

# 利用多因子正交试验建立桑的无菌快繁体系

李想韵, 朱 鸿, 饶 灿, 李 鹏, 宋 锋

(西南大学 生命科学学院 四川 重庆 400715)

**摘 要:**以桑侧枝茎段为材料, 利用  $L_9(3^4)$  正交设计探讨培养基种类和激素配比对桑茎段丛生芽诱导效率的影响, 并对影响桑外植体生根的主要因子进行了研究。结果表明:  $A_2B_2C_1$  为诱导出芽的最佳培养基与激素组合, 并且可同时实现芽增殖; 生根培养基为  $WPM+1.0\text{ mg/L IBA}$ 。

**关键词:**桑; 正交设计; 不定芽诱导; 生根

**中图分类号:** S 686 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)10-0090-03

桑(*Morus alba* L.)是桑科(Moraceae)桑属(*Morus*)多年生木本双子叶植物。桑树全身是宝, 桑树的果、根、茎、叶以及加工副产物都具有很高的药用价值和保健价值<sup>[3]</sup>。桑叶中富含人体所需的 18 种氨基酸, 其中有 8 种是人体所必需的, 桑叶中还含有槲皮素、超氧化物歧化酶、多糖、葫芦巴碱等特殊的功能性成分; 桑枝是一种很好的中药材, 其中所含的黄酮类化合物具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等功能, 在农业、医药、化工等领域有着重要的应用价值<sup>[4,5]</sup>; 桑根具有显著的降压作用, 还有一定的抗 HIV 活性<sup>[1]</sup>。采用正交设计的方法

筛选和建立桑的无菌快繁体系, 目前还未见报道。试验旨在探讨不同激素、不同培养基对桑茎段诱导出芽、芽增殖以及生根培养的影响, 以期快速筛选出最佳芽诱导、增殖和生根的培养基与激素组合, 为进一步开展桑的遗传转化工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材采自西南大学蚕桑种植基地 2 a 生嘉陵 16 号桑。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体表面消毒** 2008 年 7 月采摘 5 月萌发的桑侧枝茎段, 在低浓度洗衣粉中用小毛刷轻轻刷洗 3 min 后于清洁流水下冲洗 2~3 h、用 70% 酒精消毒 30 s、0.1% 升汞采用 2 次消毒法<sup>[6]</sup>分段消毒 5 min 和 6 min、无菌水漂洗 6~8 次、在灭菌滤纸上将外植体表面的水吸干, 切成 1 cm 长的带芽小段, 接入不同的培养基中。

**1.2.2 桑无菌体系的建立** 桑茎段诱导不定芽无菌体系的建立<sup>[7]</sup>, 设置细胞分裂素浓度、生长素浓度和基本培养基种类 3 个因素, 每个因素 3 个水平, 每处理接种

**第一作者简介:** 李想韵(1985-), 女, 四川宜宾人, 硕士, 现主要从事植物生物学与生物技术研究。E-mail: yun731@swu.edu.cn.

**通讯作者:** 孙敏(1957-), 男, 四川巴中人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物生物学与生物技术方向研究工作。E-mail: jwscm@swu.edu.cn.

**基金项目:** 三峡库区生态环境教育部重点实验室开放基金资助项目(EF200609)。

**收稿日期:** 2009-05-20

## The Research Advances of Plant Mutation Breeding with Ion-beam Irradiation

ZHU Rui-rui<sup>1</sup>, YANG Shan-shan<sup>1</sup>, WANG Yu-gang<sup>2</sup>, XU Lian-jiang<sup>3</sup>, GAO Yi-ke<sup>1</sup>

(1. College of Landscape Architecture Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Peking University Institute of Heavy Ion Physics, Key laboratory of Heavy Ion Physics, Ministry of Education, Beijing 100871, China; 3. Beijing Dongsheng Seed Industry Company, Beijing 100085, China)

**Abstract:** Dry seeds of *Aquilegia hybrida* were irradiated by H ion beams with different energy and dose, in order to study the effect of different energy and dose of ion-beam irradiation on the seed germination of *Aquilegia* and provide valuable information for the mutation breeding of *Aquilegia*. The results indicated that seed germination present irregular curve with the increasing of irradiation doses of H ion beams with different energy. The possible mechanism were also discussed.

**Key words:** Ion-beam irradiation; *Aquilegia*; Seed germination

10 个外植体(1 个/瓶), 重复 3 次, 采用  $L_9(3^4)$  正交设计(见表 1)。生根培养试验设 1/2MS 和 WPM 2 种基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 IBA 激素(培养基与激素之间配比见表 2)。接种后于温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照 12 h/d、光强 2 000 lx 进行培养。

表 1 桑不定芽诱导的因素与水平

| 水平 | 因 素   |  |              |
|----|---|--|--------------|
|    | 细胞分裂素(A)<br>6 BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 生长素(B)NAA<br>/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 基本<br>培养基(C) |
| 1  | 0.5   | 0.01   | WPM          |
| 2  | 1.0   | 0.1  | 1/2 MS       |
| 3  | 3.0   | 0.2  | MS           |

表 2 桑生根诱导试验设计

| 基本培养基 |       | 激素配比/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |     |      |
|-------|-------|---------------------------------------|-----|------|
|       |       | 6-BA                                  | NAA | IBA  |
| I     | 1/2MS | I                                     | 0.1 | 0.05 |
| II    | WPM   | II                                    | 0.2 |      |
|       |       | III                                   |     | 0.5  |
|       |       | IV                                    |     | 1.0  |
|       |       | V                                     |     | 1.5  |

2 结果与分析

2.1 桑不定芽诱导试验结果

桑茎段接入培养基 5~7 d 后开始启动分化, 茎段上的芽基点发生膨大。NAA 和 6-BA 浓度、培养基种类对不定芽诱导的影响试验结果见表 3。由于因素内水平极差(R) 的大小能够说明该因素对试验结果的影响程度, 因此 3 种因子对桑不定芽诱导影响顺序为: NAA> 培养基种类> 6-BA。诱导不定芽的最佳培养基水平组合为  $A_2B_2C_1$ , 即 WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 并且该培养基与激素的组合对不定芽的增殖最有利。图 1、2、3 分别为以 1/2MS、MS 和 WPM 作基本培养基时, 与激素配合使用培养无菌苗的效果。

2.2 桑生根诱导试验结果

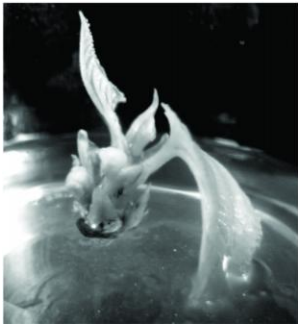


图 1 1/2MS+激素诱导出芽



图 2 WPM+激素诱导出芽与增殖



图 3 MS+激素诱导出芽

将桑带有不定芽为 1~2 cm 长的茎段接入合适的生根培养基后 20 d 开始启动生根, 35 d 后有的茎段长出长短不等的根, 但无菌苗茎段褐化较严重(图 4)。试验

表 3 桑不定芽诱导  $L_9(3^4)$  正交试验结果

| 组合号   | 因素     |        |        | 接种数<br>/个 | 出芽数<br>/个 | 出芽诱导<br>率/% | 接种 20 d 后平均每<br>瓶的丛生芽总数/个 |
|-------|--------|--------|--------|-----------|-----------|-------------|---------------------------|
| 1     | 3.0    | 0.2    | WPM    | 30        | 5         | 16.7        | 4                         |
| 2     | 0.5    | 0.1    | MS     | 30        | 0         | 0           | 0                         |
| 3     | 3.0    | 0.01   | MS     | 30        | 1         | 3.3         | 1                         |
| 4     | 0.5    | 0.2    | 1/2MS  | 30        | 0         | 0           | 0                         |
| 5     | 1.0    | 0.2    | MS     | 30        | 0         | 0           | 0                         |
| 6     | 3.0    | 0.1    | 1/2MS  | 30        | 20        | 66.7        | 8                         |
| 7     | 1.0    | 0.1    | WPM    | 30        | 30        | 100         | 16                        |
| 8     | 1.0    | 0.01   | 1/2MS  | 30        | 2         | 6.7         | 0                         |
| 9     | 0.5    | 0.01   | WPM    | 30        | 10        | 33.3        | 2                         |
| $K_1$ | 2      | 3      | 22     |           |           |             |                           |
| $K_2$ | 16     | 24     | 8      |           |           |             |                           |
| $K_3$ | 13     | 4      | 1      |           |           |             |                           |
| $M_1$ | 11.100 | 14.433 | 50.000 |           |           |             |                           |
| $M_2$ | 35.567 | 55.567 | 24.467 |           |           |             |                           |
| $M_3$ | 28.900 | 5.567  | 1.100  |           |           |             |                           |
| R     | 24.467 | 50.000 | 48.900 |           |           |             |                           |

注:  $K$  为同一因子同一水平丛生芽总数和  $M$  为出芽率反正弦值的平均数,  $R$  为极差 下标 1、2、3 分别表示不同的水平。

表 4 桑生根试验结果

| 组合号 | 基本培养基 | 因素<br>激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ |      |     | 外植体数<br>/个 | 出根数<br>/条 | 平均根长<br>/cm | 总根长<br>/cm |
|-----|-------|---|------|-----|------------|-----------|-------------|------------|
|     |       | 6-BA                                      | NAA  | IBA |            |           |             |            |
| 1   | 1/2MS | 0.1                                       | 0.05 | 0   | 15         | 0         | -           | 0          |
| 2   | 1/2MS | 0   | 0.2  | 0   | 15         | 10        | 0.5         | 5          |
| 3   | 1/2MS | 0   | 0    | 0.5 | 15         | 0         | -           | 0          |
| 4   | 1/2MS | 0   | 0    | 1.0 | 15         | 11        | 1           | 11         |
| 5   | 1/2MS | 0   | 0    | 1.5 | 15         | 0         | -           | 0          |
| 6   | WPM   | 0.1                                       | 0.05 | 0   | 15         | 0         | -           | 0          |
| 7   | WPM   | 0   | 0.2  | 0   | 15         | 18        | 1           | 18         |
| 8   | WPM   | 0   | 0    | 0.5 | 15         | 0         | -           | 0          |
| 9   | WPM   | 0   | 0    | 1.0 | 15         | 30        | 1.5         | 45         |
| 10  | WPM   | 0   | 0    | 1.5 | 15         | 0         | -           | 0          |

注: 总根长(cm)= 生根数×平均根长(cm); “-” 表示没有生根或根长接近于零而无法测得。

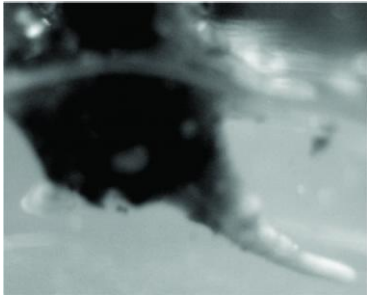


图4 WPM+激素诱导生根

### 3 小结与讨论

植物细胞分化是一个复杂的生理生化过程,大量的试验表明,植物激素的种类、浓度以及它们之间的组合将影响外植体的诱导分化、出芽及生根。茎段是无菌苗生产的理想受体,桑作为木本植物,获得无菌材料将有利于其遗传转化等后续工作的顺利开展。试验采用正交设计的方法,以桑侧芽茎段做外植体,筛选出诱导出芽的最佳培养基:WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,且该培养基有利于芽的增殖;在桑组织培养的研究中<sup>[8,9]</sup>,目前仅何建等<sup>[10]</sup>在研究长穗桑时探索到这样一种既利于出芽又利于芽增殖的培养基。采用单因素试验组合,初步筛选出适于生根的培养基与激素组合:即WPM+1.0 mg/L IBA,该试验中生根数量高于孙琳霞等<sup>[11]</sup>在桑芽体组培快繁研究中获得的生根数量。

邱璐<sup>[12]</sup>等的研究结果显示,1/2MS较MS对不定芽的诱导率高,但仍未突破100%,试验将WPM培养基与适当激素配合使用后,芽的诱导率实现了100%,并且

具有良好的增殖效果。但出根后不久,外植体逐渐褐化,因此对桑嘉陵16号生根培养中的褐化问题有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 黄盖群, 邹谨, 刘刚等. 桑树的药用价值及其开发应用[J]. 蚕学通讯, 2007, 12(4): 41-43.
  - [2] 何雪梅, 廖森泰, 刘吉平. 桑树的营养功能性成分及药理作用研究进展[J]. 蚕业科学, 2004, 30(4): 390-393.
  - [3] 李克和, 章道周, 何卫中. 桑叶茶的保健功能及其加工技术[J]. 现代农业科技, 2007(21): 160.
  - [4] 买买提依明, 特拉津·那斯尔, 夏庆友等. 新疆沙漠桑树营养成分的分析和药用价值的探讨[J]. 北方蚕业, 2008, 29(1): 20-21.
  - [5] 唐忠富. 桑资源的药用开发与利用[J]. 蚕桑通报, 2008, 39(1): 6-8.
  - [6] 张月娇. 组织培养中有效无菌材料的获得[J]. 林业实用技术, 2004(6): 20-21.
  - [7] 高健强. 多因子正交试验对鞭炮花丛生芽诱导条件的筛选[J]. 北方园艺, 2008(11): 155-156.
  - [8] 张建华, 管帮富, 彭火辉. 果桑的组培快繁技术初探[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2003(3): 35.
  - [9] 石文山, 李树丽. 沙漠乔桑的组织培养和快速繁殖技术[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21): 5544.
  - [10] 何建, 冯焱, 王建辉. 长穗桑组织培养和四倍体新种质诱导[J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 142-146.
  - [11] 孙琳霞, 李玉红, 刘忠坤. 桑芽体组培快繁技术的研究[J]. 广西蚕业, 2004, 41(2): 7.
  - [12] 邱璐, 陈善娜, 杨跃仙等. 云桑组织培养中褐化问题的研究[J]. 蚕业科学, 2000, 26(2): 118-119.
- (该文作者还有彭江、雷桅, 单位同第一作者; 孙敏, 单位西南大学生命科学学院及三峡库区生态环境教育部重点实验室 400715)

## Application of Orthogonal Design in Establishing Sterile Rapid Propagation System of Mulberry

LI Xiang-yun<sup>1</sup>, ZHU Hong<sup>1</sup>, RAO Can<sup>1</sup>, LI Peng<sup>1</sup>, SONG Feng<sup>1</sup>, PENG Jiang<sup>1</sup>, LEI Wei<sup>1</sup>, SUN Min<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region Ministry of Education, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** The lateral branches of Mulberry were taken as explants, effects of various medium and different plant hormones on caespitose buds induction was studied by L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) orthogonal design, and the roots induction was researched. The results showed that: the optimal medium for buds induction was A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>, meanwhile the breed up of caespitose buds was realized; the cultural medium for growth of roots was WPM+1.0 mg/L IBA.

**Key words:** Mulberry; Orthogonal design; Caespitose buds induction; Roots growth