但这些外植体的取材易受植物生长周期的限制. 本研究以芒的种子为外植体进行组织培养, 探索其诱导愈伤时 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的适宜范围, 旨在解决以芒的种子为材料诱导愈伤组织的一些问题.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料 04158 采自湖北赤壁, 02173 采自湖南怀化, 00051 采自四川乐山. 以上材料均种植于湖南农业大学芒属植物资源圃.

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计方法

采用二次正交回归组合设计, 即中心复合设计中的二次通用旋转组合设计方法, 进行芒种子的愈伤诱导试验设计.

1.2.1.1 试验各因素及相关参数的确定

将 2,4-D, 6-BA, KT 3 个因素分别取 5 个水平, 参考芒属植物组织培养文献中使用过的浓度, 分别确定各因素的最高浓度 Z_{2j} 和最低浓度 Z_{1j} , 参照 DPS 数据处理系统^[4] 中的运算公式, $Z_{0j} = 1/2(Z_{2j} + Z_{1j})$; $\Delta_j = 1/2(Z_{2j} - Z_{1j})$ 计算出零水平 Z_{0j} 及变化区间 Δ_j (表 1).

① 收稿日期: 2013-04-23
基金项目: 国家科技支撑计划区域重大专项(2011AA100209-3); 高等学校博士学科点专项科研项目(20124320110007); 湖南农业大学大学生创新项目(XCX12028)基金资助.
作者简介: 杨宇晨(1988-), 女, 湖北天门人, 硕士研究生, 主要从事植物细胞遗传学研究.
通信作者: 易自力, 教授.

表 1 二次通用旋转组合设计参数

因素	2,4-D	6-BA	KT	因素	2,4-D	6-BA	KT
	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
最高浓度 Z_{2j}	5	1.5	0.4	变化区间 Δ_j	1	0.5	0.1
最低浓度 Z_{1j}	3	0.5	0.2	连续变化区间值 Δ_k	$\Delta_1=0.595$	$\Delta_2=0.297$	$\Delta_3=0.059$
零水平浓度 Z_{0j}	4	1	0.3				

1.2.1.2 试验各因子的编码值及实施水平的确定

在确定了因子的上、下限及因子的零水平、变化区间以后，还需确定零水平试验点的个数，设计时选择零水平试验点的次数为 6 次. 设 Δ_k 为浓度上限到零水平间的单位编码值连续变化区间值，则

$$\Delta_k=(Z_{2j}-Z_{0j})/\gamma$$

其中 γ 值为二次通用旋转组合设计 3 因素 6 重复的星号臂值，由 m 值为 6 和因素数为 3 查得，本试验中 γ 值为 1.682. 利用 DPS 软件设计的试验方案如表 2:

表 2 芒种子愈伤组织诱导试验方案

处理 组合	c_1	c_2	c_3	2,4-D	6-BA	KT	处理 组合	c_1	c_2	c_3	2,4-D	6-BA	KT
				$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$					$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
1	1	1	1	5	1.5	0.4	9	-1.682	0	0	2.318	1	0.3
2	1	1	-1	5	1.5	0.2	10	1.682	0	0	5.682	1	0.3
3	1	-1	1	5	0.5	0.4	11	0	-1.682	0	4	0.159	0.3
4	1	-1	-1	5	0.5	0.2	12	0	1.682	0	4	1.841	0.3
5	-1	1	1	3	1.5	0.4	13	0	0	-1.682	4	1	0.132
6	-1	1	-1	3	1.5	0.2	14	0	0	1.682	4	1	0.468
7	-1	-1	1	3	0.5	0.4	15-20	0	0	0	4	1	0.3
8	-1	-1	-1	3	0.5	0.2							

1.2.2 种子诱导愈伤的方法

将从地里收回来的种子剥去颖壳，保存于 4℃. 接种前，用清水冲洗后，加入 0.1% 升汞(HgCl_2)消毒 15 min，无菌水冲洗 5 次^[6]，接种到相应的培养基中. 培养基配制时母液均采用 MS，琼脂 8 g/L，糖 30 g/L，相应激素按表 2 所设计的浓度加入.

1.3 数据计算方法

$$\text{发芽率}(\%) = \text{种子发芽数} / \text{接种数} \times 100\%$$

$$\text{出愈率}(\%) = \text{发生愈伤组织的外植体} / \text{发芽种子数} \times 100\%$$

试验数据采用 DPS 软件进行分析.

2 结果与分析

2.1 试验结果统计

统计各处理号 6 个重复中种子的发芽数和出愈数，计算每个处理号所对应的平均诱导率，得到如表 3 所示数据.

2.2 试验数据分析

根据试验数据计算回归系数，以回归系数建立二元多项式回归方程

$$y=b_0+\sum_{i=1}^mb_ix_i+\sum_{i=1}^mb_{ii}x_i^2+\sum_{i<j}^mb_{ij}x_ix_j^{[4]}$$

本试验涉及 3 个因素，因此建立三元二次回归方程

$$y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_{12}x_1x_2+b_{23}x_2x_3+b_{13}x_1x_3+b_{11}x_1^2+b_{22}x_2^2+b_{33}x_3^2$$

其中常数项为 b_0 ；一次项系数为 b_1, b_2, b_3 ；交互项回归系数为 b_{12}, b_{23}, b_{13} ；各因素的二次方效应回归系数为 b_{11}, b_{22}, b_{33} .

2.2.1 回归方程的建立

对实验数据进行分析，得出：

(1) A0421:回归方程为

$$y=0.587+0.204x_1-0.287x_2-0.842x_3-0.031x_1^2-0.045x_2^2+0.0447x_3^2+0.018x_1x_2+0.042x_1x_3+0.792x_2x_3$$

剔除不显著项, 简化后的回归方程为

$$y=0.587+0.204x_1-0.287x_2-0.031x_1^2+0.792x_2x_3$$

(2) A0444: 回归方程为

$$y=0.521+0.206x_1-0.457x_2+0.465x_3-0.027x_1^2-0.014x_2^2+0.559x_3^2+0.087x_1x_2-0.263x_1x_3+0.300x_2x_3$$

剔除不显著项, 简化后的回归方程为

$$y=0.521+0.206x_1-0.457x_2-0.027x_1^2+0.087x_1x_2-0.263x_1x_3$$

(3) C0644: 回归方程为

$$y=0.498+0.155x_1-0.254x_2-0.486x_3-0.024x_1^2-0.041x_2^2-0.303x_3^2+0.024x_1x_2+0.024x_1x_3+0.655x_2x_3$$

剔除不显著项, 简化后的回归方程为

$$y=0.498+0.155x_1-0.254x_2-0.024x_1^2+0.655x_2x_3$$

表 3 二次通用旋转组合设计各组合试验数据统计结果

处理组合	2,4-D	6-BA	KT	A0421 平均	A0444 平均	C0644 平均
	/(mg · L ⁻¹)	/(mg · L ⁻¹)	/(mg · L ⁻¹)	诱导率/%	诱导率/%	诱导率/%
1	5	1.5	0.4	65.22	71.56	55.72
2	5	1.5	0.2	54.78	77.71	47.88
3	5	0.5	0.4	63.33	66.54	51.22
4	5	0.5	0.2	65.34	70.78	55.23
5	3	1.5	0.4	69.27	74.87	57.09
6	3	1.5	0.2	57.10	62.60	48.96
7	3	0.5	0.4	67.65	79.39	56.22
8	3	0.5	0.2	74.70	81.01	62.44
9	2.318	1	0.3	59.31	64.67	50.89
10	5.682	1	0.3	62.52	67.79	54.74
11	4	0.159	0.3	72.43	79.26	60.59
12	4	1.841	0.3	60.41	66.64	52.83
13	4	1	0.132	67.92	73.67	57.07
14	4	1	0.468	71.49	77.42	60.43
15	4	1	0.3	69.69	74.84	58.29
16	4	1	0.3	70.77	76.40	57.69
17	4	1	0.3	71.44	76.89	60.44
18	4	1	0.3	66.15	72.36	56.92
19	4	1	0.3	67.73	75.37	59.21
20	4	1	0.3	68.84	73.99	59.42

2.2.2 显著性检验

对回归模型进行诊断, 考察是否有意义; 对回归方程的各项系数、失拟项进行统计检验, 用统计量对回归方程作 F 检验, 检验回归方程与实际情况的拟合程度, 是否能正确反映各因素与愈伤诱导率之间的关系。

(1) 对 A0421 的回归模型进行诊断, 根据方差分析表中 F_2 对应的 p 值为 $0.001\ 9<0.05$, 因此回归模型有意义。对各项系数进行显著性检验, 得出 $Fb_1=9.817\ 1$, $Fb_2=6.944\ 0$, $Fb_{23}=18.213\ 0$, 均大于临界值 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$, 达显著水平; $Fb_3=2.0295$, $Fb_{12}=0.970\ 0$, $Fb_{13}=0.200\ 2$, 小于 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$; 说明因子 3 对该材料的愈伤诱导率无显著影响; 因子 1 和 2, 因子 1 和 3 的交互效应小, 不影响各因子独立作用。对失拟项作 F 检验: $F_1=2.565\ 6<F_{0.05}(5, 5)=5.05$, 说明失拟项在 0.05 水平上检验不显著, 未知因子对试验结果的干扰较小; 用统计量 F_2 对回归方程作 F 检验: $F_2=7.618\ 0>F_{0.01}(9, 10)=4.94$, 回归方程在 0.01 水平上显著, 试验数据与所采用的数据模型基本上符合, 二次回归方程与实际情况拟合得较好, 可用来模拟现实数值(表 4)。

表 4 A0421 回归方程的显著性检验和拟合测验

变异来源	平方和 SS	自由度 <i>df</i>	均方 MS	偏相关	<i>F</i> 值	<i>p</i> 值
回归	0.047 2	9	0.005 2	$F_2=7.618\ 0$		0.001 9
剩余	0.006 9	10	0.000 7			
失拟	0.005 0	5	0.001 0	$F_1=2.565\ 6$		0.162 2
误差	0.001 9	5	0.000 4 总和			
				0.054 1		19

(2) 对 A0444 的回归模型进行诊断, 根据方差分析表中 F_2 对应的 p 值为 $0.009\ 7<0.05$, 因此回归模型有意义. 对各项系数进行显著性检验, $Fb_1=7.298\ 3$, $Fb_2=12.791\ 5$, $Fb_{12}=16.051\ 1$, $Fb_{13}=5.836\ 65$ 均大于临界值 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$, 达显著水平; $Fb_3=0.449\ 6$, $Fb_{23}=1.895\ 2$ 小于 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$; 说明因子 3 对该材料的愈伤诱导率无显著影响; 因子 2 和 3 的交互效应小, 不影响各因子独立作用. 对失拟项作 F 检验: $F_1=5.918\ 4<F_{0.01}(5, 5)=11.0$, 说明失拟项在 0.01 水平上检验不显著, 未知因子对试验结果的干扰较小; 用统计量 F_2 对回归方程作 F 检验: $F_2=4.988\ 5>F_{0.01(9, 10)}=4.94$, 回归方程在 0.01 水平上显著, 试验数据与所采用的数据模型基本上符合, 二次回归方程与实际情况拟合得较好, 可用来模拟现实数值(表 5).

表 5 A0444 回归方程的显著性检验和拟合测验

变异来源	平方和 <i>SS</i>	自由度 <i>df</i>	均方 <i>MS</i>	偏相关	<i>F</i> 值	<i>p</i> 值
回归	0.042 5	9	0.004 7	$F_2=4.988\ 5$		0.009 7
剩余	0.009 5	10	0.000 9			0.009 5
失拟	0.008 1	5	0.001 6	$F_1=5.918\ 4$		0.036 66
误差	0.001 4	5	0.000 3			0.001 4
总和	0.052 0	19	0.052 0			

(3) 对 C0644 的回归模型进行诊断, 根据方差分析表中 F_2 对应的 p 值为 $0.0042<0.05$, 因此回归模型有意义. 对各项系数进行显著性检验, 得出 $Fb_1=8.255\ 8$, $Fb_2=7.933\ 3$, $Fb_{23}=18.210\ 8$ 均大于临界值 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$ 达显著水平, $Fb_3=0.987\ 0$, $Fb_{12}=2.524\ 2$, $Fb_{13}=0.097\ 8$ 小于 $F_{0.05}(1, 10)=4.94$; 说明因子 3 对该材料的愈伤诱导率无显著影响; 因子 1 和 2, 因子 1 和 3 的交互效应小, 不影响各因子独立作用. 对失拟项作 F 检验: $F_1=4.764\ 7<F_{0.05}(5, 5)=5.05$, 说明失拟项在 0.05 水平上检验不显著, 未知因子对试验结果的干扰较小. 用统计量 F_2 对回归方程作 F 检验: $F_2=6.229\ 4>F_{0.01}(9, 10)=4.94$, 回归方程在 0.01 水平上显著, 试验数据与所采用的数据模型基本上符合, 二次回归方程与实际情况拟合得较好, 可用来模拟现实数值(表 6).

表 6 C0644 回归方程的显著性检验和拟合测验

变异来源	平方和 <i>SS</i>	自由度 <i>df</i>	均方 <i>MS</i>	偏相关	<i>F</i> 值	<i>p</i> 值
回归	0.026 4	9	0.002 9	$F_2=6.229\ 4$		0.004 2
剩余	0.004 7	10	0.000 5			
失拟	0.003 9	5	0.000 8	$F_1=4.764\ 7$		0.055 9
误差	0.000 8	5	0.000 2			
总和	0.031 1	19				

2.2.3 主要因子的效应分析

由于方程是经过无量纲线性编码值代换后得到的, 回归方程中各项系数已标准化, 根据回归系数的绝对值反映该因素在试验过程中对应变量作用的大小, 回归系数的正负号反映其作用的趋势为正影响或者为负影响. (1)比较 A0421 的回归方程中偏回归系数的绝对值大小, 可得到各因素影响顺序从大到小为: x_2x_3, x_2, x_1 , 即 6-BA 和 KT 互作效应对诱导效果的影响要高于 6-BA、2,4-D 单独作用时的影响, 根据回归系数的正负值, 判断出 6-BA 对试验结果为负影响, 2,4-D 单独作用、6-BA 和 KT 互作对结果均是正影响. (2)比较 A0444 的回归方程中偏回归系数的绝对值大小, 可得到各因素影响顺序从大到小为: x_2, x_1x_3, x_1, x_1x_2 , 即 6-BA 对愈伤诱导率的影响大于 2,4-D 与 KT 互作、2,4-D 单独作用和 2,4-D 与 6-BA 互作时对结果的影响, 且 6-BA、2,4-D 与 KT 互作对结果是负影响, 2,4-D 单独作用或 2,4-D 与 6-BA 互作时对结果为正影响. (3)比较 C0644 回归方程中偏回归系数的绝对值大小, 可得到各因素影响顺序从大到小为: x_2x_3, x_2, x_1 , 即 6-BA 和 KT 互作时对结果的影响大于 6-BA、2,4-D 单独作用时对结果的影响水平. 根据回归系数正负性, 判断 6-BA 对结果产生负影响, 2,4-D、6-BA 和 KT 互作对结果产生正影响.

2.2.4 模拟寻优

本试验为 3 因素 5 水平, 共有 $5^3=125$ 个处理组合, 对于材料 A0421: 愈伤诱导率大于 66.56%时的处

理组合有 59 个, 其各因素水平频率见表 7.

表 7 A0421 诱导率大于 66.56% 时各方案中各因素水平频率表

水 平	x_1 2,4-D		x_2 6-BA		x_3 KT	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
−1.682	7	0.125	14	0.25	12	0.214 3
−1	9	0.160 7	13	0.232 1	12	0.214 3
0	10	0.178 6	10	0.178 6	9	0.160 7
1	15	0.267 9	9	0.160 7	11	0.196 4
1.682	15	0.267 9	10	0.178 6	12	0.214 3
合计	59	1	59	1	59	1
加权平均	$\bar{\chi}_1=0.347$		$\bar{\chi}_2=-0.192$		$\bar{\chi}_3=-0.018$	
标准误差	0.159		0.167		0.170	
95%置信区间	0.035~0.659		−0.520~0.136		−0.351~0.316	

对于材料 A0444: 愈伤诱导率大于 73.49% 时的处理组合有 49 个, 其各因素水平频率见表 8.

表 8 A0444 诱导率大于 73.49% 时各方案中各因素水平频率表

水 平	x_1 2,4-D		x_2 6-BA		x_3 KT	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
−1.682	6	0.122 4	22	0.449	12	0.244 9
−1	8	0.163 3	17	0.346 9	10	0.204 1
0	10	0.204 1	6	0.122 4	10	0.204 1
1	12	0.244 9	3	0.061 2	9	0.183 7
1.682	13	0.2653	1 0.020 4		8 0.163 3	
合计	49	1	49	1	49	1
加权平均	$\bar{\chi}_1=0.322$		$\bar{\chi}_2=-1.006$		$\bar{\chi}_3=-0.158$	
标准误差	0.169		0.121		0.176	
95%置信区间	−0.010~0.653		−1.245~0.768		−0.503~0.187	

对于材料 C0644: 愈伤诱导率大于 56.59% 时的处理组合有 59 个, 其各因素水平频率见表 9.

表 9 C0444 诱导率大于 56.59% 时各方案中各因素水平频率表

水 平	x_1 2,4-D		x_2 6-BA		x_3 KT	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
−1.682	9	0.152 5	15	0.254 2	12	0.203 4
−1	10	0.169 5	14	0.237 3	12	0.203 4
0	10	0.169 5	10	0.169 5	11	0.186 4
1	15	0.254 2	10	0.169 5	12	0.203 4
1.682	15	0.254 2	10	0.169 5	12	0.203 4
合计	59	1	59	1	59	1
加权平均	$\bar{\chi}_1=0.256$		$\bar{\chi}_2=-0.210$		$\bar{\chi}_3=0.162$	
标准误差	0.160		0.163		0.162	
95%置信区间	−0.058~0.569		−0.529~0.108		−0.318~0.318	

将上述各表中 x_1, x_2, x_3 的置信区间代入公式

$$Z_j = Z_{0j} + \Delta_k x_k$$

其中 Z_j 为计算后的实际浓度, x_k 为 95% 置信区间对应的范围值, 计算出: (1) 材料 A0421: x_1 (2,4-D), x_2 (6-BA), x_3 (KT) 在 95% 置信区间的实际用量分别为: 4.021~4.392 mg/L, 0.846~1.040 mg/L 和 0.279~0.319 mg/L, 即当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时, 愈伤诱导率为 66.56% 以上; (2) 材料 A0444: x_1 (2,4-D), x_2 (6-BA), x_3 (KT) 在 95% 置信区间的实际用量分别为: 3.994~4.389 mg/L, 0.630~1.228 mg/L 和 0.270~0.311 mg/L, 即当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时, 愈伤诱导率为 73.49% 以上; (3) 材料 C0444: x_1 (2,4-D), x_2 (6-BA), x_3 (KT) 在 95% 置信区间的实际用量分别为: 3.965~4.339 mg/L, 0.843~1.032 mg/L 和 0.281~0.319 mg/L, 即当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时, 愈伤诱导率为 56.59% 以上.

3 讨论与结论

将统计学方法运用于植物组织培养试验设计中的思路由来已久,陆美莲等在百合组织培养试验中采用了均匀正交设计方法^[7],何建等也将正交试验法运用到了牛蒡的组织培养试验中^[8].以种子为外植体诱导愈伤时,根据回归方程求最大值的方法,得到愈伤诱导率最高的优化组合方案为:2,4-D 为 5.682 mg/L, 6-BA 为 0.159 mg/L, KT 为 0.132 mg/L.但在实际操作中,由于其它各种因素的影响,实际诱导效果并不能达到极值时的水平,因此对各材料相关因子进行分析得出各因子的适用浓度范围为:(1)材料 A0421 各因子适用浓度范围:2,4-D: 4.021~4.392 mg/L, 6-BA: 0.846~1.040 mg/L, KT: 0.279~0.319 mg/L,当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时,愈伤诱导率为 66.56%以上,试验可靠性为 95%;(2)材料 A0444 各因子适用浓度范围:2,4-D: 3.994~4.389 mg/L, 6-BA: 0.630~1.228 mg/L, KT: 0.270~0.311 mg/L,当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时,愈伤诱导率为 73.49%以上,试验可靠性为 95%;(3)材料 C0444 各因子适用浓度范围 2,4-D: 3.965~4.339 mg/L, 6-BA: 0.843~1.032 mg/L, KT: 0.281~0.319 mg/L,当培养基中 2,4-D, 6-BA, KT 3 种激素的浓度分别控制在该范围内时,愈伤诱导率为 56.59%以上,试验可靠性为 95%.根据以上 3 种材料所对应的适用浓度范围,推导出适用于芒种子愈伤诱导的各因子浓度范围大致为:2,4-D: 4.021~4.339 mg/L, 6-BA: 0.846~1.032 mg/L, KT: 0.281~0.311 mg/L.

根据回归方程得到的最优方案所对应的诱导率虽然分别只达到 66.56%, 73.49%, 56.59%, 但较未优化时的诱导率有很大提高.此外,材料的实际诱导率与最优方案中对应的诱导率有一定的差异,原因在于除了植物激素,其它因素也能影响愈伤组织的诱导率,如材料的来源、光照、培养基 pH、温度、湿度、各激素的交互作用等.为了消除或减少其它因素的干扰,试验应尽可能地做到取材一致、培养基一致及培养条件一致^[9].

参考文献:

- [1] 胡婷春,熊兴耀.新型能源植物—芒的研究进展[J].农产品加工·学刊,2010(5):23—26.
- [2] 易自力.芒属能源植物资源的开发与利用[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2012,38(5):455—463.
- [3] HOLME I B, PETERSEN K K. Callus Induction and Plant Regeneration from Different Explant Types of *Miscanthus × ogiformis* Honda ‘Giganteus’ [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 45(1): 43—52.
- [4] 周玥玥,陈智勇,黄丽芳,等.五节芒离体再生与多倍体诱导技术体系的建立[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2012,38(5):487—490.
- [5] 唐启义. DPS 数据处理系统—实验设计、统计分析及数据挖掘 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,2010:238—262.
- [6] 李 艳,王 青,李英慧,等.正交设计在黄金鱼花组织培养中的应用[J].园艺学报,2001,28(6):570—571.
- [7] 陆美莲,许新萍,周厚高,等.均匀正交设计在百合组织培养中的应用[J].西南大学学报:自然科学版,2004,26(6):699—702.
- [8] 何 建,梁国鲁.正交试验法在牛蒡组织培养中的应用[J].西南大学学报:自然科学版,2004,26(6):696—698.
- [9] 韩秀慧,尹伟伦,王华芳.二次回归正交设计在微型月季组织培养中的应用[J].林业科学,2004,7:40(4):189—192.

An Orthogonal Design Experiment for Callus Induction from *Miscanthus sinensis* Seed

YANG Yu-chen, CHEN Zhi-yong, JIANG Jian-xiong,
YU Xiao-han, YI Zi-li

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

Abstract: Seeds of 3 genotypes of *Miscanthus sinensis* were used as explants in *in vitro* culture for callus induction. Different combinations of phytohormones were adopted and the experiment result data were analyzed statistically. The results showed that the optimum phytohormone combination in the culture medium was 2,4-D 4.021—4.339 mg/L+6-BA 0.846—1.032 mg/L+KT 0.281—0.311 mg/L.

Key words: *Miscanthus sinensis*; seed; callus induction

责任编辑 欧 宾

