

李胜皓, 张晓芝, 潘月, 等. 基于响应面法对皇冠牡丹(*Paeonia×lemoinei* ‘Yellow Crown’)增殖培养基大量元素配方的优化[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(8): 1493-1506.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.08.014

基于响应面法对皇冠牡丹(*Paeonia×lemoinei* ‘Yellow Crown’)增殖培养基大量元素配方的优化

李胜皓, 张晓芝, 潘月, 郑冰雁, 文书生
(南京林业大学风景园林学院, 江苏 南京 210000)

摘要: 增殖系数低一直是制约牡丹微繁殖技术推广应用的障碍之一,但目前的研究多集中于植物生长调节剂的使用与组合,较少关注培养基配方对牡丹试管苗增殖效果的影响。本研究以皇冠牡丹(*Paeonia×lemoinei* ‘Yellow Crown’)为试验材料,使用 Design-Expert 响应面法设计优化试验,探究 WPM 中 5 种大量元素[K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 、 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$]对皇冠牡丹试管苗增殖效果的影响,并建立数学模型分析预测最佳优化培养基配方。单因素效应分析结果表明, KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 对牡丹试管苗的增殖效果有显著或极显著影响,而 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 与 K_2SO_4 对牡丹试管苗的增殖效果无明显影响。交互作用分析结果表明, K_2SO_4 与 KH_2PO_4 的交互作用对株高、茎长有显著或极显著影响, K_2SO_4 与 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 与 NH_4NO_3 的交互作用对茎长有显著或极显著影响。根据试验数据构建模型进行分析预测,结果显示,5 种大量元素优化配方为: K_2SO_4 2 257 mg/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 907 mg/L、 KH_2PO_4 481 mg/L、 NH_4NO_3 200 mg/L与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 1 963 mg/L。在该条件下开展验证试验,获得试管苗的增殖系数、株高、茎长与叶片数分别为 2.43、4.62 cm、1.30 cm、6.75 张,略高于 Design-Expert 试验得出的预测值,显著优于对照组,说明本研究成功优化了皇冠牡丹的专用增殖培养基配方。研究结果不仅能大幅提高皇冠牡丹的增殖效率,也为其他牡丹品种增殖培养体系的构建与改良提供重要的技术参考。

关键词: 牡丹; 微繁殖; 响应面法; 增殖; WPM 培养基

中图分类号: S685.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)08-1493-14

Optimization of macro-elements composition in the multiplication medium of *Paeonia×lemoinei* ‘Yellow Crown’ based on response surface methodology

LI Shenghao, ZHANG Xiaozhi, PAN Yue, ZHENG Bingyan, WEN Shusheng
(College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210000, China)

Abstract: Low multiplication coefficient has been one of the obstacles limiting the industrial application of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*) micropropagation technology, but most of the current studies have been focused on the use and combination of plant growth regulators, and less attention has been paid to the effect of medium formulation on the multiplication of test-tube seedlings of tree peony. In this study, we used *Paeonia×lemoinei* ‘Yellow Crown’ as the experimental material and designed an optimization test by using Design-Expert response surface method to investigate the effects of five macro-elements,

such as K_2SO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ in WPM medium on the multiplication effect of the test-tube seedlings of *Paeonia* sect. *Moutan*, and developed a mathematical model to predict the best optimized medium formulation. Results of single factor effect analysis showed that, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 and $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ had significant or highly significant

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001359); 南京林业大学大学生创新训练计划项目(2022NFUSPITP0436)

作者简介: 李胜皓(1999-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物与观赏园艺。(E-mail) lylne11104@163.com

通讯作者: 文书生, (E-mail) shusheng0507@126.com

effects on the multiplication effect of the test-tube seedlings, while $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and K_2SO_4 had no significant effects. Results of interaction analysis showed that, the interaction between K_2SO_4 and KH_2PO_4 had significant or highly significant effects on plant height, and stem length, the interactions between K_2SO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 and NH_4NO_3 had significant or highly significant effects on stem length. Based on the experimental data, the model analysis results predicted that the optimized formulations for five macro-elements were K_2SO_4 2 257 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 907 mg/L, KH_2PO_4 481 mg/L, NH_4NO_3 200 mg/L and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 963 mg/L. The validation test was conducted, and the multiplication coefficient, plant height, stem length and leaf number of the test-tube seedlings were 2.43, 4.62 cm, 1.30 cm and 6.75 respectively, which were slightly higher than the predicted values obtained by Design-Expert experiment and were significantly better than the control group, indicating the special multiplication medium for *P. × lemoinei* ‘Yellow Crown’ was constructed successfully. The results of this study can not only greatly improve the multiplication efficiency of *P. × lemoinei* ‘Yellow Crown’, but can also provide an important technical reference for the construction and improvement of multiplication culture system of other tree peony species.

Key words: tree peony; micropropagation; response surface method; multiplication; WPM medium

牡丹(*Paeonia* sect. *Moutan*)为芍药科芍药属落叶灌木,是原产于中国的传统名花和药用植物,近年来被发现作为新型油料植物也有巨大的市场潜力^[1]。皇冠牡丹(*P. × lemoinei* ‘Yellow Crown’)为20世纪70年代由日本育种学家选育的牡丹远缘杂交品种,花乳黄色,花头直立,芳香馥郁,生长势强,品质优良,具有很高的观赏与经济价值。但长期以来该品种的传统繁殖方式(如分株、嫁接等)存在繁殖系数低、周期长、易受环境条件限制等问题,严重制约了其规模化生产。微繁殖技术即植物的离体无性繁殖技术,在保留母株优良性状的同时,具有繁殖快速、繁殖系数高等特点,能弥补传统繁殖方法的不足,因此,构建皇冠牡丹的微繁殖技术体系是推动其规模化生产的必然趋势。

增殖培养是牡丹微繁殖技术的第2个阶段,其中试管苗能否高效地增殖和正常生长是决定微繁殖技术成败的关键。国内自1984年首次开展牡丹微繁殖技术研究以来^[2],迄今已初步建立了菱花湛露(*P. suffruticosa* ‘Ling Hua Zhan Lu’)、洛阳红(*P. × suffruticosa* ‘Luo Yang Hong’)、正午(*P. × lemoinei* ‘High Noon’)等40多个牡丹品种的增殖培养体系^[3]。但目前关于皇冠牡丹增殖培养体系的研究仍鲜见报道,仅黄素姣^[4]就植物生长调节剂对皇冠牡丹增殖生长的影响进行了探究,并获得了适合皇冠牡丹增殖的植物生长调节剂组合,即6-BA(6-苄氨基嘌呤)0.20 mg/L+GA₃(赤霉素)0.10 mg/L+ZT(玉米素)0.05 mg/L,但并未探究培养基中基础成分对其增殖效果的影响。此外,已有研究发现牡丹增殖培养过程中的培养基成分与试管苗增殖效果关系密切,如 Beruto

等^[5]发现,培养基中的 Ca^{2+} 浓度会对试管苗产生影响,并且提高 WPM(木本植物专用培养基)中的 Ca^{2+} 浓度,不仅能有效减少顶芽坏死的现象,还能提高增殖系数和茎长^[6];Li 等^[7]则发现降低培养基中 NH_4^+ 与 NO_3^- 浓度的比值可以促进试管苗的生长,并降低试管苗玻璃化率;在此基础上,有研究将 WPM 中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度分别提高至原始浓度的 3.0 倍与 4.0 倍,从而显著提高了正午牡丹(*P. × lemoinei* ‘High noon’)和凤丹牡丹(*P. ostii*)试管苗的增殖系数,且子代腋芽较为粗壮,而 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度过低会导致试管苗生长不良、易玻璃化, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度过高则会降低增殖系数,使叶片变小卷曲^[8-9]。综上,前人关于牡丹增殖培养阶段的研究多集中在植物生长调节剂的筛选,较少对培养基配方进行研究,且培养基构成组分复杂,各因素间会产生相互作用,使用常规试验方法将耗费大量时间和精力。

响应面分析法(RSM)通过结合数学方法和统计分析,对响应过程变量进行数学建模和分析,寻求最优工艺参数,是解决多变量问题的一种统计学方法^[10],主要利用二次回归模型对各因素和响应值之间的关系进行分析和拟合,试验精度高、次数少、周期短,克服了正交试验与单因素试验法的不足,已被广泛应用于食品学、生态学等领域,并常被用来改良植物组织培养过程中培养基成分与培养条件^[11-14]。在牡丹微繁殖技术研究中,响应面法也有应用,黄弄璋^[15]使用响应面法中的 Plackett-Burman 试验,以 WPM 中的大量元素、微量元素、肌醇、钙、有机物质、铁盐 6 大组分进行设计,筛选发现铁盐、钙和肌醇是影响正午牡丹增殖效果的主要影响因子,并选取这 3

个因素设计 Box-Behnken(效应面法)试验对培养基进行优化,将增殖系数提高了 10%左右。这表明响应面法在牡丹微繁殖技术培养基配方改良中具有较大的应用潜力,但目前尚未见使用响应面法对牡丹微繁殖技术培养基中的大量元素浓度进行改良调整的研究。鉴于此,本研究拟以皇冠牡丹试管苗为试验材料,利用响应面法对 WPM 中 5 种大量元素配方进行优化,以期筛选获得适宜皇冠牡丹的特定增殖培养基,为该品种规模化生产提供技术支持,并与其他牡丹品种微繁殖技术的研发提供参考与借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2022 年 2 月底于山东省菏泽市古韵牡丹基地进行,选取长势良好、无病虫害的皇冠牡丹母株,剪取带有饱满鳞芽的枝,剥下腋芽作为外植体,并按照文献[16]的方法对外植体进行消毒后进行接种,启动培养基为改良 WPM[Ca(NO₃)₂·4H₂O 1 668 mg/L+BA 0.5 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L,附加蔗糖 30.0 g/L、琼脂 6.5 g/L,pH=5.9],后续如无特殊说明,培养基同上。在第 5 次继代培养末期,切取芽丛上茎长约为 1~2 cm 的健壮单芽,去除全部叶片作为试验材料。

1.2 试验方法

以 WPM 中 5 种大量元素的无机盐[K₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NH₄NO₃、Ca(NO₃)₂·4H₂O]作为设计因素,前 4 种大量元素的无机盐(K₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NH₄NO₃)的浓度范围设置为 WPM 原浓度[K₂SO₄为 990 mg/L, MgSO₄·7H₂O 为 370 mg/L, KH₂PO₄ 为 170 mg/L, NH₄NO₃ 为 400 mg/L, Ca(NO₃)₂·4H₂O 为 556 mg/L]的 0.5~3.0 倍, Ca(NO₃)₂·4H₂O 的浓度范围设置为 WPM 原浓度的 0.5~4.0 倍,使用 Design-Expert Optimal 软件中的响应面法进行最佳优化试验设计,得到 30 个处理,并以 WPM 原浓度作为对照(表 1)。上述各处理培养基均附加 6-BA 0.5 mg/L、GA₃ 0.1 mg/L、蔗糖 30.0 g/L、琼脂 6.5 g/L,pH 5.9。

1.3 培养条件与数据统计分析

本研究中启动和增殖培养条件均为培养温度(24±1)℃,光照时间 14 h/d,荧光灯光照度为 32.4 μmol/(m²·s)。

增殖培养 50 d 后,统计不同处理试管苗的增殖系数(茎长为 1~2 cm 健壮单芽数/接种外植体个

数)、株高、茎长和叶片数,并以上述指标为目标函数建立模型,根据模型计算预测目标值对应各因素的置信区间,获得优化配方,从而确定优化培养基的组成比例,并进行验证试验。

2 结果与分析

将原始数据导入 SPSS22.0,可得增殖系数、平均株高、平均茎长与单株叶片数(表 2)。由表 2 可知,增殖系数较高的前 3 个处理依次为第 13 组、第 28 组、第 15 组;平均株高较高的前 3 个处理依次为第 19 组、第 28 组、第 6 组;平均茎长较高的前 3 个处理依次为第 28 组、第 15 组、第 14 组;单株叶片数较高的前 3 个处理依次为第 15 组、第 19 组、第 13 组。综合来看,第 28 组为最优处理,其增殖系数、平均株高、平均茎长与单株叶片数均优于对照,说明培养基大量元素浓度对试管苗增殖效果会产生显著影响。

将 SPSS22.0 处理后的数据通过软件 Design-Expert 12.0 进行数据拟合和显著性检验,对试验结果与试验因子进行三维建模,预测增殖系数和平均茎长处于较高水平时培养基成分的最优配比。其中,5 项变量因子为 K₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、NH₄NO₃、Ca(NO₃)₂·4H₂O 的浓度倍数,分别用 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 、 x_5 表示。线性项显著表示该大量元素浓度对响应值影响显著,二次项显著表示 2 种大量元素浓度交互作用显著,系数为正、负分别表示浓度增大时影响方向的正、负。

2.1 平均增殖系数模型建立与分析

以增殖系数为 Y_1 ,根据 Design-Expert 12.0 软件拟合试验处理,得到增殖系数的二次回归方程:

$$Y_1 = 1.414\ 280 + 0.001\ 072x_1 - 0.030\ 090x_2 + 0.398\ 823x_3 - 0.016\ 274x_4 + 0.224\ 442x_5 + 0.037\ 415x_1x_2 + 0.035\ 269x_1x_3 + 0.036\ 119x_1x_4 - 0.019\ 207x_1x_5 + 0.016\ 060x_2x_3 - 0.049\ 592x_2x_4 - 0.002\ 236x_2x_5 - 0.024\ 230x_3x_4 + 0.022\ 937x_3x_5 - 0.002\ 875x_4x_5 - 0.038\ 994x_1^2 + 0.001\ 120x_2^2 - 0.113\ 775x_3^2 - 0.003\ 998x_4^2 - 0.035\ 254x_5^2。$$

分析结果(表 3)表明,线性项 x_3 、 x_4 对增殖系数具有极显著影响,线性项 x_5 对增殖系数具有显著影响,由 $F(x_3) > F(x_4) > F(x_5) > F(x_2) > F(x_1)$ 可知,5 种大量元素浓度对增殖系数的影响程度为 KH₂PO₄ > NH₄NO₃ > Ca(NO₃)₂·4H₂O > MgSO₄·7H₂O > K₂SO₄。具体影响(图 1)如下: KH₂PO₄、Ca(NO₃)₂·4H₂O 浓度倍数与增殖系数呈线性正相关(图 1C;图 1E),相关系数分别为

0.398 823与0.224 442; NH_4NO_3 浓度倍数与增殖系数呈线性负相关(图 1D),相关系数为-0.016 274; K_2SO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数与增殖系数无显著相关性(图 1A、图 1B)。

表 1 增殖培养基优化试验因素浓度倍数水平取值

Table 1 Multiples of concentration of large elements in proliferation medium for optimizing test

试验编号	培养基大量元素浓度倍数				
	K_2SO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
1	0.50	2.45	3.00	3.00	0.50
2	0.50	1.73	1.74	1.33	4.00
3	0.50	2.35	2.35	3.00	3.14
4	0.50	3.00	0.50	3.00	4.00
5	0.50	3.00	0.50	1.19	0.50
6	0.50	3.00	3.00	0.50	2.55
7	0.50	0.50	0.50	0.50	2.99
8	0.50	0.50	0.95	3.00	0.50
9	0.50	0.50	3.00	3.00	3.28
10	0.50	0.50	3.00	1.03	0.50
11	0.59	2.46	1.00	3.00	1.05
12	0.63	3.00	2.25	1.49	0.75
13	1.13	3.00	0.84	0.50	2.97
14	1.66	3.00	3.00	1.83	4.00
15	1.69	1.70	1.68	1.80	2.18
16	1.69	1.70	1.68	1.80	2.18
17	1.74	1.74	0.50	1.80	2.23
18	1.75	2.15	1.75	0.50	0.50
19	1.96	0.50	3.00	0.50	4.00
20	2.14	3.00	1.75	3.00	2.25
21	2.33	0.50	0.50	3.00	4.00
22	2.44	0.50	3.00	3.00	0.50
23	3.00	2.30	0.50	3.00	0.50
24	3.00	1.95	3.00	3.00	4.00
25	3.00	0.50	0.50	0.50	0.50
26	3.00	3.00	0.56	0.50	4.00
27	3.00	3.00	3.00	1.56	0.50
28	3.00	1.68	3.00	0.50	2.15
29	3.00	0.50	1.75	1.76	2.78
30	3.00	2.33	0.71	2.50	4.00
31(对照)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

取 F 值>1.5 的二元二次项分析各因素间的交互作用与对应响应曲面(图 2)。比较 F 值大小可知, x_1x_2 、 x_1x_3 、 x_1x_4 和 x_2x_4 这 4 项对增殖系数的影响程度为: $x_2x_4>x_1x_3>x_1x_4>x_1x_2$ (表 3),即 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 NH_4NO_3 的交互作用> K_2SO_4 与 KH_2PO_4 的交互作用> K_2SO_4 与 NH_4NO_3 的交互作用> K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的交互作

用。影响如下:(1) K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度比保持为1:1 时,试管苗增殖系数未见明显变化;但低浓度 K_2SO_4 与高浓度 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 相互作用会导致增殖系数下降(图 2A)。(2) K_2SO_4 与 KH_2PO_4 浓度同时升高,增殖系数先上升后下降,且增殖系数受 KH_2PO_4 浓度影响较大(图 2B)。(3) K_2SO_4 与 NH_4NO_3 两者浓度同时升

高,增殖系数逐渐下降且受 NH_4NO_3 浓度影响较大;低浓度 NH_4NO_3 可以使增殖系数保持较高水平(图 2C)。(4)当 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 NH_4NO_3 浓度同时升高时,试管苗增殖系数逐渐降低,而高浓度 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与低浓度 NH_4NO_3 相互作用时增殖系数可达最高值(图 2D)。

表 2 不同培养基配方对增殖系数、平均株高、平均茎长与单株叶片数的影响

Table 2 Effects of different medium compositions on multiplication coefficient, average plant height, average stem length and individual leaf number

处理	增殖系数	平均株高 (cm)	平均茎长 (cm)	单株叶片数 (张)
1	1.27±0.06	3.23±0.60	0.82±0.19	1.20±0.22
2	2.00±0.06	4.44±0.20	1.20±0.19	4.92±1.14
3	1.68±0.09	3.71±0.13	1.21±0.14	3.91±0.13
4	1.37±0.12	3.60±1.54	1.02±0.33	2.94±1.53
5	1.40±0.10	3.21±0.11	1.03±0.06	2.59±0.17
6	1.96±0.09	4.58±0.33	1.33±0.05	4.22±0.53
7	1.95±0.16	4.32±0.25	1.35±0.07	4.61±0.22
8	1.67±0.02	3.17±0.11	1.45±0.12	2.86±0.43
9	1.88±0.07	3.08±0.44	1.22±0.08	3.38±0.45
10	1.69±0.09	3.29±0.24	1.26±0.06	2.88±0.23
11	1.40±0.16	2.59±0.14	0.96±0.12	2.11±0.54
12	1.93±0.24	3.78±0.18	1.27±0.06	3.72±1.03
13	2.21±0.28	3.90±0.31	1.28±0.04	5.70±0.79
14	2.06±0.27	3.86±0.31	1.46±0.03	4.15±0.24
15	2.19±0.27	4.36±0.11	1.50±0.10	5.88±1.02
16	1.94±0.16	3.47±0.11	1.34±0.04	4.71±0.53
17	1.62±0.14	3.44±0.51	1.25±0.13	3.55±0.55
18	1.88±0.15	3.81±0.32	1.21±0.17	4.27±0.06
19	2.10±0.15	4.81±0.50	1.45±0.07	5.71±0.72
20	1.73±0.07	3.06±0.20	1.24±0.16	3.66±0.35
21	1.68±0.06	3.45±0.46	1.04±0.12	3.65±0.34
22	1.61±0.09	2.84±0.51	1.12±0.14	3.84±0.54
23	1.54±0.01	2.76±0.14	0.98±0.08	2.96±0.25
24	1.89±0.19	3.62±0.32	1.33±0.12	5.01±0.61
25	1.46±0.23	2.54±0.36	0.87±0.09	2.42±0.37
26	1.59±0.08	3.29±0.36	1.03±0.12	3.30±0.20
27	1.79±0.24	3.77±0.42	1.33±0.24	3.42±0.63
28	2.19±0.06	4.66±0.41	1.62±0.28	5.30±0.37
29	1.93±0.09	3.50±0.06	1.25±0.16	4.37±0.26
30	1.62±0.03	3.08±0.17	1.17±0.16	3.47±0.34
31(CK)	1.80±0.24	3.84±0.32	1.32±0.18	4.32±0.36

增殖系数=培养 50 d 后收获的标准单芽数/接种株数;株高=试管苗根颈部到叶片顶部之间距离;茎长=试管苗根颈部到主茎顶端分叉处距离。

表 3 增殖系数模型显著性检验结果

Table 3 Significance test of multiplication coefficient model

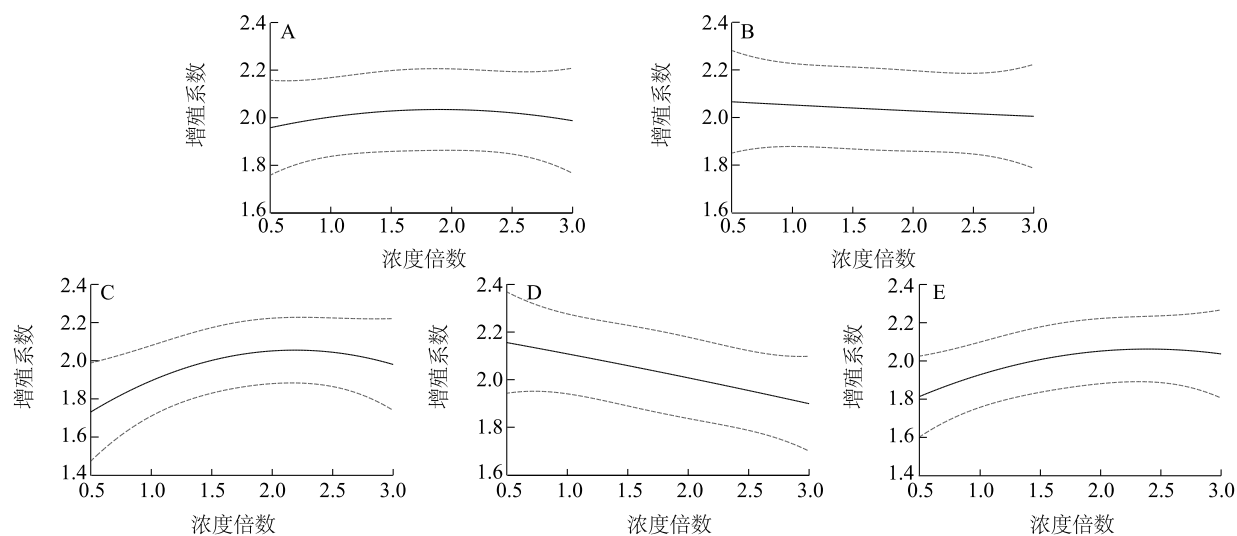
因素	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1.710 0	20	0.085 7	3.560 0	0.021 8	*
x_1	0.003 9	1	0.003 9	0.162 3	0.695 5	
x_2	0.016 4	1	0.016 4	0.678 9	0.429 2	
x_3	0.305 1	1	0.305 1	12.660 0	0.005 2	**
x_4	0.300 4	1	0.300 4	12.470 0	0.005 4	**
x_5	0.216 6	1	0.216 6	8.990 0	0.013 4	*
x_1x_2	0.040 9	1	0.040 9	1.700 0	0.222 1	
x_1x_3	0.045 1	1	0.045 1	1.870 0	0.201 1	
x_1x_4	0.041 2	1	0.041 2	1.710 0	0.220 2	
x_1x_5	0.023 3	1	0.023 3	0.967 0	0.348 6	
x_2x_3	0.008 7	1	0.008 7	0.359 8	0.562 0	
x_2x_4	0.074 4	1	0.074 4	3.090 0	0.109 4	
x_2x_5	0.000 3	1	0.000 3	0.012 2	0.914 1	
x_3x_4	0.020 9	1	0.020 9	0.867 0	0.373 7	
x_3x_5	0.035 1	1	0.035 1	1.460 0	0.255 3	
x_4x_5	0.000 5	1	0.000 5	0.019 6	0.891 5	
x_1^2	0.016 8	1	0.016 8	0.696 5	0.423 5	
x_2^2	0.000 0	1	0.000 0	0.000 6	0.981 5	
x_3^2	0.110 2	1	0.110 2	4.570 0	0.058 2	
x_4^2	0.000 2	1	0.000 2	0.007 4	0.933 0	
x_5^2	0.048 7	1	0.048 7	2.020 0	0.185 4	
残差	0.241 0	10	0.024 1	—	—	
失拟项	0.210 5	9	0.023 4	0.766 7	0.717 1	
纯误差	0.030 5	1	0.030 5	—	—	
总计	1.950 0	30	—	—	—	

* 表示线性项对增殖系数具有显著影响($P \leq 0.05$); ** 表示线性项对增殖系数具有极显著影响($P \leq 0.01$)。 $x_1 \sim x_5$ 分别表示 K_2SO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的浓度倍数。

2.2 平均株高模型建立与分析

以平均株高为 Y_2 , 根据 Design-Expert 12.0 软件拟合试验处理, 得到株高的二次回归方程:

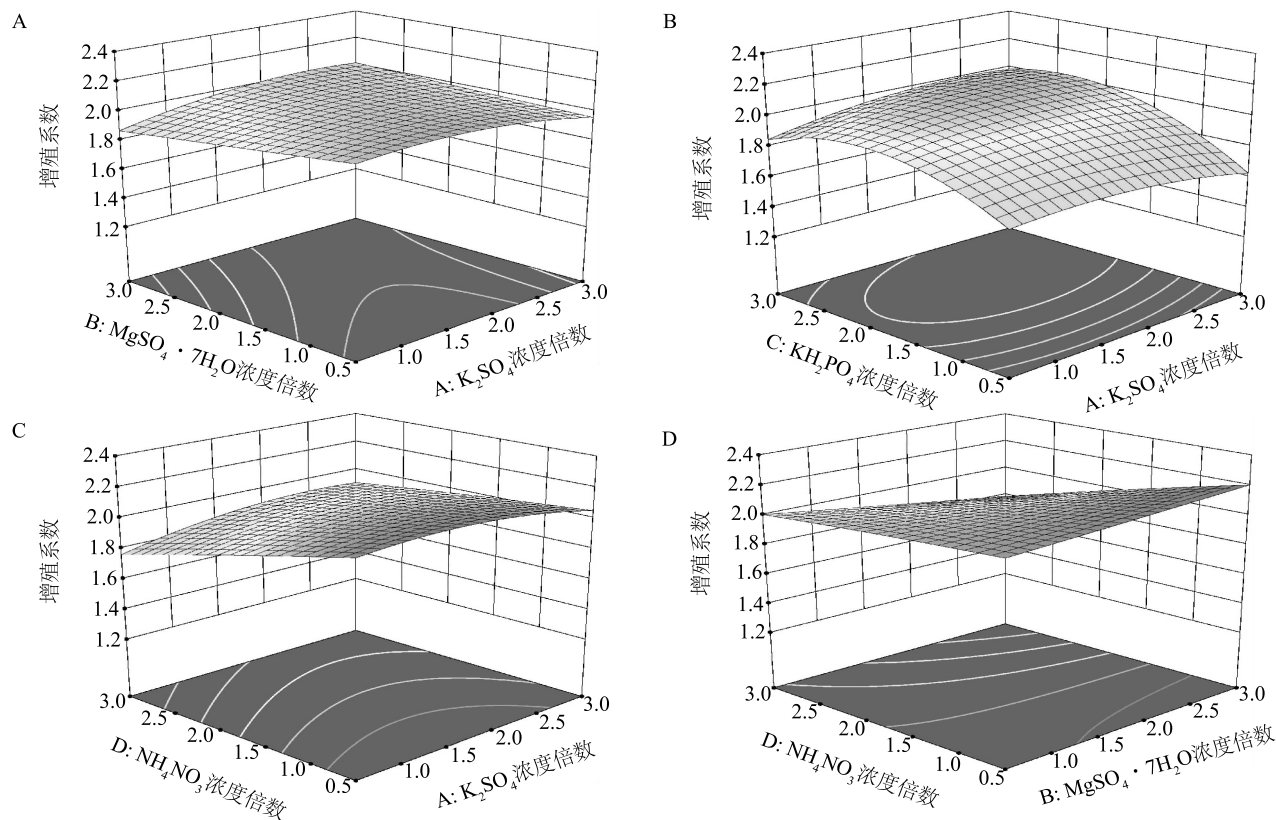
$$Y_2 = 2.998\ 730 - 0.263\ 603x_1 + 0.588\ 062x_2 + 0.264\ 487x_3 - 0.161\ 580x_4 + 0.462\ 537x_5 - 0.007\ 257x_1x_2 + 0.135\ 470x_1x_3 + 0.037\ 222x_1x_4 - 0.031\ 871x_1x_5 + 0.097\ 298x_2x_3 - 0.021\ 955x_2x_4 - 0.046\ 501x_2x_5 - 0.119\ 603x_3x_4 - 0.031\ 871x_3x_5 - 0.042\ 601x_4x_5 - 0.027\ 184x_1^2 - 0.178\ 435x_2^2 - 0.053\ 012x_3^2 + 0.028\ 309x_4^2 + 0.000\ 039x_5^2。$$



A: K_2SO_4 浓度倍数-增殖系数单因素模型; B: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度倍数-增殖系数单因素模型; C: KH_2PO_4 浓度倍数-增殖系数单因素模型; D: NH_4NO_3 浓度倍数-增殖系数单因素模型; E: $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数-增殖系数单因素模型。除所分析的因素外,其他因子均为固定取值[K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数为 2.25 倍]。实线为拟合线型模型,虚线为置信区间(误差区间)。

图 1 5 种大量元素浓度倍数-增殖系数模型

Fig.1 Five models of macro-elements concentration multiples-multiplication coefficient



A: K_2SO_4 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度倍数二元交互图; B: K_2SO_4 - KH_2PO_4 浓度倍数二元交互图; C: K_2SO_4 - NH_4NO_3 浓度倍数二元交互图; D: NH_4NO_3 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度倍数二元交互图。除所分析的双因素外,其他因子均为固定取值[K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数为 2.25 倍]。

图 2 交互作用响应曲面-增殖系数响应曲面模型

Fig.2 Interaction response surface-multiplication coefficient response surface model

分析结果(表4)表明,线性项 x_3 、 x_4 、 x_5 对株高均有极显著影响,二次项 x_1x_3 对株高有显著影响。由 $F(x_4)>F(x_5)>F(x_3)>F(x_1)>F(x_2)$ 可知,5种大量元素浓度对平均株高的影响程度为 $\text{NH}_4\text{NO}_3>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}>\text{KH}_2\text{PO}_4>\text{K}_2\text{SO}_4>\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。具体影响如下:(1) KH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数与株高呈线性正相关(图3C;图3E),相关系数分别为0.264 487与0.462 537; NH_4NO_3 浓度倍数与株高呈线性负相关,相关系数为-0.161 580(图3D); K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数与株高无显著相关性(图3A、图3B)。(2) K_2SO_4 与 KH_2PO_4 浓度倍数的交互作用与株高呈线性正相关(图3F),相关系数为0.135 470。

表4 株高模型显著性检验结果

Table 4 Significance test result of plant height model

因素	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	9.530 0	20	0.476 7	4.190 0	0.012 1	*
x_1	0.559 8	1	0.559 8	4.920 0	0.050 8	
x_2	0.013 2	1	0.013 2	0.116 2	0.740 3	
x_3	1.300 0	1	1.300 0	11.380 0	0.007 1	**
x_4	3.310 0	1	3.310 0	29.090 0	0.000 3	**
x_5	2.060 0	1	2.060 0	18.070 0	0.001 7	**
x_1x_2	0.001 5	1	0.001 5	0.013 5	0.909 8	
x_1x_3	0.665 9	1	0.665 9	5.850 0	0.036 1	*
x_1x_4	0.043 8	1	0.043 8	0.384 7	0.549 0	
x_1x_5	0.064 2	1	0.064 2	0.564 0	0.470 0	
x_2x_3	0.318 3	1	0.318 3	2.800 0	0.125 4	
x_2x_4	0.014 6	1	0.014 6	0.128 2	0.727 8	
x_2x_5	0.127 5	1	0.127 5	1.120 0	0.314 8	
x_3x_4	0.509 1	1	0.509 1	4.470 0	0.060 5	
x_3x_5	0.067 8	1	0.067 8	0.595 5	0.458 1	
x_4x_5	0.103 6	1	0.103 6	0.910 2	0.362 5	
x_1^2	0.008 2	1	0.008 2	0.071 7	0.794 3	
x_2^2	0.347 3	1	0.347 3	3.050 0	0.111 2	
x_3^2	0.023 9	1	0.023 9	0.210 3	0.656 4	
x_4^2	0.009 0	1	0.009 0	0.078 8	0.784 6	
x_5^2	0	1	0	0	0.999 4	
残差	1.140 0	10	0.113 8	—	—	
失拟项	0.738 8	9	0.082 1	0.205 7	0.945 1	
纯误差	0.399 0	1	0.399 0	—	—	
总计	10.670 0	30	—	—	—	

*表示线性项对增殖系数具有显著影响($P\leq 0.05$);**表示线性项对增殖系数具有极显著影响($P\leq 0.01$)。 $x_1\sim x_5$ 见表3注。

取 F 值 >1.0 的二元二次项分析交互作用与响应曲面。比较 F 值大小可知, x_1x_3 、 x_2x_3 、 x_2x_5 和 x_3x_4 这4项对

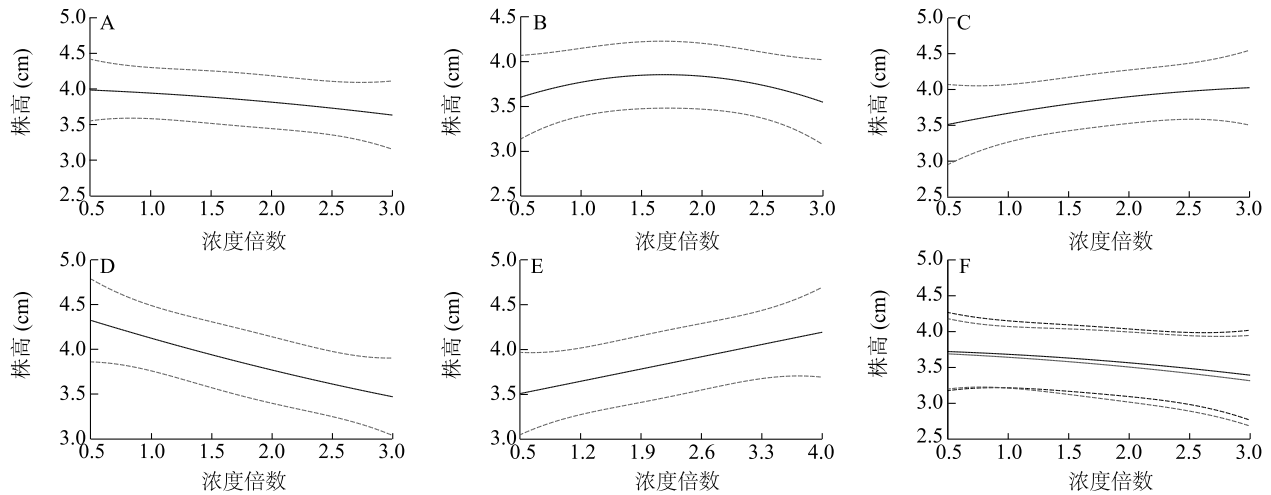
株高的影响程度为: $x_1x_3>x_3x_4>x_2x_3>x_2x_5$ (表4),即 K_2SO_4 与 KH_2PO_4 的交互作用 $>\text{KH}_2\text{PO}_4$ 与 NH_4NO_3 的交互作用 $>\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 KH_2PO_4 的交互作用 $>\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的交互作用。影响如下:(1)当 K_2SO_4 与 KH_2PO_4 浓度同时升高时,株高无明显变化,当 K_2SO_4 浓度较高且 KH_2PO_4 浓度较低时,株高呈下降趋势(图4A)。(2)当 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数为0.5~1.8倍时,株高随 KH_2PO_4 浓度升高而上升;当浓度倍数在1.8~3.0倍时,株高随 KH_2PO_4 浓度升高而下降(图4B)。(3) $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数在0.5~2.0倍时,株高随 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度升高而上升;当浓度倍数在2.0~3.0倍时,株高随 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度升高而下降(图4C)。(4)当 KH_2PO_4 浓度升高、 NH_4NO_3 浓度下降时,株高呈上升趋势并在 KH_2PO_4 浓度倍数为3.0倍、 NH_4NO_3 浓度倍数为0.5倍时达到最高值(图4D)。

2.3 平均茎长模型建立与分析

以平均茎长为 Y_3 ,根据 Design-Expert 12.0 软件拟合试验处理,得到茎长的二次回归方程:

$$Y_3 = 1.301\ 670 + 0.148\ 644x_1 - 0.196\ 973x_2 + 0.071\ 288x_3 - 0.193\ 460x_4 + 0.116\ 001x_5 + 0.060\ 904x_1x_2 + 0.062\ 311x_1x_3 + 0.005\ 765x_1x_4 + 0.009\ 485x_1x_5 + 0.020\ 522x_2x_3 - 0.023\ 159x_2x_4 + 0.021\ 980x_2x_5 - 0.050\ 456x_3x_4 + 0.023\ 133x_3x_5 + 0.002\ 436x_4x_5 - 0.027\ 867x_1^2 + 0.008\ 299x_2^2 - 0.028\ 877x_3^2 - 0.035\ 352x_4^2 - 0.042\ 483x_5^2$$

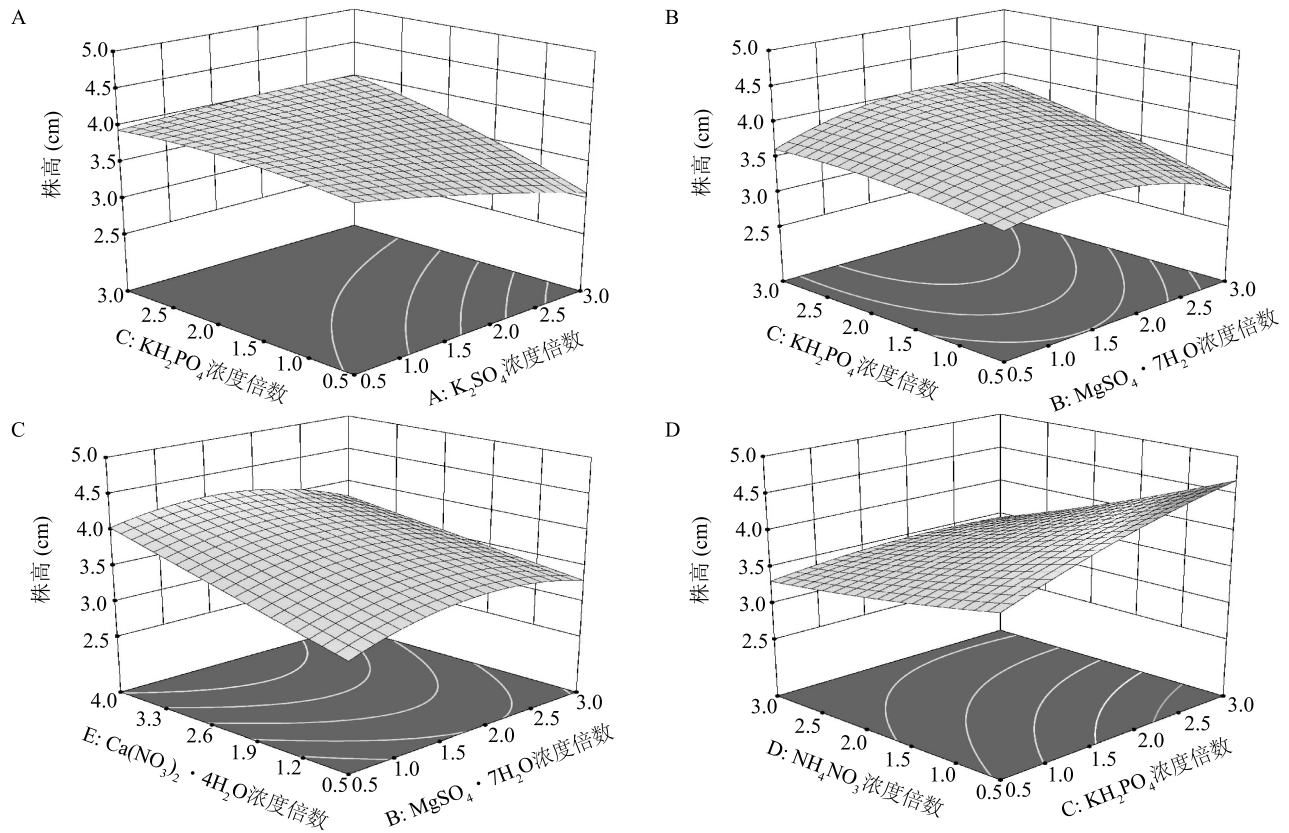
分析结果(表5)表明,线性项 x_3 、二次项 x_1x_2 和 x_1x_3 对平均茎长具有极显著影响,线性项 x_4 、二次项 x_3x_4 、 x_5^2 对茎长具有显著影响。由 $F(x_3)>F(x_4)>F(x_5)>F(x_2)>F(x_1)$ 可知,5种大量元素浓度对平均茎长的影响程度为 $\text{KH}_2\text{PO}_4>\text{NH}_4\text{NO}_3>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}>\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}>\text{K}_2\text{SO}_4$ 。具体影响如下:(1) KH_2PO_4 浓度倍数与茎长呈正线性相关(图5C),相关系数为0.071 288; NH_4NO_3 浓度倍数与茎长呈负线性相关(图5D),相关系数为-0.193 460; K_2SO_4 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数与茎长无显著相关性(图5A、图5B)。(2) K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数的交互作用与茎长呈正线性相关(图5F),相关系数为0.060 904; K_2SO_4 与 KH_2PO_4 浓度倍数的交互作用与茎长呈正线性相关(图5G),相关系数为0.062 311; NH_4NO_3 与 KH_2PO_4 浓度倍数的交互作用与茎长呈负线性相关(图5H),相关系数为-0.050 456。(3) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数对茎长无显著影响(图5E),但其平方值对茎长具有显著影响,相关系数为-0.042 483,茎长随 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数增大呈现先上升后下降的趋势。



A: K_2SO_4 浓度倍数-株高单因素模型; B: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度倍数-株高单因素模型; C: KH_2PO_4 浓度倍数-株高单因素模型; D: NH_4NO_3 浓度倍数-株高单因素模型; E: $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数-株高单因素模型; F: K_2SO_4 和 KH_2PO_4 浓度倍数-株高交互作用模型。除所分析的因素外,其他因子均为固定取值[K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数为 2.25 倍]。实线为拟合线性模型,虚线为置信区间(误差区间)。

图 3 5 种大量元素浓度倍数及元素间交互作用-株高模型

Fig.3 Five models of macro-elements concentration multiples and their interaction-plant height



A: K_2SO_4 - KH_2PO_4 浓度倍数二元交互图; B: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - KH_2PO_4 浓度倍数二元交互图; C: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数二元交互图; D: KH_2PO_4 - NH_4NO_3 浓度倍数二元交互图。除所分析的双因素外,其他因子均为固定取值[K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数为 2.25 倍]。

图 4 交互作用响应曲面图-株高模型

Fig.4 Interaction response surface-plant height model

表5 茎长模型显著性检验结果

Table 5 Significance test result of stem length model

因素	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	0.959 5	20	0.048 0	4.990 0	0.006 2	**
x_1	0.000 0	1	0.000 0	0.002 2	0.963 1	
x_2	0.007 5	1	0.007 5	0.777 4	0.398 6	
x_3	0.191 5	1	0.191 5	19.890 0	0.001 2	**
x_4	0.054 0	1	0.054 0	5.610 0	0.039 4	*
x_5	0.032 7	1	0.032 7	3.400 0	0.094 9	
x_1x_2	0.108 3	1	0.108 3	11.250 0	0.007 3	**
x_1x_3	0.140 9	1	0.140 9	14.640 0	0.003 3	**
x_1x_4	0.001 0	1	0.001 0	0.109 1	0.748 0	
x_1x_5	0.005 7	1	0.005 7	0.590 6	0.460 0	
x_2x_3	0.014 2	1	0.014 2	1.470 0	0.253 0	
x_2x_4	0.016 2	1	0.016 2	1.690 0	0.223 3	
x_2x_5	0.028 5	1	0.028 5	2.960 0	0.116 1	
x_3x_4	0.090 6	1	0.090 6	9.410 0	0.011 9	*
x_3x_5	0.035 7	1	0.035 7	3.710 0	0.083 0	
x_4x_5	0.000 3	1	0.000 3	0.035 2	0.854 9	
x_1^2	0.008 6	1	0.008 6	0.890 7	0.367 5	
x_2^2	0.000 8	1	0.000 8	0.078 1	0.785 6	
x_3^2	0.007 1	1	0.007 1	0.737 6	0.410 5	
x_4^2	0.014 0	1	0.014 0	1.450 0	0.255 8	
x_5^2	0.070 8	1	0.070 8	7.360 0	0.021 8	*
残差	0.096 2	10	0.009 6	—	—	
失拟项	0.082 9	9	0.009 2	0.690 8	0.740 4	
纯误差	0.013 3	1	0.013 3	—	—	
总计	1.060 0	30	—	—	—	

* 表示线性项对增殖系数具有显著影响($P \leq 0.05$); ** 表示线性项对增殖系数具有极显著影响($P \leq 0.01$)。 $x_1 \sim x_5$ 见表3注。

取 F 值 >3.0 的二元二次项分析交互作用与响应曲面。比较 F 值大小可知, x_1x_2 、 x_1x_3 、 x_3x_4 和 x_3x_5 这4项交互作用对茎长的影响程度顺序为: $x_1x_3 > x_1x_2 > x_3x_4 > x_3x_5$, 即 K_2SO_4 与 KH_2PO_4 的交互作用 $>K_2SO_4$ 与 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的交互作用 $>KH_2PO_4$ 与 NH_4NO_3 的交互作用 $>KH_2PO_4$ 与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 的交互作用。具体影响如下:(1) K_2SO_4 与 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为1:1 且同时升高时,茎长先下降后升高(图6A)。(2) K_2SO_4 与 KH_2PO_4 浓度同时增加时,茎长上升,在两者同时达到3.0 倍时茎长达到最高值(图6B)。(3) KH_2PO_4 与 NH_4NO_3 浓度同时升高时,茎长先升高后下降;当 KH_2PO_4 处于高浓度且 NH_4NO_3 处于低浓度时,试管苗茎长最高(图6C)。(4) KH_2PO_4 与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度同时升高时,茎长随之升高;当 KH_2PO_4 浓度较高且 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 浓度倍数约为3.0 倍时,茎长达

到最高值(图6D)。

2.4 WPM 中的5种大量元素配方优化及验证

通过 Design-Expert 12.0 建立模型,将皇冠牡丹试管苗增殖系数目标设为 max,重要程度为5(+++++);茎长目标设为 max,重要程度为4(++++);株高目标设为 max,重要程度为3(+++);叶片数目标设为 max,重要程度为2(++). 根据模型分析结果,可得出适宜皇冠牡丹增殖培养的 WPM 中的5种大量元素的最佳浓度倍数分别为 $x_1 = 2.28$ 、 $x_2 = 2.45$ 、 $x_3 = 2.83$ 、 $x_4 = 0.50$ 、 $x_5 = 3.53$, 即 K_2SO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 的质量浓度分别为2 257 mg/L、907 mg/L、481 mg/L、200 mg/L与1 963 mg/L,此时培养基中离子浓度分别为 NO_3^- 19.13 mmol/L、 NH_4^+ 2.50 mmol/L、 Ca^{2+} 8.31 mmol/L、 K^+ 29.44 mmol/L、 Mg^{2+} 3.68 mmol/L、 PO_4^{3-} 3.53 mmol/L、 SO_4^{2-} 16.63 mmol/L,并通过模型预测出在该条件下皇冠牡丹的增殖系数、株高、茎长与单株叶片数分别为2.24、4.32 cm、1.64 cm、5.31 张。使用该配方进行验证试验(图7),得到皇冠牡丹的增殖系数、株高、茎长与单株叶片数分别为2.43、4.62 cm、1.30 cm、6.75 张,除茎长稍低外,其余指标均高于预测值,并显著优于对照组(1.80、3.84 cm、1.32 cm、4.32 张),这说明该模型可信,本研究得出的5种大量元素的最佳浓度可以用于皇冠牡丹的增殖培养。

3 讨论

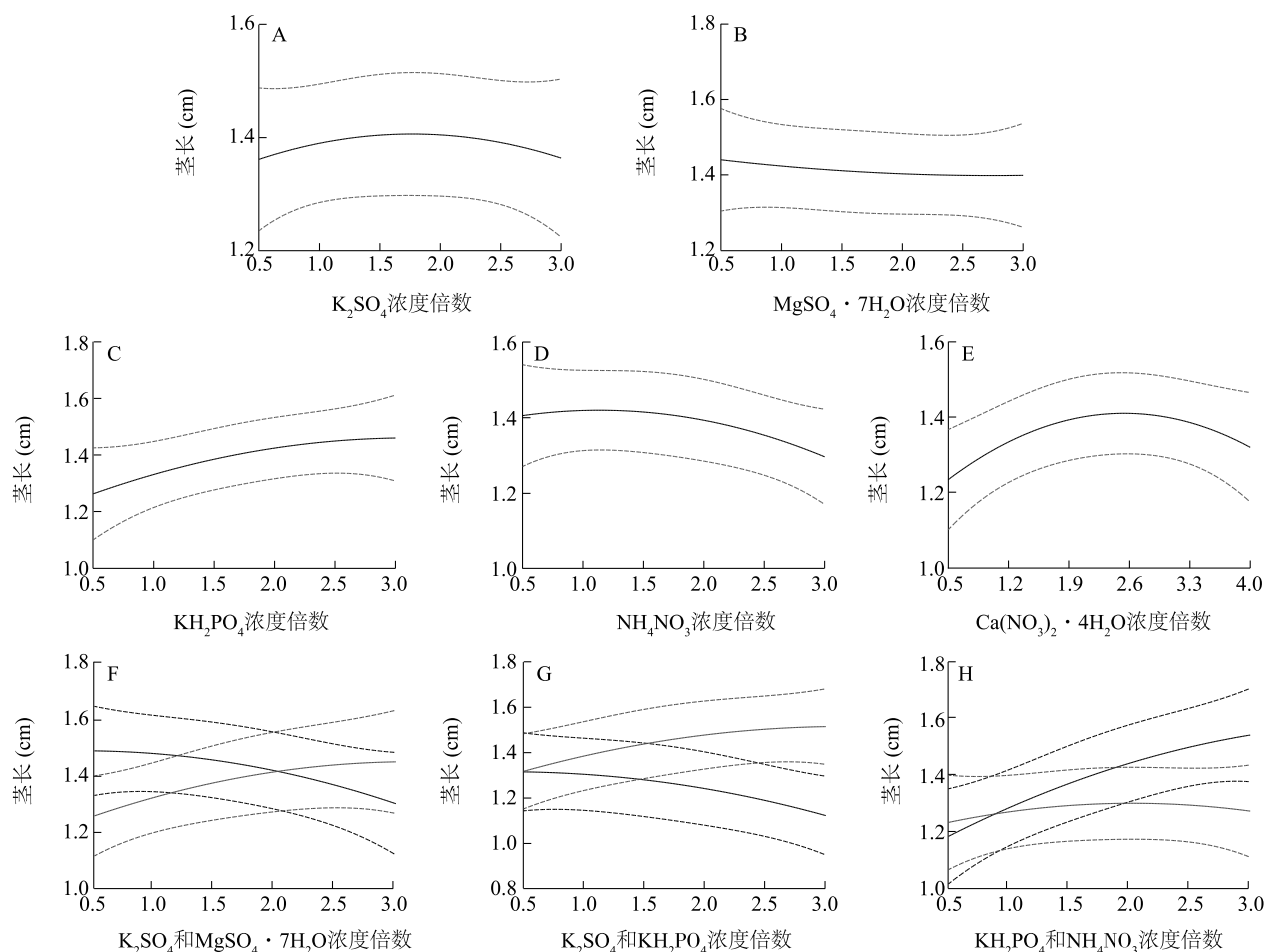
3.1 单因素条件对皇冠牡丹增殖和生长的影响

在对植物进行离体培养时,植物生长发育所需养分主要来源于培养基,基本培养基的成分与浓度对植物有重要影响^[17]。本研究结果表明,WPM 中的5种大量组分中, KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 与 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 对牡丹试管苗的增殖效果有显著或极显著影响,而 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 与 K_2SO_4 对牡丹试管苗的增殖效果无明显影响。

KH_2PO_4 可同时为植物提供磷、钾2种大量元素,在 WPM、MS 与 DKW 等植物培养基中均有添加,增加 KH_2PO_4 用量会促进植物生物量的累积^[18]。本研究发现,随着 KH_2PO_4 浓度上升,试管苗的增殖系数、株高与茎长明显提高,481 mg/L (2.83 倍) KH_2PO_4 为皇冠牡丹试管苗增殖最适浓度,而高浓度 KH_2PO_4 虽然会促进牡丹试管苗株高与茎长增加,但同时会降低增殖系数与叶片数。多数研究结果表

明,不同植物适宜的 KH_2PO_4 浓度差异显著,苹果矮砧木 SH6 继代培养的最适浓度为 $175 \text{ mg/L}^{[19]}$, 杏 (*Prunus armeniaca*) 试管苗培养的最适 KH_2PO_4 浓度为 $125 \text{ mg/L}^{[12]}$, 而油松 (*Pinus tabulaeformis*) 成熟离体胚不定芽诱导所需最适 KH_2PO_4 浓度为 $340 \text{ mg/L}^{[20]}$ 。此外,同种植物的不同品种适宜的 KH_2

PO_4 浓度也存在较大差异,如在使用 MS 的基础上, KH_2PO_4 浓度对白鹤芋属 (*Spathiphyllum*) 不同品种增殖系数的影响存在差异^[21]。因此,皇冠牡丹试管苗增殖阶段的最佳 KH_2PO_4 质量浓度为 481 mg/L (2.83 倍),但对于其他牡丹品种还需要根据实际情况具体分析。



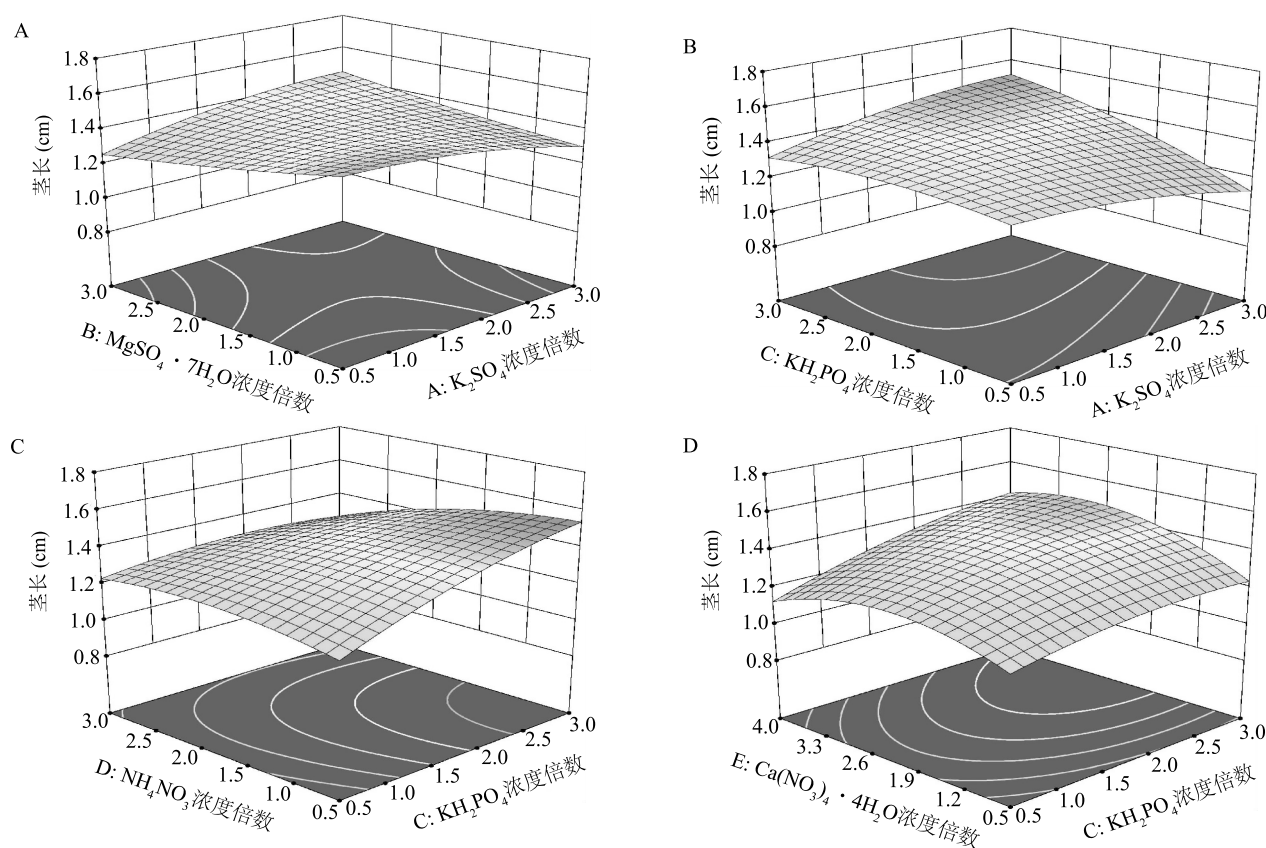
A: K_2SO_4 浓度倍数-茎长单因素模型; B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数-茎长单因素模型; C: KH_2PO_4 浓度倍数-茎长单因素模型; D: NH_4NO_3 浓度倍数-茎长单因素模型; E: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数-茎长单因素模型; F: K_2SO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数-茎长交互作用模型; G: K_2SO_4 和 KH_2PO_4 浓度倍数-茎长交互作用模型; H: KH_2PO_4 和 NH_4NO_3 浓度倍数-茎长交互作用模型。除所分析的因素外,其他因子均为固定取值 [K_2SO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数为 2.25 倍]。实线为拟合线型模型,虚线为置信区间(误差区间)。

图 5 5 种大量元素浓度倍数及元素间交互作用-茎长模型

Fig.5 Five models of macro-elements concentration multiples and their interaction-stem length

钙元素在细胞分裂、细胞壁形成和分生组织生长过程中是非常重要的^[22], 前人研究发现高浓度 Ca^{2+} 对牡丹试管苗的增殖效果有促进作用, 将 MS 培养基中 CaCl_2 浓度提升至原浓度的 2 倍可显著提高 Mme de Vatry 牡丹试管苗的增殖系数, 并减轻茎

尖坏死和玻璃化程度^[6]。然而,不同牡丹品种的最适钙盐浓度具有较大差异,同样以 WPM 作为增殖培养基,正午牡丹的最适 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 1668 mg/L (3.00 倍),此时试管苗的增殖系数可达到 3.0,子代腋芽较为粗壮^[8];而凤丹牡丹的最适 Ca



A: K_2SO_4 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数二元交互图; B: K_2SO_4 - KH_2PO_4 浓度倍数二元交互图; C: KH_2PO_4 - NH_4NO_3 浓度倍数二元交互图; D: KH_2PO_4 - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数二元交互图。除所分析的双因素外,其他因子均为固定取值[K_2SO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NH_4NO_3 浓度倍数为 1.75 倍, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数为 2.25 倍]。

图 6 交互作用响应曲面-茎长模型

Fig.6 Interaction response surface-stem length model

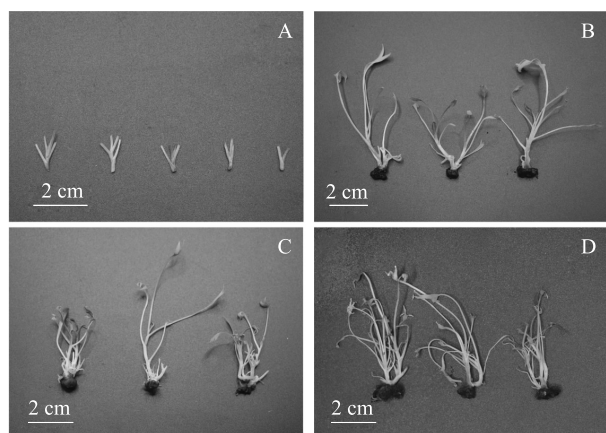
(NO_3)₂浓度为1 544 mg/L(4.00 倍),此时增殖系数可达 3.07^[9],这可能是由牡丹品种间基因型不同所致。本研究发现,随着 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度升高,皇冠牡丹试管苗的增殖系数与茎长呈先升高后下降的趋势,而株高则持续上升,最佳 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为1 963 mg/L(3.53 倍),在该条件下试管苗较为健壮,分枝与茎叶数量较对照显著提高,且茎尖坏死现象得到有效缓解,与前人研究结果一致。因此,在一定范围内提高 WPM 中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度是提高牡丹试管苗增殖效果的有效途径,而其具体的作用机理也值得后续研究深入探索。

3.2 交互作用对皇冠牡丹试管苗有增殖和生长的影响

本研究结果显示, K_2SO_4 与 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 与 NH_4NO_3 的交互作用对试管苗增殖效果影响显著或极显著。因电荷存在动态

平衡,培养基中大量元素间的交互作用实则为离子间的交互作用^[23],因此本研究以分析离子间的交互作用与元素对植物的影响为主。

K_2SO_4 与 KH_2PO_4 的交互作用对株高、茎长均有显著或极显著影响,当二者浓度同时增大时,增殖系数呈先升高后下降的趋势,株高与茎长呈升高趋势。因二者的阳离子相同,其交互作用实则为 SO_4^{2-} 与 PO_4^{3-} 间的交互作用, SO_4^{2-} 提供硫元素,含硫氨基酸不仅是构成蛋白质的主要成分,还是细胞内某些化合物合成的介质之一^[24]; PO_4^{3-} 提供磷元素,磷是植物必需的大量元素,参与磷脂、核酸、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)和辅酶等大分子合成^[25]。已有研究结果表明,施磷能显著提高牡丹植株叶片的叶绿素含量并促进光合作用^[26],而硫是植物光合作用过程中的重要组分,二者均与光合作用有关;Misson 等^[27]发现,在低磷环境下植物会加大对硫酸盐的吸收转运



A: 试验材料, 皇冠牡丹增殖培养前的健壮单芽; B: 第 28 组试管苗 (最优处理组); C: 第 31 组试管苗 (WPM 原浓度对照); D: 预测最优配方验证组试管苗。

图 7 皇冠牡丹增殖培养基优化试验

Fig. 7 Optimization experiment of proliferation medium for *Paeonia x lemoinei* 'Yellow Crown'

以合成磷脂, 而磷脂可以在一定程度上代替磷脂, 说明硫、磷元素在功能上存在重叠性, 存在相互影响。目前关于 SO_4^{2-} 与 PO_4^{3-} 在植物体内的交互作用尚未见报道, 但从本研究结果可以看出二者存在协同的交互作用, 适宜的 SO_4^{2-} 与 PO_4^{3-} 浓度比会促进试管苗的增殖。但本研究也发现, 当二者浓度同时超过 2.50 倍后, 增殖系数与叶片数会出现下降趋势, 这可能是过高的离子浓度对植物产生了毒害作用。因此, 在提高培养基内营养物质浓度以促进试管苗增殖的过程中, 应注意保持培养基中离子浓度平衡, 避免过高的浓度对植物生长产生负面影响。

本研究结果显示, K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的交互作用对茎长有极显著影响, 当两者浓度同时上升时, 茎长呈先下降后上升的趋势。已有研究结果表明钾元素与镁元素存在交互作用, 高浓度钾会抑制植物对镁的吸收, 并导致植物因缺镁而生长不良^[28]。这可能与二者相似的化学性质产生的拮抗作用有关^[29], 而对细胞膜上相同转运蛋白的竞争是二者产生拮抗作用的主要原因^[30], 且钾、镁间的交互作用会影响植物对其他养分如氮、磷、钙等的积累^[31-32]。本研究中当 K_2SO_4 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度倍数介于 0.5~2.0 时, 茎长呈下降趋势, 这与前人研究发现的钾、镁元素间的拮抗作用相符合; 而当二者浓度倍数大于 2.0 后, 茎长呈上升趋势, 这可能是由于

更高浓度的钾、镁元素能抵消一部分拮抗作用对试管苗产生的负面影响。因此, 在改良培养基中大量元素配方时应重视矿质元素间的平衡关系, 尽量避免钾、镁元素间产生拮抗作用, 而关于钾、镁元素在牡丹体内的作用机理则需要进一步研究。

本研究结果显示, KH_2PO_4 与 NH_4NO_3 间的交互作用对茎长有显著影响, 当 KH_2PO_4 浓度上升、 NH_4NO_3 浓度下降时, 茎长呈升高趋势。前人研究发现植物对二者需求的差异可能与基因型、统计方式和使用浓度范围有关^[33-35]。Akin 等^[11] 在对榛子 (*Corylus heterophylla*) 所使用的 DKW 培养基中的离子浓度进行响应面法优化时也发现相似情况, 即当 KH_2PO_4 为高浓度、 NH_4NO_3 为低浓度时, 榛子 Wepster 能得到较高的芽质量, 榛子 Dorris 和 Wepster 能达到理想芽长。这可能是由于 NH_4NO_3 与 KH_2PO_4 在产生交互作用时, 随着两者浓度升高, NH_4NO_3 与 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 同时产生了反应, 而 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 NH_4NO_3 同时为试管苗提供氮元素, 降低 NH_4^+ 与 NO_3^- 比值能够显著促进牡丹试管苗增殖^[7-9], 本研究据此优化得出结果, 将 NH_4NO_3 浓度降低为基本 WPM 中浓度的 0.50 倍后, 增殖效果得到显著提升, 与前人研究结果相似。

3.3 铵态氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和硝态氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 浓度比值对皇冠牡丹增殖的影响

氮是植物生长过程中需求量最大的矿质元素, 是组成蛋白质和核酸的必要成分。WPM 为木本植物专用培养基^[36], 供给植物的主要氮源为铵态氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和硝态氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$), 其中 NH_4NO_3 提供 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, NH_4NO_3 和 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 共同提供 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。二者虽共同提供氮元素, 但对植物生长的作用存在差异, 关于培养基中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值对试管苗增殖效果的影响已有诸多研究报道, 结果显示, 较低的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比会促进试管苗的增殖与生长^[11, 37-40]。在牡丹研究中也发现类似现象, 例如 Li 等^[7] 通过降低 MS 培养基中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度比值以促进牡丹试管苗增殖, 而后有试验通过增加培养基中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度, 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值降低的同时提高培养基中 Ca^{2+} 的浓度, 显著提高了牡丹试管苗的增殖效果^[8-9]。这表明降低培养基中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值有利于牡丹试管苗的增殖, 这可能是由于高浓度 NH_4^+ 会促进植物吸收过多水分, 从而导致试管苗枝条坏死、存活率降低^[40-41], 同

时较低的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值可以更好地缓冲培养基的 pH,减少培养基 pH 波动对试管苗的影响^[42]。本研究也得到类似结果,将 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度提升至 3.50 倍, NH_4NO_3 降低至 0.50 倍后,试管苗增殖系数得到显著提升,并且茎尖坏死现象得到缓解。综上可见,WPM 中原有的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值无法满足牡丹试管苗的增殖需要,在一定范围内提高培养基中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 浓度并降低 NH_4NO_3 浓度,是促进皇冠牡丹试管苗增殖生长的有效途径。当然,不同牡丹品种的适宜浓度存在较大差异,关于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度比值对牡丹试管苗产生影响的机理研究还尚在探索阶段,还需进一步研究。

4 结 论

本研究基于响应面法,优化得到皇冠牡丹增殖培养专用 WPM 大量元素配方 [K_2SO_4 2 257 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 907 mg/L、 KH_2PO_4 481 mg/L、 NH_4NO_3 200 mg/L、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 963 mg/L],建立了高效的皇冠牡丹增殖培养体系,在该条件下试管苗的增殖效率(增殖系数 2.43、株高 4.62 cm、茎长 1.30 cm、叶片数 6.75 张)得到显著提高。

参考文献:

- [1] LI S S, YUAN R Y, CHEN L G, et al. Systematic qualitative and quantitative assessment of fatty acids in the seeds of 60 tree peony (*Paeonia* section *Moutan* DC.) cultivars by GC-MS [J]. Food Chemistry, 2015, 173(15): 133-140.
- [2] 李玉龙,吴德玉,潘淑龙,等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报,1984(8): 500-502.
- [3] WEN S S, CHEN L, TIAN R N. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*): a review [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2020, 141(4): 1-14.
- [4] 黄素姣. 三个牡丹品种的离体快繁技术研究[D]. 北京:北京林业大学,2020.
- [5] BERUTO M, CURIR P. *In vitro* culture of tree peony through axillary budding [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2007: 477-497.
- [6] BOUZA L, JACQUES M, MIGINIAC E. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Mme de Vatry’: developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase [J]. Scientia Horticulturae, 1994, 3(57): 241-251.
- [7] LI P, CHENG P Y. Basal medium with modified calcium source and other factors influence on shoots culture of tree peony [J]. Acta Hortie, 2008(766): 383-390.
- [8] 文书生,成仿云,钟 原,等. ‘正午’牡丹微繁殖体系的建立 [J]. 植物科学学报,2016,34(1): 143-150.
- [9] 王 新,成仿云,钟 原,等. 凤丹牡丹鳞芽离体培养与快繁技术 [J]. 林业科学,2016,52(5): 101-110.
- [10] 武爱龙,何 冰,吴建阳,等. 响应面法在植物组织培养中的应用进展 [J]. 安徽农学通报,2020,26(17): 21-22.
- [11] AKIN M, EYDURAN E, REED B M. Use of RSM and CHAID data mining algorithm for predicting mineral nutrition of hazelnut [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2017, 128(2): 303-316.
- [12] KOVALCHUK I Y, MUKHITDINOVA Z, TURDIYEV T, et al. Modeling some mineral nutrient requirements for micropropagated wild apricot shoot cultures [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2017, 129(2): 325-335.
- [13] 曹 剑,黄志伟,李华,等. 利用响应面法优化毛叶木姜子茎段腋芽诱导条件 [J]. 分子植物育种,2022,20(21): 7209-7215.
- [14] 蔡正禹,文书生,田如男. 响应面法优化欧洲冬青 ‘Ferox Argentea’ 增殖培养基大量元素配方 [J]. 东北林业大学学报, 2023, 51(6): 53-63.
- [15] 黄弄璋. ‘正午’与‘凤丹’牡丹的离体增殖与生根移栽技术研究 [D]. 北京:北京林业大学,2017.
- [16] 邱金梅. 牡丹离体快繁技术的研究 [D]. 北京:北京林业大学, 2010.
- [17] 文书生,何绒绒,郑佳康,等. 牡丹组织培养技术研究进展 [J]. 林业科学,2018,54(10): 143-155.
- [18] EL-HAWAZ R F, BRIDGES W C, ADELBERG J W, et al. *In Vitro* growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0118912.
- [19] 杨雨璋,周贝贝,李民吉,等. 苹果矮化砧木 ‘SH6’ 组培快繁培养基大量元素配方的优化 [J]. 果树学报,2020,37(1): 40-49.
- [20] 董丽芬,肖 颖,邵崇斌. 氮、磷、钾元素形态配比及浓度对油松胚培养的影响 [J]. 西北林学院学报,2006,21(3): 64-66.
- [21] 朱根发. 白鹤芋属观赏植物的组织培养和快速繁殖技术研究 [J]. 中国农学通报,2003,19(3): 75-76.
- [22] HIRSCHI K D. The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal [J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2438-2442.
- [23] NIEDZ R P, EVENS T J. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) [J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 126.
- [24] 王庆仁,林 葆. 植物硫营养研究的现状与展望 [J]. 中国土壤与肥料,1996(3): 16-19.
- [25] PANG J Y, RYAN H M, HANS L, et al. Phosphorus acquisition and utilisation in crop legumes under global change [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45: 248-254.
- [26] 单佩佩. 牡丹体内外磷循环和根际微生物种群构成对外源磷素的响应 [D]. 泰安:山东农业大学,2016.
- [27] MISSON J, RAGHOTHAMA K G, JAIN A, et al. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation [J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(33): 11934-11939.
- [28] LI H X, CHEN Z J, ZHOU T, et al. High potassium to magnesium ratio affected the growth and magnesium uptake of three tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(12): 2813-2821.
- [29] VIADÉ A, FERNÁNDEZ-MARCOS M L, HERNÁNDEZ-NISTAL J, et al. Effect of particle size of limestone on Ca, Mg and K contents in soil and in sward plants[J]. Scientia Agricola, 2011, 68: 200-208.
- [30] KAMIYA T, YAMAGAMI M, HIRAI M Y, et al. Establishment of an in planta magnesium monitoring system using *CAX3* promoter-luciferase in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(1): 355-363.
- [31] 薛欣欣, 魏云霞, 王文斌, 等. 钾、镁交互作用对橡胶幼苗生长及养分吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2020, 26(10): 1870-1878.
- [32] FARHAT N, ELKHOUNI A, ZORRIG W, et al. Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38(6): 145.
- [33] HAND C, MAKI S, REED B M. Modeling optimal mineral nutrition for hazelnut micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 119(2): 411-425.
- [34] AKIN M, EYDURAN S P, EYDURAN E, et al. Analysis of macro nutrient related growth responses using multivariate adaptive regression splines[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2020, 140(3): 661-670.
- [35] REED B M, WADA S, DENOMA, J. et al. Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm.[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2013, 49(3): 343-355.
- [36] LLOYD G, MCCOWN B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture [J]. Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society (USA), 1980, 30: 421-427.
- [37] ALANAGH E N, GAROOSI G, HADDAD R, et al. Design of tissue culture media for efficient *Prunus* rootstock micropropagation using artificial intelligence models[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 117(3): 349-359.
- [38] PARK K, JANG B K, LEE H M, et al. Effective Propagation of *Selaginella tamariscina* through optimized medium composition[J]. Agronomy, 2021, 11(3): 578.
- [39] JAMSHIDI S, YADOLLAHI A, AHMADI H, et al. Predicting *In vitro* culture medium macro-nutrients composition for pear rootstocks using regression analysis and neural network models [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7. DOI: 10.3389/fpls.2016.00274.
- [40] POOTHONG S, REED B M. Optimizing shoot culture media for *Rubus* germplasm: the effects of NH_4^+ , NO_3^- , and total nitrogen [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2016, 52(3): 265-275.
- [41] GAGO J, PÉREZ-TORNERO O, LANDÍN M, et al. Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neuro-fuzzy logic: a practical case of data mining using apricot databases [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(15): 1858-1865.
- [42] MARTIN S M, ROSE D, HUI V. Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole sou. [J]. Canadian Journal of Botany, 1977, 55(22): 2838-2843.

(责任编辑:陈海霞)