

姚思扬,赵春莉,刘子平,等. 响应面法优化草莓品种红颜离体繁殖的增殖条件[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):88-91.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.021

响应面法优化草莓品种红颜离体繁殖的增殖条件

姚思扬,赵春莉,刘子平,刘翰升,刘 珮

(吉林农业大学,吉林长春 130118)

摘要:为了研究优化红颜草莓继代增殖培养的条件,以草莓品种红颜继代组培苗为试验材料,利用响应面法对其增殖条件进行优化。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,以琼脂浓度、光照度、pH 值为试验因子,以增殖系数为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计。结果表明:3 因素对植株增殖系数的影响力大小为光照度 > pH 值 > 琼脂浓度,最终得到的二元回归方程显示,红颜草莓增殖条件的优化结果如下:琼脂浓度为 7.1 g/L, pH 值为 5.37,光照度为 2 177 lx。在此条件下,最佳增殖系数预测值为 10.930 5,实际操作结果为 10.73。

关键词:草莓品种;离体繁殖;增殖条件;响应面法

中图分类号: S668.404⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0088-04

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是蔷薇科草莓属多年生草本植物,红颜 (Benihoppe) 为著名的日本品种,是以幸香和章姬为亲本杂交选育而来的,其果实鲜红饱满,味道香甜可口,产量高,耐储存耐运输^[1],深受广大种植者和消费者的喜爱,具有较高的经济价值,拥有广阔的市场。草莓的传统繁殖方法是匍匐茎繁殖和分枝繁殖,效率低,易感染病毒,长久的病毒累积使品种退化,产量降低^[2]。经过茎尖脱毒培养后进行离体快繁,不受季节限制,产量高,培养周期短,是获得大量无病毒原种苗的有效手段。

目前,关于草莓组培的相关研究,大部分集中于探讨培养基内激素的种类及浓度,旨在筛选出每个阶段的最佳培养基^[3-7],但关于其他培养条件的优化研究鲜有报道。本试验旨在探讨增殖阶段, pH 值、光照度、琼脂浓度对其增殖率的影响。并在单因素的试验基础上,参考 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,用响应面法将各因子的相互关系进行拟合分析,研究各因子与响应值的关系,从而优化红颜草莓的组培条件,以期今后相关研究提供理论实践基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

收稿日期:2018-09-05

基金项目:吉林省重点科技攻关项目(编号:20140204026NY)。

作者简介:姚思扬(1994—),女,山东寿光人,硕士研究生,主要从事观赏植物资源引种驯化及繁殖技术研究。E-mail:1575603119@qq.com。

通信作者:赵春莉,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。

30(6):930-935.

[5] Bertini L, Leonardi L, Caporale C, et al. Pathogen - responsive wheat PR4 genes are induced by activators of systemic acquired resistance and wounding[J]. Plant Science, 2003, 164(6):1067-1078.

[6] Ziadi S, Poupard P, Brisset M N, et al. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR - 10 transcripts inducible by

试验材料为吉林农业大学温室的当年生草莓匍匐茎尖,于 2017 年 5 月采摘,在园艺学院园林生物技术实验室内经初代培养后,选取长势一致的、高 2 cm 左右的红颜草莓继代组培苗为试验材料。在预试验的基础上,所用的培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L,蔗糖浓度 30 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 pH 值对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内,光照度为 2 000 lx,光照时间为 14 h/d,培养室温度为 (25 ± 2) °C, pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,琼脂粉浓度为 7 g/L。每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.1.2 光照度对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内, pH 值为 6.0,光照时间为 14 h/d,培养室温度为 (25 ± 2) °C,光照度为 1 200、1 500、1 800、2 100、2 400 lx。琼脂粉浓度为 7 g/L,每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.1.3 琼脂浓度对增殖系数的影响 将不定芽接种到培养基内, pH 值为 6.0,光照时间为 14 h/d,光照度为 2 000 lx,培养室温度为 (25 ± 2) °C,琼脂浓度为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 g/L,每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.2.2 响应面优化试验 在单因素试验的基础上,用响应面分析法,根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,以 pH 值、光照度、琼脂浓度为试验因子,增殖系数为响应值,进行 3 因素 3 水平的试验设计,见表 1。每个水平处理 10 个组培苗,培养周期为 30 d。

1.3 数据分析

用 SPSS 和 Design - Expert 8.0.6 软件对数据进行分析。增殖系数 = 培养 30 d 后不定芽总数/接种的不定芽数。

acibenzolar - S - methyl, a functional analogue of salicylic acid[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2001, 59(1):33-43.

[7] 范志金,刘秀峰,刘凤丽,等. 植物抗病激活剂诱导植物抗病性的研究进展[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1):87-92.

[8] 马 宏. 我国马铃薯软腐病防治的研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(1):42-44.

表 1 响应面试验因素水平

水平	X_1 :pH 值	X_2 :光照度 (lx)	X_3 :琼脂浓度 (g/L)
-1	5.0	1 800	6.5
0	5.5	2 100	7.0
1	6.0	2 400	7.5

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 pH 值对增殖系数的影响 由表 2 可知,pH 值为 5.5 时,试管苗呈翠绿色,植株健壮,与其他大部分处理间差异显著。当 pH 值为 6.0 时,增殖系数随着 pH 值的继续升高而降低。当 pH 值为 7.0 时,培养基内环境为碱性,增殖系数只有 3.30,植株矮小,长势不佳。由此可见,草莓增殖阶段更适于酸性的培养环境,碱性环境会抑制其增殖与生长,增殖培养的

最适 pH 值为 5.5,增殖系数可达 5.90。

2.1.2 光照度对增殖系数的影响 由表 2 可知,增殖系数随光照度的增大呈先上升后下降的趋势,在光照度 1 200 lx 下,试管苗生长缓慢,长势不佳,增殖率只有 3.1。随着光照度的增加,植株长势随之变好,增殖系数随之增加,但光照度为 2 400 lx 时,增殖系数下降,且试管苗失绿变透明状,有玻璃化现象。由此可见,光照度过低会抑制植株生长,过高会产生玻璃化苗,不利于植株生长,增殖培养的最佳光照度为 2 100 lx,增殖系数为 6.90。

2.1.3 琼脂浓度对增殖系数的影响 由表 2 可知,琼脂浓度低于 7.0 g/L 时,增殖系数都低于 5,植株矮小且有玻璃化苗产生。当琼脂浓度 ≥ 7.0 g/L 时,植株生长健壮,无玻璃化苗。 C_4 、 C_5 这 2 处理差异不显著,都有很好的增殖效果,且植株长势极佳,但从经济成本上考虑,筛选出最适宜增殖培养的琼脂浓度为 7.5 g/L,增殖系数为 6.50。

表 2 单因素试验结果

处理	pH 值	增殖系数	处理	光照度 (lx)	增殖系数	处理	琼脂浓度 (g/L)	增殖系数
A_1	5.0	$4.50 \pm 0.85b$	B_1	1 200	$3.10 \pm 0.99c$	C_1	6.0	$4.10 \pm 0.99c$
A_2	5.5	$5.90 \pm 1.20a$	B_2	1 500	$4.10 \pm 1.45c$	C_2	6.5	$4.70 \pm 0.95bc$
A_3	6.0	$5.20 \pm 0.73ab$	B_3	1 800	$5.50 \pm 0.85b$	C_3	7.0	$5.50 \pm 1.43ab$
A_4	6.5	$4.40 \pm 1.17b$	B_4	2 100	$6.90 \pm 0.89a$	C_4	7.5	$6.50 \pm 0.97a$
A_5	7.0	$3.30 \pm 0.67c$	B_5	2 400	$6.30 \pm 1.34ab$	C_5	8.0	$6.30 \pm 1.25a$

注:同列数据后标有不同小写字母的表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 二元模型的建立与分析 以增殖系数(Y)为响应值,琼脂浓度(X_1)、pH(X_2)、光照度(X_3)为因素,经过 Design - Expert 8.0.6 软件分析,得出的回归方程模型为 $Y = 10.66 + 0.36X_1 - 0.89X_2 + 1.00X_3 + 0.33X_1X_2 + 0.050X_1X_3 + 0.20X_2X_3 - 0.89X_1^2 - 1.54X_2^2 - 1.87X_3^2$ 。该回归模型 P 为 $0.000\ 3 < 0.01$,有极显著差异,失拟项为 $0.174\ 6 > 0.05$,差异不显著,模型稳定性较好。该方程响应面试验设计与结果见表 3。 $R^2 = 0.962\ 6$,说明方程拟合性良好,试验误差小。由表 4 可知, X_1 对响应值影响不显著, X_2 、 X_3 影响极显著,3 因素对增殖系数的影响力大小为 $X_3 > X_2 > X_1$, X_1 、 X_2 、 X_3 的二次项都对响应值有极显著影响,交互作用影响均不显著。

2.2.2 响应面分析 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,各图表示在 1 种因素取值为 0 时,其他 2 种因素对响应值的影响。响应面曲面的陡峭程度可表明因素对响应值的影响力大小,曲面越陡,影响力越大,反之则越小。由等高线的形状可知交互效应的强弱,椭圆形表明效应显著,圆形则相反^[8]。由图 1、图 2、图 3 可知,有关琼脂浓度的曲面较平缓,可见琼脂的影响力小。关于光照度的曲面都很陡峭,可见光照度是影响力最大的因素。通过等高线图及响应面图可见琼脂浓度与 pH 值的交互作用影响力最大,其次是光照度与 pH 值,影响力最小的是光照度与琼脂浓度的交互作用。

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红颜草莓增殖的最优条件如下:琼脂浓度为 7.08 g/L,pH 值为 5.37,光照度为 2 176.99 lx,最佳增殖系数预测值为 10.930 5。对该模型进行 3 次验证试验,试验条件如下:琼脂

表 3 响应面试验设计与结果

处理	X_1 :琼脂浓度 的编码值	X_2 :pH 值的编码值	X_3 :光照度 的编码值	Y :增殖系数
1	0	0	0	10.7
2	-1	-1	0	9.5
3	1	0	1	9.8
4	1	1	0	7.6
5	-1	1	0	6.7
6	1	-1	0	9.1
7	1	0	-1	7.2
8	0	0	0	10.4
9	-1	0	1	8.5
10	0	-1	1	8.5
11	0	0	0	11.2
12	0	0	0	10.8
13	0	1	-1	5.6
14	-1	0	-1	6.1
15	0	1	1	7.5
16	0	-1	-1	7.4
17	0	0	0	10.2

浓度为 7.1 g/L,pH 值为 5.37,光照度为 2 177 lx。每次处理 10 个不定芽,得出的 3 次结果为 10.7、11.2、10.3,平均值为 10.73。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度。

3 讨论与结论

光照度是影响植物光合作用的主要因素,在一定范围内,随着光照度的增强,植株长势随之变好。但光照度超过一定

表 4 回归分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值($P_t > F$)	显著性
模型	46.95	9	5.22	20.02	0.000 3	**
X_1 (琼脂浓度)	1.05	1	1.05	4.03	0.084 6	
X_2 (pH 值)	6.30	1	6.30	24.18	0.001 7	**
X_3 (光照度)	8.00	1	8.00	30.69	0.000 9	**
X_1X_2	0.42	1	0.42	1.62	0.243 6	
X_1X_3	0.010	1	0.010	0.038	0.850 3	
X_2X_3	0.16	1	0.16	0.61	0.459 0	
X_1^2	3.35	1	3.35	12.87	0.008 9	**
X_2^2	10.02	1	10.02	38.44	0.000 4	**
X_3^2	14.68	1	14.68	56.34	0.000 1	**
残差	1.82	7	0.26			
失拟项	1.23	3	0.41	2.78	0.174 6	
纯误差	0.59	4	0.15			
总误差	48.78	16				

注：“*”代表显著性($P < 0.05$),**代表极显著性($P < 0.01$)。

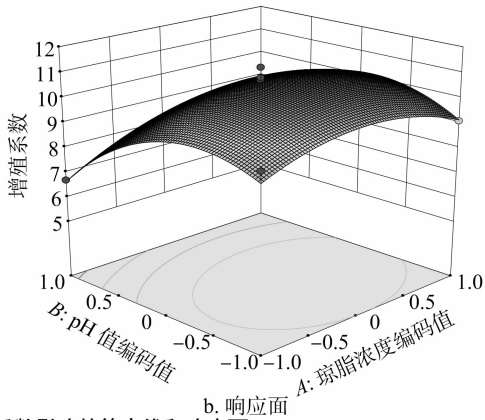
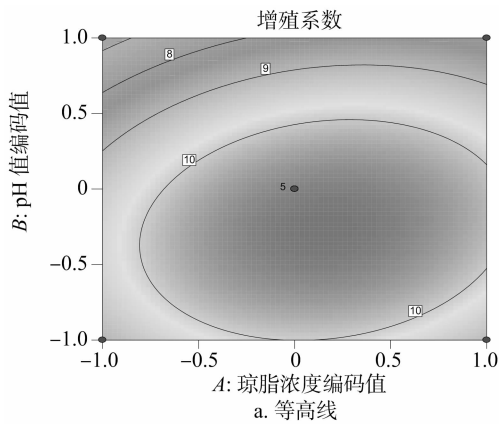


图1 琼脂浓度与 pH 值对增殖系数影响的等高线和响应面

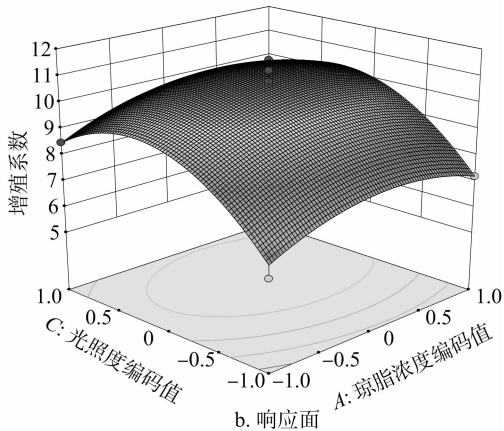
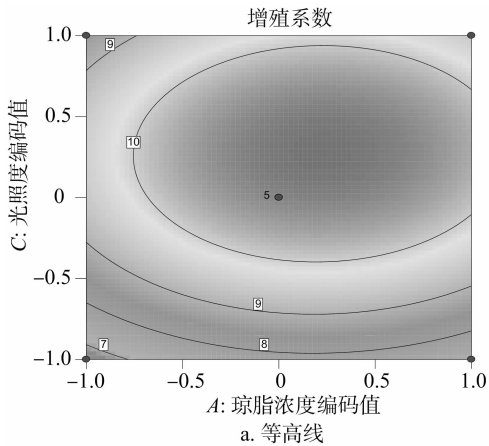


图2 琼脂浓度与光照度对增殖系数影响的等高线和响应面

范围,则会对植物产生不利影响^[9]。不同种类的组培苗所需光照差异性较大,如红树莓增殖阶段的最适光照度为 1 500 lx^[10],紫花含笑在 8 000 lx 的强光下更适于芽的生长^[11],金叶复叶槭在 4 200 lx 的光照度下生长效果最佳^[12],香蕉组培苗增殖阶段只需 1 000 lx 光照度^[13]。在组培的不同阶段,所需光照度不同,通常在生根阶段组培苗所需的光照更

多,随着组培苗生长状态的变化,要合理调控光因素,才可使植株更好生长,可见光照是影响组培苗生长的重要因素。不同植物所需的培养基酸碱环境不同,本试验证明,红颜草莓更适于酸性培养基。琼脂有凝固培养基的作用,可影响培养基内的水分,其浓度对植物生长也存在一定影响。琼脂浓度低,培养基内水分多,不利于植物生长分化,会有玻璃化现象产

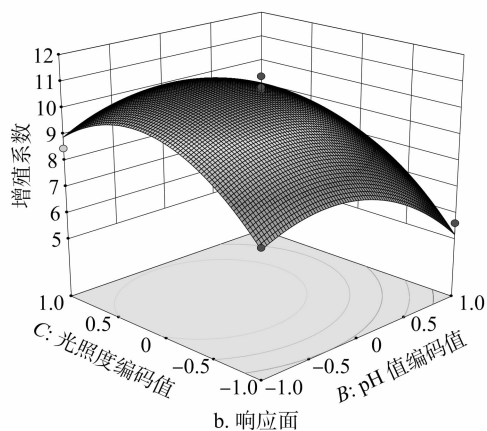
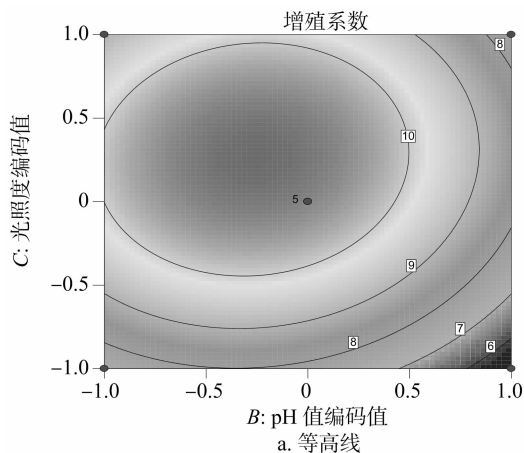


图3 pH 值与光照度对增殖系数影响的等高线和响应面

生;琼脂浓度高,培养基偏硬,会使植物失水,造成植株萎蔫^[14]。这与本试验结果一致,在单因素试验中,琼脂浓度低于 7 g/L 时,有玻璃化现象,植株长势不佳。

在试验中发现,光照度过高、琼脂浓度过低时会产生玻璃化苗。玻璃化是一种植物在离体快繁中发生的生理、形态异常的现象,可危害试管苗正常生长。玻璃化苗植株矮小,茎干透明状,叶片透明状,脆弱失绿,长势不佳^[15]。产生玻璃化的原因有很多,高温密封的培养环境、高浓度的植物激素加速了植物生长,瓶内气体浓度发生变化,供植物正常生长的气体交换环节受到影响,易产生玻璃化^[16]。温度过高、湿度过大、生长调节剂浓度高、继代次数太多,都易出现玻璃化现象,影响植株长势^[17]。对于轻度的玻璃化苗,增加蔗糖浓度,添加活性炭可使其缓解或恢复^[18]。在组培试验中,要严格控制通风、温度、光照等培养环境,控制激素浓度,避免或减少玻璃化苗的产生。

在单因素试验中,光照度、琼脂浓度、pH 值的最佳增殖系数分别为 6.9、6.5、5.9。而优化试验中最佳增殖系数为 10.73,明显高于单因素的试验结果。响应面分析法是一种试验次数少、回归方程精度高、能研究多因子间交互作用的研究方法,其高效便捷,可节省人力、成本和时间^[19-20]。优化试验的结果显示,最适合红颜草莓增殖的培养环境如下:琼脂浓度 7.1 g/L, pH 值为 5.37,光照度为 2 177 lx,增殖系数为 10.73。陈英等研究得到的最佳增殖系数为 6.62^[21]。翟婷婷研究得出的最佳增殖系数为 5.0^[22],与现有研究相比本试验的增殖系数高于已报道的部分研究结果,说明筛选增殖条件有实际意义。

参考文献:

- [1] 罗君琴,李 丽,林 俊,等. “红颊”草莓茎尖快繁技术研究[J]. 现代园艺,2008(11):4-5.
- [2] 董敬超. “红颜”草莓茎尖组织培养快繁技术研究[J]. 北方园艺,2013(24):106-108.
- [3] 李会珍,徐东进,陈登金,等. 不同植物生长调节剂对脱毒红颊草莓组培快繁的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):43-45.
- [4] 孙瑞芬,李天然,李 堃,等. 草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究[J]. 华北农学报,2002,17(3):49-53.
- [5] 牟 彤,吴 瑕,胡鑫宇. 不同激素条件对草莓组培苗快繁的影

- 响[J]. 安徽农学通报,2010,16(5):78-167.
- [6] 袁惠燕,谈建中,黄秀勤,等. 激素条件对不同品种草莓组培快繁效果的影响[J]. 苏州大学学报(自然科学版),2007,23(3):75-79.
- [7] 孙永平,高年春,张 琼,等. 红颊草莓组培快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(5):63-64.
- [8] 王允祥,吕凤霞,陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面法优化研究[J]. 南京农业大学学报,2004,27(3):89-94.
- [9] 王 政,郭玉珍,何松林. 不同光照强度对彩色马蹄莲试管苗生长的影响[J]. 西北林学院学报,2011,26(3):84-87.
- [10] 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.
- [11] 程强强,戴小英,宋晓琛,等. 紫花含笑组培快繁体系建立[J]. 林业科技开发,2014,28(1):118-121.
- [12] 孟月娥,李艳敏,赵秀山,等. 温度、光照及继代周期对金叶复叶槭组培苗生长的影响[J]. 中国农学通报,2012,28(25):209-212.
- [13] 郑洪立,叶春海,王季槐,等. 温度和光照对香蕉组培苗生长和增殖的影响[J]. 热带作物学报,2008,29(4):455-459.
- [14] 魏 琴,周黎军,宣 朴,等. 组培条件对油樟试管苗玻璃化的影响[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2006,29(5):606-608.
- [15] 韩淑兰. 黄芩细胞悬浮培养体系的建立及降低再生苗玻璃化的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2016.
- [16] 王爱芝,沈海龙,张 鹏,等. 花椒组织培养中玻璃化现象的发生与防治[J]. 东北林业大学学报,2009,37(10):18-22.
- [17] 韦梅琴,唐 楠,张文莲,等. 大岩桐试管正常苗与玻璃化苗叶表结构比较[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):93-95.
- [18] 施 琼,胡 峰,黄烈健,等. 马大杂种相思组培快繁技术[J]. 华南农业大学学报,2015,36(2):79-84.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 陈 英,张西英. 草莓品种红颜组培快繁体系的优化[J]. 新疆农业科学,2016,53(12):2210-2216.
- [22] 翟婷婷,刘成连,原永兵,等. 草莓茎尖培养快繁体系的研究[J]. 安徽农业大学学报,2015,42(4):545-548.