

文章编号:1001-4829(2008)01-0142-05

长穗桑组织培养和四倍体新种质诱导

何建¹,冯焱²,王建辉¹,陈克玲¹,梁国鲁³

(1. 四川省农业科学院园艺研究所,四川成都 610066;2. 成都市第二农业科学研究所,四川成都 611130;3. 西南大学,重庆北碚 400716)

摘要:以长穗桑枝条为外植体,建立其无菌离体快繁体系,综合利用组织培养技术和秋水仙素诱变技术,进行四倍体诱变处理,试验结果表明:长穗桑最佳的增殖培养基为 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L,最佳的生根培养基为 1/2MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 30 g/L 蔗糖,四倍体诱导的最佳处理条件为 0.2 % 浓度的秋水仙素浸泡茎段 3d,诱导率最高为 16.7 %。

关键词:长穗桑;组织培养;秋水仙素;四倍体**中图分类号:**S883.7*4 **文献标识码:**A

Studies on tissue culture and tetraploid induction of *Morus wittiorum* Hand-Mazz.

HE Jian¹, FENG Yan², WANG Jian-hui¹, CHEN Ke-ling¹, LIANG Guo-lu³

(1. Horticulture Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 610066, China; 2. Chengdu Seoend Research Institute of Agricultural Sciences, Sichuan Chengdu 611130, China; 3. Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A study of inducing tetraploid by treating in vitro stem segment of *Morus wittiorum* Hand-Mazz. was carried out with different concentrations of colchicines solution and different treated durations. The results indicated that MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + sucrose 30 g/L was the optimum medium for bud proliferation, and 1/2MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + sucrose 30 g/L is optimal for rooting. The highest induction rate of *Morus wittiorum* Hand-Mazz. was 16.7 % by treatment with 0.2 % colchicines solution for 3 days.

Key words: *Morus wittiorum* Hand-Mazz.; tissue culture; colchicine; tetraploid

长穗桑 (*Morus wittiorum* Hand-Mazz.), 是桑科 (Moraceae) 桑属 (*Morus*) 植物。长穗桑原产我国^[1], 果可食用, 叶可养蚕, 且果实和鲜叶产量都很高, 是难得的果叶两用桑树, 有较大的经济实用价值。桑果 (又称桑椹) 具营养丰富、防病治病和延缓衰老等功能特点, 在食品和药品上的应用极为广泛。特别是桑果中含有一种叫“白黎芦醇”(RES) 的物质, 能刺激人体内某些基因抑制癌细胞生长, 并能阻止血液细胞中栓塞的形成^[2]。因此, 无论是传统医学还是现代医学都视桑椹为防病保健之佳品。

目前, 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

用的多倍体桑大多具有优质、高产、果个大、肉质厚等优良性状, 因此, 本试验采用组织培养技术和多倍体育种技术相结合的方法, 诱导培育长穗桑四倍体新种质资源, 以期从中选育出产量高品质好的四倍体新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以云南省热带作物研究所提供的优良长穗桑枝条为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体材料灭菌及培养条件 取长穗桑枝条, 剪断成带芽的小段, 洗涤剂浸泡 10 min, 自来水冲洗 30 min, 75 % 乙醇处理 40 s, 0.1 % 升汞消毒 12 min (升汞中加 1~2 滴 2 % 吐温-20), 无菌水洗 4~6 次。采用基本培养基 MS, 并依试验目的的需要添加不同浓度配比的激素和蔗糖, 每种培养加琼脂

收稿日期:2007-09-11

作者简介:何建(1980-), 男, 重庆綦江人, 硕士, 主要从事园艺育种研究, E-mail: emailhejian@126.com.

表 1 增殖培养基的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表(供试因子和水平)

因子水平 Level of factors	因子种类 Factor		
	A	B	C
	BA/(mg · L ⁻¹)	BA/(mg · L ⁻¹)	蔗糖/(g · L ⁻¹)
1	0.5	0.05	20
2	1.0	0.1	30
3	2.0	0.2	40

6 g/L,pH 调至 5.8。培养温度为 25 ℃,每天光照 12 ~ 14 h,光照强度为 1500 ~ 2000 lx。

1.2.2 离体再生体系的建立 采用 $L_9(3^4)$ 正交表^[3],考察不同成分的培养基对长穗桑增殖率的影响。待初代培养的外植体抽出侧芽后,切取侧芽转入表 1 中按正交试验 $L_9(3^4)$ 设计的不同的继代增殖培养基中。每处理 10 瓶,每瓶 3 ~ 4 个芽。30d 后统计增殖率,因子水平安排(表 1)。

1.2.3 多倍体的诱导方法 将获得的无菌试管苗茎尖转移到已过滤灭菌的浓度分别为 0.05 %、0.1 %、0.2 %、0.4 % 的秋水仙素溶液中,处理时间有 1、2、3、4、5 d 5 个梯度,对照用无菌水处理 3 d。共计 21 个处理组合,每种组合处理 30 株,放于摇床上轻轻摇动使其与秋水仙素溶液充分接触,处理完毕用无菌水冲洗 4 ~ 5 次,转入到不含有秋水仙素的继代培养基上继续培养,待长势恢复良好,得到完整植株后,用茎尖进行染色体倍性鉴定。确定为四倍体的株系予以保留并繁殖。

1.2.4 四倍体的鉴定 采用去壁低渗火焰干燥法^[4]检测长穗桑染色体数目。每株分别取 1 ~ 2 个

茎尖或刚发出来的幼叶作为实验材料。其流程为:切取分裂旺盛的茎尖或刚发出来的幼叶→0.002 mol/L 8-羟基喹啉预处理 2.5 ~ 3.5 h→用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 2 ~ 24 h→纯净水洗净固定液→酶解(3 % 纤维素酶:3 % 果胶酶=1:1)2 ~ 4h→用纯净水后低渗 10 min→固定 30 min 以上→涂片,风干→5 % Giemsa 染料(pH=7.0)染色 6 ~ 10 min→自来水洗净玻片上多余的染料→镜检、计数、显微摄影。

2 结果与分析

2.1 BA、NAA 及蔗糖不同配比对长穗桑增殖效果的影响

从表 2 中可以看出,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。从表 3 各因子的水平来看,最优组合是 $A_3B_1C_2$,即 BA 浓度为 2 mg/L, NAA 浓度为 0.05 mg/L 和蔗糖 30 g/L,但未在本试验中反映出来。而从实际结果(表 2)看出,最优组合是 $A_3B_3C_2$,即 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L,其最高的增殖率为 320 %。这是因为正交试验是一种均一性试验设计,不可能包含所有处理组合,但仍可以选择较好的处理组合。从极差值来看,由于极差值越大,表示该因子越重要,因此从表 3 可看出 3 种因子中,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。而且,通过多重比较,在 0.05 的显著水平上,3 个水平的 BA 浓度使长穗桑的增殖率有显著差异,随浓度增加,增殖率显著增加。

表 2 增殖培养基正交试验表配比及增殖结果

试验代号 No.	因子 Factor			接种数 No. of inoculation	增殖芽数(30 d)/个 No. of shoots	增殖率(%) P. C. of multiplication
	A BA	B NAA	C 蔗糖			
1	0.5	0.05	20	39	58	148
2	0.5	0.1	30	40	68	170
3	0.5	0.2	40	40	50	125
4	1.0	0.05	30	32	86	269
5	1.0	0.1	40	40	89	223
6	1.0	0.2	20	38	84	221
7	2.0	0.05	40	32	98	306
8	2.0	0.1	20	36	94	261
9	2.0	0.2	30	30	96	320

注:表中字母 A,B,C 分别代表 BA,NAA 和蔗糖,下同。
Note:The letters A,B,C in the table represent BA,NAA and sucrose respectively. The same as below.

表3 增殖率的最小显著极差法的分析结果

Table 3 The analytical results of LSR

因子 Factor	水平 1 (%) Level 1	水平 2 (%) Level 2	水平 3 (%) Level 3	极大值 (%) Max	极小值 (%) Min	极差 R (%) Range
A	148	238	296	296	148	148
B	241	218	222	241	218	23
C	210	253	218	253	210	43

2.2 长穗桑四倍体诱导的结果与分析

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;同一秋水仙素处理浓度其处理时间的增加与茎尖受伤害程度也呈正相关。同时,用高浓度的秋水仙素处理发现,随着处理时间的延长,其诱导率反而下降,多数茎尖由于秋水仙素的毒害作用,虽被转入无秋水仙素的培养基中,仍慢慢萎蔫失去生活力。由表 4 可见,高浓度的秋水仙素使多倍体诱导率升高,但浓度太高会导致叶片萎蔫或严重抑制愈伤组织再生能力;而低浓度、短时间处理,则

不易获得加倍材料。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,四倍体诱导率最高,为 16.7 %。从表 4 也可以看出,所有处理组合共得到 21 株纯合四倍体,26 株嵌合体。具体结果(表 4)。

试验采用了染色体计数法鉴定多倍体,此法是鉴定多倍体最为直接准确的鉴别方法。另外,人工诱导多倍体往往会出现生长点细胞染色体加倍,而根尖仍然为原来倍性,为了避免该现象对细胞染色体倍性的鉴定结果的影响,本试验采取茎尖为鉴定

表4 秋水仙素溶液浸泡长穗桑对诱导多倍体的影响

Table 4 The effects of immersing shoot-tip in colchicines solution on inducing tetraploids of the *M. wittiorum* Hand-Mazz

秋水仙素浓度 (%) Concentration of colchicines	浸泡时间 (d) Time of immersing	处理数 (个) Treated numbers	死亡数 (个) Dead numbers	死亡率 (%) Dead percentage	获得多倍体数 (个) Obtained polyploids		四倍体诱导率 (%) Inducing ratio
					四倍体 Tetraploid	嵌合体 Chimera	
0.00	3	30	0	0.0	0	0	0
0.05	1	30	0	0.0	0	0	0
	2	30	0	0.0	0	0	0
	3	30	0	0.0	0	0	0
	4	30	0	0.0	0	0	0
	5	30	0	0.0	0	1	0
0.1	1	30	0	0.0	0	2	0
	2	30	0	0.0	0	1	0
	3	30	0	0.0	1	1	3.3
	4	30	2	6.7	0	2	0
	5	30	5	16.7	2	2	6.7
0.2	1	30	1	3.3	1	2	3.3
	2	30	3	10.0	2	4	6.7
	3	30	8	26.7	5	3	16.7
	4	30	15	50.0	2	2	6.6
	5	30	21	70.0	3	1	10.0
0.4	1	30	6	20.0	2	3	6.7
	2	30	10	33.3	3	1	10.0
	3	30	15	50.0	1	3	3.3
	4	30	23	76.7	0	0	0
	5	30	27	90.0	0	0	0

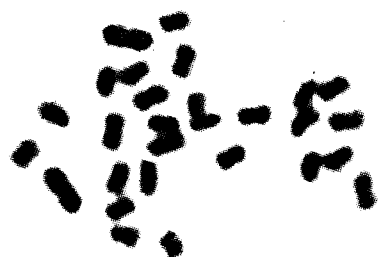


图 1 长穗桑二倍体细胞染色体 $2n=2x=28$

Fig. 1 The chromosome of diploid

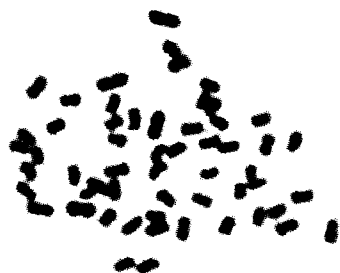


图 2 长穗桑四倍体细胞染色体 $2n=4x=56$

Fig. 2 The chromosome of tetraploid

材料。根据幼嫩茎尖细胞染色体的观察结果,未经处理的对照二倍体植株中的细胞染色体数为 $2n=2x=28$ (图 1)。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,但同时也获得了部分纯合的四倍体植株。所得到的四倍体染色体数目为 $2n=4x=56$ (图 2)。

2.3 二倍体与四倍体的形态学观察

与二倍体植株相比,四倍体长穗桑具有以下特征:株型矮化,芽粗壮多毛状,叶色浓绿,叶形较大、较厚,叶边卷翘、皱缩,叶缘锯齿特别粗大或不规则,叶柄较粗长,叶脉粗。(图 3,图 4)

2.4 嵌合体的分离与利用

实验中,经秋水仙素溶液诱导后的植株,发现有嵌合体现象的存在,其所占的比例较高。由于嵌合体在培养过程中,各种倍性的细胞增殖速度有异,所以,为避免多倍体细胞发生“回复突变”,应尽早采取嵌合体分离方法来获得纯合的多倍体植株以稳定其倍性。即将鉴定确认的嵌合体植株转接到增殖培养基中诱导其产生不定芽,再检测不定芽的倍性,如此反复,从中分离得到纯合的多倍体植株。

3 讨论与结论

3.1 秋水仙素溶液的处理浓度与时间

由于秋水仙素对不同的植物细胞会产生不同程度的影响,处理时应根据不同的植物、组织、器官来灵活掌握处理时间。至于处理的适宜时间,亦以处理材料完全被浸透,并有足够的药量进入生长点细胞为准,而且处理所持续的时间还受到诱变剂的水



图 3 长穗桑二倍体的组培苗

Fig. 3 Tube plant of diploid



图 4 长穗桑四倍体的组培苗

Fig. 4 Tube plant of tetraploid

解半衰期而定^[5]。一般来说,处理幼嫩的组织,如萌动的种子及幼苗,处理的浓度要低,处理的时间不少于 24 h。在研究中,认为中等浓度与长时间处理对长穗桑的诱变效果较好,秋水仙素的有效浓度为 0.2%,由于品种及其生理状态的差异有关因为各种植物和不同组织中微管蛋白与秋水仙素的结合能力不同^[6],因此在对不同品种或细胞进行处理时,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的诱变处理的浓度与时间问题是尤其关键的。

3.2 关于出现嵌合体现象的讨论

对于出现嵌合体芽较多,而纯合四倍体较少的现象,根据乔永刚等人的论述^[7],这可能是因为,一个芽中所有细胞分裂的时间不同步,当幼芽附着有秋水仙素溶液时,正在分裂的细胞就发生了加倍,变成四倍体细胞,而此期间该组织中一直处于 G_0 期的细胞没有发生分裂,继续保持着原来的二倍体形式。一旦解除了秋水仙素的抑制作用,诱导后的芽中各种倍性的细胞(包括尚未加倍的二倍体细胞)就保持竞争性分裂状态。由于倍性高的细胞自身 DNA 复制和蛋白质合成速度永远不及二倍体细胞快,因此加倍了的细胞分裂速度就放慢,特别是八倍体等倍性高的细胞分裂速度更慢。尽管延长时间对正生长的芽处理,大大提高了多倍体细胞在所处理组织中占有的比率,但是几乎不可能完全消除二倍体细胞在所处理组织中的存在。所以,一般说来,经过处理后的材料为多倍体细胞占绝大多数的嵌合体芽,若不及时分离,就会使组织中的多倍体细胞逐渐被

二倍体细胞排挤或“淹没”,最后恢复成二倍体芽。

3.3 二倍体和四倍体田间表现的比较

要想培育出长穗桑多倍体新品种,还须经过田间试验、经济性状选择等大量研究工作,四倍体长穗桑新种质的获得已经奠定了前期基础,而对四倍体长穗桑田间表现尤其是结果性状表现有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 柯益富. 中国桑树栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985.
- [2] 梁明芝,孙日彦,杜建勋,等. 桑椹的化学成分及药理作用[J]. 广西蚕业,2004,4(4):39-41.
- [3] 明道绪,王钦德,耿社民,等. 生物统计附试验设计[M]. 北京:中国农业出版社,2002.303-317.
- [4] 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.
- [5] 徐冠仁. 植物诱变育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1992.
- [6] More john L C. Resistance of rose microtubule polymerization to colchicines results from a low-affinity interaction of colchicines and tubulin [J]. Planta,1987a,170:230-241.
- [7] 乔永刚,宋 芸. 我国园艺植物多倍体育种研究进展[J]. 北方园艺,2002(6):7-8.

(责任编辑 陈 虹)