

Fuzzy 分析法在东方百合组培继代培养基优化中的应用

马璐¹, 杜双田^{1*}, 金凌云², 荆留萍¹, 李慧君²

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:应用 Fuzzy 正交分析法, 研究了东方百合“帝伯”(Tiber) 组培苗继代培养时蔗糖、6-BA、NAA 对组培小鳞茎增重率的影响。结果表明: 东方百合组培继代增殖培养基的最佳配方为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖。

关键词: 东方百合; 组织培养; 继代培养基; 正交试验设计

中图分类号: S682.290.353

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2010)03-0084-03

Application of Fuzzy Analysis to Optimize Tissue Culture Subculture Medium of Oriental Lily

MA Lu¹, DU Shuang-tian¹, JIN Ling-yun², JING Liu-ping¹, LI Hui-jun²

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

2. College of Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Effects of sucrose, 6-BA, and NAA on the growth rate of tissue culture bulblets of lily were studied by using orthogonal design Fuzzy analysis. The optimal combinations were MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+sucrose 30 g·L⁻¹. This formulation has application value in production practice.

Key words: oriental lily; tissue culture; subculture medium; orthogonal experiment design

百合色彩鲜艳、花姿雅致, 被人们视为“百年好合、幸福祥和”的象征, 广泛应用于各种庆典、节日和人们的日常生活中^[1-2]。中国是世界百合种质资源的分布中心, 约有 47 个种、18 个变种, 占世界百合属总数的一半以上, 其中 36 个种、15 个变种为我国特有种^[3]。近年来, 随着人们生活水平的不断提高, 鲜切花的消费日益剧增, 作为世界名花, 百合花的需求更是逐年增加, 尤其是东方百合, 以其花香、形美、寓意美好等特点独具鳌头。东方百合种球常规方法繁殖率低, 其商品种球远远不能满足市场需要^[4]。为了快速繁育优质商品种球, 目前多采用组织培养技术进行繁育^[5-10]。本研究以东方百合“帝伯”(Tiber) 种球为试验材料, 进行组织培养继代培养基的研究, 以便为工厂化生产提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料为东方百合“帝伯”(Tiber) 的鳞茎(周

径 16~18 cm)。该试验材料从荷兰引进, 实验室栽培繁殖。

1.2 方 法

取低温处理后的百合鳞茎, 除去外层有损伤的鳞片, 用自来水冲洗干净, 分取鳞片, 用 75% 乙醇浸泡 30 s 后, 在 0.1% 升汞溶液中浸泡 5~8 min, 用无菌水冲洗 5~6 遍, 再用“菇宝王”牌气雾消毒剂熏蒸 30 min。在无菌条件下将鳞片切成 5~8 mm² 的小块, 置于不同培养基上培养, 诱导小鳞茎。

试验以 MS 培养基为基本培养基, 以蔗糖、6-BA 和 NAA 为因素, 每个因素设 3 个水平。以 L₉(3⁴) 安排试验(表 1、表 2)。每个试验重复 30 瓶, 每瓶接种大小、形态基本相同的小鳞茎 10 个, 接种前后称量培养基及瓶重, 计算接种小鳞茎的重量。接种后第 30 d 取出小鳞茎, 用自来水清洗干净, 用吸水纸吸干水分, 称重计算小鳞茎的增殖率(Y_i)。

$$Y_i = (\text{培养 30 d 时小鳞茎重量} - \text{接种时小鳞茎重量}) / \text{接种时小鳞茎重量} \times 100\%$$

收稿日期: 2009-06-13 修回日期: 2009-09-21

基金项目: 农业部新技术引进项目(2004-z22)

作者简介: 马璐, 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与利用。

* 通讯作者: 杜双田, 男, 副教授, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: dst6107@126.com。

重量) / 培养 30 d 时小鳞茎重量

培养条件为: 温度 20~25℃, 光照强度 1 000~1 200 lx, 光照时间 12 h · d⁻¹。

对所得数据(Y_i)剔除 $\bar{y} \pm 2\delta$ 以外的数值之后, 再求其平均值, 并按 $Y' = Y_i - 0.1$ 进行标准化。

表 1 试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素		
	蔗糖(A ₁) /(g · L ⁻¹)	6-BA(A ₂) /(mg · L ⁻¹)	NAA(A ₃) /(mg · L ⁻¹)
1	30	1.0	0.5
2	60	2.5	2.5
3	90	4.5	4.5

表 2 试验方案及结果

Table 2 Implementation plan and results

编号	因素				Y _i	Y' = Y _i - 0.1
	A ₁	A ₂	A ₃	空列		
1	1	1	1	1	1.08	0.98
2	1	2	2	2	0.97	0.88
3	1	3	3	3	0.72	0.62
4	2	1	2	3	0.90	0.80
5	2	2	3	1	0.81	0.71
6	2	3	1	2	0.77	0.67
7	3	1	3	2	0.79	0.69
8	3	2	1	3	0.82	0.72
9	3	3	2	1	0.70	0.60
K ₁	2.48	2.47	2.37	2.29		
K ₂	2.18	2.31	2.28	2.24		
K ₃	2.01	1.89	2.02	2.14		
k ₁	0.83	0.82	0.79	0.76		
k ₂	0.72	0.77	0.76	0.75		
k ₃	0.67	0.63	0.67	0.71		

2 结果与分析

2.1 建立模糊评价参数

设蔗糖浓度(A₁)、6-BA 浓度(A₂)、NAA 浓度(A₃)论域分别为 X₁、X₂、X₃, 每个因素 3 个水平, 即:

$$A_1: 3\% A_{11}, 6\% A_{12}, 9\% A_{13}$$

$$A_2: 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{21}, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{22}, 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{23}$$

$$A_3: 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{31}, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{32}, 4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} A_{33}$$

$$\text{则有: } X_1 = \{A_{11}, A_{12}, A_{13}\}$$

$$X_2 = \{A_{21}, A_{22}, A_{23}\}$$

$$X_3 = \{A_{31}, A_{32}, A_{33}\}$$

2.2 因素主次作用分析

由于标准化后的鳞茎重量在 0~1 之间, 即 0 ≤ Y_i ≤ 1, 它代表了 A_i 在 j 水平 A_{ij} ∈ X_j 处的隶属度, 于是, A_i 相对于各水平的标准化重量也是定义域

X_i 上的 Fuzzy 集 A_i, 则有:

$$\tilde{A}_1 = (0.83, 0.72, 0.67)$$

$$\tilde{A}_2 = (0.82, 0.77, 0.63)$$

$$\tilde{A}_3 = (0.79, 0.76, 0.67)$$

Fuzzy 子集 $\tilde{A}_1, \tilde{A}_2, \tilde{A}_3$ 的高度分别为 $\text{hgt}A_1 = 0.83, \text{hgt}A_2 = 0.82, \text{hgt}A_3 = 0.79$, 显然, $\text{hgt}A_1 > \text{hgt}A_2 > \text{hgt}A_3$, 表明蔗糖浓度对小鳞茎增重的影响最大, 其次为 6-BA, 再次为 NAA。

2.3 两因素间交互作用分析

任意两因素各水平组合对小鳞茎增重的影响, 定义因素 L 与因素 N 之间的模糊关系矩阵为:

$$X_L^T \times X_N = \begin{pmatrix} A_{L1} \\ A_{L2} \\ A_{L3} \end{pmatrix} (A_{N1}, A_{N2}, A_{N3})$$

$$X_L^T \times X_N =$$

$$\begin{pmatrix} A_{L1} \wedge A_{N1}, A_{L1} \wedge A_{N2}, A_{L1} \wedge A_{N3} \\ A_{L2} \wedge A_{N1}, A_{L2} \wedge A_{N2}, A_{L2} \wedge A_{N3} \\ A_{L3} \wedge A_{N1}, A_{L3} \wedge A_{N2}, A_{L3} \wedge A_{N3} \end{pmatrix} = R_{LN}$$

根据上式可得:

$$X_1^T \times X_2 = \begin{pmatrix} 0.82, 0.77, 0.63 \\ 0.72, 0.72, 0.63 \\ 0.67, 0.67, 0.63 \end{pmatrix} = R_{12}$$

$$X_1^T \times X_3 = \begin{pmatrix} 0.79, 0.76, 0.67 \\ 0.72, 0.72, 0.67 \\ 0.67, 0.67, 0.67 \end{pmatrix} = R_{13}$$

$$X_2^T \times X_3 = \begin{pmatrix} 0.79, 0.76, 0.67 \\ 0.77, 0.76, 0.67 \\ 0.63, 0.63, 0.63 \end{pmatrix} = R_{23}$$

R_{LN} 表示因素 L 与因素 N 各水平组合对小鳞茎标准重量的联合影响, 根据隶属度最大原则, 确立任意两因素之间的最佳组合。

由 R₁₂ 可见, A₁ 与 A₂ 组合时, A₁₁ A₂₁ 为最佳组合, 即采用 30 g · L⁻¹ 蔗糖、1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 时对小鳞茎的增重最为有利。

同理, 另外两组的最佳组合分别为 A₁₁ A₃₁ 和 A₂₁ A₃₁, 即 30 g · L⁻¹ 蔗糖与 0.5 mg · L⁻¹ NAA, 60 g · L⁻¹ 蔗糖与 0.5 mg · L⁻¹ NAA 为最佳组合。

2.4 所有因素各水平组合对小鳞茎标准增重的影响

定义 $\tilde{A}_1, \tilde{A}_2, \tilde{A}_3$ 之间的笛卡尔乘积为:

$$\tilde{A}_1 \times \tilde{A}_2 \times \tilde{A}_3 \triangleq \int_{X_1 \times X_2 \times X_3} \frac{\min(y_{1i}, y_{2j}, y_{3k})}{(A_{1i}, A_{2j}, A_{3k})}$$

由上式可得各组合关于 $\tilde{A}_1 \times \tilde{A}_2 \times \tilde{A}_3$ 的隶属度 (表 3)。

由表 3 知, 在不考虑交互作用的情况下, 3 因素的最佳组合为 A₁₁ A₂₁ A₃₁, 即 30 g · L⁻¹ 蔗糖、1.0

mg · L⁻¹ 6-BA、0.5 mg · L⁻¹ NAA。

表 3 3 因素各水平组合关于 $\tilde{A}_1 \times \tilde{A}_2 \times \tilde{A}_3$ 的隶属度

Table 3 Subordinations of $\tilde{A}_1 \times \tilde{A}_2 \times \tilde{A}_3$ in each combinations of three factors

组合	隶属度	组合	隶属度
A ₁₁ A ₂₁ A ₃₁	0.79	A ₁₂ A ₂₂ A ₃₃	0.67
A ₁₁ A ₂₁ A ₃₂	0.76	A ₁₂ A ₂₃ A ₃₁	0.63
A ₁₁ A ₂₁ A ₃₃	0.67	A ₁₂ A ₂₃ A ₃₂	0.63
A ₁₁ A ₂₂ A ₃₁	0.77	A ₁₂ A ₂₃ A ₃₃	0.63
A ₁₁ A ₂₂ A ₃₂	0.76	A ₁₃ A ₂₁ A ₃₁	0.67
A ₁₁ A ₂₂ A ₃₃	0.67	A ₁₃ A ₂₁ A ₃₂	0.67
A ₁₁ A ₂₃ A ₃₁	0.63	A ₁₃ A ₂₁ A ₃₃	0.67
A ₁₁ A ₂₃ A ₃₂	0.63	A ₁₃ A ₂₂ A ₃₁	0.67
A ₁₁ A ₂₃ A ₃₃	0.63	A ₁₃ A ₂₂ A ₃₂	0.67
A ₁₂ A ₂₁ A ₃₁	0.72	A ₁₃ A ₂₂ A ₃₃	0.67
A ₁₂ A ₂₁ A ₃₂	0.72	A ₁₃ A ₂₃ A ₃₁	0.63
A ₁₂ A ₂₁ A ₃₃	0.67	A ₁₃ A ₂₃ A ₃₂	0.63
A ₁₂ A ₂₂ A ₃₁	0.72	A ₁₃ A ₂₃ A ₃₃	0.63
A ₁₂ A ₂₂ A ₃₂	0.72		

3 结论与讨论

已有的研究表明,外植体来源、激素种类和浓度、蔗糖浓度、大量元素浓度、光照、温度等都对百合鳞茎的形成及膨大造成影响^[11-12]。从试验结果来看,各因素对小鳞茎增重率的影响程度为:蔗糖>6-BA>NAA。低浓度的蔗糖、6-BA、NAA 都有利于小鳞茎的增殖,随着 6-BA 浓度的增加,产生的愈伤组织增多;随着 NAA 浓度的增加,生根量明显增大;随着蔗糖浓度的加大,形成小鳞茎的数量减少,但小鳞片增厚,个体增大。因此,高浓度的蔗糖对百合组培苗在试管内形成小鳞茎有重要的作用,高浓度的 6-BA 对诱导愈伤组织有明显效果,而高浓度的 NAA 对提高百合试管苗的生根也有显著效果。

从试验各因素对小鳞茎的增重率的影响来看,最佳组合为 A₁₁A₂₁A₃₁,即 30 g · L⁻¹蔗糖、1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、0.5 mg · L⁻¹ NAA,在进行百合组培苗的继代培养时,蔗糖、6-BA 及 NAA 的含量不能过高,否则将影响小鳞茎的增殖效果。

从试验结果看,对试验因素各水平的取值范围偏高,通过研究未能取得继代培养基的最佳配方,因此需考虑各因素的交互作用,这有待于进一步研究。

试验采用了 Fuzzy 正交分析、直观分析及正交多项式分析,所得结果完全吻合,而且 Fuzzy 分析可以定量计算试验因素的所有水平组合对生物学效率影响程度,具有一定的实际应用价值。

参考文献:

[1] 宁云芬,周厚高,黄玉源,等.百合种球繁育的研究进展[J].仲恺农业技术学院学报,2002,15(2):66-70.

NING Y F, ZHOU H G, HUANG Y Y, *et al.* Recent advances in the studies on the bulb propagation and breeding in lily (*Lilium* spp.)[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology, 2002, 15(2): 66-70.

- [2] 罗建让,张延龙,牛立新.消毒处理对百合鳞片扦插的影响[J].西北林学院学报,2008,23(2):87-90.
LUO J R, ZHANG Y L, NIU L X. Different disinfection treatments on cutting propagation of lily scale[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(2): 87-90.
- [3] 张云,原雅玲,刘青林.百合品种改良与生物技术研究进展[J].北京林业大学学报,2001,23(6):56-59.
ZHANG Y, YUAN Y L, LIU Q L. Proceeding on cultivar improvement and biotechnology in *Lilium*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2001, 23(6): 56-59.
- [4] 李悦,李艳菊,穆鼎.3个东方百合品种生物学特性观察及杂交亲和性研究[J].西北林学院学报,2008,23(3):105-109.
LI Y, LI Y J, MU D. Biological characteristics and cross compatibility on *Lilium orientalis* among three cultivars[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(3): 105-109.
- [5] 庄志鸿,刘建.试管内形成东方百合鳞茎的组织培养[J].植物生理学通讯,2002,38(2):149.
ZHUANG Z H, LIU J. Tissue culture of the bulblet formed in tube of *Lilium acapulco*[J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(2): 149.
- [6] 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.
JIANG X W, SI H J. Summary on technology of lily tissue culture[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2004(1): 78-82.
- [7] 侯娜,郭军战,王港,等.东方百合(*Lilium orientalis*)组织培养研究[J].西北林学院学报,2008,23(3):120-122.
HOU N, GUO J Z, WANG G, *et al.* Tissue culture of *Lilium orientalis*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(3): 120-122.
- [8] 付文奇,杜双田,陈建科,等.NAA和2,4-D对东方百合组织培养的影响[J].西北林学院学报,2008,23(2):83-86.
FU W Q, DU S T, CHEN J K, *et al.* Effects of NAA and 2,4-D on oriental lily scale and leaflet culture[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(2): 83-86.
- [9] 唐东芹,黄丹枫,康克轩,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.
TANG D Q, HUANG D F, KANG K X, *et al.* Tissue culture of oriental lily from bulb scale[J]. Plant Physiology Communications, 2003, 39(5): 450-452.
- [10] 杨薇红,张延龙,童斌,等.亚洲百合花器官的组织快繁技术研究[J].中国农学通报,2004,20(5):193-195.
YANG W H, ZHANG Y L, TONG B, *et al.* Tissue culture and rapid propagation of asiatic lily from flower organs[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, 20(5): 193-195.
- [11] MEI L L, DEBASIS C, KEE Y P. Growth of *Lilium orientalis* hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture[J]. Sci. Hortic, 2003, 97: 41-48.
- [12] KUMAR S, KASHYAP M, SHARMA D R. In vitro regeneration and bulblet growth from lily bulb scale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance[J]. Biol. Plant, 2005, 49(4): 629-632.