

# 毛白杨无性系 30 号组培再生体系的建立

李 慧, 樊军锋, 高建社, 周永学, 王 虎

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以毛白杨无性系 30 号的茎段为外植体, 对其再生能力和再生条件进行了研究, 以期建立毛白杨无性系 30 号的组织快繁体系。结果表明: MS 培养基为比较合适的基本培养基; MS+6-BA 0.5 mg/L 和 MS+TDZ 0.0015 mg/L+NAA 0.01 mg/L 是其比较合适的诱导培养基, 不定芽诱导率分别为 86.7% 和 83.3%; MS+6-BA 0.7 mg/L+NAA 0.05 mg/L 是其最佳增殖培养基, 增殖率为 628%; 诱导毛白杨 30 号生根的最佳培养基为 1/2MS+NAA 0.01 mg/L, 生根率为 96.8%。

**关键词:**毛白杨无性系 30 号; 增殖; 生根; 组织培养

**中图分类号:**S 792.117 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0110-04

毛白杨无性系 30 号是陕西省西北农林科技大学杨树育种组经过 14 a 多学科协作研究综合选育出的白杨派优良无性系之一。该无性系为雄性, 其环保、生态、景观效果好, 速生性突出, 抗旱性较强, 对锈病、黑斑病、褐斑病和干部溃疡病均表现为强抗性<sup>[1]</sup>。由于该无性系大田扦插成活率低(40%~70%), 严重限制了该优良无性系的生产推广。有关白杨派繁殖育苗技术已有研究, 但对于不同的无性系而言, 其植株再生能力有着很大的差异, 针对某一具体材料, 必须结合其自身的生理特点, 建立适合其生长繁殖的高效再生体系<sup>[2]</sup>。该试验对影响再生率和生根率的几个主要因素进行研究, 并首次对毛白杨无性系 30 号的组织快繁技术进行深入探讨, 旨在为该优良无性系的工厂化育苗和全面推广奠定坚实的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2011 年 2 月底于西北农林科技大学周至渭河试验站采集毛白杨无性系 30 号 1 a 生带芽枝条, 剪成 1 m 左右。将枝条于温室内水培, 每 3 d 换 1 次水, 水培 15 d 后, 当苗干上新生出嫩茎长至 5~10 cm 时, 从嫩茎上剪取带 1~2 个嫩芽的茎段, 去叶, 自来水冲洗 10 min, 用 84 消毒液消毒 1~5 min, 无菌水冲洗 5 遍, 再用 0.1% 升汞消毒 2~7 min, 无菌水冲洗 5~8 遍。消毒的时间视茎段的木质化程度决定, 幼嫩茎段应适当缩短时间<sup>[3]</sup>。

**第一作者简介:**李慧(1985-), 女, 在读硕士, 现主要从事林木遗传育种和林业生物技术研究工作。E-mail:lh200108@163.com。

**责任作者:**樊军锋(1963-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事林木遗传育种研究工作。E-mail:fanjf28@163.com。

**基金项目:**西北农林科技大学唐仲英育种基金资助项目(2009); 陕西省“13115”重大科技专项资助项目(2009IDKG-12)。

**收稿日期:**2011-11-29

在超净工作台上将无菌茎段切成 1 cm 左右带 1~2 个腋芽的小段, 接种于 100 mL 三角瓶中, 并用封口膜封口。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基本培养基的筛选** 以未添加任何植物激素的 MS、1/2MS 和 1/4MS 培养基为基本培养基, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6 g/L, pH 为 5.8, 每个处理接种 20 瓶, 每瓶 1 个外植体, 设置 3 次重复。6 周后观察结果, 统计数据。

**1.2.2 细胞分裂素诱导不定芽试验** 将无菌外植体分别接种到添加细胞分裂素 6-BA 和 TDZ 的 MS 培养基中, 6-BA 设 0、0.3、0.5、0.7、1.0 和 1.5 mg/L 6 个梯度; TDZ 设 0、0.0010、0.0015、0.0020、0.0025 和 0.0030 mg/L 6 个梯度, 每梯度均附加 NAA 0.01 mg/L, 5 周后观察并统计结果。

**1.2.3 不定芽增殖的正交实验** 选取 NAA、6-BA 和培养基 3 个因素, 每种因素 3 个水平, 选用  $L_9(3^4)$  正交实验(表 1), 考察 3 种因素对毛白杨无性系 30 号不定芽增殖的影响, 试验设计共有 9 个处理, 每处理接种 20 瓶, 3 次重复, 5 周后观察并统计结果。

表 1 正交实验因子与水平

水平	NAA/mg·L <sup>-1</sup>	6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	培养基种类
1	0.05	0.3	1/4MS
2	0.10	0.5	1/2MS
3	0.15	0.7	MS

**1.2.4 壮苗培养** 多次增殖继代后的丛生芽多数长势较弱, 并有部分幼苗出现玻璃化现象, 将这些长势较弱的无菌嫩苗接种到未添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基中进行壮苗培养, 以便下一步诱导生根。

**1.2.5 生根培养基的筛选** 当壮苗培养的无菌苗长至 2~3 cm 时, 将其转入添加生长素 NAA 的诱导生根培养基 MS 和 1/2MS 中, NAA 浓度设置 0、0.01、0.05 和 0.10 mg/L 4 个梯度。5 周后观察并统计结果, 根据无菌苗的生根情况筛选最佳的生根培养基。

以上试验培养条件为温度(25±2)℃,光照时间为14 h/d,光照强度2 000~3 000 lx。如未加说明,每处理接种外植体10个,3次重复,pH为5.8,蔗糖30 g/L,琼脂6 g/L。

1.3 数据处理

应用SPSS数据分析软件,对该试验中的数据进行处理并分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的筛选

该试验选用了植物组培试验中最常用的MS、1/2MS和1/4MS培养基为基本培养基,毛白杨无性系30号在以上培养基中均见生长,观察其生长状况。由表2可知,毛白杨无性系30号在MS培养基中的诱导率最大,为73.3%,且生长状况明显优于其它2种培养基,所以毛白杨30号更适合于在MS培养基中生长。

表2 3种培养基对腋芽生长的影响

培养基种类	接种外植体数/个	产生腋芽外植体数/个	诱导率/%	芽生长状况
MS	60	44	73.3	腋芽萌发快,芽长1~4 cm不等,且4 cm居多,叶片大而浓绿,长势健壮
1/2 MS	60	39	65.0	腋芽萌发较快,芽长1~3 cm不等,叶片小,颜色鲜绿,长势一般
1/4 MS	60	32	53.3	腋芽萌发较慢,芽长1~2 cm,叶片小,颜色鲜绿,长势一般

2.2 细胞分裂素对不定芽生长的影响

2.2.1 6-BA对不定芽增殖的影响 由表3可知,在未添加6-BA的MS培养基中,不定芽诱导率为73.3%,随着6-BA浓度的增加,不定芽的增殖率相应有所提高,当6-BA浓度达到0.5 mg/L和0.7 mg/L时,增殖率最高,为86.7%,但后者玻璃化稍重于前者,且0.7 mg/L时植株叶片小,长势较弱;随着6-BA浓度的增加,丛生芽数量不断减少,不定芽增殖率也有所降低,芽苗长势脆弱,且玻璃化现象有加重趋势,当6-BA浓度达到1.5 mg/L时,玻璃化程度达到36.7%,因此,6-BA浓度为0.5 mg/L时最适于毛白杨无性系30号的不定芽增殖。

表3 6-BA对不定芽增殖的影响

6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	接种外植体数/个	产生不定芽外植体数/个	诱导率/%	玻璃化数/个	芽生长状况
0	30	22	73.3	0	外植体腋芽萌发较多,腋芽1~4 cm不等,叶片大,颜色浓绿
0.3	30	24	80.0	1	诱导为丛生芽,芽长1~2 cm不等,叶片伸展,长势较弱
0.5	30	26	86.7	1	丛生芽多,芽长1~3 cm不等,叶片伸展,长势健壮
0.7	30	26	86.7	3	丛生芽多,芽长1~2 cm不等,叶片小,节间短,长势较弱
1.0	30	21	70.0	7	丛生芽多,芽长1 cm左右,叶片小,节间短,长势较弱
1.5	30	16	53.3	11	丛生芽多,芽长多数小于1 cm,叶片很小,长势脆弱

2.2.2 TDZ对不定芽增殖的影响 由表4可知,在未添加TDZ的MS培养基中,不定芽诱导率为73.3%,随TDZ浓度的增加,丛生芽数量不断增加,增殖率也相应提高,当TDZ浓度为0.0015 mg/L时,叶片颜色正常且较大,长势最好,诱导率最大,为83.3%,但随浓度提高,丛生芽颜色有发黄迹象,丛生芽长度也变短,叶片变小,长势较弱,诱导率降低且玻璃化现象严重,不适于进一步的继代和生根培养。因此,TDZ为0.0015 mg/L是毛白杨无性系30号增殖培养的最佳浓度。

表4 TDZ对不定芽增殖的影响

TDZ浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	接种外植体数/个	产生不定芽外植体数/个	诱导率/%	芽生长状况
0	0	30	22	73.3	外植体腋芽萌发较多,腋芽1~4 cm不等,叶片大,颜色浓绿
0.0010	0.01	30	24	80.0	诱导为丛生芽,芽长1~2 cm不等,叶片大小不均,颜色浅绿,长势较弱
0.0015	0.01	30	25	83.3	丛生芽多,芽长1~3 cm不等,叶片大,颜色浓绿,长势健壮
0.0020	0.01	30	22	73.3	丛生芽多,芽长1~4 cm不等,叶片大小不均,节间短,长势较弱,有玻璃化现象
0.0025	0.01	30	20	66.7	丛生芽多,芽长1~3 cm不等,叶片小,节间短,颜色泛黄,长势较弱,有玻璃化现象
0.0030	0.01	30	17	56.7	丛生芽多,芽长多数1 cm左右,叶片很小,颜色泛黄,长势脆弱,玻璃化加重

2.3 不同因子及浓度水平对不定芽增殖的影响

由表5可知,NAA和6-BA的极差值都远远大于空白列的极差值,说明二者对不定芽增殖的影响较大,而培养基的极差值与空白列的极差值相接近,再由表6方差分析可知,不同6-BA浓度对毛白杨无性系30号不定芽增殖的诱导达到了显著水平,不同种类培养基对不定芽的增殖则无显著差异,因此3种因素对毛白杨无性系30号增殖的影响程度由强到弱依次是B>A>C,即:因素6-BA对不定芽的增殖起主导作用。6-BA浓度在0.7 mg/L水平时,不定芽增殖率的平均水平最高,为501.33%,随浓度降低,平均增殖率也有所降低,0.3 mg/L时最低为196.67%。NAA浓度为0.05 mg/L时不定芽平均增殖率最高,为444.67%,随NAA浓度升高,平均增殖率下降,浓度为0.15 mg/L时增殖率最低,为262.00%,可见,低浓度的6-BA不利于不定芽的增殖,而过高的NAA浓度也会抑制不定芽的诱导。结合表5、6可知,NAA和6-BA诱导毛白杨无性系30号增殖的最佳水平分别为A<sub>1</sub>和B<sub>3</sub>,结合正交表格,这个组合为A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即MS+6-BA 0.7 mg/L+NAA 0.05 mg/L,而此组合对不定芽增殖的诱导率为628%,也是所有组合中增殖率最大的,说明方差分析与试验结果相符。

表 5 正交实验设计  $L_9(3^4)$  结果

处理号	NAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	6-BA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	培养基种类	空白试验	增殖率
	A	B	C	K	/ %
1	1(0.05)	1(0.3)	1(1/4MS)	1	256
2	1(0.05)	2(0.5)	2(1/2MS)	2	450
3	1(0.05)	3(0.7)	3 (MS)	3	628
4	2(0.10)	1(0.3)	2(1/2MS)	3	220
5	2(0.10)	2(0.5)	3 (MS)	1	314
6	2(0.10)	3(0.7)	1 (1/4MS)	2	470
7	3(0.15)	1(0.3)	3 (MS)	2	114
8	3(0.15)	2(0.5)	1 (1/4MS)	3	266
9	3(0.15)	3(0.7)	2 (1/2MS)	1	406
$K_1$	1 334	590	992	976	
$K_2$	1 004	1 030	1 076	1 034	
$K_3$	786	1 504	1 056	1 114	
$k_1$	444.67	196.67	330.67	325.33	
$k_2$	334.67	343.33	358.67	344.67	
$k_3$	262.00	501.33	352.00	371.33	
极差(R)	182.67	304.66	28.00	26.66	

表 6 激素诱导不定芽的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	50 747.556	2	25 373.778	15.854	0.059
B	139 296.889	2	69 648.444	43.518	0.022
C	1 283.556	2	641.778	0.401	0.714
误差	3 200.889	2	1 600.444		
总变异	1 278 904.000	9			

注:  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

#### 2.4 壮苗培养

细胞分裂素的使用不利于植株抽茎,而利于丛状叶增加,对长势较弱的丛生芽经过 6 周壮苗培养后,除个别芽苗玻璃化外,均长势良好,芽苗高度集中在 3~4 cm,且芽苗叶片颜色鲜绿、伸展,可进行下一步生根培养。

#### 2.5 激素对生根诱导的影响

由表 7 可知,在未添加 NAA 的 MS 培养基中,生根慢且生根率仅有 75%,随 NAA 的加入,生根时间缩短,且生根率提高,但根较不发达,长势一般。在大量元素减半的 1/2MS 中,生根较快且生根率明显提高,在 NAA 浓度为 0.01 mg/L 时,生根率达到 96.8%,生根条数最多,开始生根时间在 1 周左右,且植株高,叶片大而深绿,整株长势健壮。随 NAA 浓度提高,生根率稍有降低,且植株较短,叶片稍小,根长势一般。因此认为 NAA 诱导毛白杨无性系 30 号的最佳培养基为 1/2MS+NAA 0.01 mg/L。

表 7 NAA 对生根诱导的影响

培养基种类	NAA 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根率 / %	开始生根 天数/d	平均根 数/条	平均根 长/cm	根生长状态
MS	0	75.0	12	4.4	3.8	主根短,细长,长势较弱
MS	0.01	82.3	10	5.6	3.8	主根较发达,细长,须根少
MS	0.05	89.6	10	4.8	3.5	主根短,较粗壮,须根见多
MS	0.10	84.5	11	4.2	3.2	主根短且单一,须根较多
1/2MS	0	93.6	10	5.2	4.3	根呈放射状,主根短,粗壮,须根少
1/2MS	0.01	96.8	6	6.3	4.6	根呈均匀放射状,主根发达而粗壮
1/2MS	0.05	95.2	8	5.5	4.2	主根短偏向一侧生长,须根发达
1/2MS	0.10	92.5	8	5.2	4.2	主根短,单一粗壮,须根较多



图 1 毛白杨组培苗增殖

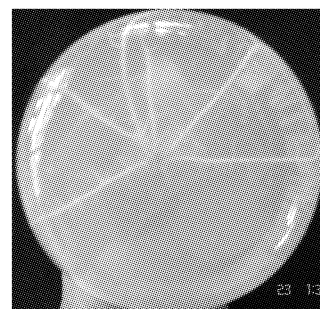


图 2 毛白杨组培苗生根

### 3 结论与讨论

合适的培养基是植物组织培养成功的前提与关键<sup>[4]</sup>,MS 培养基富含植物生长所需的盐类物质。细胞分裂素是植物组织培养中不可或缺的植物生长调节物质,细胞分裂素可以促进细胞分裂,对不定芽的分化和增殖有显著作用,研究表明,在培养基中添加较高浓度的细胞分裂素和较低浓度的生长素类物质可以促进植物体侧芽的萌发和不定芽的产生<sup>[5]</sup>。而 6-BA 则是较常用和较为有效的细胞分裂素。TDZ 是一种新型植物生长调节剂,具有很强的细胞分裂素活性,它可以促进愈伤组织生长,还可促进侧芽和不定芽的发生,一般来说 TDZ 的使用浓度要比其它细胞分裂素低得多。NAA 是一种光谱型的植物生长调节剂,能促进细胞的分裂与扩大,诱导植物形成不定根,NAA 对组织培养中外植体生根的诱导有着显著的作用,且一般认为较低浓度的生长素对发根更有利<sup>[6]</sup>。

该研究通过正交实验发现,6-BA 与 NAA 相互配合时,二者对不定芽增殖的影响效应远远大于培养基,并获得了诱导不定芽增殖的最佳组合,为 MS+6-BA 0.7 mg/L+NAA 0.05 mg/L。

在生根处理试验中,生根率与 NAA 浓度和培养基种类有密切关系,毛白杨无性系 30 号的最佳生根培养基是 1/2MS+NAA 0.01 mg/L,植物体长势健壮,较高浓度的 NAA 反而使生根率降低,根生长状态一般。MS 培养基中生根率较低,这与赵华艳等<sup>[16]</sup>的高盐浓度对某些杨树生根不利的说法相一致。

未添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基是最适于毛白杨无性系 30 号生长的基本培养基,且毛白杨生长健壮,腋芽诱导率较高。细胞分裂素在组织培养中有着举足轻重的作用,适当的细胞分裂素及其浓度可使快繁体系的建立事半功倍,该试验所采用的 6-BA 和 TDZ 均能有效促进毛白杨不定芽的增殖,单独使用 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,不定芽诱导率为 86.7%;与 NAA 相互作用的 TDZ 浓度为 0.0015 mg/L 时,不定芽诱导率为 83.3%,细胞分裂素浓度过低不利于芽增殖,过高浓度的细胞分裂素使诱导率降低,玻璃化加重。玻璃化现



象在植物组织培养中比较普遍,目前有关玻璃化苗的防范措施虽有一定研究,但其发生机理仍很模糊,尤其从有关分子水平研究玻璃化现象发生机理的报道至今未见,因此关于试管苗玻璃化现象系统的机理和防止措施有待进一步研究和探讨<sup>[7-15]</sup>。

### 参考文献

- [1] 高建社. 杨树新品种-14、30、85号毛白杨[J]. 现代种业, 2003(4): 47.
- [2] 李科友, 朱海兰, 赵忠. 毛白杨无性系 85 号高效再生系统的建立[J]. 林业科技开发, 2008, 22(2): 45-48.
- [3] 曹孜义, 刘国民. 实用组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1999: 38-41.
- [4] 王水琦. 植物组织培养[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 33-34.
- [5] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(2): 19-22.
- [6] 崔丽华. 植物生长调节剂对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师专学报(自然科学版), 2000, 2(2): 97-99.
- [7] 李胜, 李唯, 杨德龙. 试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 甘肃农业大学学报, 2003, 38(1): 1-16.
- [8] 任东植, 李峰, 曲运琴, 等. 影响枣组培苗玻璃化的几个因素及其防治[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 21-23.
- [9] 郑进, 康薇. 杨树组织培养中应注意的几个问题[J]. 黄石理工学院学报, 2010, 26(3): 21-26.
- [10] 吴迪, 关录凡, 王秋玉. 杂种山杨玻璃化内源激素含量研究[J]. 林业科学, 2007, 43(10): 127-129.
- [11] 朱小虎. 植物组培试验中存在的问题及改进方法[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报, 2009, 22(2): 110-111.
- [12] 李万德, 杜桂, 张剑. 植物组织培养实验中存在的问题及其解决方法[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 4(2): 11-12.
- [13] 蔡祖国, 徐小彪, 周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 353-355.
- [14] 叶添谋. 植物组织培养过程中的常见技术难题研究进展[J]. 韶关学院学报(自然科学版), 2010, 31(3): 84-90.
- [15] 尚宏琴. 植物组织培养中的三大难题概述[J]. 生物学教学, 2010, 35(6): 64-65.
- [16] 赵华艳, 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.

## Establishment of Tissue Culture Regeneration System of *Populus tomentosa* Clone-30

LI Hui, FAN Jun-feng, GAO Jian-she, ZHOU Yong-xue, WANG Hu

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Taking stems of the *P. tomentosa* clone-30 as explants, the regeneration ability and conditions were studied, in order to build a rapid tissue propagation system. The results showed that the appropriate basic medium was MS and the appropriate inductive medium was MS+6-BA 0.5 mg/L and MS+TDZ 0.0015 mg/L+NAA 0.01 mg/L, the shoot induction rates were respectively 86.7% and 83.3%. The optimal regeneration medium was MS+6-BA 0.7 mg/L+NAA 0.05 mg/L and the regeneration rate was 628%, the optimal rootage medium was 1/2MS+NAA 0.01 mg/L, and the rate of the rooting was 96.8%.

**Key words:** *populous tomentosa* clone-30; proliferation; rootage; tissue culture

## 农药冬季如何保管不失效

冬季农户家里没有用完的农药,如保管不当,常出现变质失效或爆炸燃烧等问题。常用农药从外部形态上分为固体和液体 2 种,不同形态的农药储藏有不同的要求。

**液体农药:**注意隔热防晒,避免高温、接触空气;远离火源,防止接触氧化和碱性物质,宜放在通风避光、阴凉干燥的地方,不要和硝酸盐、强酸等物质及木炭、纸屑等有机物放在一起。瓶装农药的瓶盖、瓶塞必须拧紧盖牢,防止挥发分解。有些农药又有各自的特性,如辛硫磷和氟乐灵等,储存时不要与碱性物质混放在一起。瓶装液体农药遇 0℃ 以下低温容易结冰,形成块状或使瓶子冻裂,最好用稻壳等物保温防冻。

**固体农药:**主要注意隔湿防潮,用木板或晒干的谷壳、麦秸、稻草等做铺垫,并注意通风散湿。烟雾剂存放时不可与易挥发、易燃、易爆物品放在一起,温度也不要超过 30℃。

**微生物农药:**在低温干燥的环境中保存,防高温、潮湿,保存时间不要超过 2 a。