

响应面优化早花忍冬组培苗增殖培养条件

李金英, 肖美卉, 芦雄雄, 王颖*, 吴林, 赵春莉

(吉林农业大学园艺学院 长春 130118)

摘要:本试验以早花忍冬组培苗的茎段为试验材料,采用Box-Behnken响应面设计法优化早花忍冬茎段继代培养的条件,为早花忍冬组培离体快繁体系建立提供了参考依据。通过单因素试验法确定激素的添加范围,通过响应面优化得到最佳的增殖培养基。结果表明:激素种类对早花忍冬组培苗茎段继代培养的影响顺序依次为:6-BA>IAA>IBA,并且在6-BA浓度为1.9 mg/L、IBA浓度为0.76 mg/L、IAA浓度为0.27 mg/L时,茎段继代培养的增殖系数为7.66,与方程预测值相接近。

关键词:早花忍冬;响应面;茎段增殖

中图分类号:S663.9

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)03-0130-04

Optimization of Culture Conditions for Proliferation of Tissue Culture Seedlings of *Lonicera Praeflorens* Batal by Response Surface Methodology

LI Jinying, XIAO Meihui, LU Xiongiong, WANG Ying*, WU Lin, ZHAO Chunli

(College of Horticulture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The stem segments of tissue culture seedlings of *Lonicera praeflorens* Batal were adopted as the materials in the experiment. And the Box-Behnken Response Surface Methodology was used to optimize the subculture conditions of *Lonicera praeflorens* Batal in order to provide reference for establishing the rapid proliferation system of the in vitro tissue culture of *Lonicera praeflorens* Batal. The addition range of hormone was determined by single factor test method, and the optimized culture medium for proliferation was obtained by Response Surface Methodology accordingly. The results showed that: the descending order of the influence that different hormone sorts had on the stem segments subculture of tissue culture seedlings of *Lonicera praeflorens* Batal is: 6-BA>IAA>IBA. Furthermore, the multiplication coefficient of the subculture of stem segments was 7.66, under the condition of 1.9 mg/L 6-BA, 0.76 mg/L IBA, and 0.27 mg/L IAA, which are very close to the predicted values.

Key words: *Lonicera praeflorens* Batal; Response surface method; Stem proliferation culture experiments

我国拥有忍冬科忍冬属植物资源较多,是忍冬属植物集中分布的中心之一^[1]。忍冬属植物种质资源类型丰富,花色多样,大多数为优良的观赏树种^[2]。早花忍冬(*Lonicera praeflorens* Batal.)是忍冬科忍冬属特有的早花植物,果实可食用,开花早于大多数树种,花色优美、花香清新,适宜在绿化中充当春花和绿篱^[3]。早花忍冬红色果实口感微甜、没有明显的苦涩味,是忍冬属中少有的果实可食用的植物^[4]。早花忍冬的花、茎、叶及根

中均可分离出药用物质,如具有抗菌作用的有机酸类、抗病毒作用的黄酮类、护肝作用的皂苷类以及抗氧化作用的咖啡酸类,具有巨大的潜在开发价值,是食用、观赏和药用价值兼得的优良早春小浆果资源^[5-6]。虽然早花忍冬利用价值较大,但至今未被合理开发利用,缺乏优良的苗木,没有实现大面积栽植利用。

植物组织培养技术可实现植物种质资源保存、大规模生产、植物脱毒,可在短期内获得大量优质苗木^[7-9]。选取茎段作为组培材料培养过程简单,主要诱导不定芽,种苗性状相对稳定^[10]。目前,对早花忍冬的组培研究大多采用随机区组设计或正交设计来探究适宜条件,但却无法明确各个激素之间的相互作用关系^[11]。响应面试验法(Response Surface Methodology)是通过建立各因素

收稿日期:2020-02-03

基金项目:吉林省科技厅“三区”人才项目(202022309);吉林省科技厅计划项目(20200402113NC)

作者简介:李金英(1978-),女,讲师,博士,主要从事植物组织培养及资源研究。

通讯作者:王颖,女,博士,副教授,E-mail: li_jy78@163.com

与其中相互作用关系的二项多次回归方程,把各因素与响应值之间的关系通过函数模型形式得以展现,并通过计算得出各因素和响应值之间的最优参数,有效反映出各个因素间的变化趋势与在其影响下的最适培养条件的一种统计学方法。响应面法具有高精度、预测误差值小、试验次数较少、弥补了正交设计不能体现多种因素间相互作用关系等优点^[12]。

因此,本试验通过响应面法来优化早花忍冬组培中继代培养的条件,筛选出适合早花忍冬组培苗生长的最优培养基配方,可以有效提高繁殖系数,为构建早花忍冬的完整离体快繁体系、实现规模化生产提供了借鉴与参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选取实验室内现有的生长健壮的早花忍冬组培苗为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 继代增殖培养基单因素试验设计

通过单因素试验来确定各激素的适宜范围。本试验选取3种不同的激素,设置5种不同的激素浓度,分别为:6-BA(1、1.5、2、3、4 mg/L);IAA(0.1、0.3、0.5、0.7、1 mg/L);IBA(0.25、0.5、0.75、1、1.5 mg/L),将生长健康且长势大致相同的早花忍冬组培苗茎段,经过修剪后分别接种到不同的培养基内。每个处理接种5瓶,每瓶接种5株,3次重复,30 d后观察并统计增殖系数。

1.2.2 继代增殖培养基不同浓度激素响应面设计

选取6-BA的浓度(A)、IBA的浓度(B)、IAA的浓度(C)作为试验因子(表1),以增殖系数为响

表1 早花忍冬增殖培养基响应面试验因素水平

水平	因素		
	6-BA	IBA	IAA
-1	1	0.5	0.1
0	2	0.75	0.3
1	3	1	0.5

应值(Y),根据单因素试验所得到的结果,在Design Expert 8.0.6软件的Box-Behnken试验设计中输入各因素之间最适的水平区间范围,可得到一个3因素3水平的17组试验方案。接种30 d后,统计早花忍冬组培苗茎段继代的增殖系数,并通过Design Expert 8.0.6软件对试验结果进行计算,得出一个二项多次的回归方程,对回归方程进行方差分析后,绘制响应值和等高线图,研究各因素之间的相互作用关系。

1.2.3 数据统计与分析

(1)数据计算公式

增殖系数=培养30 d后获得的有效不定芽数/接种前不定芽数

(2)数据分析

使用Excel和IBM SPSS Statistics 20.0软件进行数据统计和显著性分析,同时,利用Design Expert 8.0.6软件对所得数据进行计算和分析,推测出最佳激素配比,通过试验验证结果的准确性。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

将早花忍冬接种到单因素的增殖培养基内,5 d后开始逐渐从茎段分化出不定芽,由于不同激素浓度的影响,不同培养基内的增殖系数也有较大的差异。

表2 单因素试验

处理	6-BA(mg/L)	增殖系数	处理	IBA(mg/L)	增殖系数	处理	IAA(mg/L)	增殖系数
A1	1	2.57±0.21c	B1	0.25	2.05±0.49c	C1	0.1	1.17±0.05e
A2	1.5	3.26±0.14b	B2	0.5	2.78±1.17b	C2	0.3	1.91±0.02c
A3	2	4.46±0.22a	B3	0.75	3.04±0.61a	C3	0.5	2.94±0.03a
A4	3	3.05±0.40bc	B4	1	2.23±0.49c	C4	0.7	2.06±0.05b
A5	4	2.06±0.44d	B5	1.5	1.67±0.05d	C5	1	1.67±0.06d

注:同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

由表2可知,6-BA对早花忍冬增殖系数影响最大,随着6-BA浓度不断增加,增殖系数呈现先增加再下降的趋势,2 mg/L增殖系数达到最大值为4.46。IBA浓度在0.75 mg/L时增殖系数最大,组培苗茎段生长较为粗壮;IAA浓度在0.5 mg/L时增殖系数最大,为2.94。由此可知,早花忍冬茎段增殖

系数最佳的添加激素范围为:6-BA 1~3 mg/L、IBA 0.5~1 mg/L、IAA 0.1~0.5 mg/L。

2.2 Box-Behnken试验方案及结果

以Box-Behnken中心试验设计原理,采用Design Expert 8.0.6软件对三种激素设计出17组试验方案,以三种不同浓度的激素:6-BA(A)、IBA

(B)、IAA(C)为自变量,以增殖系数(Y)为响应值,试验结果见表3。

表3 增殖培养试验设计与统计

试验号	6-BA(mg/L)	IBA(mg/L)	IAA(mg/L)	增殖系数
1	2	1	0.5	5.04
2	1	1	0.3	4.64
3	2	0.75	0.3	7.19
4	1	0.5	0.3	4.66
5	2	0.75	0.3	7.3
6	1	0.75	0.5	4.23
7	2	0.75	0.3	7.23
8	2	0.5	0.1	5.55
9	3	0.75	0.5	3.12
10	2	0.5	0.5	5.23
11	2	0.75	0.3	7.06
12	2	0.75	0.3	7.35
13	2	1	0.1	5.98
14	3	0.75	0.1	3.89
15	1	0.75	0.1	4.34
16	3	1	0.3	3.68
17	3	0.5	0.3	3.23

2.3 回归方程分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件通过计算试验结果得到一个二项多次的回归方程:

$$\text{增殖系数}=7.23-0.49A+0.084B-0.27C+0.12AB-0.17AC-0.16BC-2.36A^2-0.81B^2-0.97C^2$$

其中相关系数 $R^2=0.9956$,说明本次试验中存在 99.56% 的差异可以通过所建立的回归方程模型来解释。方差分析中 P 值和 F 值的大小可以反映所建立模型的可行性, P 值越小, F 值越大,模型就越有意义。通过表 4 可知,该回归方程 $P<0.0001$,证明该方程具有极显著性;且失拟项 $F=2.91$, $P=0.1641>0.05$,失拟项不显著,证明该二项多次回归方程模型具有高拟合度和高可靠性,所以可利用此方程来对早花忍冬组培苗茎段继代增殖的培养基组合进行预测与分析。

对回归方程中回归系数的显著性进行显著性分析可知,6-BA、IBA 和 IAA 对增殖系数的线性效应极显著($P<0.01$)。因素 A 对增殖系数的影响极为显著,因素 C 对增殖系数有着显著性影响,按各因素对增殖系数的影响大小排序依次为: $A>C>B$;而且 AB、AC 和 BC 两两交互作用均不显著; A^2 、 B^2

表4 响应面二次回归方程方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	35.59	9	3.95	174.76	<0.0001	**
A	1.95	1	1.95	86.19	<0.0001	**
B	0.056	1	0.056	2.48	0.1593	
C	0.57	1	0.57	25.3	0.0015	*
AB	0.055	1	0.055	2.44	0.1622	
AC	0.11	1	0.11	4.81	0.0643	
BC	0.096	1	0.096	4.25	0.0783	
A^2	23.54	1	23.54	1040.11	<0.0001	**
B^2	2.76	1	2.76	121.86	<0.0001	**
C^2	3.94	1	3.94	173.91	<0.0001	**
残差	0.16	7	0.023			
失拟项	0.11	3	0.036	2.91	0.1641	
误差项	0.05	4	0.012			
总和	35.75	16				

$R^2=0.9956$

注:“*”表示差异显著($P<0.05$);“**”表示差异极显著($P<0.01$)

和 C^2 对增殖系数的曲面效应均具有极显著的影响。因此,通过此回归方程计算得到的最优组培苗茎段继代增殖配方为:6-BA=1.9 mg/L, IBA=0.76 mg/L, IAA=0.27 mg/L,在此配方下预测的增殖系数可达到 7.79。

2.4 响应值和等高线分析

根据拟合方程,绘制 3 因素之间交互作用的

响应面图和等高线图(图 1~图 3)。通过两两激素相互作用的等高线图和响应面图可知,各等高线图均存在最小的椭圆形,说明增殖系数可取到最大值。由图 1 和图 2 可知,响应曲线较为陡峭且等高线为椭圆形,说明 IBA 与 6-BA 的交互作用和 IAA 与 6-BA 的交互作用对增殖系数的影响差异显著。由图 3 可知,响应曲面较为平缓且等高

线图近似圆形,说明 IAA 与 IBA 的交互作用对增殖系数的影响差异不显著。

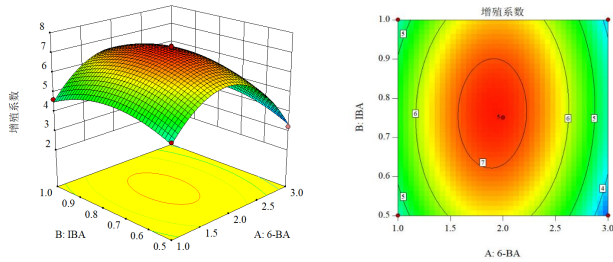


图1 IBA与6-BA交互作用对增殖系数的影响

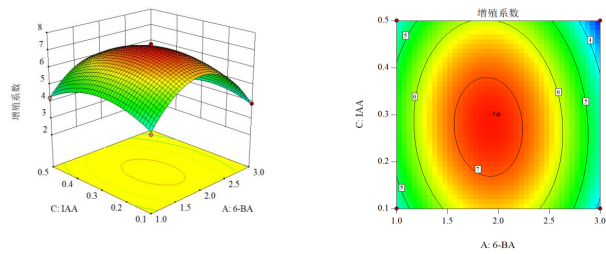


图2 IAA与6-BA交互作用对增殖系数的影响

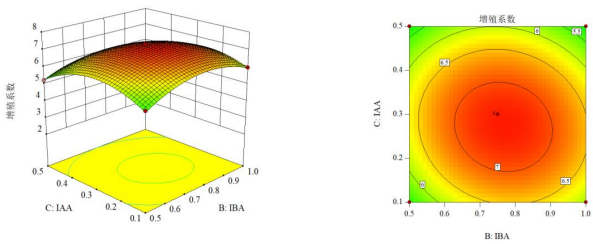


图3 IAA与IBA交互作用对增殖系数的影响

2.5 最佳激素浓度配比及验证

通过回归方程得到最优组培苗增殖条件,对该预测值进行3次重复试验加以验证。把生长健壮的早花忍冬组培苗茎段接种至MS+1.9 mg/L 6-BA+0.76 mg/L IBA+0.27 mg/L IAA的培养基内,每瓶接种5株,每个处理接种30瓶,3次重复,30 d后计算其增殖系数的平均数为7.66,与通过Design Expert 8.0.6软件分析得到的预测值相差无几,证明响应面法可以优化其培养基的配方,试验方案也具有可操作性和实际意义。

3 讨论与结论

本试验研究从单因素试验法出发,首先确定培养基内添加的激素浓度较为适宜的范围:6-BA 1~3 mg/L、IBA 0.5~1 mg/L、IAA 0.1~0.5 mg/L。再通过Box-Behnken响应面试验设计出17组试验处理组合,最后通过Design Expert 8.0.6软件对这17组试验结果进行响应面优化分析,通过得到的回归方程计算出试验的最优解,再进行实际试验

的分析验证。由试验得出最优的增殖培养基是MS+6-BA 1.9 mg/L+IBA 0.76 mg/L+IAA 0.27 mg/L,实际的增殖系数为7.66,与回归方程的预测值比较接近,证明了该试验方法的可行性与合理性。

王欢等人研究证明6-BA浓度在0.5~2 mg/L时,早花忍冬的茎段增殖系数会随着6-BA浓度的增加而增大,超过2 mg/L时反而会受到抑制^[13]。这与本试验中通过回归方程计算得出的6-BA最适浓度在1.9 mg/L基本一致。梁琦兰等人通过正交设计进行了蓝靛果忍冬茎段增殖试验,并通过方差分析得到各因素随着水平变化而产生的变化关系,但却忽略了各因素之间的相互促进或抑制作用的关系^[14],而本试验通过响应面优化法得到了6-BA与IBA之间、IAA与6-BA之间的交互作用关系对增殖系数起到促进影响,这一结果有效弥补了正交设计中的不足。在大多数植物组织培养试验中,正交设计应用得较多。虽然正交设计可以有效减少试验次数,但却无法明确各个因素之间的相互作用关系,不能在整体上更好地体现整个因素的关系水平^[15-17]。而响应面试验法虽比正交设计增加了试验次数,但却具有较高的精准度,在一定程度上弥补了正交设计的不足之处,可确定各个因素之间的相互作用趋势,从而得到优化的目的^[18-19]。

本研究通过响应面试验法优化了早花忍冬组培苗茎段继代增殖的培养条件,最佳的离体培养条件有效地提高了组培苗的增殖系数,缩短了植物的扩繁周期。

参考文献:

- [1] 杜佳朋,张友民,王 豫.忍冬属植物的研究进展[J].北方园艺,2005(4):11-13.
- [2] 薛 欢,肖 杰,苑景淇,等.4种忍冬属植物光响应特性[J].北华大学学报,2019,20(2):168-172.
- [3] 白凤菊.吉林市忍冬科植物资源及园林绿化应用[J].中国林副特产,2014(5):82-83.
- [4] 李金英.长白山忍冬科三属主要果树种质资源研究[D].长春:吉林农业大学,2015.
- [5] 苑景淇,薛 欢,于忠亮,等.5种忍冬属植物种子扫描电镜观察[J].北华大学学报,2018,19(5):595-599.
- [6] 张小娜,童 杰,周衍晶,等.忍冬属药材药效成分及药理作用研究进展[J].中国药理学通报,2014,30(8):1049-1054.
- [7] 冯婷婷,郭九峰,宋天磊,等.药用植物组织培养研究综述[J].安徽农学通报,2019,25(24):23-27.
- [8] 杜梦卿,连 朋,王丽娟.不同浓度TDZ和2,4-D组合对草莓花药组织培养的影响[J].东北农业科学,2021,46(2):73-75,131.

种流动相系统,结果后者所得色谱行为好,且比前者多一个特征峰,所以,选择甲醇-pH 6.5 磷酸盐缓冲液为流动相。

由于蛹虫草中核苷类成分的极性差别较大,考察 0.5、0.7、1.0 mL/min 三种流速,参照文献报道^[8],调整多种不同比例的梯度系统,综合分离效果、主要色谱峰的特征和重现性,最终选择 0.5 mL/min 和“1.4.3”项的梯度比例。

3 结 论

本项研究得到的蛹虫草 HPLC 特征图谱,标定了共有的 8 个特征峰,并指认其中鸟苷峰为参照峰。所建立的测定方法精密性、重现性和稳定性均符合要求,可用于蛹虫草内在质量控制的检测,为蛹虫草进一步“一测多评”提供参考。

参考文献:

[1] 严仲铠,李万林.中国长白山药用植物彩色图志[M].北京:人民卫生出版社,1997:1.

[2] 樊慧婷,林洪升.蛹虫草化学成分及药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(15):2549-2552.

[3] 温慧颖,辛树权.北虫草生长发育条件的初步探究[J].东北农业科学,2016,41(3):99-103.

[4] 苏颖,李竞.人工蛹虫草 HPLC 指纹图谱的建立[J].亚太传统医药,2012,8(3):10-11.

[5] 牛聪聪,王身艳,刘畅,等.HPLC 测定人工蛹虫草中 6 种核苷类成分的含量[J].中国生化药物杂志,2016,36(3):169-175.

[6] 潘兴娇,张杰,沈昱翔,等.HPLC 同时测定云南重楼根茎中 9 种核苷类成分的含量[J].中药材,2016,39(4):813-818.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:115.

[8] 王朋展,相美容,李灿,等.HPLC 法同时测定不同来源半夏及其伪品中 9 种核苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(2):212-218.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第 133 页)

[9] 胡延生,姜继发,建德锋,等.欧李愈伤组织诱导及分化研究[J].吉林农业科学,2015,40(6):98-100.

[10] 袁芳,宋凯杰,杨泽东,等.铁皮石斛茎段类原球茎的诱导及植株再生[J].东北农业科学,2019,44(4):66-71.

[11] 石建国.凌源青龙河流域早花忍冬的有性繁殖及保护利用研究[J].景观农业,2017(11):108.

[12] 武爱龙,何冰,吴建阳,等.响应面法在植物组织培养中的应用进展[J].安徽农学通报,2020,26(17):21-22.

[13] 王欢,姜哲,许士钊,等.早花忍冬离体快繁技术[J].北方园艺,2015(4):95-98.

[14] 梁琦兰,张启昌,杨振国,等.蓝靛果忍冬芽体组织培养技术研究[J].北华大学学报,2006,7(6):549-551.

[15] 武爱龙,何冰,吴建阳,等.响应面法优化珍珠相思不定

芽诱导及增殖培养条件[J].分子植物育种,2020,18(23):7868-7878.

[16] 李闯,张海燕,谭化,等.马铃薯新品种“吉薯 1 号”茎尖脱毒及组培快繁研究[J].东北农业科学,2019,44(6):62-64,73.

[17] 张玉英,韦正乙,王云鹏,等.番茄叶片高频再生体系建立[J].吉林农业科学,2014,39(2):78-82,86.

[18] Guo X,Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from phellinusignarius[J]. Carbohydrate Polymers, 2010,80(2):344-349.

[19] 赵春莉,刘子平,李金英,等.“红双喜”月季组培苗瓶外生根技术研究[J].东北农业科学,2019,44(3):28-32.

(责任编辑:刘洪霞)