

影响桑树茎尖组培快繁效率的关键因素

魏景芳 包书丰 葛亚新 王 淳

(河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄, 050051)

武玉璧 张进献

(河北省农林科学院蚕桑研究所)

摘 要 以桑树茎尖为外植体,研究了影响桑树组培快繁的关键因素。结果表明,采用低 pH、软琼脂培养基加不沉滤纸托的方法,可较好地解决外植体褐变对分化的不良影响;在培养基中去掉肌醇、提高 BA 浓度 (1.5 mg/L) 并配以黄化处理,可提高继代增殖率;采用“驯化+选择”的方法以食用蔗糖代替果糖,可大幅度降低培养成本;IAA 与 IBA 配合使用使试管苗生根率达 100%;移植前“增光降温”炼苗,结合在全光喷雾苗床上过渡,使移栽成活率稳定在 95% 以上,且可大大提高效率。

关键词 桑树 茎尖 组织培养 快速繁殖

近年来,随着组织培养技术的发展,利用这项技术进行各种植物的快速繁殖和种苗生产,正向着实用化、工厂化发展。国内在葡萄、香蕉、毛白杨等多种植物上已初步实现了大规模工厂化育苗^[1]。在桑树方面,随着密植桑园的普及和扩大,对优良桑苗的需要增加,迫切需要对这一技术的开发利用。有关桑树组培,虽然已有不少成功的报道^[2,3],但距实用化还有一定的距离,特别是要进行大规模工厂化育苗,还有一些问题尚待解决,其关键是在提高桑树快繁效率的同时降低成本。为此我们开展了此项研究,现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

供试品种为插桑、生根一号、梓柳、剑持、一之濑、新一之濑、鼠返等。选择生长健壮、无病虫害的桑植株,采集树冠中上部生长旺盛的当年生枝条,截取梢部长 5~10cm 段做为外植体备用。截取枝条 2~3cm 长的顶梢,去掉叶片,用中性洗液洗涤后以蒸馏水冲洗,然后用 0.1% 的氯化汞溶液消毒 5min,用无菌蒸馏水冲洗 3 次,无菌条件下剥离顶芽外面的叶片,切取茎尖部分接种于 MS+BA 1mg/L+果糖 3% 的培养基上诱导出试管苗,应用“驯化+选择”的方法,选出能在食用白糖做碳源的培养基上正常生长的植株。选择方法为:先将小苗转接在含 2% 果糖和 1% 蔗糖做碳源的继代培养基上,待小苗长出后,选择生长正常的小苗,将其转到 1% 果糖和 2% 蔗糖做碳源的继代培养基上,尔后转接在 3% 蔗糖培养基和 3% 食用白糖的培养基上,经继代培养后,在附加 IAA 和 IBA 的生根培养基上生根,增光降温壮苗并结合全光喷雾苗床过渡后移栽大田。

2 结果与分析

2.1 影响桑树茎尖离体培养及试管苗诱导的因素

桑树茎尖培养易发生褐变而影响试管苗的诱导。我们试验了不同长度的外植体对褐变的影响,其结果如表1所示。从表1结果可以看出,4个参试品种均发生了不同程度的褐变,其中

表1 不同外植体长度对褐变及试管苗诱导的影响

品 种	外植体 长度(mm)	接种数 (个)	褐变数 (个)	无 褐 变 数 (个)	
				停止生长数	旺盛生长数
剑 持	1~2	20	11	4	5
	10	20	17	3	—
一之濑	1~2	20	13	6	1
	10	20	14	6	—
新一之濑	1~2	20	12	1	7
	10	20*	8	2	—
鼠 返	1~2	20	13	5	2
	10	20	18	1	—

* 其中一瓶(接种10个)污染

1~2mm 长度组的平均褐变率为 61%,明显低于 10mm 组(71%)。而且前者有 19%的外植体旺盛生长并分化为正常的试管苗,而后者几乎不能旺盛生长,说明 1~2mm 的茎尖适宜外植体离体培养,易于诱导出试管苗。其原因可能与生长点周围所产生的多酚类物质及树脂多少有

表2 培养基及接种方法对试管苗诱导的影响

品 种	培养基及 接种方法	接种数 (个)	褐变数 (个)	无 褐 变 数 (个)	
				停止生长数	旺盛生长数
插 桑	MS I *	10	4	4	2
	MS II **	10	2	2	6
生根一号	MS I	10	5	3	2
	MS II	10	3	5	2
攄 攄	MS I	10	10	—	—
	MS II	10	6	2	2

* 琼脂 0.7%, pH 5.8; ** 琼脂 0.4%, pH 4.5, 在培养基表面放滤纸托

关。1~2mm 的外植体小,代谢积累的有害物质少,加之这一部分分生组织活跃,分裂旺盛,有利于试管苗的诱导。基于这种分析,我们以 1~2mm 的外植体为试材,探讨了低 pH、软琼脂培

培养基表面加不沉滤纸托的方法对试管苗诱导的影响,其结果如表 2 所示。从表中结果看出,三个供试品种均以 MS I 的褐变率最低,分别为 20%、30%和 60%,平均为 37%。而 MSI 平均为 63%。在没有发生褐变的外植体中 MS I 的旺盛生长数为 10,而 MSI 为 4。其原因主要是由于在培养基表面放上滤纸托,靠滤纸的吸附作用运输养分,同时也将外植体氧化褐变及代谢积累的有害物质及时扩散,减少了外植体周围有害物质的积累,造成一个分裂生长的良好条件。采用这种方法,7d 开始萌动,两周长出第一片子叶,20d 左右开始伸长生长,30d 即可长成 1~2cm 高的小苗。

2.2 影响继代增殖率的因素

继代增殖率是组培快繁的制约因素之一。我们试验了在培养基中去掉肌醇、提高 BA 浓度(1.5mg/L)并配以黄化处理(降低光照)的方法对增殖率的影响。结果表明,处理组每瓶接种 10 株试管苗,平均每瓶可分化出 80~100 株,其继代有效增殖率为 8~10 倍,而对照组的增殖率仅为 3~5 倍,主要是由于细胞分裂素具有抑制顶芽生长、促进侧芽生长的作用,加之黄化处理,促进了多芽苗和丛生苗的形成。

2.3 不同碳源对试管苗继代培养的影响

试管苗生长的主要碳源供给来自培养基,一般桑树组培多使用果糖,而果糖的价格是食用白糖的 400 多倍。为降低成本,我们试验了果糖和食用白糖做碳源对继代培养的影响,结果列于表 3。

表 3 不同碳源对试管苗继代的影响

品 种	碳 源	转接数	继代数	继代率 (倍)
插 桑	果 糖	50	194	4
	食用白糖	50	3	0.06
生根一号	果 糖	50	153	3.06
	食用白糖	50	2	0.04

从结果可以看出,同样的材料在果糖做碳源的培养基上继代增殖率为 3~4 倍,而在食用白糖做碳源的培养基上继代增殖率则很低,几乎不能生长。

我们采用“驯化+选择”的方法,选出了在食用白糖做碳源的培养基上可正常生长的株系,又经过以后的继代培养,获得了与在果糖培养基上基本相同的结果。

2.4 激素配比对试管苗生根的影响

影响试管苗生根的主要因素是激素。将试管无根苗接种于含 IAA 1mg/L、BA 0.1mg/L; IBA 1mg/L、IAA 0.1mg/L 的 MS 生根培养基上进行生根培养,结果见表 4。试验结果表明,IAA 和 IBA 配合使用效果明显,IAA 1mg/L、IBA 0.1mg/L 或 IBA 1mg/L、IAA 0.1mg/L 使试管苗的生根率达到了 100%,同时每株的生根条数也较 IAA 与 BA 配合使用的为多。结果还表明,低温(20~25℃)对生根具有一定的促进作用。

2.5 过渡培养与增光降温壮苗对生根苗生理状态及移栽成活率的影响

表 5 结果表明,两种不同的处理,其茎高、根数并无明显差异,但经过增光降温处理的生根

苗茎变粗且木质化程度高,侧根发达,移栽成活率高。其主要原因在于试管苗本身生理代谢机能发生了变化,因试管苗长期处于异养状态中,虽然在生长素的作用下产生了根,但其生理代谢还不可能从异养型完全转变为自养型,在这种状态下如果将其转移到没有碳源供给的外部环境中,则很难适应,加之外界环境的胁迫,就难以成活。通过增光壮苗提高了试管苗的光合作用强度,从而积累了能量,同时也促进茎的微管系统的发育和根系的发达,而降低温度则防止了小苗的徒长,提高了抗性,促进了试管苗由异养型向自养型的转变。

表4 不同激素配合使用对生根的影响

浓度(mg/L)	调查株数	生根株数	生根率(%)	生根条数/株
IAA 1、BA 0.1	20	15	75	5.2
IBA 1、BA 0.1	20	16	80	4.7
IAA 1、IBA 0.1	20	20	100	6.8
IBA 1、IAA 0.1	20	20	100	6.13

表5 过渡培养和壮苗处理对试管苗的影响

处 理	茎 高 (cm)	茎 粗 (mm)	木质化 程度	根数(条)	根长(cm)	侧 根	成活率 (%)
过渡培养	5.83	1.25	低	4.33	4.31	少	40
壮苗处理	5.12	2.1	高	5.2	5.26	发达	80

2.6 全光喷雾苗床过渡对试管苗移栽成活率的影响

将试管苗先直接移栽于全光喷雾苗床上过渡,然后移栽大田与常规的先移栽于营养土苗床再移于大田的方法对移栽成活率的影响作了对比研究,结果表明,全光喷雾苗床法和营养土苗床法的苗床移栽成活率和大田移栽成活率分别为99.5%,95.0%和95.0%,85.0%。显然前者的效果明显好于后者,这是因为,全光喷雾苗床的间歇喷雾,可创造试管苗生长适宜的温、湿环境,苗床上部的遮荫网,使小苗处于散射光的照射下,每隔4天喷一次营养液和多菌灵杀菌剂,既补充营养,又防止污染,保证了试管苗移栽所需的条件,因此苗床移栽成活率几乎达到了100%,其总成活率(试管苗数/大田成活苗数)达95%以上。此外,由于全光喷雾苗床基本上为自动控制,管理方便,一次可处理几万乃至十几万株试管苗,可大大提高生产效率。

参 考 文 献

- 1 陈维伦. 我国植物快速繁殖和无毒种苗生产的现状和问题. 见:孙敬三,陈维伦主编. 植物生物技术和作物改良. 北京:中国科学技术出版社,1990,213~241
- 2 马凤桐,刘玉荣. 成龄桑树冬芽的组织培养. 植物生理学通讯,1985(1):34
- 3 陈爱玉. 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
- 4 马宝昆,高仪. 苹果试管苗生根的研究. 河北农业大学学报,1990(3):7~17
- 5 竹内正幸,中岛哲夫等. 植物组织培养技术(日文). 东京:朝仓书店,1983,120~122

The Key Factors Influencing on Rapid Propagation of Mulberry Through Stem Tip Culture *in vitro*

Wei Jingfang Bao Shufeng Ge Yaxin Wang Chun

(Agro-physics, Plant Physiology and Biochemistry Institute, Hebei Academy
of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang)

Wu Yubi Zhang Jinxian

(Silkworm and Mulberry Institute, Hebei Academy
of Agricultural and Forestry Sciences, Chengde)

Abstract The key factors influencing on rapid propagation of mulberry through meristem culture were studied using its by young stem tip as explant. The results showed that subculturing the explant on the lower pH and soft agar medium on which there was a filter paper supporting the meristem could overcome the harmful effect of explant browning on differentiation; increasing concentration of BA (15 mg/L) on the medium without inositol could promote the germination and propagation; using the method of "domestication and selection" and taking cane sugar instead of fluctose as carbon source could decrease the culture cost greatly; using IAA and IBA cooperatively could raise the root-forming frequency to 100%; increasing light and decreasing temperature combined with whole day illumination and spraying before transplant could make the survival rate of the transplant reach to above 95%.

Key words: Mulberry; Stem tip; Meristem culture; Rapid propagation