

# 基于响应面法优化兰州百合芽增殖培养基

裴怀弟, 林玉红, 李琦, 李淑洁, 张艳萍

(甘肃省农业科学院生物技术研究所以, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以兰州百合鳞片为外植体获得的小鳞芽为材料, 利用响应面法的 Box-Behnken 设计方法, 对百合组培芽增殖进行试验优化。结果从响应面法优化模型得出的芽增殖最佳培养基为 MS+1.25 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 在此条件下, 增殖系数达 3.82。

**关键词:** 响应面法; 兰州百合; 芽增殖; 增殖系数; 培养基

**中图分类号:** S644.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)07-0007-06

[doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.07.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.07.003)

## Optimization of Lanzhou Lily Bud Proliferation Medium Based on Response Surface Method

PEI Huaidi, LIN Yuhong, LI Qi, LI Shujie, ZHANG Yanping

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** The buds of small scales obtained from Lanzhou Lily's scales as explants were used as materials, the Box-Behnken design method of response surface method was used to optimize the bud proliferation of lily tissue culture. The results showed that the optimal medium for bud proliferation obtained from the response surface method was MS+1.25 mg/L 6-ba +0.2 mg/L NAA. Under this condition, the bud multiplication coefficient reached 3.82.

**Key words:** Response surface method; Lanzhou lily; Bud proliferation; Proliferation coefficient; Medium

兰州百合(*Lilium davidiivar. unicolor*)是百合科(*Liliaceae*)百合属(*Lilium*)川百合的

收稿日期: 2020-02-17

**基金项目:** 国家自然科学基金地区基金项目(31960599); 甘肃省科技重大专项(18ZD2NA010); 甘肃省农业科学院中青年基金项目(2017GAAS94); 甘肃省农业科学院科技支撑项目(2017GAAS36); 甘肃省农业科学院重点研发计划(2019GAAS019)。

**作者简介:** 裴怀弟(1979—), 女, 甘肃天水人, 助理研究员, 主要从事生物技术应用及栽培生理研究工作。Email: phdfeixiang@163.com。

**通信作者:** 林玉红(1964—), 女, 山东文登人, 研究员, 主要从事作物栽培生理研究工作。Email: 497969681@qq.com。

43.55%。

### 参考文献:

- [1] 王建成, 车宗贤. 腐殖酸水溶肥喷施量对番茄的影响[J]. 甘肃农业科技, 2014(8): 10-12.
- [2] 李卫军, 张宏, 奚辉, 等. 日光温室滴灌水肥一体化系统选择与应用技术[J]. 中国农业信息, 2016(3): 55-57.
- [3] 罗小妹, 文彩红. 施肥方式对苹果树生长及产量的影响[J]. 甘肃农业科技, 2012(12): 17-21.
- [4] 张国良, 李永安, 张春雷. 甘肃主要农作物测土配方及水肥一体化施肥手册[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2016: 293-294.
- [5] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 89-125.

(本文责编: 杨杰)

变种, 为多年生鳞茎草本植物<sup>[1-3]</sup>, 其鳞茎具有营养和滋补双重功效, 是甘肃省的地方特色农产品, 也是二阴山旱区农民的支柱产业。目前, 兰州百合主要以无性繁殖为主, 而长期的无性繁殖导致兰州百合病毒病日趋严重, 种性退化, 品质和产量下降等。解决这一问题目前最有效的方法就是繁育和推广脱毒种球<sup>[4-5]</sup>。采用组织培养技术, 建立稳定的组培快繁体系, 可有效提高种苗繁殖速度<sup>[6-7]</sup>, 在获得大量幼苗的同时, 还有利于保持亲本的优良性状<sup>[8]</sup>, 是兰州百合进行品种改良的基础。在组织培养中, 添加植物生长调节剂是比较普遍的现象。植物生长调节剂是植物组织培养的关键物质, 尽管用量很少, 但在植物组织培养中起着重要和关键的调节作用<sup>[9-11]</sup>。关于兰州百合组织培养方面的研究已有很多报道<sup>[8,12-14]</sup>, 大多数试验采用正交设计不同浓度、不同激素的配比, 以期归纳出最佳组合。然而正交设计只是不连续的点的优化组合, 响应曲面法可以得到连续的函数关系, 优化实验设计的优势明显。采用响应面法对培养基中添加物浓度进行合理配比<sup>[15]</sup>, 明确各因素和响应值之间的关系, 可获得更优、更简化的试验设计方法。

响应面分析法是一种寻找多因素系统中最佳条件并且能研究各因素间交互作用的数学统计方法, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系<sup>[16-18]</sup>。该方法实验次数少、周期短, 求得的回归方程精度高<sup>[19-21]</sup>。Box-Behnken 响应面法作为一种能快速优化工艺条件的方法已广泛用于各领域<sup>[22-26]</sup>, 但通过响应面分析法优化兰州百合组培芽增殖的研究尚未见报道。我们在兰州百合组培快繁体系研究中, 着重在百合芽增殖环节通过减少生长调节剂用量和种类, 采用响应面优化法, 以最经济、最有效的方式对试验参数进行分析和研究<sup>[27]</sup>, 以期在提高增殖系数的同时简化培养基配方, 为兰州百合提纯复壮及脱毒种苗种球产业化提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 外植体 选用外形饱满、颜色洁白、健壮无病斑的 3 年生兰州百合。将百合鳞茎剥去外层鳞片, 取中内层鳞片, 自来水冲洗干净, 做好标记, 用滤纸吸干水分后置 3~5℃低温条件下预处理 5~7 d, 然后在超净工作台上用无菌水冲洗 3~5 遍。用 75%乙醇消毒 30~40 s, 放入 0.1%升汞溶液中消毒 8~10 min, 用无菌水冲洗 5~6 遍, 置垫有无菌滤纸的培养皿中晾干备用。

1.1.2 试剂 所用植物生长调节剂 6-苄氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)、萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)均购自 Sigma 公司, MS 培养基所用试剂药品各成分均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验 取经过消毒处理的兰州百合鳞茎的中内层鳞片于超净工作台上, 切成 0.3 cm × 0.3 cm 外植体接种到不定芽诱导培养基中。将鳞片上诱导长出的丛生芽, 用解剖刀切取 0.3 cm 左右的单芽, 接种到附加有不同浓度 NAA、6-BA 组合的芽增殖培养基(表 1)中, 每处理 6 瓶, 每瓶接 5 株单芽, 3 次重复。增殖 30~35 d 后统计有效增殖芽数。

芽增殖系数 = 有效增殖芽数 / 接种芽数

1.2.2 响应面法优化试验 采用统计软件 Design-expert11.0.4 进行中心组合试验(Central Composite Design, CCD)设计。根据 CCD 中心组合试验设计原理, 在前期单因素试验结果的基础上, 选取中心组合试验因子和响应值进行响应面试验设计。每处理 6 瓶, 每瓶接 5 株单芽, 3 次重复。定期观察统计增殖情况。

1.2.3 培养条件 于 2017 年 3—8 月在甘肃省农业科学院生物技术研究实验室进行培养, 基础培养基为含有 3%蔗糖和 0.5%琼脂的 MS 培养基, 附加激素, pH 为 5.8~6.0。

在 2 000~3 000 lx 连续光照、温度(25±2)℃条件下培养,光照时间 14 h/d,所用设备为植物组培常用仪器设备。

### 1.3 数据处理

单因素试验数据分析采用 SPASS7.0 软件进行,优化试验数据分析用 Design-expert11.0.4。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验中不同植物生长调节剂浓度对兰州百合芽增殖的影响

从兰州百合试管苗芽增殖效果(表1)看,5号培养基(6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L)增殖系数达到最高,为 3.47,与8号培养基(6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L)增殖系数 3.38 差异不显著;其余处理对百合增殖的效果均较5号培养基降低,差异达显著水平( $P<0.01$ )。在添加有相同浓度 NAA 的培养基中,随着 6-BA 浓度的增加,芽平均增殖系数呈现一个先增后降的趋势,6-BA 浓度为 1.0、1.5 mg/L 时,增殖系数较大,说明适量的植物生长调节剂配比能显著提高百合芽增殖系数。

### 2.2 响应面法优化试验

在单因素诱导试验中,6-BA 和 NAA 配合使用对兰州百合芽增殖效果最好。根据 CCD 中心组合试验设计的原理,采用 6-BA

和 NAA 2 因素 5 水平的响应面法,以第 5 个配方浓度为中心参考值,通过实验设计所得各水平 6-BA 为 0.19、0.50、1.25、2.00、2.31 mg/L; NAA 为 0.06、0.10、0.20、0.30、0.34 mg/L。

2.2.1 模型的建立及显著性检验 对 6-BA 浓度  $X_1$ 、NAA 浓度  $X_2$  做如下变换,  $x_i=(X_i-X_0)/X$ 。式中,  $x_i$  为自变量的编码值;  $X_i$  为自变量的真实值;  $X_0$  为试验中心点处自变量的真实值;  $X$  为自变量的变化步长。共计 13 个试验点,1~8 是析因试验,9~13 是中心试验,零点试验重复 5 次,以估计试验误差。设计方案与试验结果见表 2。所得数据经 Design-expert11.0.4 回归分析,以芽增殖系数( $Y$ )为响应值,经回归拟合后,得最终的回归预测方程:

$$Y=-0.259 112+4.577 90x_1+7.709 206 292 0x_2+0.633 333x_1x_2-1.625 56x_1^2-18.437 50x_2^2$$

式中:  $Y$  为增殖系数;  $x_1$  为 6-BA 浓度;  $x_2$  为 NAA 浓度。从表 3 可以看出,回归方程的失拟检验差异不显著( $P=0.338 3>0.05$ ),表明实验误差小并且方程式对实验拟合情况较好。总回归方程  $F$  检验  $P<0.000 1$ ,差异达到极显著。方程一次项的影响中,  $x_1$  的  $P<0.000 1$ ,差异极显著;  $x_2$  的  $P=0.124 6>0.01$ ,差异不显著;二次项  $x_1^2$  的

表 1 不同激素浓度对兰州百合芽增殖的影响

培养基编号	激素/(mg/L)		接种数/株	增殖数/个	平均芽增殖系数
	6-BA	NAA			
1	0.5	0.1	90	97	1.62±0.126fH
2	0.5	0.2	90	119	1.98±0.104eFG
3	0.5	0.3	90	107	1.78±0.076fGH
4	1.0	0.1	90	155	2.58±0.104cC
5	1.0	0.2	90	208	3.47±0.116aA
6	1.0	0.3	90	191	3.18±0.125bB
7	1.5	0.1	90	135	2.25±0.076eEF
8	1.5	0.2	90	203	3.38±0.104aAB
9	1.5	0.3	90	157	2.62±0.077cC
10	2.0	0.1	90	137	2.28±0.126dDE
11	2.0	0.2	90	142	2.38±0.153dCD
12	2.0	0.3	90	122	2.03±0.076eEFG

表 2 中心组合试验设计与结果

试验 序号	因素		响应值 芽增殖系数(Y)
	6-BA( $X_1$ )	NAA( $X_2$ )	
1	-1	-1	2.15
2	1	-1	2.98
3	-1	1	2.24
4	1	1	3.26
5	-1.4	0	1.45
6	1.4	0	2.86
7	0	-1.4	3.45
8	0	1.4	3.78
9	0	0	3.83
10	0	0	3.92
11	0	0	3.52
12	0	0	3.64
13	0	0	4.06

$P < 0.0001$ , 差异极显著,  $x_2^2$  的  $P = 0.0241 < 0.05$ , 差异显著; 两因素间的交互作用  $x_1x_2$  的  $P = 0.5928 > 0.05$ , 差异不显著, 校正决定系数  $R^2 = 0.9568$ , 表明 95.68% 的试验数据可用此模型解释。由此看出, 该回归方程对试验拟合情况较好, 可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系。对试验结果及数据分析表明, 6-BA( $x_1$ )对兰州百合芽增殖的影响最大, NAA( $x_2$ )影响不显著。

2.2.2 响应曲面分析 响应曲面和等高线图可以解释自变量之间的相互关系, 还可以反映变量间的相互作用。响应曲面图形是特定的响应值  $y$  所对应的自变量构成的一个三维空间图, 从响应面图中可看出最佳参数及各参数之间的相互作用关系。当特征值为正值时响应面分析图为山丘形曲面, 可以得到极

表 3 回归模型各项的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均差	F值	P	显著性
模型	7.79	5	1.5600	54.18	<0.0001	**
$X_1$	1.85	1	1.8500	64.24	<0.0001	**
$X_2$	0.0875	1	0.0875	3.04	0.1246	
$X_1X_2$	0.0090	1	0.0090	0.3139	0.5928	
$X_1^2$	5.82	1	5.8200	202.28	<0.0001	**
$X_2^2$	0.2365	1	0.2369	8.22	0.0241	*
残差	0.2013	7	0.0288			
失拟项	0.1073	3	0.0358	1.52	0.3383	
误差	0.0940	4	0.0235			
总和	7.99	12				

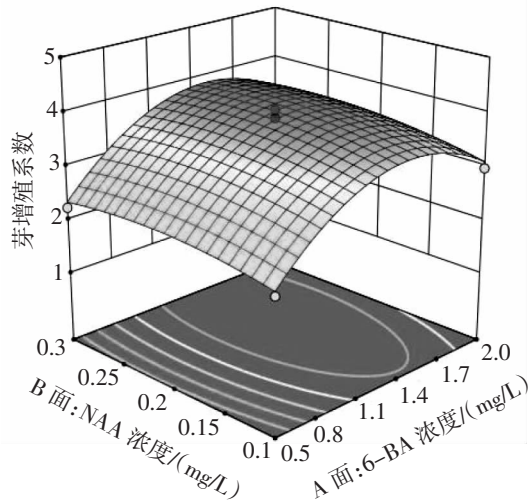


图 1  $y=f(x_1, x_2)$ 响应曲面

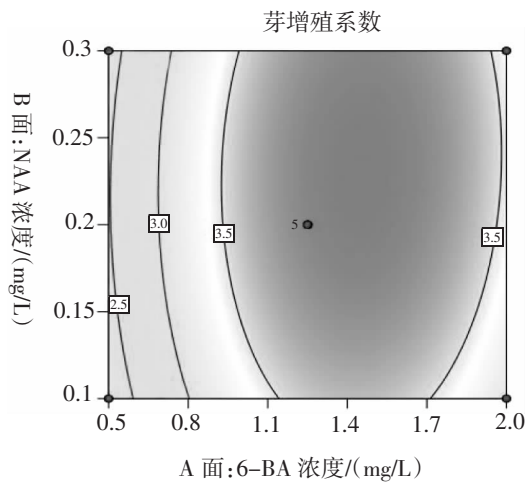


图 2  $y=f(x_1, x_2)$ 等高线



大值；当所有特征值为负值时，则为山谷曲面，有极小值存在；当特征值有正有负时，为马鞍形曲面，无极值存在<sup>[28]</sup>。而等高线形成的图形显示了两因素交互效应的强弱<sup>[27]</sup>。根据拟合方程，绘制出 2 个因素对兰州百合芽增殖系数的响应曲面(图 1)和等高线(图 2)。从图 1 可以看出，6-BA 和 NAA 存在极点值，6-BA 对百合芽增殖系数的影响较为显著，表现为曲线较陡；NAA 对增殖系数的影响不显著，表现为曲线比较平缓。因此，培养基中 6-BA 的浓度变化对兰州百合芽增殖影响敏感，而 NAA 相对不敏感。由图 2 可以看出，6-BA、NAA 两因素交互作用不显著。

**2.2.3 最佳配方验证** 基于以上试验，回归模型预测的兰州百合芽增殖最佳培养基配方为 6-BA 浓度为 1.25 mg/L，NAA 浓度为 0.2 mg/L。用所得最佳值进行响应面法所得结果的可靠性验证试验，每次 10 瓶，重复 3 次，统计有效芽增殖系数。实际得到的芽增殖系数为 3.82，为理论预测值 3.87 的 98.71%，与理论预测值基本吻合，证实了该模型的有效性。可见，采用中心组合试验设计(CCD)优化得到的兰州百合芽增殖培养基配方准确可靠，具有实用价值。

### 3 结论与讨论

研究结果表明，兰州百合有效芽增殖阶段细胞分裂素 6-BA 不可缺少，而生长素 NAA 和分裂素 6-BA 的组合比例不宜过高，太高会影响芽的增殖系数，只有二者优化组合，才能有效提高组培苗芽增殖系数。从前期单因素试验结果来看，在基础培养基 MS 中附加 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.2 mg/L 的增殖效果较好，这与从响应面法优化出的兰州百合芽增殖最佳培养基为 MS + 6-BA(1.25 mg/L) + IBA(0.2 mg/L)基本一致，优化后的培养基增殖系数从之前单因素试验所得最高 3.47 提高到 3.82。

兰州百合人工栽培条件下种球繁殖速度

较慢，繁殖系数低，组织培养技术是繁殖种苗种球的有效手段之一。利用组织培养技术，可以在短时间内大批量的培育出所需要的植物新个体，还可以防止植物病毒的危害，极大的提高了农业生产效率。尤其是通过组织培养手段获得脱毒的原始材料以后，对进行百合种球的培育和生产具有重要的意义。关于兰州百合组培快繁技术的研究较多，同时添加的激素种类较多、激素浓度较高。龙春林等<sup>[29]</sup>的研究表明，兰州百合增殖培养以 MS+NAA0.2 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 为宜，但其 6-BA 激素浓度较高，增加了成本，降低了产投比。另外，张红岩等<sup>[30]</sup>采用 MS+6-BA 1.5 mg/L + 2, 4-D 1.0 mg/L + GA3 0.8 mg/L 培养基，尽管出芽较多，但激素种类偏多，所用 6-BA 浓度比本试验优化后的还高。本试验应用的响应面分析法与传统的数理统计方法相比，求得的各参数组合更加精确，同时用量更经济有效，可以大大降低生产过程中造成的原料浪费<sup>[25]</sup>。

本研究主要从基础培养基 MS 中添加最适宜浓度的 6-BA 和 NAA 2 个因素入手，采用响应面法对兰州百合芽增殖培养基进行优化，以期提高兰州百合组培快速繁殖过程中增殖系数，同时筛选出最简化激素组合。在相同条件下，优化后的培养基尽可能地减少了添加植物生长调节剂的种类和降低了其用量，最终降低生产成本。

### 参考文献：

- [1] 白贺兰, 乔德华. 兰州百合产业发展现状及优化升级对策[J]. 甘肃农业科技, 2017(12): 79-82.
- [2] 江 晶, 杨一斐, 张朝巍, 等. 兰州百合优势种植区分布与土壤养分分析[J]. 甘肃农业科技, 2018(7): 45-47.
- [3] 崔文娟, 林玉红, 欧巧明, 等. 兰州百合 DNA 提取方法比较及 RAPD 体系的快速优化[J]. 甘肃农业科技, 2017(1): 8-12.
- [4] 王生林, 王明霞. 兰州百合产业发展的思考

- 与对策[J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(1): 82-87.
- [5] 刘 芬, 董 铁, 李红旭, 等. 脱毒兰州百合农艺性状研究[J]. 北方园艺, 2007(7): 146-148.
- [6] 曹君迈, 马海军, 谭亚萍. 离体黑果枸杞再生途径的研究[J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(5): 54-58.
- [7] 赵许鹏, 赵晓明, 施 豪, 等. ‘贵长’猕猴桃叶片高效直接再生体系的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(10): 48-54.
- [8] 段四喜, 徐春莲, 汤王外, 等. 3 种因素对兰州百合不定芽诱导的影响[J]. 江西农业学报, 2017, 29(12): 47-52.
- [9] 赵 玮, 党占海, 李闻娟. 强抗旱胡麻新品种陇亚 11 号组织培养技术优化研究 [J]. 中国沙漠, 2012, 32(5): 1355-1361.
- [10] 张艳萍, 赵 玮, 罗万银, 等. 利用响应面法优化野生白刺茎段增殖培养基[J]. 中国沙漠, 2015, 35(6): 1579-1583.
- [11] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [12] 裴怀弟, 林玉红, 李淑洁, 等. 兰州百合小鳞茎诱导技术研究[J]. 甘肃农业科技, 2019(7): 29-32.
- [13] 崔兴林, 秦新惠, 刘 芬, 等. 兰州百合高效再生体系的建立[J]. 中国蔬菜, 2014(6): 44-46.
- [14] 胡友军, 贾双双, 周玉丽. 兰州百合鳞茎不定芽诱导和植株再生[J]. 安徽科技学院学报, 2016, 30(6): 26-31.
- [15] 王 艳, 陈 勋, 李 灿, 等. 基于响应面法优化白及原球茎液体培养基 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 190-194.
- [16] 李 莉, 张 赛, 何 强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [17] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花的蒽醌(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.
- [18] 付 航, 黄函签, 王 妍, 等. 防风愈伤组织诱导及植株再生体系的建立[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3127-3133.
- [19] 孙萍萍, 王 颀, 孙剑锋, 等. 响应面法对缢蛏粗多糖提取工艺的优化[J]. 水产科学, 2010, 29(4): 203-207.
- [20] 游庆红, 尹秀莲. 响应面法优化桑黄多糖的提取工艺研究[J]. 中国酿造, 2010(5): 67-69.
- [21] 魏桢元, 钟耀广, 刘长江. 响应面优化法对香菇多糖提取的工艺研究[J]. 辽宁农业科学, 2010(2): 11-14.
- [22] YOLMEH M, NAJAFI M B H, FARHOOSH R. Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from an-natto seeds by response surface methodology(RSMP)[J]. Food Chem., 2014, 15(155): 319-324.
- [23] MYER R H, MONTGOMERY D C, VINING G G, et al. Response surface methodology: a retrospective and literature survey[J]. J. Qual. Tech., 2004, 36(1): 53-77.
- [24] 冯 颖, 陈巧红, 孟宪军, 等. 响应面法优化无梗五加果多糖超声波、微波法提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 268-272.
- [25] 冯 颖, 于 磊, 孟宪军, 等. 响应面法优化超滤提纯无梗五加果多糖工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 67-71.
- [26] 江林娟, 邹 雪, 黄雪丽, 等. 响应面法优化马铃薯茎段高效再生体系[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(6): 918-925.
- [27] 沈慧慧, 邓 辉, 易丽娟, 等. 响应面法优化悬浮培养肉苁蓉细胞中苯乙醇苷超声提取工艺的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 179-183.
- [28] 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.
- [29] 龙春林, 程治英, 王 俐, 等. 兰州百合器官离体培养外植体位置效应观察[J]. 云南植物研究, 2004, 26(2): 221-225.
- [30] 张红岩, 周 兴, 莫勇生, 等. 兰州百合组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 广西科学院学报, 2015, 31(1): 49-53.

(本文责编: 陈 伟)