

果桑侧芽生长点组织快繁初探

田 洁,付 堃,杨爱珍,丁 宁,刘悦萍

(北京农学院生物技术系,北京 102206)

摘 要:果桑(*Morus spp*)具有很高的经济价值,是目前中国农业产业结构调整的首选树种。桑苗可通过组织培养快速繁殖。笔者以果桑侧芽生长点为材料,研究各种消毒条件、不同浓度的培养基和不同褐化抑制剂对其组织快繁的影响。实验结果得到了生长茁壮的愈伤组织,并诱导生根。主要结果如下:果桑生长点先用75%酒精消毒30s,再用加入少量吐温-80的0.1% HgCl_2 消毒8min,在 $\text{MS}+6\text{-BA } 2\text{mg/L}+\text{IAA } 0.5\text{mg/L}$ 的培养基上诱导愈伤率可达80%。在生根培养基 $\text{MS}+\text{IAA } 0.1\text{mg/L}+6\text{-BA } 0.5\text{mg/L}$ 上,生根率可达70%。如果直接进行不定芽诱导,在 $\text{MS}+\text{IAA } 0.2\text{mg/L}+6\text{-BA } 3.0\text{mg/L}$ 的培养基上,每个茎段平均可以产生3个不定芽。抗坏血酸可以在一定程度上抑制愈伤组织的褐化现象。但是在整个果桑组织培养过程中仍然存在很多问题,需要进一步研究。

关键词:果桑;侧芽;组织快繁

中图分类号:S888 **文献标识码:**A

The Primary Study of Mulberry Rapid Propagation by Culture of Side Bud Tissue

Tian Ji, Fu Shuang, Yang Aizhen, Ding Ning, Liu Yueping

(Department of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing 100206)

Abstract: Mulberry (*Morus spp*) is the optimized species in agricultural structure adjustment of China and has a high economic value. The seedling of mulberry can be propagated rapidly by tissue culture. The author focused on the effects of various sterilization conditions, different concentration of mediums and different browning inhibition on tissue rapid propagation using Mulberry's side bud tissue as explants. As a result, the explants have grown into healthy and strong callus and been inducted into roots. The main results were as follows: The Mulberry's side bud tissue was disinfected for 30 seconds using 75% alcohol firstly, then for 8 minutes by HgCl_2 solution with a few of Tween-80. In the culture medium of $\text{MS}+6\text{-BA } 2\text{mg/L}+\text{IAA } 0.5\text{mg/L}$, the induction rate of callus was about 80%. In the rooting culture medium of $\text{MS}+\text{IAA } 0.1\text{mg/L}+6\text{-BA } 0.5\text{mg/L}$, the rooting rate was about 70%. If taking adventitious bud induction directly, each stem can produce three adventitious bud averagely in the culture medium of $\text{MS}+\text{IAA } 0.2\text{mg/L}+6\text{-BA } 3.0\text{mg/L}$. Ascorbic acid can inhibit callus browning to a certain extent. But there are still many problems in the process of Mulberry's tissue rapid propagation and further study is necessary.

Key words: mulberry, side buds, tissue rapid propagation

果桑(*Morus spp*)是果、叶兼用的桑树。除收获桑果外,叶可养蚕,饲蚕后的桑枝,还可生产实用菌,具有很高的经济价值,是中国农业产业结构调整的首选树种^[1]。在桑树育种过程中,桑苗繁殖的方法很多,传统

的嫁接法和扦插法具有很大的局限性,一方面繁殖速度慢,往往需要几年时间,另外苗木质量较差,不能脱毒易感染病毒。近年来,由于植物的组织培养有着快速,脱毒,生产量大的特点,可利用组织培养快速繁殖

基金项目:北京市委组织部优秀人才资助项目(2005RC-01)。

第一作者简介:田洁,男,1985年出生,北京人,硕士,主要从事果树种质资源的研究。通信地址:102206 北京市昌平区回龙观镇朱辛庄北农路7号北京农学院0702信箱。Tel:010-80797447, E-mail: tianji19850331@sohu.com。

通讯作者:刘悦萍,女,1976年出生,副教授,研究方向为植物生理生化。通信地址:102206 北京市昌平区回龙观镇北农路7号。Email: cauping@sina.com。

收稿日期:2008-04-15,修回日期:2008-04-24。

大量脱毒苗,为加速培育果桑良种开辟了新途径^[2,3]。

关于桑树组织的研究,已建立起通过桑芽,胚,胚珠,胚轴,子叶,叶片,花药,原生质体的培养形成完整植株的体系^[4]。但是像叶片这些外植体,成愈率很低,小于10%,且愈伤组织生长较慢,多数很快褐变。桑芽生长点生长快,且诱导出的不定芽几乎不改变原有品种的性质,因而在组培育种上具有明显优势,但是顶芽生长点数量有限。桑侧芽是生长点组织的来源之一,可是生长较为缓慢,直接分离生长点比较困难。但通过调节培养基中激素含量,可使其生长速度加快。

一般认为桑树组织快繁中,从愈伤组织形成不定芽是比较困难的,原因是桑树的愈伤组织生长较其他木本植物慢,而且愈伤组织在培养过程中容易形成不定根而不易分化为不定芽。从桑树愈伤组织不定芽分化的报道来看,外源激素的配比主要以高浓度的细胞分裂素与低浓度的生长素配合使用。而在生长素/细胞分裂素比例高时,分化能力往往受到抑制^[5,6]。

虽然日本学者押金健吾已经通过桑下胚轴诱导产生愈伤组织并分化为不定芽,但是国内相关的报道很少^[6]。而且目前的果桑组培研究还没有达到生产的要求,存在费用较高,成活率偏低的现象,这些都限制了组织快繁技术在果桑生产上的应用^[7]。笔者以果桑侧芽生长点为外植体,对果桑组织培养快繁中的诱导愈伤培养基,继代培养基,分化培养基和实验中遇到的各种问题进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3年生果桑侧芽,取自北京昌平区小汤山国家科技园区。

1.2 培养方法

1.2.1 材料处理 取生长旺盛的桑树枝条,剪掉叶片,仅留3~5mm长的柄。用洗涤剂将枝条表面刷洗干净,流水冲洗6~8h。然后剪成适当长度的茎段。在超净工作台中,将茎段用75%乙醇浸泡15s,再用0.1%-0.2% HgCl_2 溶液灭菌15min,然后用无菌蒸馏水洗5次。

1.2.2 培养基的配制 以MS为基础培养基,添加不同浓度的6-BA和IAA配制不同浓度的愈伤组织(6-BA 0.1mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L 和 IAA 0.1mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L),愈伤分化(6-BA 0.1mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L 和 IAA 0.1mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L)和不定芽诱导(6-BA 0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L, 3.0mg/L 和 IAA 0.1mg/L, 0.2mg/L, 0.5mg/L, 1.0mg/L)培养基。所用器皿

和培养基在121℃、压力1.1kg/cm²下灭菌15min。

1.2.3 接种与培养 将消毒好的茎段严格按照无菌操作插入培养基中,如在分化培养基中,将愈伤组织直接放在培养基表面。将接种好的培养瓶在光照强度1500lx,温度25±2℃,光照时间12h的温室里,进行培养(见图1)。

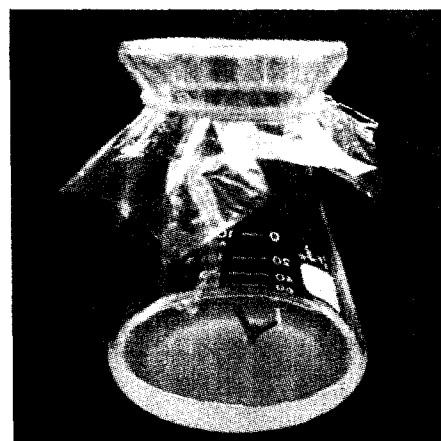


图1 外植体

1.3 各种消毒方法的比较

外植体在酒精中消毒后分别放入5%、10%和20%次氯酸钠,0.10%、0.15%和0.20% HgCl_2 , 0.10% HgCl_2 + 吐温-80, 0.15% HgCl_2 + 吐温-80, 0.20% HgCl_2 + 吐温-80九种消毒剂中,分别消毒3min, 5min, 8min, 10min,比较各种消毒剂的消毒效果,并记录结果。

1.4 各种褐化抑制剂的比较

愈伤组织生长到一定大小后,开始出现褐化,转移到分别加入0.1%PVP, 0.2%PVP, 0.1%活性炭, 0.2%活性炭, 20mg/L抗坏血酸, 40mg/L抗坏血酸的MS+6-BA 2mg/L + IAA 0.5mg/L培养基上,观察褐化情况,比较各种褐化抑制剂的效果。

2 结果与分析

2.1 不同时期培养基最佳激素浓度配比

通过实验发现,在MS+6-BA 2mg/L + IAA 0.5mg/L诱导愈伤培养基上接种的外植体,愈伤诱导率可达80%,得到了较好的愈伤组织(见图2),且愈伤组织生长速度较快。在MS+IAA 0.1mg/L+6-BA 0.5mg/L的生根培养基上,愈伤组织的生根率可达70%。而且根的个数比较多,分化率高(见图3)。当直接用外植体进行不定芽诱导时,在MS+IAA 0.2mg/L + 6-BA 3.0mg/L的不定芽诱导培养基上,诱导率可达70%。每个茎段平均可以产生3个不定芽(见图4)。

2.2 各种消毒条件处理比较的结果

实验结果表明,果桑生长点先用酒精消毒30s,再用加入吐温-80的0.1% HgCl_2 8min,消毒效果最好,

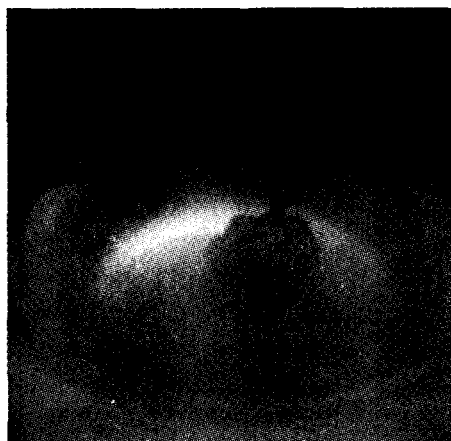


图2 愈伤组织

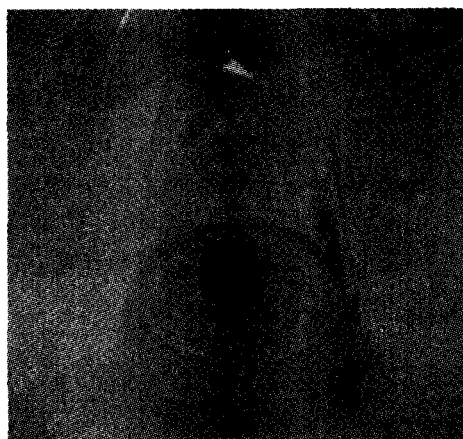


图3 生根培养

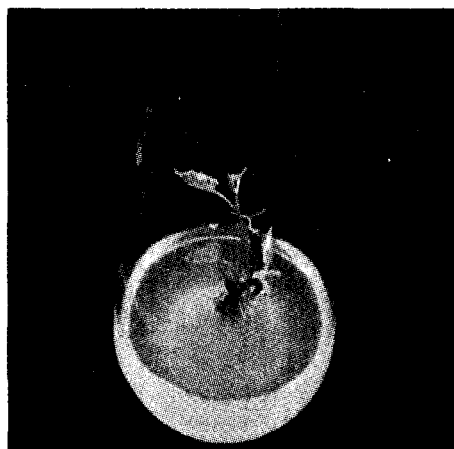


图4 不定芽诱导

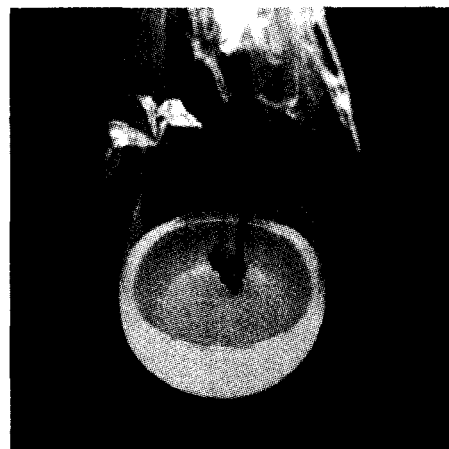


图5 褐化

褐化率较低。次氯酸钠效果很差,基本达不到杀毒效果。而 HgCl_2 浓度高,消毒时间长,虽然消毒效果比较好,但是会提高褐化率。

2.3 各种褐化抑制剂的效果

从褐化抑制剂的比较实验中可以看出,PVP,抗坏血酸,活性炭的效果都不是很好,褐化现象较严重(见图5)。相比较而言,抗坏血酸的效果相对较好,在一定程度上抑制了褐化现象的产生。

3 结论与讨论

实验试材属于木本植物,与草本植物相比,木本植物的许多性状特性复杂而不稳定,同一树体不同部位、不同时间所处的生理状态不同,且大多木本植物是异花授粉植物,因此外植体材料差异较大,进行植物离体培养试验可重复性小。木本植物继代增殖培养中培养物褐化、玻璃化问题较难克服。常规无性繁殖困难的树种,其组培技术各项技术指标的突破也存在一定的困难。迄今为止,木本植物组培技术还难以找到可普遍遵循的规律。

在实验中,同样遇到了消毒,褐化等问题。在消毒

上,通过加入吐温-80的方法,显著提高了消毒水平,感染的外植体明显减少。在褐化上,实验尝试了多种褐化抑制剂,但是效果不是很明显。

3.1 培养

在愈伤组织培养中,IAA浓度增加,会使外植体膨大,使愈伤组织的发生率降低。所以,应该适当控制IAA的浓度。近来人们对新型的细胞分裂素物质4-PU(苯基脲类细胞分裂素),TDZ(苯基噻二唑基脲)很感兴趣,但是至于能否利用到愈伤组织培养上还需研究^[8]。在生根培养中,IAA浓度过高,不利于生根。因为根对IAA敏感,IAA浓度过高,抑制根的分化^[9]。6-BA对不定芽的诱导有促进作用,在IAA浓度一定的情况下,分化率随6-BA浓度增加而增加^[10]。实验通过对比不同浓度的IAA和6-BA浓度对外植体诱导愈伤,生根及不定芽诱导的影响,得到了适合果桑侧芽愈伤诱导、生根和直接不定芽诱导的合适培养基成分及浓度,得到了较为满意的实验结果。

3.2 消毒

对于木本植物, HgCl_2 的消毒效果明显好于次氯

酸钠,而草本植物多用次氯酸钠消毒。所以,对于不同的试材,应选用不同的消毒方式^[11]。桑树为多年生木本植物,其茎秆组织疏松,因此灭菌极其困难,用10%~20%的次氯酸钠溶液几乎没有灭菌效果。因此对外植体消毒应使用 HgCl_2 。近年来,吐温-80 在木本植物组织培养中的作用越来越受到重视,搭配 HgCl_2 使用能够显著提高消毒效果。笔者在果桑组织快繁上尝试了这一方法,得到了较好的效果。

3.3 褐化

褐变是桑树组织快繁中的一个不容忽视的问题,尤其是当培养基中细胞分裂素的含量较高时,褐变现象尤为严重。实验通过在培养基中添加抗坏血酸, PVP, 活性炭等褐化抑制剂进行比较,发现抗坏血酸可以在一定程度上抑制褐变现象的发生。但是当培养时间较长时,培养物仍会发生明显褐变。可能是与其木本植物的特性有关。因此,果桑组织快繁中,建议应该及时转移培养物到新的培养基中。

通过以上实验,笔者对愈伤组织快繁的培养基进行了改进,提高了愈伤组织的诱导率。而且在生根培养和不定芽诱导的培养基的配方上,也进行了修正。在消毒方法上,笔者通过对多种消毒剂的比较,得出了一套较为完整的、低污染的消毒方法。通过以上几个方面的研究,为果桑高效再生体系的建立及遗传转化奠定了基础。目前来看,果桑的组织快繁研究水平较低、面积

窄。今后的工作重点应着重于组织快繁条件下的生理生化研究、突变体的诱导和筛选,适用于多基因型的高频再生体系和遗传转化的研究。

参考文献

- [1] 王金娣.果桑营养成分的测定.中国蚕业,2005,79:42.
- [2] 陈爱玉,倪国孚.桑树幼胚培养和试管苗快速繁殖技术的研究.蚕业科学,1989,15(4):173-176.
- [3] HARUMI YAKUWA,SEIBI OKA. Plant regeneration through meristem culture from vegetative buds of Mulberry (*Morus bombycis* Koidz).Stored in liquid nitrogen, Annals of Botany,1988(62):79-82.
- [4] 陈爱玉,王勇,倪国孚.桑子叶愈伤组织的培养与植株再生.蚕业科学,1995,21(2):120-121.
- [5] 押金见吾.桑树愈伤组织在各种培养条件下的再分化研究.日本蚕丝科学与技术,1989,10(11):13-19.
- [6] 谈键中.植物激素与外植体种类对愈伤组织初代培养不定芽的影响.苏州蚕专学报,1991(2):6-8.
- [7] 孔令汶,谭智达,卞元生,等.影响桑树叶片培养不定芽形态分化主要因素的研究.蚕业科学,1995,21(2):67-71.
- [8] 张建华,管帮富,彭火辉.果桑的组培快繁技术初探.蚕桑茶叶通讯,2003(3):35.
- [9] 张和禹,李东升,林青松.桑下胚轴愈伤组织诱导分化的研究.安徽农业科学,2003,31(5):776-777.
- [10] 邱璐,陈严平,张光明.云桑2号的组织培养和快速繁殖.云南农业大学学报,2000,15(1):89-92.
- [11] 杨金富,余茂德,徐立,等.桑树试管苗生根因素研究.蚕学通讯,2002,22(3):1-5.