

桑树子叶节高频再生体系的建立

王 朝 阳

(河南科技大学 林业职业学院, 河南 洛阳 471002)

摘 要:选用无菌培养 10 d 左右的桑树幼苗,切取子叶节外植体。以 MS 培养基为基本培养基,对 6-BA、IBA 诱导丛生芽的适宜浓度进行筛选,并对诱导生根激素 IBA、NAA 的最适宜浓度进行了研究,通过直接的器官再生途径,建立了桑树子叶节高频再生体系。结果表明:诱导丛生芽最佳激素组合为 2.0 mg/L 6-BA 和 0.15 mg/L IBA;生根较适宜的激素为 2.0 mg/L IBA。

关键词:桑树;子叶节;植株再生

中图分类号:S 792.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0158-03

中国是最早栽桑养蚕的国家,目前全国收集桑树种质资源有 3 000 多份,分属 15 个种 4 个变种^[1],为我国桑树资源开发利用和新品种选育奠定了坚实的基础。桑椹具有重要的药理作用和保健功能,桑椹酒、桑椹饮料、桑椹干等产品早已开发问世,桑椹被认为是第 3 代水果中的珍品。桑叶是养蚕的原料,每 667 m² 可采摘 1 000~1 500 kg。桑树的扩繁和栽培为桑蚕产业化带来巨大的经济效益。桑树子叶节快繁体系的建立,一方面为桑苗工厂化生产奠定基础;另外也为桑树遗传转化、优良无性系保存等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以“红果 2 号”桑树种子为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌实生苗的培养 取饱满的桑树种子,用 75%乙醇消毒 30 s,用 0.1%氯化汞溶液表面消毒 8 min,再用无菌蒸馏水洗涤 4~5 次,无菌滤纸吸干表面水分后接种于附加 30 g/L 葡萄糖、6.3 g/L 琼脂粉的 MS+2.0 mg/L 6-BA 培养基上。培养条件为:光照时间 16 h/d,培养温度(24±1)℃,光照强度 1 500~2 500 lx。

1.2.2 外植体的制备及丛生芽再生 取培养 10 d 左右的无菌苗,在无菌操作台内切掉其顶芽和部分下胚轴即为外植体材料。接于添加不同浓度 6-BA 和 IBA 的 MS 培养基上进行丛生芽的诱导培养。培养温度(24±1)℃,光照时间 16 h/d,光照强度 1 500~2 500 lx。MS 培养基,附加 30 g/L 葡萄糖、6.3 g/L 琼脂,pH 5.8~6.2。

1.2.3 继代及生根培养 待丛生芽长至 2.0 cm 左右,进行单芽切割转移至试管苗生长培养基进行培养,当芽苗生长至 4.0 cm 左右时,转移至生根培养基上生根培养。当根长至 4.0 cm 左右时将幼苗进行移栽,移栽后应注意保湿,置于 25℃、16 h 光照的温室中生长。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 浓度对子叶节不定芽的影响

以 MS 为基本培养基,探讨不同浓度的 6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L)对桑树子叶节不定芽诱导的影响。由表 1 可知,当 6-BA 浓度在 0.5~2.0 mg/L 之间,不定芽的诱导数量与激素浓度增加成正比,当 6-BA 浓度大于 2.0 mg/L,不定芽的诱导数量则随之降低。6-BA 浓度的高低极大影响分化率和每个外植体诱导的不定芽数^[2-3]。从理论上讲,6-BA 浓度越高,不定芽诱导率和诱导个数也应越高,但是如果不定芽太多,相互抑制作用导致不能伸长,严重影响其正常生长。所以 6-BA 的浓度应适宜,该试验认为诱导桑树子叶节不定芽较适合的 6-BA 浓度为 2.0 mg/L,此时不定芽再生频率高、芽体健壮。

表 1 不同 6-BA 浓度对不定芽诱导的影响

编号	6-BA	结 果		
	/mg·L ⁻¹	平均诱导芽数/个	丛生芽诱导率/%	平均芽长/cm
1	0.5	2.73	54.2	2.72
2	1.0	3.75	78.3	2.93
3	1.5	4.21	82.4	3.16
4	2.0	4.76	87.1	3.92
5	2.5	4.52	81.8	3.67
6	3.0	3.28	67.3	2.83

2.2 不同激素组合对不定芽诱导的影响

以 2.0 mg/L 6-BA 较适合不定芽的诱导,所以保持 6-BA 浓度不变,添加不同浓度的 IBA,观察其对桑树不定芽的诱导情况。有大量研究表明,IBA 对丛生芽的诱导起着重要作用^[4],该研究参考前人诱导丛生芽所使用

作者简介:王朝阳(1983-),男,助理讲师,现主要从事农业生物技术方面的研究和教学工作。E-mail:wangzhaoyang1983@163.com。
收稿日期:2010-12-07

合适的 IBA 浓度范围进行丛生芽的诱导。由表 2 可知,IBA 浓度在 0.05~0.15 mg/L 浓度范围内,随着 IBA 浓度的增加,丛生芽诱导率和平均芽长都呈上升趋势。IBA 浓度 0.15 mg/L 时,每个外植体平均诱导丛生数达 5.21 个,丛生芽诱导率达 97.3%,平均芽长可达 4.96 cm (图 1)。IBA 浓度 0.2~0.4 mg/L 范围内,随着 IBA 浓度的增加,丛生芽诱导率和平均芽长则大致呈下降趋势。结果表明,适合的 IBA 浓度适宜桑树子叶节丛生芽的诱导和生长,IBA 浓度过高则对不定芽诱导起抑制作用。

表 2 不同激素组合对不定芽诱导的影响

编号	植物激素/mg·L ⁻¹		平均诱导芽数 /个	丛生芽诱导率 /%	平均芽长 /cm
	6-BA	IBA			
1	2.0	0.05	2.30	46.50	2.35
2	2.0	0.10	3.87	83.20	3.46
3	2.0	0.15	5.21	97.30	4.96
4	2.0	0.20	4.21	84.30	2.64
5	2.0	0.25	4.19	83.82	3.21
6	2.0	0.30	3.21	62.10	3.87
7	2.0	0.35	2.17	35.40	3.43
8	2.0	0.40	1.21	32.10	1.26



图 1 桑树子叶节不定芽诱导

2.3 生根与移栽

当不定芽长至 2 cm 左右时,进行单芽切割进行继代培养。当芽长至 4.0 cm 左右时采用常用的植物生根激素 IBA、NAA,设置不同浓度对桑树不定芽生根情况进行比较。不定芽接种于生根培养基 10 d 左右就可产生愈伤组织进而出现白色新根。由表 3 可知,IBA 和 NAA 对桑树不定芽诱导生根之间差异明显,IBA 诱导生根效果总体上较理想。当 IBA 浓度在 0.5~2.0 mg/L 浓度范围内,随着 IBA 浓度的升高生根率、生根数和平均根长都呈上升趋势,以 IBA 2.0 mg/L 诱导生根效果最佳。此时生根率达 100%,平均生根数达 17.7 个,平均根长 4.65 cm (图 2)。培养 1 个月左右,当根长至 4.0 cm 左右即可进行移栽。移栽前先将组培瓶口打开,练苗 2~3 d,让幼苗逐渐适应外界环境,然后小心的用镊子将苗取出,用清水洗净试管苗根部的培养基。移栽到浇透水的育苗盘中,注意遮阴保湿。1 个月后将成活的幼苗移栽至大田,2 个月后统计成活率达 95% 以上。

表 3 激素对桑树幼苗生根的影响

编号	植物激素/mg·L ⁻¹		平均生根数 /个	生根率 /%	平均根长 /cm
	IBA	NAA			
1	0.5		11.20	83.7	2.78
2	1.0		13.30	98.7	3.67
3	1.5		15.65	100	3.59
4	2.0		17.70	100	4.65
5		0.5	6.40	69.6	4.83
6		1.0	8.3	78.2	3.43
7		1.5	9.2	82.1	2.76
8		2.0	4.3	62.3	1.09



图 2 桑树生根培养

3 结论与讨论

桑树的组织培养,最早始于 1968 年日本的大山胜夫,经过多年来中外科学家的不懈努力取得了很大进展,目前已通过胚、桑芽、胚轴、胚珠、子叶、叶片、花药^[5-7]等外植体的培养形成完整植株,建立了桑树的繁殖体系。由于桑树是多年生木本植物所以桑树在组培过程中还存在许多困难,比如:外植体褐化、愈伤组织生长较缓慢,不易诱导出不定芽、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等,以上问题严重限制了桑树离体快繁速度。

该试验通过子叶节建立的桑树繁殖体系,有效避免了桑树在常规组培中出现的褐化、愈伤组织生长较缓慢等难题。诱导丛生芽最佳激素组合为 2.0 mg/L 6-BA 和 0.15 mg/L IBA;生根较适宜的激素为 2.0 mg/L IBA。丛生芽诱导效率较高且生长健壮,移栽成活也符合规模化生产的需求。

参考文献

- [1] 柯益富. 桑树栽培育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
- [2] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 478-484.
- [3] Meurer C A, Dinkins R D, Collins C B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.
- [4] Shyamkumar B, Anjaneyulu C, Giri C C. Multiple shoot induction from cotyledonary node explants of *Terminalia chebula* [J]. Biologia Plantarum, 2003, 47(4): 585-588.
- [5] Sharma K K, Thorpe T A. In vitro propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments[J]. Scientia Horticulturae, 1990, 42(4): 307-320.
- [6] 周安莲, 余茂德. 桑树子叶愈伤组织的诱导培养[J]. 四川蚕业, 2001(3): 12-13.
- [7] 田晖. 桑树组织培养快繁技术研究[J]. 浙江农业科学, 2009(4): 828-831.

大雪兰快速繁殖技术的研究

刘 方¹, 陆 露¹, 郭仕坛¹, 杨宏光¹, 伍建榕^{1,2}

(1. 西南林业大学 保护生物学学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘 要:以大雪兰种子为试材, 进行无菌播种试验, 找出了最适合大雪兰种子萌发、原球茎增殖分化及生根的培养基。结果表明: 利于大雪兰种子萌发的培养基是 1/2MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L+椰子汁(CM) 50 mL/L; 利于大雪兰原球茎增殖分化的培养基是 1/2 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L; 利于生根壮苗的培养基是 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+AC 2 g/L。

关键词:大雪兰种子; 萌发; 增殖分化; 生根

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0160-03

大雪兰(*Cymbidium mastersii* Griff.) 是滇兰中的名品之一, 又称“棕根雪白”、“长寿兰”。它株型挺拔、雄健, 花色雪白, 迎冬而开, 花姿俏丽, 叶色青翠^[1]。素心兰是大雪兰的一个变种, 整个花被洁白无瑕, 属稀有品种, 从而引起了广大养兰爱好者的兴趣。为满足广大养兰爱

好者的需求, 就需应用组织培养技术来解决这一供需矛盾。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大雪兰自然生长下未开裂的绿色蒴果(来自越南), 并把其种子作为外植体。将 4℃下保存的蒴果在流水下冲洗干净, 并修剪其一端的梗, 保留 1 cm 左右→放入超净工作台→将蒴果放入 75%酒精浸泡 30 s→再用 0.1% 升汞消毒 20 min→无菌水冲洗 4 次→用无菌滤纸吸干蒴果表面的水分→将其置于无菌培养皿中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 种子预处理 从蒴果中取出的种子, 装入小滤纸袋内, 每个蒴果内的种子一般分装在 3 个滤纸袋内(依蒴果大小而定), 确保种子能充分接触到 NaOH。将装好的小滤纸袋浸入 0.1 mol/L NaOH 溶液预处理, 处理时间设置为 5、10、15、20、25、30、35、40 min, 处理后用无

第一作者简介:刘方(1985-), 女, 河南焦作人, 在读硕士, 研究方向为森林保护学与资源微生物利用。E-mail: liufang528000@163.com。

通讯作者:伍建榕(1963-), 女, 福建清流人, 博士, 教授, 现从事森林病理学及资源微生物利用研究的学科科研工作。E-mail: wujianrong63@yahoo.com.cn。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重点资助项目(2008BAC39B05); 国家自然科学基金资助项目(30671717); 西南林业大学重点基金资助项目(BC2010FK01); 云南省重点学科森林保护学资助项目(XKZ200905)。

收稿日期:2010-11-25

Study on High-frequency Regeneration System of Cotyledon Node in *Morus alba* L

WANG Zhao-yang

(Vocational College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471002)

Abstract: Using sterile culture of about 10 days *Morus alba* L, seedlings were cut cotyledon node explants. Using MS medium as the basic medium, screening appropriate concentration of 6-BA, NAA. As well as rooting hormone IBA and NAA the most appropriate concentration were studied, regenerate by organogenesis to set up high-frequency of cotyledon node regeneration system in *Morus alba* L. The results showed that the best hormone combination for induced multiple shoot clumps was 2.0 mg/L 6-BA and 0.15 mg/L IBA; the hormone for the rooting was 2.0 mg/L IBA.

Key words: *Morus alba* L; cotyledon node; regeneration