

6-BA 与 NAA 浓度对比对何首乌不定芽增殖的影响

陈 菊, 陈国惠

(西南农业大学农学与生命科学学院, 重庆 400716)

摘 要: 以何首乌幼嫩茎段为外植体, 采用二次回归正交设计方法研究了何首乌组织培养快繁和继代培养基中 6-BA 和 NAA 浓度配比关系。通过对所建模型的分析得出: 6-BA 的最优浓度为 1.26~1.99mg/L, NAA 的最优浓度为 0.05~0.48mg/L, 其可信度达 95%。

关键词: 二次回归正交设计; 何首乌; 组织培养; 6-BA; NAA

中图分类号: S 567.23*9; S722.3*7 **文献标识码:** A

Study of the Concentration of 6-ba and Naa in the Rapid Propagation of *Polygonum multiflorum Thunb*

Chen Ju, Chen Guohui

(College of Agronomy and Life Science, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract: Quadratic regressive factorial experiment was used to optimize concentration of 6-BA and NAA in MS medium for shoot propagation from the stem segments of *Polygonum multiflorum Thunb*. The result showed that the most of shoot achieved by the 6-BA and NAA concentrations were in a rang of 1.26~1.99mg/L and 0.05~0.48mg/L respectively. The probability of the event was 95%.

Key words: Quadratic regression factorial experiment, *Polygonum multiflorum Thunb*, Tissue culture, 6-BA, NAA

何首乌 (*Polygonum multiflorum Thunb.*), 别名首乌, 为蓼科多年生草本植物, 是常用传统中药。研究表明, 何首乌具有增强免疫功能^[1], 抗氧化作用^[2], 延长寿命、延缓衰老^[3]等抗衰老作用, 还具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功效。近年来何首乌的需求量日趋增大, 野生资源日益枯竭, 人工栽培已发展起来。无论是在快繁、良种选育, 还是在其药理研究中, 运用组织培养的方法都必将起到事半功倍的作用。

二次回归正交试验设计是一种广泛用于处理多因素试验的科学方法, 它将回归分析法与正交试验法的优点有机地结合起来, 采用正交表安排处理组合, 用最小二乘原理建立回归方程, 对试验结果进行拟合, 使得数据处理简便, 建立模型准确等优点^[4]。本实验旨在以何首乌茎段不定芽分化培养基中细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 作为试验因素进行研究, 应用二次回归正交设计的方法, 寻找激素浓度和比例的最优配比。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2005 年在重庆市西南农业大学生物技术试验室进行, 何首乌外植体采自重庆市西南农业大学教学农场。

1.2 方法

采用二次回归正交实验设计, 首先选取何首乌的幼嫩茎段在自来水下冲洗干净, 无菌滤纸, 吸干表面水分后, 用 70% 乙醇浸泡 30s, 然后用 0.1% 升汞消毒 10min, 无菌水冲洗 5~6 次后将茎段剪成长约 1~1.5cm 的小段, 接种在不添加任何激素的 MS 诱导培养基上进行培养, 30 d 后接种到以二次回归正交设计的含不同浓度的 6-BA (0~2.5mg/L)、NAA (0~1.0 mg/L) 组合的各种 MS 增殖培养基中。增殖培养基上培养 30 d 后按每个处理不定芽增殖数进行二次回归正交分析。

培养条件: 培养过程中的温度 (21~25) °C, 光照时

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目“根茎类中药材退化原因及其共性控制技术”(8024)。

第一作者简介: 陈菊, 女, 1979 年出生, 贵州长顺人, 西南大学在读硕士研究生, 从事中药材栽培研究。E-mail: chenju2366@163.com, 通信地址: 400716 重庆北碚西南大学原西农校区 651 信箱。

通讯作者: 陈国惠, 女, 1953 年出生, 重庆大足人, 副教授, 主要从事药用植物研究。

收稿日期: 2006-07-05, 修回日期: 2006-07-17。

间 12~16h/d,光照强度 2000~2500Lx。

1.3 实验方案

采用二元二次正交组合设计^[9],试验因素为分裂素 6-BA,记为 X_1 和生长素 NAA,记为 X_2 ,其浓度设计见表 1。具体的正交组合设计表见表 2。

表 1 6-BA 与 NAA 二次回归正交设计的编码与用量

编码 Code	X_1 , 6-BA (mg/L)	X_2 , NAA (mg/L)
r (1.32)	2.5	1.0
1	1.82	0.88
0	1.25	0.5
-1	0.68	0.12
-r(-1.32)	0	0
Δ_j	0.57	0.38

1.4 试验数据的采集

表 2 中的 X_1 、 X_2 的编码值分别是 6-BA 和 NAA 各水平的编码值,按表 1 中 6-BA 和 NAA 各水平的实际用量进行不同浓度的组合配比试验,其中试验组合 9~14 为 6-BA 和 NAA 零水平时的浓度组合,即 6 次重复,零水平安排重复的作用在于对试验结果进行统计分析时能够了解经过 F 检验结果显著的回归方程在被研究区域内的拟合情况。何首乌茎段在这些培养基中培养 30 d 后,统计茎段增殖的总芽数列于表 2 的最后一列。

表 2 何首乌不定芽发生的二元二次正交组合设计与不定芽增殖数

处理号	X_0	X_1 (6-BA)	X_2 (NAA)	X_1X_2	X_1^2	X_2^2	Y 芽增殖数
1	1	1	1	1	0.4654	0.4654	35
2	1	1	-1	-1	0.4654	0.4654	43
3	1	-1	1	-1	0.4654	0.4654	20
4	1	-1	-1	1	0.4654	0.4654	22
5	1	1.32	0	0	1.2078	-0.5346	36
6	1	-1.32	0	0	1.2078	-0.5346	12
7	1	0	1.32	0	-0.5346	1.2078	30
8	1	0	-1.32	0	-0.5346	1.2078	36
9	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	49
10	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	50
11	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	48
12	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	50
13	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	52
14	1	0	0	0	-0.5346	-0.5346	46
A= ΣX^2	14	7.485	7.485	4	6.070	6.070	$\Sigma Y=529$
D= ΣXY	529	67.68	-17.92	-6	-79.168	-47.805	SSY=2130.357
b=D/A	37.789	9.042	-2.394	-1.5	-13.042	-7.875	SSu=2072.867
u=D ² /A		611.985	42.904	9	1032.498	376.475	SSc=57.49

1.5 分析方法

根据二元二次回归正交组合实际试验标准的分析方法,并进行数字模型和各因素的显著性测验。以得出影响何首乌的不定芽分化的回归模型。

2 结果与分析

2.1 何首乌不定芽增殖数

试验结果记于表 2 的 Y 列。资料运算结果记于表 2 的最后 4 行。由表 2 的 b 行值可得到回归方程式(2)式。其中(2)式中的 b_0 值计算式为(1)式。

$$b_0 = \frac{\Sigma Y}{N} - \frac{\Sigma X_i^2}{N} * \Sigma b_{ij} = 48.968 \dots\dots\dots (1)$$

$$\hat{y} = 48.968 + 9.042x_1 - 2.394x_2 - 1.5x_1x_2 - 13.042x_1^2 - 7.875x_2^2 \dots\dots\dots (2)$$

2.2 显著性测验

对回归方程(2)进行显著性测验(见表 3)。由表 3 表明,回归方程极显著,且 X_2 项显著, X_1 , X_1^2 , X_2^2 项极显著,而 X_1X_2 项不显著,可以剔除,但为了相互比较和建立方程,本试验仍予以保留。

表 3 回归方程的显著性检验

变异来源	df	SS	MS	F	F α
X_1	1	611.985	611.985	85.164**	F0.05(1,8)=11.26
X_2	1	42.904	42.904	5.970*	F0.05(1,8)=5.32
X_1X_2	1	9	9	1.252	F0.05(1,8)=5.32
X_1^2	1	1032.198	1032.498	143.683**	F0.01(1,8)=11.26
X_2^2	1	376.475	376.475	52.390**	F0.01(1,8)=11.26
回归	5	2072.867	414.573	57.692**	F0.01(5,8)=6.63
离回归	8	57.49	7.186		
总变异 Total	13	2130.357			

2.3 回归模型的拟合测验

回归方程的显著,并不一定表示二次回归方程拟合良好,还需进行回归模型的拟合测验(见表 4)。

由拟合测验看出,纯误差平方和和失拟平方和的差异性检验结果($F < F_{0.05}$),表明回归方程拟合良好。于

是回归方程(2)式可作为建立数字模型的基本方程式。

2.4 不同浓度 6-BA、NAA 优良组合方案的选择

本试验为 2 因数 5 水平,共有 $5^2=25$ 个处理组合。采用频数区间值计法,筛选出 25 个处理组合中不定芽 >40 的优良方案(见表 5)。

表4 回归模型的拟合测验

变异来源	df	SS	MS	F	F α
失拟	3	20.83	6.9433	0.947*	F _{0.05(3,5)} =5.41
纯误差	5	36.66	7.332		
总计	8				

表5 最优组合频数分析表

编码值	X ₁ 6-BA		X ₂ NAA	
	次数	频率	次数	频率
-r=1.32	0	0.00	0	0.00
-1	0	0.00	3	0.60
0	2	0.40	2	0.40
1	2	0.40	0	0.00
r=1.32	1	0.20	0	0.00
合计	5	1.00	5	1.00
平均数	0.66		-0.6	
标准误	0.28		0.24	
95%置信区间	0.02~1.31		-1.15~-0.05	
最优浓度	1.26~1.99		0.06~0.48	

由表5选出何首乌不定芽增殖数 >40 的 6-BA、NAA 的最优浓度分别为 1.26~1.99mg/L、0.05~0.48mg/L, 其可信度为 95%。

3 结果与讨论

笔者利用回归正交设计方法, 通过模拟寻优, 对试验结果进行预测, 筛选出了何首乌组织培养中所用的各个植物激素的浓度配比(表5), 即当 6-BA 的浓度控制在 1.26~1.99mg/L 范围内, NAA 的浓度控制在 0.05~0.48mg/L 时, 有 95% 的把握获得不定芽的增殖数 >40。

影响植物器官分化的内源激素, 细胞分裂素和生长素要达到一定的浓度和比例时才能使器官发生, 从而达到预期的目的。一般 6-BA 可以有效的诱导芽的萌发与不定增殖, 而低浓度的生长素可以促进茎的伸长。本试验中, 何首乌增殖培养所需的 6-BA 和 NAA 浓度的要求都有一定的范围, 分别为 1.26~1.99mg/L 和 0.05~0.48mg/L, 在该范围内, 何首乌不定芽的增殖数达到最优。

除了植物激素, 其他因素如材料的来源, 温度、湿

度、光照、pH 值等都会影响到不定芽的增殖, 这些因素的研究有待进一步试验。

参考文献

- [1] 应久皓, 周学优, 朱秀琴. 何首乌炮制品药理临床研究[J]. 中国中药杂志, 1991, 17(12): 722
- [2] 刘青云, 彭代银, 瞿晓梅, 等. 首乌丸抗衰老作用的实验研究[J]. 中成药, 1991, 13(4): 28
- [3] 杨秀伟. 何首乌醇提取物对易老化小鼠肝脏和脑 MAO 活性的影响[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(1): 48
- [4] 杨安贵. 农业实验设计基础及统计分析[M]. 重庆: 重庆人民大学出版社, 1994. 79~92
- [5] 续九如, 黄智慧. 林业实验设计. 北京: 高等教育出版社, 1995. 133~142

(责任编辑: 秦守亮)