

本文引用:王艳,陈勋,李灿,娄婷,周日宝. 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.

基于响应面法优化白及原球茎液体培养基

王艳,陈勋,李灿,娄婷,周日宝*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 采用响应面优化(Box-Behnken design, BBD)法优选白及原球茎液体培养基,提高白及种子萌发形成原球茎的诱导率。**方法** 采用3水平4因素设计BBD实验,在30 g/L的蔗糖溶液中添加大量元素(MS)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)和玉米素(ZT)作为白及原球茎液体培养基,并通过响应面法优选4种添加物浓度配比。**结果** BBD实验模型设计成功可用于响应面结果优化,经响应面优化后,在1 mg/L MS、2 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA、0.07 mg/L ZT条件下,白及原球茎诱导率可达(93.13±0.34)%,与预测值95.38%差异无统计学意义($P>0.05$)。白及原球茎直播种苗存活率良好,长出的叶片数、植株高度、茎长及茎宽均超过种子直播种苗的数值。**结论** 在基本液体培养基中合理配比4种天然添加物可提高白及原球茎诱导率,进而提高种子萌发率。

[关键词] 白及;原球茎;响应面;BBD设计;诱导率

[中图分类号] R282.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.009

Optimization of *Bletilla striata* Protocorm Liquid Medium Based on Response Surface Methodology

WANG Yan, CHEN Xun, LI Can, LOU Ting, ZHOU Ribao*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To increase the induction rate of *Bletilla striata* protocorms from seeds by optimizing *Bletilla striata* protocorm liquid medium based on Box-Behnken design (BBD) methodology. **Methods** The BBD experiment was designed with four factors and three levels. The *Bletilla striata* protocorm liquid medium was obtained by adding major elements (MS), 6-benzylamine adenine (6-BA), naphthylacetic acid (NAA), and zeatin (ZT) into 30 g/L sucrose solution. The concentrations of four additives (MS, 6-BA, NAA, and ZT) were optimized by response surface methodology (RSM). **Results** The successfully established BBD model could be used for optimization by RSM. After optimization by RSM, the induction rate of *Bletilla striata* protocorms could reached (93.13 ± 0.34)% under the conditions of 1 mg/L MS, 2 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA, and 0.07 mg/L ZT; there was no significant difference between the experimental value and the predicted one (93.13% ± 0.34% vs 95.38%, $P>0.05$). The seedlings from direct seeding of *Bletilla striata* protocorms had a good survival rate, and were superior to those from direct seeding of *Bletilla striata* seeds in terms of the number of leaves, the height of the plant, and the length and width of the stem. **Conclusion** An appropriate composition of four natural additives in the basic liquid medium results in an increase in the induction rate of *Bletilla striata* protocorms and thus promotes the seed germination rate.

[Keywords] *Bletilla striata*; protocorm; response surface methodology; Box-Behnken design; induction rate

[收稿日期] 2018-08-10

[基金项目] 湖南省科技厅中央引导地方科技发展专项资金(2017XF5044);湖湘中药资源保护与利用协同创新中心(湘教通[2015]351号);2018年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目立项(湘教通[2018]147号);湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科字[2018]3号)。

[作者简介] 王艳,女,在读硕士研究生,研究方向:中药资源与质量控制。

[通讯作者] *周日宝,男,教授,博士研究生导师,E-mail:1057323510@qq.com。

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f. 为兰科白及属多年生草本植物,以其假鳞茎入药,为我国传统中药,具有补血、止血、消肿、收敛等多种功效^[1]。白及同时作为一种景观植物,花色艳丽,观赏价值高,在我国多地均有栽培^[2]。但其栽培存在繁殖周期长、繁殖效率低、耗种量大等不足,有待于进一步提升^[3-4]。

无菌栽培技术的发展促进了中药材栽培的发展^[5-6],采用无菌萌发技术应用于白及培养已取得较好效果,已成为今后白及繁殖的重要途径之一^[7-8]。白及的发育遵循兰科植物基本发育规律,种子发育成完整植株需经历种胚、原球茎、根状茎、假鳞茎4个阶段,其中以原球茎最为重要^[9]。原球茎是兰科种子萌发过程中的一种形态学构造,具有遗传性状稳定且代谢旺盛等特点,通过原球茎进行继代培养可迅速获得增殖小苗^[10]。因此,如何提高原球茎诱导率已成为白及研究的重点及难点。

目前,在培养基中添加相关植物激素以促进植物种子萌发形成原球茎已成为研究热潮^[11-12],但如何对培养基中天然添加物浓度进行合理配比仍有待于进一步研究。故本实验以白及为栽培样本,采用响应面优化(Box-Behnken design, BBD)大量元素(MS)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)和玉米素(ZT)等添加物浓度进行优化研究,通过提高白及原球茎诱导率以促进白及种子萌发,旨在提高白及快速繁殖。

1 材料

1.1 药品与试剂

白及种子购于四川成都都江堰基地,经湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定为白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f.成熟期的蒴果。

所需试剂主要有硝酸钾(AR,湘中地质实验研究所);75%酒精(安徽安特食品股份有限公司);升汞(AR,贵州省铜仁化学试剂厂);无水氯化钙、蔗糖、甘氨酸、盐酸硫胺素、烟酸、肌醇、1-萘乙酸(NAA)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、玉米素溶液(ZT)均为国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 主要仪器

BSC生物安全柜(超净工作台)(苏州市华宇净化设备有限公司);PYX-800Q-B人工气候箱(科力仪器);GB/T 23111分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);YXQ-LS-100G立式压力蒸汽灭菌器

(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);CX23奥林巴斯光学显微镜(北京瑞科中仪科技有限公司)。

2 方法

2.1 培养方法及条件

种子消毒:在超净工作台中,用镊子打开白及果荚,取出种子放入多层纱布包好放入75%酒精中浸泡1 min,再放入用0.1% HgCl₂消毒10 min,期间不停摇动,无菌水冲洗5~6次,放在无菌滤纸吸干表面水分。

白及种子液体培养基以MS为基础培养基,将消毒灭菌后的白及种子在无菌环境下分别接种到所配制的不同液体培养基中,进行无菌培养。设4个变量分别是:MS、6-BA、NAA和ZT。每一个处理组均含有30 g/L蔗糖,培养条件为:pH5.8,室温25℃,黑暗培养8 d,然后进行光照培养37 d,光照强度2 000 Lx,光照时间12 h/d,共培养45 d。

2.2 BBD实验设计

以前期单因素预实验结果为基础,采用3水平4因素BBD实验筛选白及原球茎诱导率最优组合。选取MS(A)、6-BA(B)、NAA(C)和ZT(D)因素中影响最大的3个水平,分别以-1、0、1编码,因素与水平设计见表1。

原球茎诱导率=原球茎个数/接种种子总数×100%。

表1 BBD实验设计各因素水平(mg/L)

水平	A	B	C	D
-1	0.25	0.5	0.5	0.02
0	0.63	1.25	1.25	0.06
+1	1	2	2	0.1

2.3 统计学方法

响应曲面模型和显著性统计采用Design Expert 8.0.6软件进行设计分析。计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用SPSS 21.0统计软件进行方差分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异, $P < 0.01$ 具有极显著性差异。模型的准确性及显著性由F值、回归系数r和失拟项决定。回归系数R²越接近1,则模型越可靠,预测系数和调整系数越高,模型越可靠。

表 2 BBD 实验设计与结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

编号	MS	6-BA/ (mg·L) ⁻¹	NAA/ (mg·L) ⁻¹	ZT/ (mg·L) ⁻¹	原球茎 诱导率%
1	1	1.25	1.25	0.1	72.88±7.31
2	1	1.25	1.25	0.02	73.26±5.23
3	0.63	1.25	1.25	0.06	88.26±9.65
4	0.63	0.5	1.25	0.02	69.46±6.55
5	0.25	0.5	1.25	0.06	90.76±3.43
6	0.63	1.25	2	0.02	68.65±8.32
7	0.63	2	1.25	0.1	72.73±10.11
8	0.25	1.25	1.25	0.1	75.96±7.89
9	0.63	0.5	2	0.06	87.69±9.01
10	0.63	1.25	0.5	0.1	82.11±4.23
11	0.63	2	1.25	0.02	64.87±9.56
12	0.63	2	2	0.06	75.76±7.43
13	0.63	2	0.5	0.06	88.07±6.55
14	1	0.5	1.25	0.06	82.83±3.67
15	0.63	1.25	1.25	0.06	89.65±5.90
16	0.63	1.25	1.25	0.06	90.19±3.21
17	0.63	1.25	0.5	0.02	60.76±11.45
18	1	2	1.25	0.06	86.92±2.89
19	0.63	0.5	0.5	0.06	87.88±5.96
20	0.25	1.25	2	0.06	84.23±3.11
21	1	1.25	0.5	0.06	90.76±3.28
22	1	1.25	2	0.06	76.65±8.34
23	0.63	1.25	2	0.1	69.61±9.74
24	0.63	1.25	1.25	0.06	88.07±5.91
25	0.25	2	1.25	0.06	76.00±5.34
26	0.63	0.5	1.25	0.1	81.12±8.23
27	0.63	1.25	1.25	0.06	88.97±3.44
28	0.25	1.25	1.25	0.02	56.66±8.32
29	0.25	1.25	0.5	0.06	76.92±4.25

3 结果

3.1 统计分析和模型拟合

BBD 实验数据如表 2 所示。根据表 2 的数据分析得出 BBD 模型回归方程为:

$$Y = -8.59 + 60.70 \times A - 0.47 \times B + 39.79 \times C + 1760.63 \times D + 16.76 \times A \times B - 19.04 \times A \times C - 327.99 \times A \times D - 5.38 \times B \times C - 31.73 \times B \times D - 169.87 \times C \times D - 26.48 \times A^2 - 2.12 \times B^2 - 5.45 \times C^2 - 9809.07 \times D^2$$

原球茎诱导率。

由表 3 可知,模型回归系数 $R^2=0.9891$, $P<0.01$, 说明该模型回归极为显著,可用于白及原球茎诱导率的试验设计。根据显著性标准,一次项 A、B、C、D,交互项 AB、AC、AD、BC、CD 以及二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 对白及原球茎诱导率的影响均具有显著性 ($P<0.01$)。方程的失拟项 P 值为 0.14 ($P>0.05$),表明其对试验

表 3 回归模型方差分析

方差源	方差	自由度	平均和	F 值	P 值
Model	2574.31	14	183.87	90.35	<0.0001
A	43.25	1	43.25	21.25	0.0004
B	104.41	1	104.41	51.30	<0.0001
C	47.69	1	47.69	23.43	0.0003
D	307.48	1	307.48	151.09	<0.0001
AB	88.91	1	88.91	43.69	<0.0001
AC	114.73	1	114.73	56.38	<0.0001
AD	96.82	1	96.82	47.57	<0.0001
BC	36.69	1	36.69	18.03	0.0008
BD	3.625	1	3.62	1.78	0.2033
CD	103.88	1	103.88	51.04	<0.0001
A^2	90.00	1	90.00	44.22	<0.0001
B^2	9.23	1	9.23	4.53	0.0514
C^2	60.99	1	60.99	29.97	<0.0001
D^2	1597.73	1	1597.73	785.11	<0.0001
残差	28.49	14	2.03		
失拟项	25.26	10	2.52	3.12	0.1415
纯误差	3.23	4	0.80		
总和	2602.80	28			
R^2	0.9891				
R_{adj}^2	0.9781				
R_{pred}^2	0.9422				
精密度	32.90				

结果的影响不显著,说明模型良好; $R_{adj}^2=0.9891$ 可解释本模型中 98.91% 响应值的变化; $R_{pred}^2=0.9422$, $R_{adj}^2=0.9891$, 二者差异在合理范围内 ($|R_{adj}^2 - R_{pred}^2| < 0.2$), 说明该模型具有较好的回归性。精密度的 $32.9 > 4$ 进一步表明本模型设计合理^[13]。

3.2 RSM 分析

响应面三维图和等高线图不仅可以解释自变量之间的相互作用,也可反映变量间的相互作用。通过观察曲面的倾斜度确定两者对响应值的影响程度,倾斜度越高,即坡度越陡,说明两者交互作用越显著。A、B、C 和 D 对白及原球茎诱导率的影响如图 2 所示,4 因素之间的交互曲面均具有较大的倾斜度,说明两两因素之间的交互作用对白及原球茎诱导率的影响较大。

3.3 验证试验

3.3.1 最优液体培养基培养白及无菌种子 根据拟合方程和方差分析结果可知白及原球茎诱导率的最优条件为:A=1 mg/L、B=2 mg/L、C=0.5 mg/L、D=0.07 mg/L。在此条件下,白及原球茎诱导率达到最大预测值 95.38%。为证实预测值的准确性,在最优条件下进行验证实验,得到较高的白及原球茎诱导

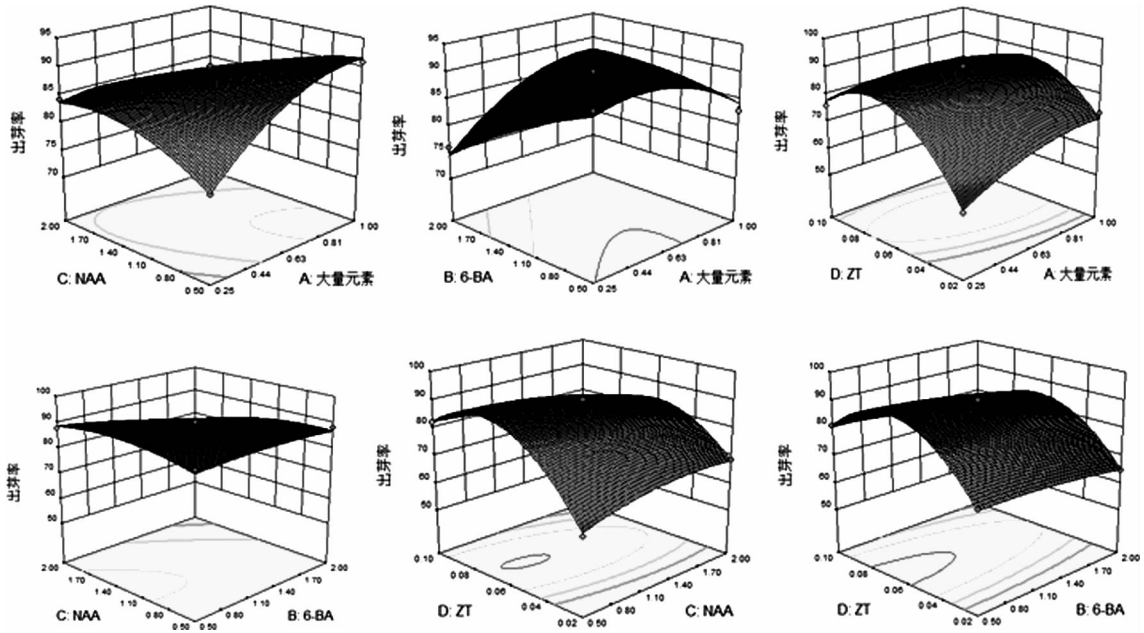


图1 A、B、C、D交互作用对白及原球茎诱导率影响的响应面

率,其实测值为(93.13±0.34)%,与预测值 95.38%相比差异无统计学意义($P>0.05$),且图2白及种子形成原球茎状况进一步可说明 BBD 模型预测良好,该配比可用于白及种子萌发形成原球茎的液体培养基。

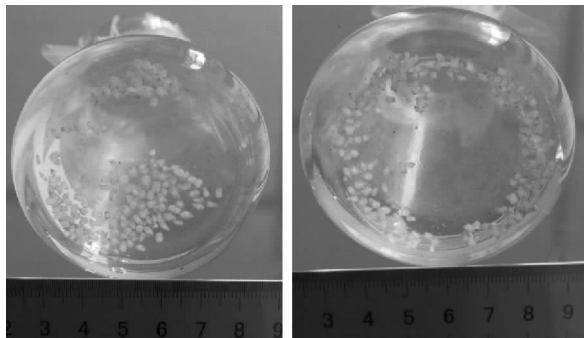
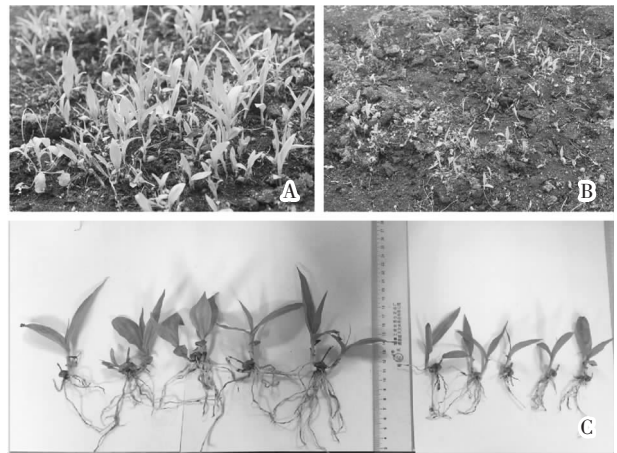


图2 最佳条件下白及种子形成原球茎状况

3.3.2 原球茎炼苗驯化直播与种子直播种苗长势对比 白及种子液体培养 60 d 后,开瓶取出原球茎用自来水冲洗干净培养基,放入清水中炼苗驯化处理 3 d 后直接播种在基质为培养土(椰糠等):珍珠岩:蛭石配比为 10:2:1 的苗床上。播种完后用保鲜膜覆盖穴盘,控制大棚内的各项环境因素,达到白及最适宜成苗的条件,并保持大棚内通风,定期浇水,按时进行田间追肥管理。在白及种子接种在液体培养基的同一天将白及种子直接进行同等条件直播培养。两种方式均培养 10 个月后种苗长势如图 3 所示。

两种方式培养栽种 10 个月后,采用随机 5 点取样调查法,每点随机取 10 株白及苗,每组各取 50 株

进行观测,观测指标有真叶片数、株高、茎长、茎宽。测量单株各项指标的方差值见表 4。白及原球茎播种长出的叶片数、植株高度、茎长及茎宽均超过种子直播种苗的数值。



注:A.原球茎播种种苗;B.种子直播种苗;C.左为原球茎播种种苗、右为种子直播种苗

图3 原球茎播种与种子直播种苗长势对比

表 4 白及种苗生长特性比较($\bar{x}\pm s, n=50$)

白及种苗	叶片数/片	株高/cm	茎长/cm	茎宽/cm
原球茎直播种苗	4.28±0.50	9.45±0.71	1.10±0.11	0.53±0.06
种子直播种苗	3.96±0.33	6.38±0.50	1.07±0.11	0.48±0.05

4 结论

白及在野生状态或人工栽培条件下繁殖速度较

慢,繁殖系数低。组培技术是白及种子萌发非常有效的一项手段^[14],本研究主要从MS浓度、6-BA浓度、NAA浓度和ZT浓度4个因素着手,考察其对白及种子萌发形成原球茎的影响,并筛选最佳条件。液体培养白及种子萌发形成原球茎受许多因素的影响,不同培养基配方对白及种子萌发形成原球茎的诱导率的影响不同。本研究采用响应面法对现有的白及种子萌发形成原球茎的液体培养基培养条件优化,为更好优选出白及原球茎提供技术支撑。

同时,在实验中发现白及的种子细小如灰尘,在液体培养时很难精确计算白及种子的接种数量。故本研究在前人研究的基础上,按照白及种子相同的悬浮程度,每种处理取相同计量的白及种子悬浮液进行定量接种,基本保证了每组实验中白及种子总数的一致性,最大限度降低了因接种密度不同所导致的实验的误差。在现有的报道中采用液体培养白及种子及原球茎的研究逐渐增多,本研究通过液体培养白及种子及原球茎,以求克服固体培养的弊端,在培养过程中,种子和原球茎能充分接触营养物质,加快了种子萌发和原球茎生长发育速度,最终提高了白及种子萌发率和原球茎诱导率,可为快速生产白及无菌苗提供有效的技术参数,为推动白及种苗规模化生产奠定坚实基础。此外,后期在原球茎需要转接培养时,将其移栽在自然界中,既提高了发芽率,而且降低了生产成本,能在短时间内获得大量的白及种苗,满足大面积、规模化育苗的需要,具有生产与经济上的双重意义。

参考文献

- [1] 汤逸飞,阮川芬,应晨,等.白及属植物化学成分与药理作用研究进展[J].中草药,2014,45(19):2864-2872.
- [2] 孙乐乐,杨永红,刘军凯,等.白及的本草考证[J].中药材,2010,33(12):1965-198.
- [3] 任凤鸣,刘艳,李滢,等.白及属药用植物的资源分布及繁育[J].中草药,2016,47(24):4478-4487.
- [4] 周至明,黄程生,彭丽丽,等.白及人工种植初步研究[J].中药材,2006,29(1):7-8.
- [5] KYLIN A. A new method for large-scale aseptic cultivation of higher plants[J].Physiologia Plantarum,2010,3(2):165-174.
- [6] ZHANG A, WANG Y, HUANG H, et al. Efficient callus induction and high-frequency regeneration system establishment of strawberry 'Akihime' [J]. Guihaia, 2018, 38(4):482-491.
- [7] 徐德林,储士润,李树刚,等.四种天然添加物对白及组培苗诱导的影响[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(10):181-186.
- [8] 潘胤池,李林,肖世基,等.白及繁育技术研究进展[J].中成药,2018,40(5):1142-1149.
- [9] 聂宁,朱艳,田梅,等.白及种子萌发及原球茎发育过程的细胞组织学观察[J].中国中药杂志,2016,41(8):1446-1449.
- [10] 谢利,马晓娟,郭和蓉,等.杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖[J].植物生理学报,2014,50(2):209-213.
- [11] 闫斌,潘超美,何洁,等.穿心莲组培苗的壮苗生根与移栽基质研究[J].时珍国医国药,2016,27(7):1730-1732.
- [12] 吕亚丽,郭顺星,孟志霞.天山雪莲组培苗生根培养体系的优化[J].中国药理学杂志,2009,44(17):1291-1294.
- [13] 熊苏慧,唐洁,李诗卉,等.一种新型天然低共熔溶剂用于玉竹总黄酮的绿色提取[J].中草药,2018,49(10):2378-2386.
- [14] 宋晓丹,陈晓玲,尚丽,等.白及种子试管高频萌发的应用研究[J].中国现代中药,2014,16(9):751-754.
- [15] 崔瑞勤,陈科力,徐雷.基于组培快繁技术的白及种子萌发和幼苗形态观察[J].江苏农业科学,2015,43(2):238-240.

(本文编辑 苏维)