

赵春莉,姚思扬,王 嫚,等. 应用响应面法优化软枣猕猴桃的一步成苗培养基[J]. 江苏农业科学,2019,47(19):61–64.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.19.014

# 应用响应面法优化软枣猕猴桃的一步成苗培养基

赵春莉,姚思扬,王 嫚,王一飞,吴 双,汤 昊,胡钊源

(吉林农业大学园艺学院,吉林长春 130118)

**摘要:**以软枣猕猴桃带芽茎段为外植体,利用响应面法对其组培一步成苗试验进行优化。在单因素的试验基础上,根据 Box – Behnken 的中心组合试验设计原理,以 6 – BA、NAA、IBA 的浓度为试验因子,植株再生频率为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计。结果表明:3 因素对植株再生频率的影响力大小为 6 – BA 的浓度 > IBA 的浓度 > NAA 的浓度,最终得到的二元回归方程显示,一步成苗的培养基优化结果为 MS + 6 – BA 2.42 mg/L + NAA 0.27 mg/L + IBA 0.32 mg/L。在此条件下,最佳再生频率预测值为 4.23,实际操作结果为 4.13。

**关键词:**响应面;一步成苗;再生频率;软枣猕猴桃;单因素试验;回归分析;再生频率

**中图分类号:** S663.404<sup>+</sup>.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)19–0061–04

软枣猕猴桃 (*Actinidia arguta*) 是猕猴桃科猕猴桃属植物,分布广阔,产量高,果实甜度高,富含维生素 C、蛋白、氨基酸、果胶等成分,其中维生素 C 含量高达 430.8 mg/100 g,是苹果、梨的 80~100 倍,柑橘的 5~10 倍<sup>[1]</sup>,有极高的营养价值,还可加工成果脯、果汁、罐头果酱、酒类等产品<sup>[2]</sup>。其根、茎、叶均可入药,可治疗消化不良、腹泻、呕吐和风湿性关节炎,有抗衰老防癌的功效<sup>[3]</sup>。猕猴桃适应能力强,种植范围较广,根系发达,可有效保持水土,提高土壤肥力,有良好的生态价值<sup>[4]</sup>。在园林景观应用上,它是一种很好的缠绕木,可作庭院景观观赏,可应用在花架花棚的设计中<sup>[5]</sup>。软枣猕猴桃应用广泛,具有良好的食用、药用、生态、景观价值,具有广阔的经济市场。

软枣猕猴桃传统的繁殖方式为播种繁殖和扦插繁殖<sup>[6–8]</sup>,但种子繁殖易性状分离,生长缓慢。扦插生根率不高,过度采集枝条有损母株<sup>[9]</sup>。组织培养可以保留植株优良性状,可快速大量地繁殖出苗。目前,已有相关软枣猕猴桃组织培养的报道<sup>[9–12]</sup>。传统的组织培养试验是在每个阶段筛选出合适的培养基和培养环境,转接过程可能会造成污染,工作量较大,周期长。一步成苗指在一个培养基内完成诱导、增

殖、生根阶段,可节省成本,节省时间。目前,一步成苗技术还不够成熟,软枣猕猴桃的一步成苗研究未见报道。响应面分析法普遍应用于优化试验中,可精确地反映各因素间的关系,预测出最佳优化条件。本试验以软枣猕猴桃带芽茎段为外植体,研究单因素 6 – BA、IBA、NAA 浓度对其一步成苗的影响,用响应面法优化软枣猕猴桃一步成苗培养基,以期今后相关研究提供理论实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为长白山野生软枣猕猴桃带芽茎段,于 2017 年 5 月采自吉林长白山地区,后用低温保温箱将外植体带回吉林农业大学园艺学院实验室进行研究。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体的灭菌处理** 将外植体用洗洁精洗净灰尘,再用流水冲洗 1 h。放在超净工作台的滤纸上吸干水分,放入灭菌后的烧杯中。加 75% 乙醇消毒 30 s,用蒸馏水清洗 4 次,加 0.1% 三氯甲烷消毒 6 min,用蒸馏水冲洗 5 次。消毒期间不断振荡,使试剂与材料充分接触。

**1.2.2 单因素试验** 为探究每种生长激素的不同浓度对外植体产生的影响,以 MS 为基本培养基,将 6 – BA、IBA、NAA 分别设置 5 种浓度:6 – BA (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L); NAA (0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/L); IBA (0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/L)。将外植体分别接种到培养基内,每个处理接 15 个茎段,培养周期为 50 d。

**1.2.3 软枣猕猴桃一步成苗培养基的优化** 在单因素试验

法研究[J]. 成都中医药大学学报,2017,40(3):49–52.

[18] 田小霞,毛培春,张 琳,等. 苜蓿属植物苗期耐盐指标筛选及耐盐性综合评价[J]. 植物资源与环境学报,2018,27(2):46–56.

[19] 王庆惠,韩 伟,侯银莹,等. 不同耐盐品种棉花根系主要指标对盐胁迫的响应[J]. 应用生态学报,2018,29(3):865–873.

[20] 刘 翔. EMS 诱变技术在植物育种中的研究进展[J]. 激光生物学报,2014,23(3):197–201.

收稿日期:2018–07–12

基金项目:吉林省重点科技攻关项目(编号:20140204030NY、20140101271JC);大学生创新创业训练计划(编号:2017496)。

作者简介:赵春莉(1973—),女,山东寿光人,博士,副教授,主要从事观赏植物资源引种驯化及繁殖技术研究。E-mail: zcl8368@163.com。

39(6):655–664.

[15] 刘 威,杨 峰,任旭东,等. EMS 对种子萌发影响的进展[J]. 分子植物育种,2017,15(11):4585–4589.

[16] Bidabadi, Meon S S, Wahab S, et al. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). [J]. Australian Journal of Crop Science, 2012, 6(3):567–575.

[17] 张大燕,文 欢,王 伟,等. 甲基磺酸乙酯化学诱变川芎的方

的基础上,用响应面分析法,根据 Box – Behnken 的中心组合试验设计原理,以 6 – BA、NAA、IBA 浓度为试验因子,植株再生频率为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计,结果见表 1,每个水平处理 10 个茎段,培养周期为 50 d。

表 1 响应面试验因素水平

水平编码	$X_1$ :6 – BA 浓度 (mg/L)	$X_2$ :NAA 浓度 (mg/L)	$X_3$ :IBA 浓度 (mg/L)
–1	1.0	0.1	0.1
0	2.0	0.3	0.3
1	3.0	0.5	0.5

1.2.4 培养条件 基础培养基为 MS 培养基,加入蔗糖 30 g/L,琼脂粉 8 g/L,pH 值 5.8 ~ 6.0。培养环境为:温度 (25 ± 2) ℃,光照度 2 000 lx,每天光照 14 h。

1.2.5 数据分析 采用 Design – Expert 8.0.6 软件对数据进行分析。

诱导率 = 出不定芽的外植体/接种的外植体数 × 100%; 植株再生频率 = 再生植株总数/接种的外植体数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同 6 – BA 浓度对外植体的影响 6 – BA 是一种常用的细胞分裂素,对细胞生长分化有良好的促进作用。外植体接种 15 d 左右,有嫩绿色芽点产生,逐渐长大成为不定芽,30 d 后部分不定芽会增殖出多个不定芽,当 6 – BA 浓度为 1.0、2.0、3.0 mg/L 时,诱导率和增殖效果较好。当 6 – BA 浓度为 4.0 mg/L 时,诱导率和再生频率都有所下降,可见浓度过高的 6 – BA 对外植体生长分化有抑制作用。50 d 后,有部分不定芽长出须根,6 – BA 浓度为 2.0 mg/L 时,生根率较好,植株再生频率最高。

表 2 不同 6 – BA 浓度对外植体的影响

处理	6 – BA 浓度 (mg/L)	诱导数 (个)	不定芽数 (个)	诱导率 (%)	再生频率
A1	1.0	9	16	60.00	1.07
A2	2.0	13	24	86.67	1.60
A3	3.0	11	22	73.33	1.47
A4	4.0	9	13	60.00	0.87
A5	5.0	7	9	46.67	0.60

2.1.2 不同 NAA 浓度对外植体的影响 由表 3 可知,低浓度的 NAA 对诱导与增殖的效果都很差,在 NAA 浓度大于 0.10 mg/L 时,诱导速度慢,25 d 后才有不定芽形成,形成的不定芽少。在 NAA 浓度为 0.20、0.40 mg/L 时,20 d 后即可诱导出不定芽,且 30 d 后增殖的不定芽较多;NAA 浓度为 0.80 mg/L 时,对不定芽生长有抑制作用。50 d 后,部分不定芽有根系生成,其中处理 B3、B4 的生根效果较好。最终筛选出最适宜外植体诱导分化的 NAA 最佳浓度为 0.20 mg/L,最佳诱导率为 60.00%,植株再生频率为 1.13。可见,单独使用生长素 NAA 对植株再生效果不佳。

2.1.3 不同 IBA 浓度对外植体的影响 由表 4 可见,IBA 浓度为 0.05 mg/L 时,诱导和增殖效果差。IBA 浓度在 0.10 mg/L 以上时,20 d 后有不定芽形成,诱导率较高,不定芽较多。随着 IBA 浓度升高,诱导率和再生频率都升高,30 d

后增殖效果较明显,50 d 后,不定芽形成根且根系健壮。IBA 浓度在 0.80 mg/L 时,再生苗的再生频率有所下降。可见,IBA 诱导外植体分化的最佳浓度为 0.40 mg/L,再生频率为 1.27。

表 3 不同 NAA 浓度对外植体的影响

处理	NAA 浓度 (mg/L)	诱导数 (个)	不定芽数 (个)	诱导率 (%)	再生频率
B1	0.05	4	6	26.67	0.40
B2	0.10	8	10	53.33	0.67
B3	0.20	9	17	60.00	1.13
B4	0.40	9	16	60.00	1.07
B5	0.80	7	11	46.67	0.73

表 4 不同 IBA 浓度对外植体的影响

处理	IBA 浓度 (mg/L)	诱导数 (个)	不定芽数 (个)	诱导率 (%)	再生频率
C1	0.05	5	8	33.33	0.53
C2	0.10	7	16	46.67	1.06
C3	0.20	9	17	60.00	1.13
C4	0.40	10	19	66.67	1.27
C5	0.80	8	17	53.33	1.13

2.2 软枣猕猴桃一步成苗培养基的优化试验结果

2.2.1 回归方程分析 以 6 – BA 浓度 ( $X_1$ )、NAA 浓度 ( $X_2$ )、IBA 浓度 ( $X_3$ ) 为自因素,以植株再生频率 ( $Y$ ) 为响应值,根据试验结果(表 5)得到回归方程为:

$Y = 4.10 + 0.44X_1 - 0.25X_2 + 0.29X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.15X_1X_3 + 0.42X_2X_3 - 0.53X_1^2 - 0.80X_2^2 - 0.87X_3^2$ ,  $R^2 = 0.9640$ 。该回归模型的  $P$  值 = 0.000 3 < 0.01,有极显著性;失拟项  $F$  值 = 0.177 6 > 0.05,无显著性。说明该方程模型拟合度较好,试验误差较小。表 6 显示, $X_1$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  回归系数极显著 ( $P < 0.01$ ), $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_2X_3$  回归系数显著 ( $P < 0.05$ )。说明因素 6 – BA 浓度对植物再生频率有极显著影响,IBA 浓度与 NAA 浓度对其有显著影响,且 NAA 浓度与 IBA 浓度的交互作用对植株再生频率有显著性影响。6 – BA 浓度与 NAA 浓度、IBA 浓度的交互作用对结果影响不显著。

表 5 响应面试验设计与结果

处理	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y$
1	1	–1	0	3.5
2	0	0	0	4.0
3	0	–1	–1	2.8
4	0	1	–1	1.6
5	0	–1	1	2.4
6	–1	0	1	2.6
7	0	0	0	3.9
8	–1	1	0	2.3
9	–1	–1	0	2.7
10	0	1	1	2.9
11	0	0	0	4.3
12	1	0	–1	3.1
13	1	1	0	2.6
14	1	0	1	3.5
15	0	0	0	4.3
16	0	0	0	4.0
17	–1	0	–1	1.6

表 6 响应面二次回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	11.43	9	1.27	20.80	0.000 3	**
$X_1$	1.53	1	1.53	25.07	0.001 6	**
$X_2$	0.50	1	0.50	8.19	0.024 3	*
$X_3$	0.66	1	0.66	10.83	0.013 3	*
$X_1X_2$	0.06	1	0.06	1.02	0.345 4	
$X_1X_3$	0.09	1	0.04	1.47	0.264 1	
$X_2X_3$	0.72	1	0.72	11.83	0.010 8	*
$X_1^2$	1.16	1	1.16	19.00	0.003 3	**
$X_2^2$	2.69	1	2.69	44.12	0.000 3	**
$X_3^2$	3.22	1	3.22	52.79	0.000 2	**
残差	0.43	7	0.06			
失拟项	0.29	3	0.10	2.74	0.177 6	
纯误差	0.14	4	0.04			
总误差	11.86	16				

注：\*、\*\* 分别代表影响显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。

2.2.2 响应面分析 通过 Design - Expert 8.0.6 软件绘制因素间交互作用的等高线图 and 响应面图,结果见图 1 至图 3,通过等高线、响应面形状来分析因素之间的交互作用以及对再生频率的影响。其中,6-BA 浓度对植株再生频率的影响最大,其次是 IBA 浓度,对植株再生频率影响最小的是 NAA 浓度。由此可以看出,存在最高点,所以最佳再生频率出现在所

选因素水平的范围之内。6-BA 浓度与 NAA 浓度、IBA 浓度的响应面坡度较为平缓,对再生频率的影响不显著。NAA 浓度与 IBA 浓度的响应面最高点位于中间,边缘形状较陡,呈明显凸字形,故 NAA 浓度与 IBA 浓度的交互作用对再生频率有极显著影响。

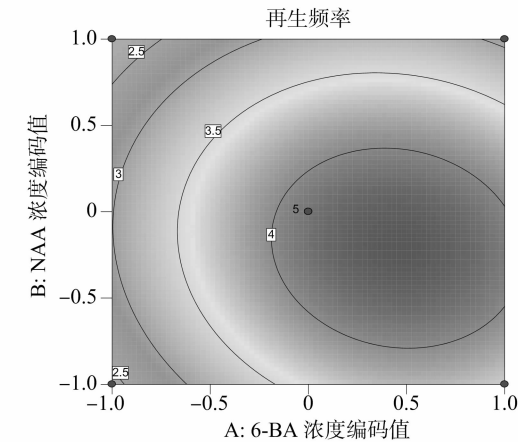


图1 6-BA 浓度与 NAA 浓度对再生频率的影响

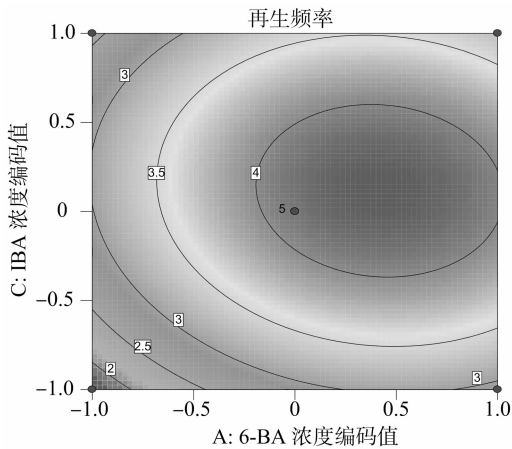
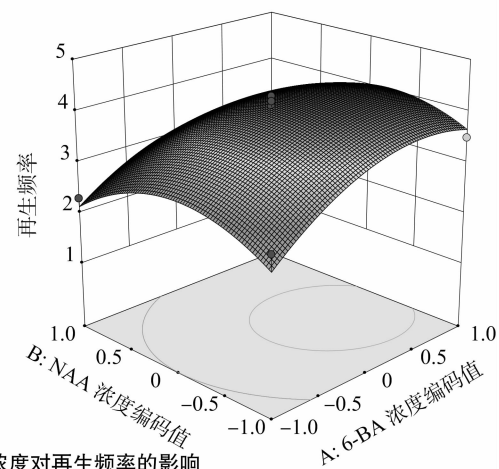
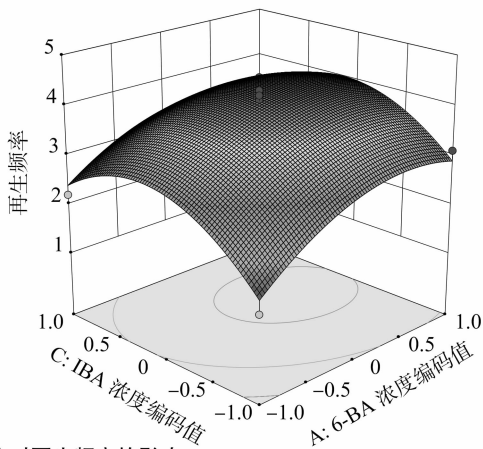


图2 6-BA 浓度与 IBA 浓度对再生频率的影响



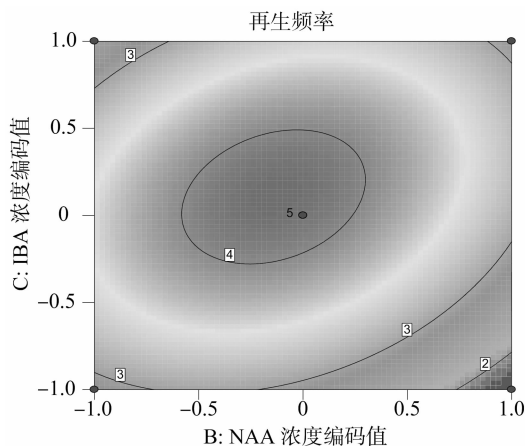
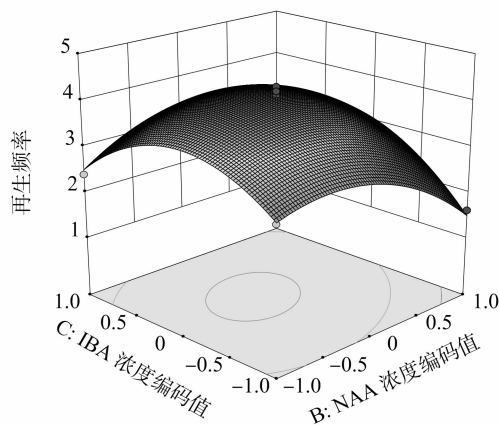


图3 NAA 浓度与 IBA 浓度对再生频率的影响



2.2.3 模拟方程的验证试验 通过二次回归方程的分析可得出软枣猕猴桃一步成苗的最优条件为:6-BA 浓度 2.42 mg/L, NAA 浓度 0.27 mg/L, IBA 浓度 0.32 mg/L, 最佳再生频率预测值为 4.23。对该模型进行 3 次验证试验, 每次处理 10 个茎段, 得出的 3 次结果为 4.3、3.9、4.2, 平均结果为 4.13, 与预测值十分接近, 说明方程与真实试验拟合度较好, 该优化方案有实际意义和可行性。

### 3 讨论与结论

关于软枣猕猴桃的组培研究, 通常要经过诱导、增殖、生根的阶段, 要统计诱导率、增殖率、生根率, 每个阶段都须要筛选出最佳培养基, 一般每个阶段需要 20~30 d<sup>[13]</sup>, 成苗至少需要 80 d。一步成苗所有阶段在 1 个培养基内进行, 并能产生完整植株, 大大节省了成本、时间、人力, 是一种新型的组培方法。试验选择了 6-BA、IBA、NAA 3 种植物激素, 其中细胞分裂素 6-BA 对外植体的诱导、分化、增殖有很好的促进作用, 生长素 IBA、NAA 对植物生长、生根都有很好的效果。单因素试验中 6-BA 对不定芽诱导的效果要好于 IBA 和 NAA, 有研究<sup>[14]</sup>筛选出最适合软枣猕猴桃诱导的 6-BA 浓度是 1.5 mg/L, 诱导率最高 85.91%。本试验发现 2.0 mg/L 6-BA 诱导效果更好, 可达 86.67%。

一步成苗最重要的参数是植株再生频率, 统计的是再生的带有根系的完整植株, 不同于传统组培方法统计的增殖系数。接种 30 d 后, 大部分植株基部有增殖的丛生芽产生, 也有在茎段上增殖的现象, 但这种幼嫩芽苗不计入试验结果。有研究在软枣猕猴桃增殖阶段的增殖系数最高可达 5.86, 高于本次试验的植株再生频率, 但该试验从接种到生根阶段培养了 80 d, 本试验从接种到生根仅需 50 d, 减短了试验周期, 简化了试验步骤, 节省了试验成本, 为软枣猕猴桃组培苗的高效工厂化生产提供了理论技术支持<sup>[13-14]</sup>。

响应面分析法是用多元二次回归方程将试验中的多种因素进行拟合, 通过对响应面和等高线的分析, 研究各因子与响应值的关系<sup>[15]</sup>。相对于传统试验方法, 响应面是一种试验次数少、回归方程更为精准、能反映各因素间交互作用的一种高效、经济、实用的分析方法<sup>[16-17]</sup>。由优化试验得出的结果可知, 最佳优化培养基为: MS + 6-BA 2.42 mg/L + NAA 0.27 mg/L + IBA 0.32 mg/L, 植株再生频率为 4.23, 高于单因素试验的最

佳值 1.60, 说明该优化方案有可行性和实际意义。

### 参考文献:

- [1] 王菲, 许金光, 刘长江. 软枣猕猴桃中的功能保健成分及其在食品加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 421-423.
- [2] 王占勤, 米建海, 纪虎娃, 等. 野生软枣猕猴桃果实品质初步研究[J]. 山西林业科技, 2011, 40(3): 26-27.
- [3] 王晓东, 段全猛. 软枣猕猴桃的利用与栽培[J]. 特种经济动植物, 2006(2): 33-34.
- [4] 王艳芳, 张立民. 软枣猕猴桃实用价值及发展前景[J]. 新农业, 2016(3): 34-36.
- [5] 牛晓林. 长白山软枣猕猴桃组织培养和快繁技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [6] 王春华. 软枣猕猴桃苗木繁殖技术[J]. 烟台果树, 2017(1): 41-42.
- [7] 龙茹, 秘树青, 王子华, 等. 外源激素对软枣猕猴桃硬枝扦插生根的影响[J]. 河北科技师范学院学报, 2010, 24(2): 12-15.
- [8] 王晓春. 软枣猕猴桃播种与嫁接育苗方法[J]. 特种经济动植物, 2010, 13(3): 41-42.
- [9] 郭志欣, 顾地周, 闫中雪, 等. 软枣猕猴桃优良品系“2008-07”组织培养繁殖技术研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(11): 93-98.
- [10] 刘小刚, 焦晋, 赵宇, 等. 野生软枣猕猴桃组织培养及褐变处理[J]. 中国农学通报, 2013, 29(19): 113-119.
- [11] 田新华, 卢慧颖, 吴捷. 软枣猕猴桃组织培养的研究[J]. 林业科技, 2008, 33(6): 56-58.
- [12] 王富富. 软枣猕猴桃花药培养及再生体系建立[D]. 中国农业科学院, 2017.
- [13] 朴一龙, 朴日子. 野生软枣猕猴桃离体培养体系的建立及优化[J]. 北方园艺, 2011(15): 157-160.
- [14] 刘延吉, 郝桂杰, 姜岩岩, 等. 不同品种野生软枣猕猴桃最佳组培方法的研究[J]. 北方园艺, 2012(17): 124-126.
- [15] 张艳萍, 赵玮, 罗万银, 等. 利用响应面法优化野生白刺(Nitraria sibirica)茎段增殖培养基[J]. 中国沙漠, 2015, 35(6): 1579-1583.
- [16] 杨秀荣, 王雪莲, 王敏, 等. 利用响应面分析方法优化生防细菌 B579 增殖培养基[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 35-39.
- [17] 付勇, 严善春, 李小平. 响应面法优化黄粉虫幼虫油脂提取工艺[J]. 林业科学, 2010, 46(8): 125-129.