

毛白杨无性系 85 号高效再生系统的建立

李科友¹, 朱海兰¹, 赵忠¹, 樊军锋¹, 李玲²

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国林业科学研究院林业研究所)

摘 要:应用均匀设计和正交试验筛选出毛白杨无性系 85 号叶片不定芽诱导最佳组合为 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA, 诱导不定芽生根最适宜的培养基及激素配比为 1/2MS+0.50 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA。此条件下, 叶片平均产生不定芽 21.2 个, 不定芽生根率可达到 99%, 生根数为 7 条。该研究为毛白杨无性系 85 号工厂化育苗和利用叶盘法开展基因转化培育抗逆新品种奠定了良好基础。

关键词:毛白杨无性系 85 号; 植株再生; 组织培养

Establishment of an Efficient Regeneration System for *Populus tomentosa* Clone-85 // LI Ke-you, ZHU Hailan, ZHAO Zhong, FAN Jun-feng, LI Ling

Abstract: To optimize the regeneration system of *P. tomentosa* Clone-85, influences of the different medium and proportion of hormone on adventitious bud and root for leaf-explants were studied by uniform design and orthogonal experimental design. The results demonstrated that the optimal medium and proportion of hormone was MS+0.5 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA for bud differentiation, and 1/2MS+0.05 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA for adventitious root. Using the optimal regeneration system of *P. tomentosa* Clone-85, the average 21.2 buds was induced in each leaf, the rooting rate was 99%, and the average root number was 7. The results laid a sound foundation for regeneration of *P. tomentosa* 85 in industry and gene transformation by leaf disc method.

Key words: *Populus tomentosa* Clone-85; Plantlet regeneration; Tissue culture

First author's address: College of Forestry, Northwest A & F University, 712100, Yangling, Shanxi, China

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)是我国特有的乡土树种,具有生长速度快、轮伐期短、蓄积量大和抗病虫能力强等优良性状,在水土保持和维护生态平衡方面发挥重要作用^[1]。通常采用嫁接、根繁、扦插等繁殖方法进行育苗,但这些方法普遍存在繁殖速度慢、成活率低等缺点^[2]。利用组织培养可以加快苗木的繁殖速度,短期内获得大量苗木,同时,也是杨树基因工程成功的先决条件。

毛白杨无性系 85 号(*Populus tomentosa* Clone-85)是原陕西省林业科学研究院在我国毛白杨分布中心陕西关中地区,依据形态特征、注重形质指标,兼顾生长状况、抗病特性等择优选择,经过 14 年研究选育出的白杨派优良无性系之一。具有生长迅速,干形通直,材质好,抗溃疡病和抗旱性强等特征,是西北地区重要的造林树种。有关毛白杨再生系统的研究虽有报道^[3-6],但不同无性系在植株再生能力上有很大差异,对于每种具体的材料而言,必须依据植株的生

理特点,建立适合其自身特点的高效再生系统^[2,7]。关于毛白杨无性系 85 号再生系统的建立和优化未见报道。本研究通过对影响再生率的几个主要因素的研究,建立高效的毛白杨无性系 85 号再生系统,为该无性系工厂化育苗和遗传转化奠定条件。

1 材料与方法

1.1 材 料

取 80 cm 健壮毛白杨无性系 85 号越冬苗干若干段,放入 27℃ 温室水培,每 3 d 换水 1 次。14 d 后,待茎段上嫩芽长至 5~10 cm 时,剪取嫩茎,用 0.1% 升汞消毒 10 min,用无菌水冲洗 3 次后放入 MS 培养基中培养。2 个月后,取嫩茎、嫩茎上新长出的无菌叶片作为外殖体。

1.2 方 法

1.2.1 再生系统的优化

(1) 外殖体的选择。将得到的毛白杨无性系 85 号的嫩茎、嫩叶片,接种于 MS 培养基,并附加一定浓度的 6-BA 和 NAA,考察不同外殖体对不定芽诱导的影响。

(2) 不定芽的诱导。选取 6-BA、NAA、蔗糖的不同浓度及不同培养基作为参选因素,分别标记为 A、

收稿日期:2007-10-10

修回日期:2007-12-08

基金项目:科技部国家转基因植物研究与产业化专项“耐盐抗虫转基因杨树新品种选育”(编号:JY03-B-26-02)。

第一作者简介:李科友(1962-),男,副教授,博士,主要从事生物技术和植物化学研究。E-mail: likeyou2675@sina.com

应用研究

B、C 和 D, 前 2 个因素取 6 个水平, 蔗糖取 3 个水平, 基本培养基取 2 个水平即 2 种培养基, 选用均匀设计表 $U_6(6^4)$ 安排不定芽诱导的试验方案(表 1)^[8]。将无菌叶片沿主脉横切后放入以上 6 个处理中, 每个培养皿设置 1 个处理, 每处理用 40 片叶片。将培养皿放在温度为 25~27℃, 光照长度为 16 h 的培养间培养, 光照强度为 2 000~3 000 lx。每 14 d 换 1 次新鲜培养基。60 d 时, 统计各处理叶片切口上产生的诱导芽数量, 对测定结果运用均匀设计软件和 DPS 软件处理数据, 进行统计分析, 筛选最佳不定芽诱导培养基及配比。

表 1 $U_6(6^4)$ 均匀设计试验方案

实验号	因素及水平			
	6-BA (A)/mg·L ⁻¹	NAA (B)/mg·L ⁻¹	蔗糖 (C)/g·L ⁻¹	基本培养基(D)
1	1(0.10)	2(0.05)	3(30.00)	2(MS)
2	2(0.50)	4(0.15)	3(30.00)	1(1/2MS)
3	3(1.00)	6(0.25)	2(20.00)	2(MS)
4	4(1.50)	1(0.01)	2(20.00)	1(1/2MS)
5	5(2.00)	3(0.10)	1(10.00)	2(MS)
6	6(2.50)	5(0.20)	1(10.00)	1(1/2MS)

(3) 不定根的诱导。将培养基、生长素、细胞分裂素作为 3 个试验因素, 每因素设 3 个水平, 设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验, 共 9 个处理(表 2)^[8]。将叶片上诱导产生的长度为 1 cm 左右的芽苗放入以上生根处理中, 每处理放入 40 不定芽。培养条件为 (25±1)℃, 每天光照 12~14 h, 光照强度为 2 000~3 000 lx。每 14 d 换 1 次新鲜培养基。30 d 左右根据各处理生根数量、根长、根粗及芽苗底端生根处愈伤组织大小, 筛选最适生根培养基及激素配比。

表 2 试验因素和水平 /mg·L⁻¹

水平	培养基种类	2,4-D	NAA	IBA
1	MS	0.50	0.10	0.01
2	1/2MS	0.10	0.25	0.05
3	1/4MS	0.00	0.50	0.10

2 结果与分析

2.1 外殖体的选择

本研究将毛白杨无性系 85 号的嫩茎、嫩叶片, 接种于 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA 培养基中, 在温度为 25~27℃, 光照长度为 16 h 的培养间培养。重复 2 次, 28 d 左右, 不定芽伸长至 0.2~0.3 cm, 并长出 1~2 片叶子。此时, 统计各处理平均诱导生芽数, 并列入表 3 中。从表 3 可知, 毛白杨无性系 85 号嫩茎、叶片都能诱导出不定芽, 但叶片比嫩

茎的平均诱导率和增殖率都较高。因此, 本研究选叶片作为外殖体建立高效再生和遗传转化体系。

表 3 不同外殖体对不定芽诱导的影响 /mg·L⁻¹

外殖体	接种数	平均诱导率/%	不定芽数	平均增殖率/%
嫩茎	20	70.0±2.0	84	6.0
叶片	20	98.0±1.0	140	7.4

2.2 叶片不定芽诱导的最适组合

将毛白杨无性系 85 号无菌叶片沿主脉横切放入 $U_6(6^4)$ 均匀设计各种处理中后, 约 14 d 左右, 叶片切口突起, 出现肉眼可见的愈伤组织。21 d 左右, 部分处理愈伤组织分化产生小米粒大小芽点, 部分愈伤组织体积增大, 但并不分化出芽点。28 d 左右, 芽点伸长至 0.2~0.3 cm, 并长出 1~2 片叶子。56 d 左右, 芽苗长度可达 0.5~1.2 cm, 并出现 2~4 片叶子。此时, 统计各处理平均诱导生芽数及生长状态, 并列入表 4 中。

表 4 $U_6(6^4)$ 均匀设计各种处理组合诱导叶片外殖体生芽效果比较

试验编号	处理叶片数	芽点出现时间/d	每叶片平均生芽数	芽苗状态
1	40	20	12.3	
2	40	20	15.2	生长健康,
3	40	20	18.1	长度大小为
4	40	21	12.2	0.8~1.2
5	40	21	14.5	cm
6	40	21	12.6	

注: (1) 表中数据为实验 60 d 时的统计结果; (2) MS 培养基根据文献[9]配制; (3) 1/2MS 培养基: 大量元素减半, 其余成分同 MS。后同。

2.2.1 回归分析

对测定结果运用均匀设计软件和 DPS 软件处理数据, 进行回归分析结果见表 5。由表 5 可知因素 B 的显著性概率 P 值最大 ($P=0.67075$), 是最不显著的因素, 剔除 B 后重新分析得到新的方差分析 ($F=79.651 > F_{0.01}(4, 1)=13.654$) 和回归系数见表 6。

表 5 第 1 次回归系数

变量	自由度	回归系数	标准误	T 值	显著水平
INTERCEPT	1	-1.435 07	1.916 09	-0.721 83	0.593 89
A	1	-0.445 96	0.265 10	-1.637 64	0.247 35
B	1	0.034 51	0.067 89	0.492 29	0.670 75
C	1	0.683 65	0.478 23	1.507 05	0.281 24
D	1	2.420 22	0.859 78	2.927 92	0.110 12

表 6 回归系数

变量	自由度	回归系数	标准误	T 值	显著水平
INTERCEPT	1	-1.601 33	1.505 16	-1.149 74	0.380 94
A	1	-0.434 72	0.234 81	-2.025 15	0.148 63
C	1	0.716 62	0.363 42	1.962 52	0.164 78
D	1	2.443 40	0.642 94	3.739 66	0.131 48

由回归系数表可知:每个自变量的显著性概率 P 值都小于 0.2,说明因素 A、C、D 对不定芽诱导都是显著有效的。因素 D 影响最大($P=0.13148$),达极显著水平,因素 B 的影响最小,未达显著水平,各因素的影响显著性依次为:D、A、C、B。得到的回归方程为: $lgy = 1.65103 - 0.431723 \lg A + 0.72662 \lg C + 2.47340 \lg D$ 。

2.2.2 水平的优化

根据两次逐步回归,并剔除不显著试验因素 NAA 后,经试验优化后的结果:因素 A (即 6-BA) 的最优条件为 0.50 mg/L;因素 C (即蔗糖) 的最优条件为 30 g/L;因素 D (即培养基) 的最优条件为 2;因素 B (即 NAA) 对芽的诱导没有显著影响,从节约成本的角度取其水平为 0.01 mg/L。因此,不定芽诱导的最佳组合为 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖。

2.2.3 验证试验

对均匀设计优化确定的毛白杨无性系 85 号不定芽诱导的最佳组合 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖,进行验证试验,叶片不定芽数平均值为 21.2。

2.3 不定根诱导的最适组合

为选择适合的生根培养基和激素,按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计了 9 种处理,生根试验结果见表 7。实验结果表明:无论是极差分析还是方差分析,均说明基本培养基和 NAA 是提高不定芽生根诱导率的主要因子。

表 7 不同培养基及 IBA、NAA 和 2,4-D 组合诱导生根效果比较

试验编号	培养基种类	2,4-D /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	第 30 天芽苗生根率/% X_1	X_2
1	MS	0.50	0.10	0.01	27.5	35.0
2	MS	0.10	0.25	0.05	75.0	56.4
3	MS	0	0.50	0.10	87.5	66.7
4	1/2MS	0.50	0.25	0.10	87.5	75.0
5	1/2MS	0.10	0.50	0.01	96.0	98.5
6	1/2MS	0	0.10	0.05	85.7	87.5
7	1/4MS	0.50	0.50	0.05	75.0	75.0
8	1/4MS	0.10	0.10	0.10	50.3	55.0
9	1/4MS	0	0.25	0.01	66.7	50.0
K_1	358.1	385.0	351.0	383.7		
K_2	530.2	431.2	410.6	454.6		
K_3	372.0	444.1	498.7	422.0		
R	158.2	59.1	147.7	38.3		

注:1/4MS 培养基中大量元素、钙元素含量为 MS 的 1/4,蔗糖用量减半,其余成分同 MS 培养基。

通过极差和交互作用分析(表 8),毛白杨无性系 85 号芽苗最佳诱导生根培养基及激素配比为 1/2 MS

+0.50 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA。此条件下芽苗在培养 30 d 时的生根率可达到 99%,每个芽苗生根数为 7 条。

表 8 不同培养基、IBA 和 NAA 浓度对不定根形成的差异性比较

基本培养基	每芽苗平均生根数	2,4-D 浓度 /mg·L ⁻¹	每芽苗平均生根数	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	每芽苗平均生根数	IBA 浓度 /mg·L ⁻¹	每芽苗平均生根数
MS	4.7 a	0.5	4.5 a	0.10	4.3 a	0.01	4.0 a
1/2MS	6.7 b	0.1	4.3 a	0.50	7.0 b	0.05	5.3 a
1/4MS	3.4 c	0	5.1 a	1.00	5.0 a	0.10	3.3 a

注:表中字母表示邓肯氏检验 $\alpha=0.05$ 显著水平,凡是相同字母标记的为差异不显著,不同字母标记的为差异显著。

3 结论与讨论

理论上每一个植物细胞都具有再生成完整植株的能力,即细胞全能性。但在实际应用中,组织的再生受植株基因型、性别及年龄、组织来源、生理状态等多种因素的影响。一般来说,外殖体越幼嫩,植株越容易再生^[10]。本研究采用毛白杨无性系 85 号新生的无菌叶片作为外殖体优化再生系。

MS 培养基富含植物所需的盐类,杨树组织培养中主要用于芽的诱导。1/4MS 和 1/2MS 常用于诱导杨树试管苗的生根,这是由于高盐浓度对某些杨树的生根不利,因此应根据材料来源、实验目的来选择培养基。生长素主要促进细胞分裂、诱导愈伤组织产生和促进生根等,在杨树上常用的有:NAA、IBA 和 2,4-D。NAA 和 IBA 广泛用于杨树的生根,并能与细胞分裂素互作促进芽的增殖。2,4-D 对杨树愈伤组织的诱导有效,对器官的分化不利。细胞分裂素主要促进细胞分裂、改变顶端优势和促进芽的分化等。杨树上常用的有 KT、6-BA、ZT 和 2-ip 等。6-BA 在杨树芽的诱导方面应用很广,已诱导十余种杨树成苗,但也有报道认为它不利于某些杨再生芽^[11]。通常杨树组培中使用蔗糖,用量为 20.0~30.0 g/L。光周期由植株的生理特性决定,以 16 h 光照居多,24 h 或 12 h 光照也有报道^[7]。光强影响某些杨树的形态发生。有时弱光或全黑会促进愈伤组织分化和根的再生^[9]。温度对杨树植株的生长也有一定的影响,温度过高会导致分化芽出现玻璃化苗,低则苗生长缓慢。

毛白杨无性系 85 号不定芽诱导的最佳培养基及激素配比为 MS+0.50 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖,叶片平均产生不定芽数 21.2 个。毛白杨无性系 85 号不定芽最佳诱导生根培养基及激素配比为 1/2 MS+0.50 mg/L NAA+0.05 mg/L IBA。此条件下芽苗在培养 30 d 时的生根率可达 99%,每个芽苗生根数为 7 条。该研究为利用叶盘法开展毛白杨

无性系 85 号基因转化培育抗逆新品种奠定了基础。

在植物组织培养过程中,常需要进行激素种类和浓度的配比试验,工作量相当大。正交试验设计、正交拉丁方设计在因素、水平数较多时仍存在试验次数多、规模大等问题。在多因素、多水平的试验中采用均匀设计,具有试验次数少、可操作性强、节约时间和精力、迅速达到优化因素的效果,符合多因素复杂试验对试验条件一致性的要求,试验准确性高。在植物快繁中应用均匀设计探索培养基配方,将极大地提高工作效率,可应用于植物激素种类和浓度的筛选,以及探讨基本培养基的组成等,从而使植物组织培养的条件得到有效的控制^[12]。

参考文献

- [1]徐伟英.杨树[M].哈尔滨:黑龙江人民出版社,1988.
- [2]张存旭,张瑞娥,赵忠.不同无性系毛白杨离体植株再生能力比较研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(8):71-74.
- [3]吴耀辉,马彩萍.截叶毛白杨叶组织培养成苗的研究[J].西北植物研究,1983,3(1):65-69.
- [4]孙学新,邓煜.毛白杨优树快速繁殖的研究[J].甘肃农业大学学报,1989(2):21-23.
- [5]陈维伦,郭东红,杨善英,等.用组织培养快速繁殖毛白杨(*Populus tomentosa*)的研究[J].植物学集刊,1983,1:135-138.
- [6]朱之梯.毛白杨优树快速繁殖方法的研究[J].北京林业大学学报,1986,8(4):1-7.
- [7]赵花燕,卢善发,晁瑞堂.杨树的组织培养及其基因工程研究[J].植物学通报,2001,18(2):169-176.
- [8]张德培,罗蕴玲.应用概率统计[M].北京:高等教育出版社,2004.
- [9]杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987.
- [10]朱大保.国外杨树组培微繁技术的进展[J].北京林业大学学报,1990,12(1):84-91.
- [11]Howe G T, Goldfarb B, Strauss S H. Agrobacterium-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1994, 36:59-71.
- [12]Fang K T, Winker P. Uniformity and orthogonality [R]. Technical Report MATH-176 HongKong: Hong Kong Baptist University, 1998.

(责任编辑 吴祝华)

加杨叶总黄酮提取工艺的优化

石慧,范文,陈媛梅

(北京林业大学理学院,北京 100083)

摘要:为优化加杨叶总黄酮的提取工艺,通过单因素和正交试验进行优选,所得结果采用方差分析,并进行精密度和回收率试验。结果表明:影响加杨叶总黄酮提取工艺的主要因素为提取温度,其次是液料比和乙醇浓度,而提取时间的影响不大。确定加杨叶总黄酮最佳提取工艺为:时间 60 min,乙醇浓度 50%,液料比 40:1,温度 80℃。此法重现性好,精密度高,平均回收率达 98.92%。

关键词:加杨叶;总黄酮;提取工艺;精密度;回收率

Optimal Extraction Technology of Total Flavonoids from Leaves of *Populus canadensis* Moench. // SHI Hui, FANG Wen, CHEN Yuan-mei

Abstract: The single factor test and the orthogonal experimental design were carried out to optimize the extraction technology of total flavonoids from leaves of *Populus canadensis* Moench in this paper. The results indicated that the extraction temperature, the ratio of solvent to material and the ethanol concentration had a remarkable influence on the extraction of total flavonoids, while the extraction time had hardly influence on it. The optimal extraction technology was 50% ethanol and the ratio of solvent to material 40:1 at the temperature of 80℃ for 60 min. The optimized technology had good reproducibility and more precision, and the average recovery was 98.92%.

Key words: Leaves of *Populus canadensis* Moench.; Total flavonoids; Extraction technology; Precision; Recovery

Author's address: College of Science, Beijing Forestry University, 100083, Beijing, China

加杨(*Populus Canadensis* Moench.) 又称加拿大杨,是美洲黑杨和欧洲黑杨的杂交种,属杨柳科杨属

植物,主要分布于辽宁、华北、西北、华东等地,资源极为丰富^[1]。杨树叶的药用历史悠久。在民间,用杨树叶水煮液在骨科治疗中配合正骨治疗,对控制陈旧性软组织感染及化脓性骨髓炎疗效较好;用其嫩枝叶熬水洗浴无名肿疡,有消肿去毒之功效^[2]。而目前

收稿日期:2007-11-02

修回日期:2007-12-03

基金项目:北京林业大学研究生自选课题基金资助项目(06jj127)。

第一作者简介:石慧(1981-),女,硕士生,研究方向为生物大分子结构与物理化学研究。