

郭芳, 刘海鹏, 李保国, 等. 应用响应面法优化红树莓组培苗增殖培养条件[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 56–59.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.014

应用响应面法优化红树莓组培苗增殖培养条件

郭芳¹, 刘海鹏¹, 李保国¹, 张雪梅¹, 齐国辉¹, 李迎超², 张玲³, 许洋²

(1. 河北农业大学林学院/河北省林木种质资源与森林保护重点实验室, 河北保定 071000; 2. 中国林业科学研究院林业研究所/国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 河北至高点农业科技有限公司, 河北邢台 054400)

摘要:在单因素试验基础上, 根据 Box – Behnken 中心组合 (BBD) 试验原理, 选取 6 – BA 浓度、光照度、增殖周期为试验因素, 以增殖系数为响应值, 采取 3 因素 3 水平响应面法进行回归模型分析, 以优化红树莓组培苗增殖的培养条件。结果表明, 以无透气孔的塑料盖为封口材料, 红树莓组培苗增殖的最佳培养条件为 6 – BA 1.59 mg/L、光照度 1 391 lx、增殖周期 42 d, 在此条件下红树莓组培苗的增殖系数预测值为 10.950, 验证得到的实际值为 11.019。

关键词:响应面法; 培养条件; 红树莓; 增殖系数; 光照度; 增殖周期

中图分类号: S663.204⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0056-04

红树莓 (*Rubus idaeus* L.) 为蔷薇科悬钩子属多年生落叶灌木, 别称覆盆子、马林、托盘等, 果实为聚合果, 富含果糖、维生素、氨基酸等, 风味香醇, 酸甜可口, 在世界上被誉为“黄金水果”, 具有防癌、抗氧化、解热镇痛、抗凝血等保健药功能, 现广泛应用于化妆、医药、食品、保健等领域, 成为最具潜力的第 3 代新兴保健水果^[1-2]。发展红树莓, 大量的优质苗木是关键。目前, 红树莓苗木生产主要依靠根孽繁殖, 不仅繁殖系数低、速度慢, 而且连续根孽繁殖会造成品种退化, 易通过苗木传播土壤病虫害。利用组织培养技术进行红树莓脱毒快繁是快速繁育优良苗木的最佳途径, 我国已在猕猴桃、枣树、草莓等树种上建立了相关的繁育体系^[3-5]。对于红树莓, 前人的研究大多集中在最佳培养基筛选^[6-10], 而对其培养条件的优化研究尚无报道。

6 – BA 为人工合成的细胞分裂素类化合物, 能够显著促进细胞分裂、调控营养物质运输、促进植物新陈代谢等^[11]。光强直接影响植物的生长发育和结构特征, 而封口材料则会

影响培养瓶内的通气性, 进而影响容器内湿度及气体与外界的交换。响应面分析法作为一种优化工艺条件的有效方法, 可以精确表述因素和响应值之间的关系, 现已被广泛用于多因素影响的试验优化上。本研究在 6 – BA、光照度、封口方式及增殖周期等单因素对红树莓组培苗增殖影响试验的基础上, 将响应面法应用于红树莓组培苗增殖培养条件的优化, 以确立红树莓组织培养育苗技术体系, 为红树莓组织培养工厂化育苗提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为“海尔特兹”红树莓继代组培苗 1 cm 左右的带芽茎段。MS 基本培养基, 其蔗糖含量为 30 g/L, 琼脂为 5 g/L, 高压灭菌前 pH 值为 5.8。

1.2 试验设计

1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 6 – BA 浓度对红树莓组培苗增殖的影响 光照度 2 000 lx、增殖周期 30 d、封口方式选择无透气孔的塑料盖, 设定 6 – BA 处理浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L。

1.2.1.2 光照度对红树莓组培苗增殖的影响 6 – BA 1.0 mg/L、增殖周期 30 d、封口方式选择无透气孔的塑料盖, 设定光照处理强度分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500 lx。

1.2.1.3 增殖周期对红树莓组培苗增殖的影响 6 – BA 1.0 mg/L、光照度 2 000 lx、封口方式选择无透气孔的塑料盖,

liver microsomes [J]. Analytical Biochemistry, 1983, 135 (2): 453–455.

[11] Rabilloud T, Blisnick T, Heller M, et al. Analysis of membrane proteins by two – dimensional electrophoresis; comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum* – infected erythrocyte ghosts [J]. Electrophoresis, 1999, 20 (18): 3603–3610.

[12] Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? [J]. Electrophoresis, 2000, 21 (6): 1054–1070.

收稿日期: 2016 – 04 – 17

基金项目: 河北省科技支撑计划 (编号: 16226806D); 国家现代农业科技成果惠民示范工程 (编号: Z141100002314009)。

作者简介: 郭芳 (1990—), 女, 河北卢龙人, 硕士研究生, 从事经济林栽培生理研究。E – mail: guofang901003@163.com。

通信作者: 李保国, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事经济林栽培生理和山区开发技术研究及经济林栽培教学工作。E – mail: 13582620586@163.com。

701–704.

[8] Yan J X, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix – assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization – mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2000, 21 (17): 3666–3672.

[9] O' Farrell P H. High resolution two – dimensional electrophoresis of proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250: 4007–4021.

[10] Perdue G H, Schaap H W, Selivonchick D P. The use of a zwitterionic detergent in two – dimensional gel electrophoresis of trout

设定增殖处理周期分别为 30、40、50、60 d。

1.2.1.4 封口方式对红树莓组培苗增殖的影响 6-BA 1.0 mg/L、光照度 2 000 lx、增殖周期 30 d, 设定封口处理方式分别为无透气孔的塑料盖、普通封口膜。

1.2.2 红树莓组培苗增殖培养条件的优化 采用响应面分析法, 根据中心组合试验 (BBD) 设计原理, 确定 6-BA、光照度、增殖周期 3 个因素作为中心组合试验因子 (表 1), 增殖系数为响应值, 进行响应面试验设计 (表 2)。

表 1 中心组合试验因子和水平编码

水平	X_1 : 6-BA (mg/L)	X_2 : 光照度 (lx)	X_3 : 增殖周期 (d)
-1	1.0	1 000	30
0	1.5	1 500	40
1	2.0	2 000	50

表 2 中心组合试验设计及试验结果

试验序号	各因子编码			Y : 增殖系数
	X_1 : 6-BA	X_2 : 光照度	X_3 : 增殖周期	
1	0	-1	1	8.076
2	0	0	0	10.733
3	0	0	0	10.524
4	-1	0	-1	6.476
5	-1	0	1	8.124
6	1	1	0	7.600
7	1	0	-1	6.971
8	-1	1	0	6.410
9	0	0	0	10.724
10	-1	-1	0	8.943
11	0	0	0	10.924
12	0	-1	-1	7.010
13	1	-1	0	9.210
14	0	0	0	10.771
15	0	1	1	7.286
16	0	1	-1	4.990
17	1	0	1	9.076

表 3 不同单因素试验对红树莓组培苗增殖的影响

6-BA		光照度		增殖周期		封口方式	
浓度 (mg/L)	增殖系数	强度 (lx)	增殖系数	周期 (d)	增殖系数	封口方式	增殖系数
0.0	0.971 ± 0.050d	500	1.905 ± 0.147d	30	4.038 ± 0.108c	无透气孔塑料盖	4.038 ± 0.108a
0.5	1.686 ± 0.103c	1 000	4.705 ± 0.184b	40	6.962 ± 0.044a	普通封口膜	2.229 ± 0.151b
1.0	4.038 ± 0.108b	1 500	6.419 ± 0.157a	50	6.105 ± 0.087b		
1.5	5.267 ± 0.157a	2 000	4.038 ± 0.108c	60	4.133 ± 0.129c		
2.0	4.143 ± 0.351b	2 500	3.752 ± 0.231c				

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.4 封口方式对红树莓组培苗增殖的影响 由表 3 可知, 以无透气孔塑料盖为封口材料的红树莓组培苗, 其增殖系数显著优于普通封口膜 ($P < 0.05$), 且以普通封口膜为封口材料的红树莓组培苗明显发黄, 甚至发生死亡, 这一方面可能是由于普通封口膜完全将培养瓶密封, 而塑料盖与培养瓶之间为螺旋状连接, 增加了容器的透气性, 培养过程中 CO_2 得到补充, 从而提高了组培苗的光合自养能力, 进而影响其增殖, 另一方面可能是光透过普通封口膜后被吸收或反射了利于红

1.3 试验方法

试验于 2015 年 8—10 月在河北省南和县河北至高点农业科技有限公司组培中心进行, 选用容积为 240 mL 的培养瓶, 每瓶接入 7 个红树莓茎段, 均匀分布; 各试验随机区组设计, 每处理 20 瓶, 重复 5 次; 培养室内培养 30 d, 调查其增殖系数, 培养条件为温度 (25 ± 2) $^{\circ}C$, 湿度 (50 ± 5) %, 光周期 14 h/d。

1.4 数据处理

采用 LSD 法及 Design-Expert 8.0.5 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 6-BA 浓度对红树莓组培苗增殖的影响 由表 3 可知, 随培养基中 6-BA 浓度的升高, 红树莓组培苗的增殖系数逐渐增加, 6-BA 浓度达到 1.5 mg/L 时增殖系数达到最大, 为 5.267; 当 6-BA 浓度增加到 2.0 mg/L 时, 红树莓组培苗的增殖系数反而减小, 说明 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时红树莓组培苗的增殖生长受到抑制。因此, 红树莓组培苗增殖的最适 6-BA 浓度为 1.5 mg/L。

2.1.2 光照度对红树莓组培苗增殖的影响 由表 3 可知, 随光照度的增加, 红树莓组培苗的增殖系数逐渐增加, 光照度达到 1 500 lx 时, 增殖系数达到最大, 为 6.419; 当光照度增加到 2 000 lx 时, 红树莓组培苗的增殖系数反而减小, 说明当光照度超过 2 000 lx 时, 红树莓组培苗的增殖生长受到抑制。因此, 红树莓组培苗增殖的最适光照度为 1 500 lx。

2.1.3 增殖周期对红树莓组培苗增殖的影响 由表 3 可知, 随增殖周期由 30 d 延长到 40 d, 红树莓组培苗的增殖系数逐渐增加, 增殖系数达到 6.962, 且达到显著差异水平 ($P < 0.05$); 当增殖周期继续延长, 红树莓组培苗的增殖系数反而减小, 说明当增殖周期超过 40 d 时, 培养基中的营养物质消耗殆尽, 组培苗停止生长, 甚至发生死亡, 导致增殖系数降低。因此, 红树莓组培苗的最适增殖周期为 40 d。

树莓组培苗进行光合作用的光谱, 使其净光合速率降低。因此, 增殖的最适封口方式为无透气孔的塑料盖。

2.2 红树莓组培苗增殖培养条件的优化

2.2.1 试验结果回归分析 根据表 2 试验结果, 以 6-BA (X_1)、光照度 (X_2)、增殖周期 (X_3) 为自因素, 以增殖系数 (Y) 为响应值, 得回归方程模型为 $Y = -42.60786 + 9.66619X_1 + 0.015516X_2 + 1.67183X_3 + 0.0009X_1X_2 + 0.022857X_1X_3 + 0.00006X_2X_3 - 3.74667X_1^2 - 0.000007X_2^2 - 0.021367X_3^2$ ($R^2 =$

0.994 0),该回归拟合模型经方差检验达到极显著水平(表 4),响应值的变化有 99.40% 来源于所选自变量;该模型决定系数 $R^2=0.994\ 0$ 与决定系数 $R^2_{Adj}=0.986\ 3$ 相近,表明该方程与数据拟合度良好,试验误差小,可用于对红树莓组培苗增殖情况的分析预测。由表 4 可见,6-BA 浓度、光照度、增殖周期的一次项、二次项变化对红树莓组培苗的增殖有极显著影响,光照度和增殖周期交互项对红树莓组培苗增殖有显著影响,而 6-BA 和光照度、6-BA 和增殖周期交互项对红树莓组培苗增殖的影响不显著,各试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;失拟项检验 $P=0.109\ 3>0.05$,说明试验无其他显著因素的影响,可信度比较高^[12]。

表 4 红树莓组培苗增殖回归模型方差分析

方差源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	53.690	9	5.970	129.29	<0.000 1	**
X_1	1.050	1	1.050	22.86	0.002 0	**
X_2	6.040	1	6.040	130.94	<0.000 1	**
X_3	6.330	1	6.330	137.11	<0.000 1	**
X_1X_2	0.210	1	0.210	4.62	0.068 6	
X_1X_3	0.052	1	0.052	1.13	0.322 6	
X_2X_3	0.380	1	0.380	8.18	0.024 3	*
X_1X_1	3.690	1	3.690	80.06	<0.000 1	**
X_2X_2	13.010	1	13.010	282.05	<0.000 1	**
X_3X_3	19.220	1	19.220	416.59	<0.000 1	**
残差	0.320	7	0.046			
失拟	0.240	3	0.080	3.94	0.109 3	
误差	0.082	4	0.020			
总和	54.020	16				

注: *、** 表示该方差源经检验分别达到显著 ($P<0.05$)、极显著水平 ($P<0.01$)。

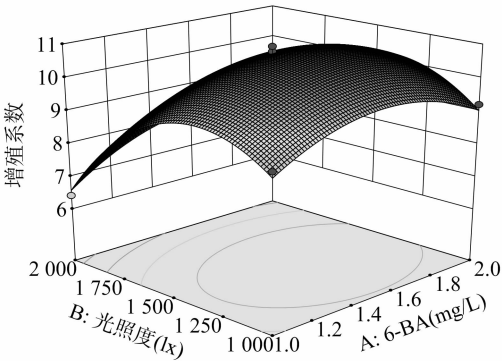


图1 6-BA 浓度和光照度对红树莓组培苗增殖影响的响应面图和等高线

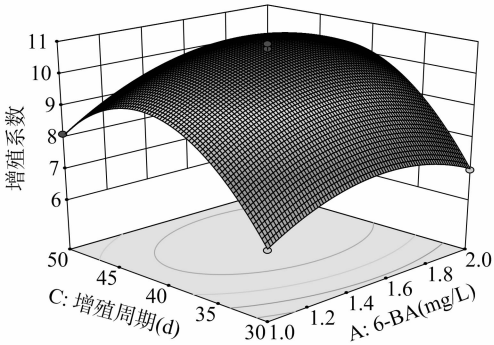
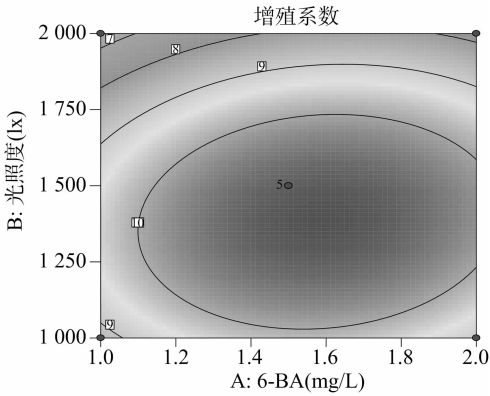


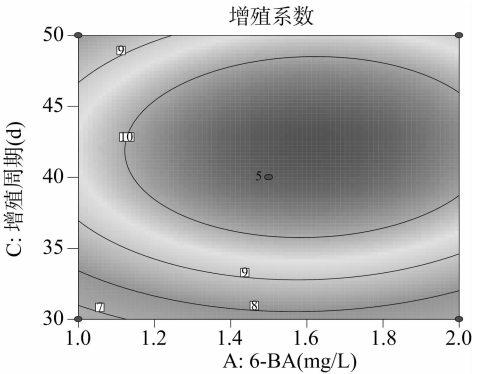
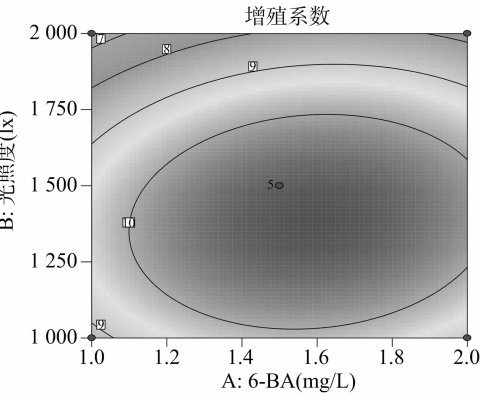
图2 6-BA 浓度和增殖周期对红树莓组培苗增殖影响的响应面图和等高线

2.2.2 响应面分析 通过多元回归方程所作响应面曲线图及等高线图可以直观地反映 6-BA 浓度、光照度和增殖周期对红树莓组培苗增殖的影响。由图 1、图 2、图 3 可见,增殖周期对红树莓组培苗增殖的影响最为明显,曲线面最陡;其次是光照度,曲线面较陡;影响作用最小的是 6-BA 浓度,曲线面趋于平缓;各因素所选范围内均存在极值点;光照度和增殖周期的交互作用显著,6-BA 和光照度、6-BA 和增殖周期的交互作用不显著。

2.2.3 模型方程的验证 通过 Design-Expert 8.0.5 软件求出回归模型的极值点,得到以无透气孔塑料盖为封口材料时红树莓组培苗增殖培养的最优条件为 6-BA 1.59 mg/L、光照度 1 390.81 lx、增殖周期 41.97 d,此条件下增殖系数理论值为 10.950。验证试验培养条件调整为 6-BA 1.59 mg/L、光照度 1 391 lx、增殖周期 42 d,重复 3 次,得到增殖系数真实平均值为 11.019,与理论预测值非常相近,这说明该模型可信,响应面法可用于红树莓组培苗增殖培养条件的优化。

3 结论与讨论

单因素试验结果表明,红树莓组培苗增殖培养的最适 6-BA 浓度为 1.5 mg/L、光照度为 1 500 lx、增殖周期为 40 d,以无透气孔塑料盖对容器进行封口。在此基础上,设计 BBD 中心组合试验进行响应面分析,得到红树莓组培苗增殖的最佳综合培养条件为 6-BA 1.59 mg/L、光照度 1 391 lx、增殖周期 42 d,此时红树莓组培苗的增殖系数理论值为 10.950,实际验证增殖系数为 11.019,两者高度接近,说明响应面法用于红树莓组培苗增殖培养条件的优化是可靠的。



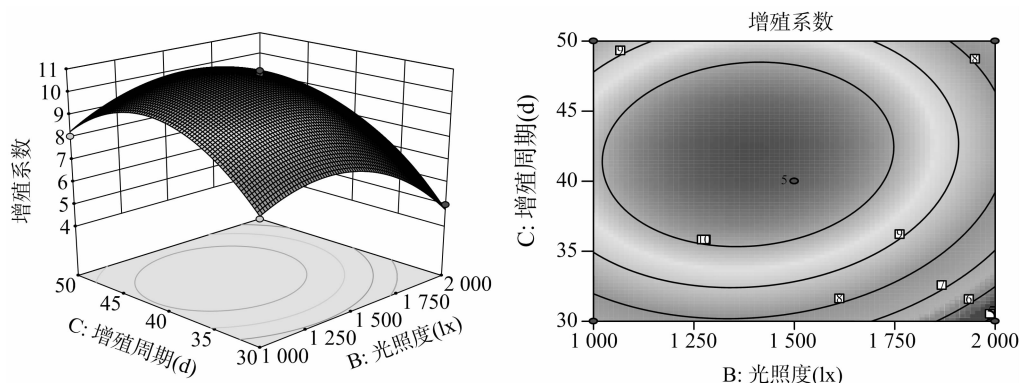


图3 光照度和增殖周期对红树莓组培苗增殖影响的响应面图和等高线

6-BA 是一种细胞分裂素,其主要作用是促进细胞分裂,但浓度过高则会抑制芽的发生。本研究中,当 6-BA 浓度大于 1.5 mg/L 时,红树莓组培苗的增殖开始受到抑制,而其影响红树莓生长的机理有待进一步研究。封口方式对组培苗的增殖会产生影响,封口方式不同使容器内外的气体交换产生差异,从而对培养容器中气体组成^[13]、芽伸长、温度、湿度及增殖等产生影响^[14-15]。Tsuru 等试验表明,透气状况的改善可提高增殖培养的效率^[16-17]。本试验中选择无透气孔的塑料盖进行封口,对红树莓组培苗的增殖效果要显著好于普通封口膜,除由于透气不同外,也可能是光透过普通封口膜后,被吸收或反射了有利于红树莓组培苗进行光合作用的光谱,使其净光合速率降低,从而导致增殖率降低,具体原因也有待进一步研究。

对于培养条件的优化,主要方法有单因素试验、正交试验法、响应面法等。单因素试验常用于确定某一因素的使用范围,方法简单、容易,结果明了,但忽略组分间的交互作用,可能会完全丢失最适宜的条件;正交试验法虽研究多因素、多水平的组合,但只能对一个个孤立的试验点进行分析,并不能在给出的整个区域上找到因素和响应值之间一个明确的函数表达式;响应面法采用多元二次回归模型拟合各因素与响应值之间的关系,试验数少、周期短、回归方程精度高,并能克服正交试验只能处理离散水平值,而无法找出最佳组合和响应值的缺陷^[18]。近几年,响应面法在食品学、生态学等领域得到广泛应用^[19-22]。本试验选取 6-BA 浓度、光照度、增殖周期 3 个因素,利用响应面分析法优化红树莓组培苗的增殖培养条件并获得成功,为红树莓组织培养的工厂化育苗提供了一定的理论支撑。

参考文献:

- [1] 贺立恒. 美国红树莓和黑莓脱毒快繁及工厂化育苗研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [2] 尹相博,于咏梅,于立芝. 红树莓组织培养研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2013(2):140-143.
- [3] 刘 峰,张太奎,张汉尧. 猕猴桃组织培养研究现状与展望[J]. 福建林业科技,2013,40(4):231-235.
- [4] 金 琪. 枣树再生体系的建立及离体加倍的初步研究[D]. 北京:北京林业大学,2014.
- [5] 刘 刃. “红颊”草莓组培标准化与生物反应器扩繁及穴盘壮苗技术研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2013.
- [6] 杨 帆,张万博,朗贤波,等. 植物生长调节剂对树莓组培苗增殖生长的影响[J]. 延边农业大学学报,2014,36(1):13-15.
- [7] 王海新,赵 艳,尤淑丽,等. 植物生长调节剂“易丰收”对树莓组培苗生根的影响[J]. 北方园艺,2013(4):31-33.
- [8] 李 钱,田明芳. 树莓组培快繁技术研究[J]. 北方果树,2013(5):11-12.
- [9] 陈 琦,陈 瑜,黄庆文,等. 树莓茎尖组织培养体系的优化研究[J]. 西北植物学报,2007,27(9):1892-1898.
- [10] 郭玉霞,董彦琪,刘喜存,等. 红树莓组培快繁技术研究[J]. 河南农业科学,2011,40(4):127-128.
- [11] 宋晓燕,郁松林,何 娟,等. GA₃ 和 6-BA 混合处理对葡萄果穗致畸的发育解剖学研究[J]. 西北植物学报,2009,29(12):2492-2501.
- [12] 陈君琛,赖谱富,周学划,等. 响应面法优化大球盖菇粗多糖提取工艺[J]. 食品科学,2012,33(2):139-142.
- [13] Lentini Z, Mussell H, Mutschler M A, et al. Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development in vitro of rapid-cycling *Brassica campestris* L. [J]. Plant Science, 1988, 54(1):75-81.
- [14] Monette P L. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1986, 6(1):73-82.
- [15] Mackay W A, Kitto S L. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French tarragon [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1988, 113(2):282-287.
- [16] Tsuru M, Koda M, Inoue M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera* using “theopen culture system” [J]. Scientia Horticulturae, 2000, 86(1):81-88.
- [17] 申 萍,王 政,何松林. 不同封口方式对牡丹试管苗生长的影响[J]. 河南农业科学,2014,43(2):100-104.
- [18] 赵 强,余四九,王廷璞,等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报,2012,21(4):206-214.
- [19] 刘倩倩. 响应面优化鲜甘薯生料浓液发酵乙醇工艺[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):302-304.
- [20] 杨 洋,胡永红,杨文革,等. 多抗菌素发酵培养基响应面优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):154-158.
- [21] 李春慧,蒲万霞,吴 润,等. 响应面法对啤酒酵母菌剂培养条件的优化[J]. 中国兽医科学,2014,44(10):1095-1100.
- [22] 吴祥庭,朱 涛,郑巧敏,等. 响应面法优化山药皮中皂苷提取的研究[J]. 中国粮油学报,2011,26(6):91-96.