

## 延缓桑树组培苗褐化的措施探讨

王照红<sup>1</sup> 杜建勋<sup>1</sup> 孙日彦<sup>1</sup> 周象海<sup>1</sup> 李竹林<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东省蚕业研究所, 山东 烟台 264002; <sup>2</sup> 招远市夏甸镇政府, 山东 招远 265415)

**摘要** 桑树无菌体系建立过程中易出现组培苗褐化问题, 导致组培苗死亡, 无菌体系难以建立。延缓组培苗的褐化, 应把初培养的时间、外植体的选择、适宜的培养基、抗氧化剂及吸附剂的添加、培养条件和适时的转接等措施有机结合起来, 减轻褐化对组培苗的影响。

**关键词** 桑树 无菌体系 褐化 组培苗

基因工程越来越多地应用于桑树育种及桑苗快繁等方面<sup>[1-3]</sup>, 组培是其重要一环。许多植物的组织培养中发现有褐变现象, 尤以木本植物和热带植物组织培养中褐变严重。桑树属木本植物, 组培苗极易出现根部褐化现象。

### 1 组织苗的褐化现象

组培苗褐化是由于植物细胞膜的结构发生变化和破坏时, 酶(主要是多酚氧化酶 PPO)和底物(苯基羧酸、苯丙烷衍生物、黄酮衍生物)就结合在一块, 在氧的作用下, 生成醌类化合物, 从而引起褐变。在褐变过程中, 产生的醌类物质, 它们多呈棕褐色, 当扩散到培养基后, 就会抑制其他酶的活性, 从而影响所接触外植体的培养。邱璐<sup>[4]</sup>等研究了桑树生理、培养基组分、转种周期和光照等因素对组培苗褐化的影响。

目前, 桑树组培抑制组培苗褐化主要以频繁转接、加入 L-赖氨酸、活性炭粉等方法, 最有效为频繁转接, 一般以 15~20 d 转接 1 次为适宜, 工作量大; 而上述几种药物对组培苗褐化的抑制影响不大。

### 2 延缓褐化的措施

#### 2.1 初培养的时间选择

冬季进行初培养, 组培苗褐化现象较轻, 时间最好选择在 1、2 月份。夏季进行初培养则褐化现象严重, 特别在 7、8 月份, 褐化现象最为严重, 无菌体系难以建立。冬季温度低, 酶的活性低, 褐化轻, 较易建立无菌体系。

#### 2.2 外植体的选择

外植体采集时期, 以冬季催生的桑芽最为理想, 春秋季节的生长芽也是不错的选择。冬季建立桑树的无菌体系, 宜剪取当年生的桑树中部枝条, 用适宜的营养液如克诺普氏植物完全营养液催生桑芽; 春秋采用枝条中上部的桑芽。桑芽留有 1.5~2 cm 的嫩茎以便转接时有足够长的嫩茎供切除外植体褐化的部分。采集时间, 考虑到杂菌在植物附着的多少, 应采取阴雨天勿采, 晴天下午采集; 采前喷杀虫剂、杀菌剂或套塑料袋以减少外植体上的杂菌量。

#### 2.3 培养基的筛选

不同的桑树品种, 对培养基中的激素品种和浓度要求差别很大; 筛选出适合不同桑树品种的培养基(以 MS 培养基为基础培养基, 添加适宜的激素品种和浓度), 使组培苗生长旺盛, 在褐化严重前生长出更多的生长芽和足够长的茎, 降低褐化对建立无菌体系的影响。研究表明一些植物降低培养基 PH 值, 可有效减轻褐化的发生, 如水稻 pH 值为 4.5~5.0 时, 生长状态良好的, 其表面呈黄白色, pH 值为 5.5~6.0 时, 愈伤组织严重褐变; 在桑树组培中, 可适当降低培养基 PH 值已减轻褐化程度。将欲培养的桑树外植体接种到空白琼脂培养基中培养 5~7 d, 使组织中的酚类物质部分渗入培养基中, 然后接种至适宜的培养基上。

#### 2.4 添加适宜的抗氧化剂与吸附剂

在培养基中如 PVP-90, 抗坏血酸、柠檬酸、抗坏血酸氧化酶\硫脲、二氨基二硫代甲酸钠、2-巯基苯并噻唑、氯化钠等是 PPO 的抑制剂。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)是酚类物质的专一性吸附剂,

研究表明,PVP可有效延缓褐化产生5 d以上,使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的培养苗,经20~25 d培养,外植体的切口周围被一层白色粘状物质包围,切口褐化现象大为减轻。活性炭是一种吸附性较强的无机吸附剂,能吸附各种微量物质和微小颗粒,在有些作物培养上抑制褐化效果不错,上述物质均可抑制组培苗的褐化。

### 2.5 培养条件的选择

温度过高或光照过强,均可使PPO的活性提高,从而加速被培养的组织褐变。高浓度CO<sub>2</sub>也会促进褐变,其原因是环境中的CO<sub>2</sub>向细胞内扩散,使细胞内CO<sub>2</sub>增多,产生褐变。适当降低培养温度(20~22℃),加强培养室的通风换气,对抑制褐化有一定的作用。

### 2.6 频繁的转接

根据桑树组培苗褐化程度,适时地进行转接是最有效的防治褐化的措施;培养基中的酚类物质达到一定浓度,抑制危害到组培苗的生长时,应及时将苗移植到新的培养基上。正常条件下培养,一般15~20 d转接1次较为适宜。组培苗经5~6次转接,4~5个月左右的培养,可基本消除褐化现象。

(上接第27页)

进行防治;二是春蚕结束后用40%的乐果加洗衣粉进行防治;三是晚秋结束后用多种方法进行综合防治,力求干净彻底。

### 2.3 加强原蚕饲养,提高蚕儿的匀整度和强健度

2.3.1 做好催青工作,保证转青和收蚁整齐 我们利用微机自控催青系统进行严格的胚子发育进度掌控,并在转青齐一、且少见苗蚁的时候发种,一次性孵化率均在90%以上。

2.3.2 保证合理的温湿度,做到良桑饱食 我们运用从南方引进的小蚕饲育温湿自动控制器,并配以木框双层塑料保温保湿棚和木制式可叠放式蚕匾组合而成小蚕共育棚,能充分有效地给予原蚕合理的目的温湿度,保证按预定日期健康发育。在整个蚕期,做到提前分匾、匀座,防止蚕头过密,食桑不足;做到精选桑叶,剔除各类不良叶,五龄后期还要加强摘芯工作。

2.3.3 做好选除工作,淘汰不良个体 除在收蚁时扫除苗末蚁外,重点应在蚕期坚决淘汰弱小蚕、迟眠蚕、半脱皮蚕和不结茧蚕,按要求消毒深埋。种茧调查结束后,种场人员下去及时收回不良茧,制种期要督促淘汰大肚蛹、卷翅蛾、秃蛾等一切不

### 2.7 其他措施

外植体接入培养基后进行5天左右的暗培养,可一定程度上减轻褐化的发生;有报道适当降低培养基的盐分浓度,也有减轻组培苗褐化的作用。

### 3 小结

适宜的培养基和外植体褐化的程度是无菌体系建立成功与否的关键。在有适合桑树不同品种的培养基的基础上,采取合理的措施,将外植体的褐化减轻至较低水平,对建立桑树的无菌体系可起到事半功倍的效果;如若褐化问题不能解决,则很难建立起无菌体系。

### 参考文献

- [1] 管志文等. 农杆菌携带柞蚕抗菌肽基因转入桑树的研究. 蚕业科学, 1994, 20(1): 1-68
- [2] 王洪利. 桑树转水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Oryzacystatin)基因的研究[D]. 杭州: 浙江大学, [出版时间不详].
- [3] 王勇, 等. 植物基因工程技术及其在桑树上的应用前景. 蚕业科学, 1994, 20(4): 235-238
- [4] 邱璐, 等. 云桑组织培养中褐化问题的研究. 蚕业科学, 2000, 26(2): 118-119

正常蛹和蛾,充分保证品种纯正。

### 2.4 严格执行标准,联合种茧调查

我地的种茧调查工作都由省、市、县三家业务部门负责同志参加,按照当年所饲养品种应达的各项硬性指标,遵照执行。凡合格者,参与制种;不合格的,种场以适当高于普茧价收购用作原料茧,并补偿部分原种款,以减少群众损失。

### 2.5 做好发蛾调节工作

由于一户一般情况下只养一个品系,发育快慢也就在所难免,蚕期调节不过的,重点就在蛹期调节。此时,技术人员要根据中、日系蛹色变化情况,及时修正调温计划,预先做好提头留尾工作,尽量达到同日等量发蛾。

### 2.6 规范制种技术,严格袋蛾标准

制种工作中应采取早感光,掌握迟交长交的原则,坚决控制二交,禁止三交,交配时间不少于4~6 h。为控制产卵时长,达到即浸种、冷浸种生产要求,各驻村技术人员统一布控制种时间,并在当晚收回蛾袋统一保管。并对袋蛾情况,分户进行抽检,不达袋蛾标准的,对号入座,淘汰所制蚕种。