



长穗桑四倍体诱导初步研究

武宇坤, 何建, 王西木, 郭启高, 梁国鲁

(西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要: 以长穗桑为试验材料, 对其进行继代增殖及对最佳增殖培养基进行了筛选, 并用组织培养技术结合秋水仙素溶液浸泡法以获得四倍体新材料。结果表明: 增殖培养基采用 MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L+蔗糖 30mg/L 最佳, 其最高的增殖系数为 3.2。四倍体诱导率达到 26.7%, 其染色体数目为 $2n=4x=56$, 最佳诱导条件为用 0.2% 的秋水仙素溶液浸泡 3d。所获得的四倍体最适生根培养基为 1/2MS + BA0.1mg/L + NAA0.05mg/L + 30mg/L 蔗糖, 生根率达到 100%。

关键词: 长穗桑; 多倍体; 组织培养; 诱导

中图分类号: S663.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1672-450X (2008) 02-0026-02

Preliminary Study on Tetraploid Induction of *Morus wittiorum*

WU Yu-kun, HE Jian, WANG Xi-mu, GUO Qi-gao, LIANG Guo-lu

Horticulture and Landscape Academy of Southwest University, Beibei 400716, China

Abstract: An experiment of *Morus wittiorum* was carried out in vitro with colchicine solutions to select the favourable proliferation medium for tetraploid. The results indicated that the optimum proliferation medium was MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L+sugar 30mg/L. The proliferation coefficient could reach to 3.2 and induction rate of tetraploid was 26.7% with chromosome number of $2n=4x=56$. The optimal induction result was obtained by treatment with 0.2% colchicine solution for 3 days. 1/2MS+BA0.1mg/L+NAA0.05mg/L+sugar 30mg/L was optimal for rooting, and rooting rate reached 100%.

Key words: *Morus wittiorum*; polyploid; tissue culture; induction

果桑的果实即桑椹, 味甜, 有滋阴益肾、养血生津的功效, 并且具有营养丰富、防病治病和延缓衰老等功能特点, 在食品和药品上的应用都很广泛。据专家预测, 桑果将成为第三代水果中的精品, 21 世纪初在全球将掀起食用桑椹热^[1, 2]。

长穗桑 (*M. wittiorum* Hand-Mazz.) 是自然野生桑种, 叶大而厚, 可作养蚕用叶; 果实大且味甜, 又可作果用桑; 因树型高大, 还可作木材用桑^[3-5]。目前我国的果用桑栽培品种以二倍体为主, 也有一定数量的三倍体, 天然四倍体种质很罕见。生产上应用的三倍体桑大多具有优质、高产、桑果大、无核、肉厚等优良性状, 但关于长穗桑多倍体诱导尚无相关报道。

本试验拟在原有获得长穗桑无菌体系的基础上, 结合组织培养诱导出长穗桑多倍体新种质资源, 并希望从中选育出更多类型的产量高、品质好的新品种。

1 材料和方法

1.1 试验材料

云南省热带作物科学研究所提供的优良长穗桑枝

条。

1.2 试验方法

1.2.1 长穗桑继代增殖培养基的筛选

待初代培养的外植体抽出侧芽后, 切取侧芽转入继代增殖培养基中。其培养基的激素处理组合见表 1。每处理 10 瓶, 每瓶 3~4 个芽。30d 后统计增殖率。

1.2.2 秋水仙素溶液浸泡法诱导多倍体

本实验参照郭启高等的秋水仙素浸泡法进行多倍体的诱导^[6]。

1.2.3 多倍体的鉴定

分别取 1~2 个茎尖或刚发出来的幼叶作为材料, 参照李懋学 (1996) 的染色体计数法进行^[7]。

1.2.4 四倍体植株的生根与移栽

选择生长健壮, 高 3~5cm 的试管苗, 切掉其基部的愈伤组织, 然后转移到生根培养基上, 诱导其不定根的产生。生根培养基采用 1/2MS + BA0.1mg/L + NAA0.05mg/L + 30mg/L 蔗糖。

当试管苗基部长出 1~3 根乳白色不定根时, 进行炼苗 1 周左右, 取出试管苗, 用水冲洗掉根上附着的培养基, 移栽到营养钵中, 精心管理。



2 结果与分析

2.1 适宜培养基筛选

从表1可以看出:随着BA浓度的增加,增殖率也相应的提高,而NAA、蔗糖的浓度和增殖率的提高并没有明显的线性关系。最优组合是 $A_3B_3C_2$, 即MS+BA2.0mg/L+NAA0.2mg/L+蔗糖30mg/L,其增殖率最高达320%。从表2可看出,对长穗桑增殖率影响最大的是BA,而NAA和蔗糖的影响作用较小。

表1 不同激素与蔗糖浓度组合下的增殖系数

序号	BA	NAA	蔗糖	接种数	增殖芽数 (30d)/个	增殖系数
1	0.5	0.05	20	39	58	1.48
2	0.5	0.1	30	40	68	1.70
3	0.5	0.2	40	40	50	1.25
4	1.0	0.05	30	32	86	2.69
5	1.0	0.1	40	40	89	2.23
6	1.0	0.2	20	38	84	2.21
7	2.0	0.05	40	32	98	3.06
8	2.0	0.1	20	36	94	2.61
9	2.0	0.2	30	30	96	3.20

表2 最小显著极差法的分析结果

因子	水平1	水平2	水平3	极大值	极小值	极差R
BA	148	237	296	296	148	148
NAA	241	218	222	241	218	23
蔗糖	210	253	218	253	210	43

2.2 多倍体诱导

由表3可见,随着秋水仙素处理浓度的提高,对茎尖的伤害程度相应加重,而且,同一秋水仙素处理浓度随处理时间的增加与茎尖受伤害程度呈正相关;同时看到,用高浓度的秋水仙素处理,随着处理时间的延长其诱导率反而下降,这是由于伤害程度也随之加重而使得大部分材料死亡。在对秋水仙素处理浓度和处理时间的最佳组合研究中,以0.2%秋水仙素处理3d效果好,诱导率最高,为26.7%,且纯合四倍体植株的比例最大,为20.0%。所有处理组合共得到15株纯合四倍体,16株嵌合体,纯合四倍体的平均得率为2.5%。死亡材料总数为141株,平均死亡率为23.5%。

2.3 长穗桑多倍体的鉴定

根据幼嫩根尖细胞染色体的观察结果,未处理的

表3 秋水仙素溶液浸泡长穗桑对诱导多倍体的影响

秋水仙素浓度 (%)	浸泡时间 (d)	处理数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)	获得多倍体 (个)		诱导率 (%)
					4x	嵌合体	
0.00	2	30	0	0.0	0	0	0.0
0.05	1	30	0	0.0	0	0	0.0
	2	30	0	0.0	0	0	0.0
	3	30	0	0.0	0	0	0.0
	4	30	0	0.0	0	0	0.0
	5	30	0	0.0	0	1	3.3
0.1	1	30	0	0.0	0	0	0.0
	2	30	0	0.0	0	0	0.0
	3	30	0	0.0	0	0	0.0
	4	30	2	6.7	0	1	3.3
	5	30	5	16.7	0	2	6.7
0.2	1	30	1	3.3	0	2	6.7
	2	30	3	10.0	2	1	10.0
	3	30	8	26.7	6	2	26.7
	4	30	15	50.0	1	2	10.0
	5	30	21	70.0	3	1	13.3
0.4	1	30	2	20.0	2	2	13.3
	2	30	10	33.3	2	1	10.0
	3	30	15	50.0	0	1	3.3
	4	30	23	76.7	0	0	0.0
	5	30	27	90.0	0	0	0.0

对照二倍体植株中的细胞染色体数为 $2n=2x=28$ 。而经秋水仙素溶液处理后的材料,虽存在较高比例的嵌合体,但同时也获得了较多纯合的四倍体植株。所得到的四倍体染色体数目为 $2n=4x=56$ 。

2.4 多倍体生根

经观察,15d后所有四倍体试管苗基部均能长出1~3根乳白色粗壮的不定根,其生根率达到100%。

3 讨论

3.1 诱变处理部位的选择

本实验采用长穗桑的茎尖作为诱变处理,因为茎尖细胞的分裂最旺盛,对药剂的吸收也较快,易于和秋水仙素相结合,提高诱变频率。

不同试验材料与秋水仙素溶液的结合能力不同,对秋水仙素的耐受性也不尽相同,因此所采用的方法不同,其诱导效果也不同。在用秋水仙素进行多倍体诱导实验中,采用何种方法应根据具体材料、具体品种而定。一般采用生命力旺盛的组织,如萌发的种子和生长点,是最好的处理材料,还可采用愈伤组织、茎尖组织、原生质体等离体材料^[8]。(下转第41页)



2.3 石斛种植

在选好的地块上搭建高1.7m的荫棚,宽随地形而定,向阳面挂一草帘,以利调节温湿度和保持通气。

植地用多菌灵、百菌清等药剂处理后,用小砾石拌少量细沙,作宽40cm,长120cm,高17cm的高畦,或根据地形每隔1m栽一根木桩,用木板边材、竹片搭成高60~80cm,宽100~120cm的床架,上铺高10~15cm经发酵的锯木屑,用木板压实,平整后栽培。种植密度约100株/m²。

从不同材料的栽培试验结果(表1)可以看出,经发酵的锯木屑是人工栽培石斛较理想的基质。冬季栽植,翌年春季随气温升高,石斛苗开始长根发芽,随着气温的逐渐升高,石斛的长势越来越好,6~7月生长量最大,年可达1m以上。

2.4 田间管理

2.4.1 水肥管理

石斛栽植后要保持湿润,适当浇水,但不能浇水过多,以免造成积水烂根。

石斛栽植后一般在次年开始追肥,每年1~2次。第一次追肥在清明前后,以氮肥混合猪牛粪及河泥为主;第二次追肥在立冬前后,用花生枯、菜籽饼、过磷酸钙等,加河泥调匀糊在苗株根部,此外每隔1~2个月,用2%的过磷酸钙或1%的硫酸钾作根外施肥。

2.4.2 调整郁闭度

石斛种植地的郁闭度以60%左右为宜,因此石斛生长期要经常调整郁闭度,避免过于荫蔽或郁闭度不足。

3 病虫害防治

石斛常见的病虫害有以下几种:

(1) 石斛炭疽病: 为害叶片及茎枝,受害叶片出现褐色或黑色病斑,1~5月发生。该病可用50%多菌灵1000倍液或50%甲基托布津1000倍液喷雾防治。

(2) 石斛菲盾蚧: 在植株叶片边缘或背面吸食汁液,引起叶片枯萎,严重时造成整株枯黄死亡,同时还会引发煤污病。可采用40%乐果乳剂1000倍液或1~3度石硫合剂喷雾防治。清除老虫枝,集中烧毁。

(3) 蜗牛: 藏于叶背取食叶肉、茎和花瓣,为害极大。防治方法: 用蜗牛净或用麸皮拌敌百虫,撒在其活动的地方诱杀;或在栽培床及周边环境喷洒敌百虫、溴氰菊酯,亦可撒生石灰、饱和食盐水。同时注意保持场所卫生,把枯枝败叶及时清除棚外。

4 采收与初加工

石斛全年均可采收,以秋后采收的质量为佳。引种栽培的石斛一年以后即可陆续采收,采收时应注意采老留嫩,留下嫩茎继续生长,达到一年栽种多年受益之目的。

表1 石斛大棚栽培试验资料

材 料	种植期	发芽时间	成活率(%)	年生长量(cm)	肥料处理	效 果
砾石拌细沙	冬季	3月	85	55	农家肥	死株多
锯木屑(发酵)	冬季	2月	95	85	复合肥	成 活

(上接第27页)

3.2 秋水仙素处理的浓度和时间

关于秋水仙素处理的浓度和时间问题,人们有不同的看法,因为不同的浓度与处理时间会对细胞产生不同程度的影响,所以掌握好秋水仙素诱变处理的浓度与时间问题是关键^[6]。本实验采用了秋水仙素浸泡茎段法,得出适合长穗桑的秋水仙素有效浓度为0.2%,浸泡法的处理时间为3d。

参考文献:

[1] 杨德铨. 桑果开发利用的可行性研究[J]. 蚕桑通报. 1991, 22(1): 58-60.

[2] 操红缨. 桑椹研究进展[J]. 时珍国医国药. 1999, 10(8): 624-626.
 [3] 刘利, 潘一乐. 果桑资源研究利用现状与展望[J]. 植物遗传资源科学, 2001, 2(2): 61-65.
 [4] 储一宁. 云南果用桑资源与开发[J]. 云南蚕桑通讯. 1995(3): 28.
 [5] 储一宁, 余茂德. 云南省桑属植物种质资源分类及生态分布研究[J]. 蚕业科学, 2002, 28(1): 1-6.
 [6] 郭启高, 张钟灵, 周虹, 等. 秋水仙碱诱导生姜多倍体的研究[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(5): 400-402.
 [7] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
 [8] 景士西. 园艺植物育种学总论[M]. 北京: 中国农业出版社, 226.