

NAA 和 2,4-D 对东方百合组织培养的影响

付文奇^{1,2}, 杜双田^{1*}, 陈建科³, 尹 华⁴

(1. 西北农林科技大学, 陕西 杨陵; 712100; 2. 西安植物园, 陕西 西安 710061;

3. 杨凌乐达生物科技有限公司, 陕西 杨陵 712100; 4. 陕西省林业厅, 陕西 西安 710082)

摘要:借助正交回归多项式建立数学模型的方法,研究了 NAA 对东方百合“蒂伯”(Tiber)鳞片诱导小鳞茎及 2,4-D 对小叶片诱导愈伤组织的影响,以探讨东方百合组织培养中 NAA 及 2,4-D 的用量范围及最佳用量。结果表明, NAA 诱导离体鳞片外植体产生小鳞茎的用量范围为 0.15~0.9 mg·L⁻¹,最佳用量为 0.69 mg·L⁻¹; 2,4-D 诱导叶片形成愈伤组织的最佳用量为 3.2 mg·L⁻¹。

关键词:东方百合; NAA; 2,4-D; 组织培养; 数学模型

中图分类号:S682.29

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)02-0083-04

Effects of NAA and 2,4-D on Oriental Lily Scale and Leaflet Culture

FU Wen-qi^{1,2}, DU Shuang-tian^{1*}, CHEN Jian-ke³, YIN Hua⁴

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Xi'an Botanical Garden Shaanxi Xi'an, China; 3. Yangling Leda Biology Science & Technology Co.,

Ltd., Yangling, Shaanxi 712100, China; 4. Forestry Department of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710082, China)

Abstract: Adopting orthogonal polynomial regression method, the mathematical model of the effects of NAA on bulbil induction, and that of 2,4-D on callus induction from leaflet on oriental lily cv. "Tiber" were established. The results showed that NAA at 0.15~0.9 mg·L⁻¹ was appreciate, and 0.69 mg·L⁻¹ was the optimum concentration for bulbil induction from scale explants in vitro; and that 3.2mg·L⁻¹ was the optimum concentration of 2,4-D for callus induction from leaflet explant in vitro.

Key words: oriental lily; NAA; 2,4-D; tissue culture; mathematical model

百合(*Lilium. spp*)是世界著名的观赏花卉之一^[1]。其栽培品种繁多,花色鲜艳,花姿雅致,适宜温室周年栽培,鲜花市场销量很大,尤其是东方系列百合的鲜花需求量逐年增加,在我国花卉市场占有重要地位^[2];近年来我国百合的栽培面积越来越大,特别是东方百合的种球生产对环境条件要求较高,生产周期长,生产成本低,传统的繁殖方法易导致百合种球感染病毒,造成种性降低,因此生产上商品种球几乎完全依赖进口。为了实现东方百合种球生产的国产化,降低生产成本,组织培养是一项有效的途径^[3-5]。关于东方百合的组织培养技术研究的报道虽然较多,但有关植物生长调节剂对百合组培效果

影响的数学模型研究报道尚少。本研究以东方百合蒂伯(Tiber)为材料,分别探讨了 NAA 对百合小鳞茎诱导及 2,4-D 小叶片诱导愈伤组织的诱导率的动态变化规律,以期为东方百合组织培养技术的完善提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料为东方百合“蒂伯”(Tiber)的鳞茎(周径为 160~180 mm),该鳞茎从荷兰引进,实验室栽培 2 a。

收稿日期:2007-06-29 修回日期:2007-08-31

基金项目:农业部新技术引进项目(2004-z22)

作者简介:付文奇(1978-),男,陕西周至人,在读硕士,主要从事花卉栽培与育种研究。

* 通讯作者:杜双田。E-mail:dst6107@126.com。

1.2 方法

取低温处理之后的百合鳞茎,去除外层干枯鳞片,先用自来水冲洗干净,分取鳞片用 75 % 的乙醇浸泡 30 s 之后,在 0.1 % 升汞溶液中浸泡 5~8 min,无菌水冲洗 5~6 遍,再用“菇宝王”牌气雾消毒剂熏蒸 30 min。然后在无菌条件下将鳞片切成边长 8~10 mm 的小方块,置于不同的培养基上,以 MS 为基本培养基。NAA 对诱导小鳞茎的影响试验,每个处理添加 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA, NAA 的试验水平分别为 0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 mg · L⁻¹ 和 0.9 mg · L⁻¹,以不加 NAA 为对照,接种后培养 30 d,每个试验随机抽取 20 瓶对产生的小鳞茎计数;2,4-D 对愈伤组织的诱导试验,采用组培小鳞茎的叶片为外植体,每个处理添加 0.5 mg · L⁻¹ 的 6-BA 固定不变,2,4-D 的试验水平分别为 0.5、1.0、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2 mg · L⁻¹ 和 3.6 mg · L⁻¹,以不加 2,4-D 为对照。培养条件为:温度 20℃~25℃,光照强度 1 000~1 200 Lx,光照时间为 12 h · d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 NAA 对鳞片诱导小鳞茎的影响

从表 1 可见,在培养基中适当添加外源激素 NAA,诱导产生的小鳞茎数量明显高于对照组。由于 NAA 的试验水平为等距的,借助 N=7 的正交回归多项式计算回归方程^[6],以 z_{1j} 表示 NAA 的含量变化, y_{1j} 表示小鳞茎的数量,以 X_j 作为计算的中间变量,令 X_j(z_{1i}) = λΨ_j(z_{1i}), 其中:λ 是用来整数化处理的系数。Ψ_j(z_{1i}) 为正交多项式组(表 2)。

表 1 NAA 对鳞片诱导小鳞茎效果的影响

Table 1 Effects of different concentrations of NAA on bulbil induction

试验编号	6-BA	NAA(z _{1i})	小鳞茎数(y _{1j})/个
	/(mg · L ⁻¹)		
1	0.5	0.0	13
2	0.5	0.15	31
3	0.5	0.30	65
4	0.5	0.45	87
5	0.5	0.60	152
6	0.5	0.75	131
7	0.5	0.90	108

由表 2 可得回归方程:

$$y_{1j} = 83.857 + 20.43X_{11} - 4.69X_{12} - 15.33X_{13} + 0.208X_{14} + 1.548X_{15} \quad (1)$$

由于 X₁₄、X₁₅ 的系数较小,从方程中剔除之后得:

$$y_{1j} = 83.857 + 20.43X_{11} - 4.69X_{12} - 15.33X_{13} \quad (2)$$

经检验方程(2)成立,该方程的置信度为 95%。

对方程(2)进行转换,由正交多项式公式得:

$$\begin{cases} \Psi_0(z_1) = 1 \\ \Psi_1(z_1) = \frac{z_1 - 0.45}{0.15} \\ \Psi_2(z_1) = \left(\frac{z_1 - 0.45}{0.15}\right)^2 - \frac{35}{12} \\ \Psi_3(z_1) = \left(\frac{z_1 - 0.45}{0.15}\right) \left[\frac{z_1 - 0.45}{0.15}\right]^2 - \frac{35}{12} \\ \frac{32}{15} \left(\frac{z_1 - 0.45}{0.15}\right) \end{cases}$$

将上式代入方程(2)得:

$$y_{1j} = -758.2z_1^3 + 814.36z_1^2 - 35.27z_1 + 17.66 \quad (3)$$

由方程(3)可得 NAA 在不同试验水平时 y_{1j} 的预测值(y_{1j}),结合表 1 得图 1。

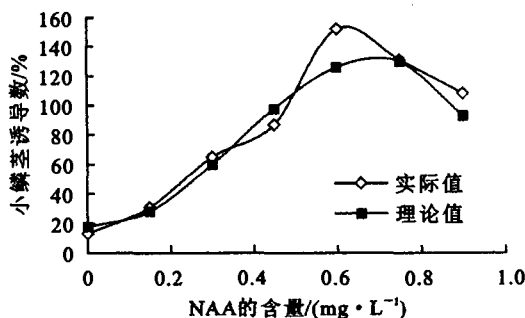


图 1 NAA 的含量对小鳞茎诱导数的影响

Fig. 1 Relationship between NAA and number of bulbil induction

由图 1 可见,实际值与理论值曲线十分接近,表明回归方程拟合的比较理想,对方程(3)进一步分析知,曲线的拐点为(0.36, 75.1)及(0.69, 131.97),极大值为:

$$Z_{1max} = 0.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$Y_{1max} = 131.97 \text{ 个}$$

表明在 NAA 浓度为 0.69 mg · L⁻¹ 时,利用百合的鳞片诱导小鳞茎的效果最好。

2.2 2,4-D 对百合鳞片叶诱导愈伤组织的影响

利用鳞片叶为外植体接种后其基部出现淡绿色的突起,部分直接分化成小鳞茎,部分形成愈伤组织,愈伤组织进一步膨大,表面形成无数的小突起,分化形成小鳞茎,接种培养的第 60 d 统计产生愈伤组织(表 3)。

表 2 正交回归多项式计算表

Table 2 Calculation upon orthogonal polynomial

序号	$X_0(\Psi_0)$	$X_1(\Psi_1)$	$X_2(\Psi_2)$	$X_3(-\frac{1}{6}\Psi_3)$	$X_4(\frac{7}{12}\Psi_4)$	$X_5(\frac{7}{20}\Psi_5)$	y_j /个
1	1	-3	5	-1	3	-1	13
2	1	-2	0	1	-7	4	31
3	1	-1	-3	1	1	-5	65
4	1	0	-4	0	6	0	87
5	1	1	-3	-1	1	5	152
6	1	2	0	-1	-7	-4	131
7	1	3	5	1	3	1	108
$\lambda^2 S$	7	28	84	6	154	84	
B_j	587	572	-394	-92	-32	130	
b_j	83.857	20.429	-4.69	-15.333	0.208	1.548	
S_j	—	11 685.143	1 847.86	1 410.667	6.649	201.19	

表 3 2,4-D 对百合小鳞茎幼叶片诱导愈伤组织的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 2,4-D on lily leaf callus induction

2,4-D 浓度 (z_{2i})/(mg · L ⁻¹)	有效接种数 /个	形成愈伤组织 /个	愈伤组织诱导率 (y_2)/%
0.0	30	0	0
0.5	30	0	0
1.0	28	0	0
1.2	30	1	3
1.6	29	8	27
2.0	30	11	37
2.4	30	13	43
2.8	26	15	57
3.2	25	15	60
3.6	30	16	53

从表 3 可知,在 2,4-D 浓度小于、等于 1.0 mg · L⁻¹ 时,不能形成愈伤组织。2,4-D 浓度为 1.2 mg · L⁻¹ 时,诱导率仅为 3%,以后随着 2,4-D 浓度的增加,诱导率逐渐增加;当 2,4-D 浓度达到 3.2 mg · L⁻¹ 时,愈伤组织的诱导率达到最高值为 60%;随着 2,4-D 浓度的进一步增加,诱导率略有降低。为了计算 2,4-D 浓度与愈伤组织诱导率的函数关系,同样借用 $n=7$ 的正交回归多项式,以 z_{2j} 表示 2,4-D 的含量变化, y_{2j} 表示愈伤组织的诱导率,令 $X_{2j}(z_{2i}) = \lambda \Psi_j(z_{2i})$,经计算得:

$$y_{2j} = 40 + 8.43X_{21} - 2.071X_{22} - 0.5X_{23} - 0.58X_{24} + 0.21X_{25} \quad (4)$$

由于 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 的系数较小同样从方程(4)中剔除,于是可得:

$$y_{2j} = 40 + 8.43X_{21} - 2.07X_{22} \quad (5)$$

经计算方程(5)拟合的很好,置信度达 99%。

对方程(5)进行转换,由正交回归多项式公式得:

$$\begin{cases} \Psi_0(z_2) = 1 \\ \Psi_1(z_2) = \frac{z_2 - 2.4}{0.4} \\ \Psi_2(z_2) = 4\left(\frac{z_2 - 2.4}{0.4}\right)^2 - 4 \end{cases}$$

将上式代入方程(5)得:

$$y_{2j} = -76.82 + 83.18z_2 - 12.94z_2^2 \quad (6)$$

对方程(6)求导得:

$$\frac{\delta y_2}{\delta Z_2} = -25.88z_2 + 83.18 = 0 \quad (7)$$

即: $Z_{2max} = 3.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

$$y_{2max} = 56.85\%$$

由方程(6)可得 y_{2j} 的预测值 \hat{y}_{2j} ,结合表 3 可得图 2。

由图 2 可见实际值与预测值非常接近。表明方程(6)符合 2,4-D 的含量对愈伤组织诱导率的影响规律。

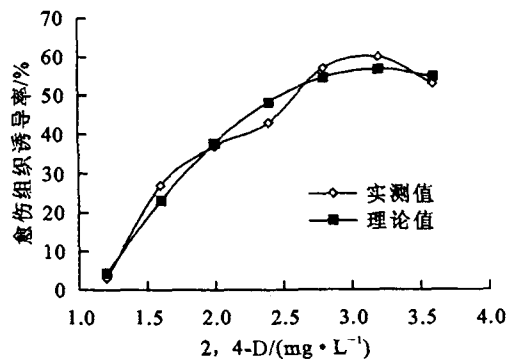


图 2 2,4-D 对愈伤组织诱导率的影响

Fig. 2 Relationship between 2,4-D and rate of induction

3 结论与讨论

(1)采用 MS 培养基添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, NAA 的添加对东方百合鳞片诱导小鳞茎的数量具有显著影响,在试验浓度范围 $0.0, 0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, NAA 的添加量与小鳞茎的诱导数之间呈三次函数关系,函数曲线的拐点分别为 $(0.36, 75.1)$ 及 $(0.69, 131.97)$ 。从试验结果可以看出,在不添加 NAA 的情况下,能顺利的诱导出小鳞茎,且诱导率为 13%,说明百合的鳞片中可能含有一定量的生长调节物质;从曲线的形态看,当 NAA 的浓度在 $0.15 \sim 0.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度的增加,小鳞茎的诱导数迅速增加;当 NAA 浓度在 $0.36 \sim 0.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度的增加,小鳞茎的诱导数增加速率逐渐减缓;当 NAA 浓度为 $0.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,以鳞片为外植体,小鳞茎的诱导数最高;当 NAA 浓度大于 $0.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度的增加,小鳞茎的诱导数逐渐降低。添加的最佳量 NAA ($0.69 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与对照相比,产生小鳞茎的数量可以提高 11.7 倍。

关于 NAA 与 6-BA 不同浓度对比对东方百合小鳞茎诱导的影响,国内的研究报道较多,唐东芹^[7]、李宏宇^[8]、赵庆芳^[9]报道的适宜诱导配方依次为:MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, MS+ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃, MS+ $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT + $0.05 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。影响百合鳞茎形成和膨大的因素是多方面的^[11-12],如不同的品种、不同的组培时间、鳞片本身的差异及不同植物生长调节剂的配比等。总之,适量的添加 NAA 对小鳞茎的形成有明显的促进作用。

(2)2,4-D 的添加量对百合小鳞茎上叶片愈伤组织的诱导率有极显著的影响,在 2,4-D 浓度小于 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,外植体不能形成愈伤组织;2,4-D 浓度在 $1.2 \sim 3.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,2,4-D 的浓度与愈伤组织的诱导率之间呈二次函数关系;当 2,4-D 的用量为 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织诱导率达到最大值 56.85%。据罗丽萍^[10]等报道,MS 培养基添加 6, BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-D 小鳞茎叶片产生愈伤组织

的最佳用量为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与本文研究结果接近。

(3)影响东方百合小鳞茎及愈伤组织形成的激素较多,例如 NAA、2,4-D、IAA、KT、GA₃ 等,本文仅限于在 BA 用量不变的情况下,研究了 NAA 与鳞片诱导小鳞茎数量及 2,4-D 与叶片诱导愈伤组织的诱导率的函数关系,取得了初步结果,而多种植物生长调节剂不同水平的组合对百合组培效果的影响有待于进一步研究。

(4)本研究采用正交回归多项式列表计算,逐级检验,逐渐逼近的方法研究植物生长调节剂与东方百合组培效果的函数关系,计算简便、快捷,计算结果符合客观实际,表明该方法在植物组织培养研究中是可行的,对进一步研究植物生长调节剂的适宜用量及各种植物生长调节剂之间的合理搭配、筛选最佳配方,提高组培技术等具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 王俐,李枝林,赵燕.百合的组织培养及快繁技术[J].云南农业大学学报,2001,16(4):304-307.
- [2] 蒋细旺,司怀军.百合的组织培养技术综述[J].湖北农业科学,2004(1):78-82.
- [3] 唐东芹,黄丹枫,唐克轩,等.东方百合鳞片的组织培养[J].植物生理学通讯,2003,23(5):450-452.
- [4] 王刚,杜捷,李桂英,等.兰州百合和野百合组织培养及快速繁殖研究[J].西北师范大学报:自然科学版,2002,38(1):69-71.
- [5] 丁兰,刘国安,田卫东,等.新铁炮百合组织培养和快速繁殖研究[J].西北师范大学学报:自然科学版,2001,37(1):80-82.
- [6] 任露泉.试验优化技术[M].北京:机械工业出版社,1986:173-175.
- [7] 唐东芹,黄丹枫,唐克轩,等.东方百合鳞片的组织培养[J].植物生理学通讯,2003,39(5):450-452.
- [8] 李宏宇,马鸿翔,雷家军,等.东方百合鳞片结合叶片切段培养快繁技术[J].江苏农业科学,2006(3):91-94.
- [9] 赵庆芳,曾小英,丁兰,等.东方百合组织培养和快速繁殖研究[J].西北师范大学学报:自然科学版,2003,39(1):56-58.
- [10] 罗丽萍,杨柏云,章敏华,等.百合的组织培养[J].中草药,2001,32(7):640-642.
- [11] LIAN M, EBASIS C. Growth of oriental hybrid "Casablanca" bulblet using bioreactor culture[J]. Sci Hort, 2003, 97: 41-48.
- [12] LIM S, SEON J H, PAEK K Y, et al. Development of pilot-scale process for mass production of *Lilium* bulblet in vitro [J]. Acta Hort, 1998, 461: 237-241.