

果桑离体组织培养研究

刘健, 于元杰 (山东农业大学, 山东泰安 271000)

摘要 以果桑为材料, 对其进行组织培养, 结果表明: 基本培养基 MS 较有利于果桑芽体的萌发与生长; 初代培养最佳培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 继代培养最佳培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L; 生根培养最佳培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

关键词 果桑; 组织培养

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)16-3891-02

Study on Mulberry Tissue Culture System

LIU Jian et al (Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000)

Abstract We studied mulberry tissue culture system and quick multiplication technology. Through this experiment, following result was obtained: the basic culture medium was MS to be advantageous to fruit mulberry sprouting and growth. The initially generation medium should be MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The subculture medium should be MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L. Rooting culture medium should be 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L.

Key words Fruit mulberry; Tissue culture

1 材料与方法

1.1 试验概况 试验在山东滨州职业学院植物组织培养中心进行。接种材料取自山东省滨州市邹平县地方果桑品种大紫甜。取春季新梢顶芽, 用洗洁净溶液浸泡芽体 20 min, 不断用试管刷搅拌, 自来水冲洗干净后, 再用滤纸吸干芽体表面水份。将芽装入磨口的广口瓶, 加入适量体积的 0.1% HgCl₂ 溶液, 并加入 1~2 滴吐温-80, 用力振荡 5~10 min, 倒去消毒液后, 用无菌水清洗 3~4 次。在无菌滤纸上剥取芽内生长点接种, 4~5 个/瓶。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基筛选。 分别用 MS(Murashige and skoog)、1/2MS、WPM(Wood plant medium)、B5(Gamborg's B5 medium)作基本培养基, 各处理采用相同的激素水平, 添加 BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。各处理接种 10 瓶, 3 个芽/瓶, 3 次重复。25 d 后观察芽生长情况。

1.2.2 初代培养基筛选。 ①不同 BA 浓度对茎芽增殖的影响。BA 浓度设 0.4、0.8、1.2、1.4、1.8、2.0、2.4、2.8 mg/L 8 个处理, 各处理分别接芽 15 个, 28 d 后调查茎芽增殖情况。②BA 与 NAA 配合使用对茎芽增殖的影响。BA 为 2.0 mg/L, NAA 浓度设 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mg/L 8 个处理。各处理分别接芽处理接芽 15 个, 28 d 后调查茎芽增殖情况。

1.2.3 继代增殖培养基筛选。 以 MS 为基本培养基, 分别附加 BA 0、1.0、2.0、3.0 mg/L 和 NAA 0、0.01、0.05、0.10 mg/L, GA₃ 0、0.5、1.0、2.0 mg/L, 采用正交试验设计。30 d 后调查茎芽生长情况。

1.2.4 生根培养基筛选。 将继代培养基中高于 1.5 cm 的幼苗切出, 分别转接到如下生根培养基上: 1/2MS、1/2 MS+NAA 0.2 mg/L、1/2 MS+NAA 0.5 mg/L; 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L; 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L、1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 1.0 mg/L; 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 1.5 mg/L。各培养基中均加入 0.15% 的活性炭。每个处理接 30 个幼苗, 3 次重

复, 25 d 后统计生根率。

1.3 培养条件 培养室温度 23~25 ℃, 光照 2 000~2 500 lx 左右, 光照时间 12 h。基本培养基为 MS, 附加蔗糖 20 g/L, 琼脂 6 g/L 作为固定剂, pH 值为 5.8~6.0。

1.4 数据处理 试验数据用 DPS(Data process syst)统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基筛选 果桑顶芽在不同培养基上的生长情况见表 1。表 1 表明, 培养 8 d 后芽开始伸长, 基部膨大, 逐渐形成愈伤组织。MS 培养基上产生愈伤数、愈伤萌芽数均为最多, 芽长最长; B5 和 WPM 培养基次之; 1/2MS 培养基上产生愈伤数、愈伤萌芽数均为最少, 芽长最短。采用新复极差测验(SSR), 进行差异显著性分析, 结果见表 2。

表 1 培养基对果桑芽体萌芽及生长的影响

培养基	接种芽数/个	产生愈伤数/个	愈伤萌芽数/个	芽长/cm	叶片颜色
WPM	90	41	1.6	1.6	深绿
B5	90	48	2.1	1.6	淡绿
MS	90	61	2.4	1.8	绿色
1/2MS	90	38	1.3	1.3	淡绿

表 2 培养基对果桑芽体萌芽及生长的影响分析

	愈伤率/%	差异显著性	愈伤萌芽数/个	差异显著性	芽长/cm	差异显著性
MS	20.3	a	A	MS	2.4	a
B5	16.0	b	B	B5	2.1	ab
WPM	13.7	bc	B	WPM	1.6	bc
1/2MS	12.7	c	B	1/2MS	1.3	c

表 2 表明, 产生愈伤数, MS 培养基与其他 3 个培养基间存在显著差异。愈伤萌芽数, MS 与 WPM 培养基间存在差异, 但不显著; MS 与 1/2 MS 培养基间差异达显著水平。芽长, 各培养基间虽存在差异, 但差异均不显著。说明基本培养基 MS 较有利于果桑芽体的萌发与生长。

2.2 BA 浓度对愈伤增殖的影响 BA 是愈伤组织增殖的重要影响因素。表 3 表明, BA 浓度在 0.4~2.0 mg/L 范围内, 试管苗愈伤增殖数随 BA 浓度的增加而递增; 当 BA 浓度达 2.0 mg/L 时, 愈伤增殖的平均数达最大值, 为 6.0 芽/个。随后愈伤芽增殖数随 BA 用量的增加而递减, 当 BA 浓度为

作者简介 刘健(1973-), 男, 山东邹平人, 硕士, 讲师, 从事植物组织培养和生物技术方面的研究。

收稿日期 2006-05-11

2.8 mg/L 时,愈伤增殖数仅为 2.8 个芽/个,比 BA 浓度为 1.4 mg/L 时的茎芽增殖数减少 3.2 芽/个。说明愈伤增殖培养时 BA 的最佳浓度为 2.0 mg/L。

表 3 BA 浓度及 BA 与 NAA 配合使用时 NAA 浓度对果桑愈伤增殖的影响

激素浓度//mg/L	愈伤芽增殖数	激素浓度//mg/L	愈伤芽增殖数
BA 0.4	1.5	BA 2.0+NAA 0.05	4.9
BA 0.8	2.3	BA 2.0+NAA 0.10	6.5
BA 1.2	4.3	BA 2.0+NAA 0.15	5.5
BA 1.4	4.6	BA 2.0+NAA 0.20	4.6
BA 1.8	4.8	BA 2.0+NAA 0.25	4.2
BA 2.0	6.0	BA 2.0+NAA 0.30	4.1
BA 2.4	4.5	BA 2.0+NAA 0.35	3.3
BA 2.8	2.8	BA 2.0+NAA 0.40	3.1

2.3 BA 与 NAA 配合使用对茎芽增殖的影响 当 BA 用量一定(2.0 mg/L)时,配合不同用量的 NAA 进行试验(表 3)。表 3 表明,在试验处理范围内,NAA 浓度以 0.1 mg/L 效果最好,其愈伤平均增殖数为 6.5 芽/个。NAA 浓度高或低于 0.1 mg/L 效果都不理想。

2.4 继代培养基筛选 表 4 表明,培养基中只添加 NAA 和 GA₃ 时,芽的萌发率很低;添加 NAA、GA₃ 和 1.0 mg/L BA 时,萌芽率均值上升;添加 NAA、GA₃ 和 2.0 mg/L BA 时,萌芽率均值达最大,为 76.7%,且在嫩茎中部有 2 重芽萌发,萌芽较长;添加 NAA、GA₃ 和 3.0 mg/L BA 时,萌芽率均值有所下降。

表 4 不同植物生长调节物质及浓度配比对果桑萌芽率及生长影响

激素浓度//mg/L	接种数	萌芽率	芽长	叶色
BA 0+NAA 0+GA ₃ 0	30	0	0	深绿
BA 0+NAA 0.05+GA ₃ 0.5	30	8.2	0.7	深绿
BA 0+NAA 0.10+GA ₃ 1.0	30	21.5	1.3	深绿
BA 0+NAA 0.20+GA ₃ 2.0	30	13.5	1.5	深绿
BA 1.0+NAA 0+GA ₃ 2.0	30	52.1	2.2	绿色
BA 1.0+NAA 0.05+GA ₃ 0	30	47.8	1.4	绿色
BA 1.0+NAA 0.10+GA ₃ 0.5	30	43.2	1.9	绿色
BA 1.0+NAA 0.20+GA ₃ 1.0	30	53.3	1.8	绿色
BA 2.0+NAA 0+GA ₃ 1.0	30	81.0	1.6	淡绿
BA 2.0+NAA 0.05+GA ₃ 2.0	30	75.3	2.0	淡绿
BA 2.0+NAA 0.10+GA ₃ 0	30	68.1	1.3	淡绿
BA 2.0+NAA 0.20+GA ₃ 0.5	30	82.4	1.7	淡绿
BA 3.0+NAA 0+GA ₃ 0.5	30	61.3	1.6	黄绿
BA 3.0+NAA 0.05+GA ₃ 1.0	30	59.8	1.2	黄绿
BA 3.0+NAA 0.10+GA ₃ 2.0	30	71.4	1.3	黄绿
BA 3.0+NAA 0.20+GA ₃ 0	30	75.5	0.7	黄绿

表 7 不同植物生长调节物质及浓度对果桑生根的影响

处理	供试苗数	生根苗数	生根率//%	平均根数	平均根长	根生长情况
1/2 MS	90	75	83	1.1	2.0	根细弱,叶色浅绿
1/2 MS+NAA 0.2	90	90	100	4.5	2.6	根较粗壮,叶色深绿
1/2 MS+NAA 0.5	90	90	100	3.3	2.5	根较粗壮,叶色深绿
1/2 MS+NAA 1.0	90	90	100	3.7	2.2	根较粗壮,叶色深绿
1/2 MS+NAA 0.2+IBA 0.5	90	90	100	5.5	3.9	根较粗细合适,叶色绿色
1/2 MS+NAA 0.2+IBA 1.0	90	90	100	5.0	4.1	根较粗细合适,叶色绿色
1/2 MS+NAA 0.5+IBA 1.5	90	90	100	4.7	3.5	根较粗细合适,叶色绿色

管苗茎芽增殖数随 BA 浓度的增加而递增,BA 浓度采用 2.0 mg/L 效果最好;NAA 浓度采用 0.1 mg/L 效果最好。初代培养最佳培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

(3)继代培养。试验表明,添加 2.0 mg/L BA 时,萌芽率均值最大;对于芽长的影响 BA 的效果最显著,其次为 GA₃,再次为 NAA。继代培养最佳培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L。

(4)生根培养。试验表明,同时添加 NAA 和 IBA 对生根效果较好;大紫甜果桑生根培养的最佳培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

由极值 R(表 5)可以看出,BA 促进萌芽率效果最佳,说明萌芽对 BA 的反应敏感;促进萌芽率效果其次为 NAA、GA₃,两者各处理水平间差异较小。表 5 表明,继代培养的培养基最佳配比为 MS+2.0 mg/L BA+0.20 mg/L NAA+1.0 mg/L GA₃。由方差分析表(表 6)可以看出,BA 与 NAA、GA₃ 间的萌芽率差异显著,NAA 与 GA₃ 间的萌芽率差异不显著,这与极值分析结果相符。

对芽长的影响,BA 效果最显著,其次为 GA₃,再次为 NAA。

表 5 不同植物生长调节物质对果桑萌芽率及生长影响的极值

均值	萌芽率			芽长		
	BA	NAA	GA ₃	BA	NAA	GA ₃
K ₁	10.8	48.6	47.9	0.9	1.4	1.4
K ₂	49.1	47.8	48.8	1.8	1.3	1.5
K ₃	76.7	51.1	53.9	1.7	1.5	1.5
K ₄	67.0	56.2	53.1	1.2	1.4	1.8
R	65.9	7.6	6.1	0.9	0.2	0.4

2.5 生根培养 激素对植物根的生长发育影响很大。不同植物生长调节物质及浓度对果桑生根的影响结果见表 7。

表 6 不同植物生长调节物质对果桑萌芽率的方差分析

处理	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
BA	10 144.400	3	182.930	*
NAA	171.615	3	3.095	
GA ₃	127.295	3	2.295	
误差	55.45	3		

注:置信度 $\alpha=0.05$ 。

由表 7 可知,在该试验采用的所有培养基上,果桑均能够生根,说明果桑组培苗容易生根。表 7 还表明,在只添加 NAA 的情况下,单株根的数量平均达到 3.7 条,根较粗壮,叶色深绿;在同时添加 NAA 和 IBA 的情况下,根的粗细适中,叶色绿色。说明同时添加 NAA 和 IBA 对果桑生根的效果更好。适宜大紫甜果桑生根的最佳培养基为 1/2 MS+NAA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L。

3 结论

(1)基本培养基筛选。试验表明基本培养基 MS 较适合果桑芽体的萌发与生长。

(2)初代培养。试验表明,BA 浓度为 0.4~2.0 mg/L 时,试

参考文献

- [1] 胡彦,赵艳.植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2004,32(专辑):130-134.
- [2] 王卓伟,余茂德,鲁成,等.桑树多倍体育种材料遗传背景 AFLP 分析[J].蚕业科学,2001,27(3):33-35.
- [3] 柯益富.桑树栽培及育种学[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [4] 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.
- [5] 徐立,余茂德,杨金富,等.不同桑树材料冬芽组织培养试验[J].蚕学通讯,2002,22(3):10-12.
- [6] JAINAK.用不同基因型桑树腋芽增殖的试管繁殖[J].国外农学——蚕业,1992,52:38-41.
- [7] 片濑雅彦.桑腋芽培养与新梢增殖[J].国外农学——蚕业,1994,57:35-38.