

文章编号:0439-8114(2007)01-0027-03

培养条件对台湾青枣组织培养的影响

任敬民, 胡民强, 文素珍, 罗满源

(佛山科学技术学院生命科学院园艺系, 广东 佛山 528231)

摘要:研究了温度、光照、pH值对台湾青枣愈伤组织的影响。结果表明, 温度在24~31℃范围, 愈伤组织的生长量随温度的升高而增加。光照时间越长, 愈伤组织生长量越有递增趋势, 当光照时间达到24h时, 愈伤组织增加最多。pH值在5.5~7.0范围内时, 越接近6.0, 越有利于愈伤组织的产生。故台湾青枣愈伤组织生长的适宜温度为31℃, 光照为24h, pH值为6.0。

关键词:台湾青枣; 组织培养; 温度; 光照; pH值

中图分类号:S667.9; Q943.1

文献标识号:B

Effect of Culture Conditions on Tissue Culture of Taiwanqingzao

REN Jing-min, HU Min-qiang, WEN Su-zhen, LUO Man-yuan

(Department of Horticulture, Life Science College, Foshan University, Foshan 528231, Guangdong, China)

Abstract: Effect of temperature, illumination length, pH on Tissue culture of Taiwanqingzao (*Ziziphus mauritiana*) was studied. The results showed that the proper temperature was between 30~32℃, the suitable illumination length was about 24 hours and the suitable pH was 6.0 in the tissue culture of Taiwanqingzao.

Key words: Taiwanqingzao; tissue culture; temperature; illumination length; pH

台湾青枣是从鼠李科枣属毛叶枣 (*Ziziphus mauritiana*) 中经多代选择培育而成的优良水果品种, 其果实呈长椭圆形, 果大, 单果重一般在100~160 g之间, 果皮鲜绿, 果肉白色, 皮薄光滑, 肉质细嫩, 味清甜多汁, 营养价值极高。据测定, 每100 g鲜果肉含碳水化合物18~23 g, 果糖和葡萄糖含量达11%~16%, 可溶性固形物达14%~20%。粗蛋白0.86 g, 维生素C 50~85 mg, 维生素A、维生素B₁、维生素B₂、维生素K等含量也相当丰富。因而有“维生素丸”之美称。此外, 还含有磷、钙、铁、钾、锌等微量元素。因此吸引很多农民争相栽种, 导致苗木的需求量日益增大^[1-2]。

在台湾青枣的离体组织培养中, 合适的光照时间、pH值、温度有利于愈伤组织的产生和提高青枣离体培养的成功率。关于青枣组培中的温度、光照和pH值的研究尚未见专门文献报道。虽然陈宗礼等研究了温度、光照和密度^[3]以及pH值^[4]对红枣组培苗快速繁殖的影响; 但由于红枣与台湾青枣属于

不同的种, 生理特性存在较大的差异。因此, 我们对此进行了详细研究, 以期对青枣的组培应用提供相关的理论指导和最适控制条件。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

台湾青枣为本院试验农场五年生成年树; 仪器有LRH-250-GS型人工气候箱(广东省医疗器械厂), pH-3C酸度计(上海虹益仪器厂), JJ200型精密电子天平(江苏常熟双杰测试仪器厂)。

1.2 试验设计

1.2.1 温度对台湾青枣愈伤组织的影响试验 采用单因子随机区组设计, 温度设24℃、28℃、31℃3种处理, 光照为12 h, 接种密度为每瓶4个, 每处理重复5次。

1.2.2 光照对台湾青枣愈伤组织的影响试验 采用单因子随机区组设计, 光照周期设每天6 h、12 h、24 h3种处理, 培养温度为28℃, 接种密度和重复

同 1.2.1。

1.2.3 高压灭菌后 pH 值的变化试验 采用复因子设计, pH 因子设 5.5、6.0、6.5、7.0 共 4 种水平; 测定时间因子设灭菌后 30 min、60 min、90 min 测量 3 种水平。

1.2.4 pH 值对培养基硬度的影响试验 采用对比试验, 设 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 共 5 种处理。

1.2.5 不同 pH 值对台湾青枣愈伤组织的影响试验 采用单因子随机区组设计, pH 值依次为 5.5、6.0、6.5、7.0 共 4 种处理。每处理重复 5 次。光照为 12 h, 培养温度为 28℃。

1.3 方法

1.3.1 培养基组成 MS+ZT (玉米素) 0.1 mg·L⁻¹+ LH(水解乳蛋白) 20 mg·L⁻¹+ Sugar 30 g·L⁻¹。在温度和光照的试验中培养基的 pH 值均为 5.8, 用常规的高压蒸汽法灭菌。

1.3.2 接种与调查方法 选取洁净、无病虫害的母株, 剪取一年生枝或根蘖苗上新抽出的带芽茎段, 自来水冲洗几分钟至数小时, 然后用肥皂粉水溶液或洗衣粉水轻轻擦洗, 再在流水中反复漂洗多次, 冲净残留的肥皂粉或洗衣粉。接着将漂洗过的材料在超净工作台上先用 70% 的酒精消毒 30~60s, 然后再用 0.1% 的氯化汞溶液消毒 3~5 min, 每次消毒后用无菌水涮洗 3~10 次。温度、光照、不同 pH 值对台湾青枣愈伤组织的影响试验均在无菌条件下, 每个处理接 40 个材料。接种后 28~30 d 后, 称量愈伤组织的重量, 用愈伤组织的增加重量作为衡量指标。除在 pH 值对台湾青枣愈伤组织产生的影响中接种材料为幼果外, 其余均以带芽茎段为接种对象。在高压灭菌后 pH 值的变化试验中, 培养基经高压灭菌(120Pa、20 min)后不同时间随机取样, 用复合 pH 电极测 pH 值。

2 结果与分析

2.1 温度对台湾青枣愈伤组织的影响

从表 1 看出, 在试验范围内, 随着温度的升高, 愈伤组织的增加量也在明显递增。其中 31℃ 处理的愈伤组织增加的重量最多(平均增加 0.145 4 g)。处理间的差异显著 ($F=6.73>F_{0.05}=3.88$)。SSR 检验表

表 1 温度对台湾青枣愈伤组织的影响

温度/℃	愈伤组织平均增重/g	SSR 检验
31	0.145 4	a A
28	0.109 2	b B
24	0.095 2	c B

注: 不同大、小写字母分别表示差异极显著(1%)或显著(5%), 下表同。

明, 31℃ 与 24℃、28℃ 间均存在极显著差异 ($P<0.01$), 24℃ 与 28℃ 间存在显著差异 ($P<0.05$)。总的来说, 31℃ 有助于刺激愈伤组织的产生。

2.2 光照对台湾青枣愈伤组织的影响

从表 2 看出, 处理间存在显著差异 ($F=12>F_{0.01}=6.92$)。24 h 光照与 12 h、6 h 间存在极显著差异 ($P<0.01$)。在试验范围内, 光照时间越长, 愈伤组织的增加量也有递增的趋势。其中, 24 h 光照的愈伤组织的平均增加量达 0.168 g。6 h 与 12 h 愈伤组织的增加量也有递增的趋势, 但差异不显著。

表 2 光照对台湾青枣愈伤组织的影响

光周期/h	愈伤组织平均增重/g	SSR 检验
24	0.168 0	a A
12	0.109 2	b B
6	0.095 2	c B

2.3 高压灭菌后不同时间 pH 值的变化

从表 3 看出, 高压灭菌后, 培养基的 pH 值发生了变化, 变化幅度与 pH 值的底值有关, pH 值设计在 5.5~7.0 间, 底值高的灭菌后 pH 值下降的幅度增大; 底值小的灭菌后 pH 值下降的幅度小。如 pH 值 5.5(30 min) 的下降 0.2, 而 pH 值 7.0(30 min) 的下降 0.6。灭菌后冷凝过程也影响 pH 值的变化, 灭菌后 30min 的下降幅度最大。以灭菌前 pH 5.5 为例, 培养基下降到 5.2。以后随着冷凝时间的延长, pH 值有逐渐恢复的趋势, 到凝固(90 min)时, 培养基 pH 值恢复到 5.4。

表 3 高压灭菌后不同时间 pH 值的变化

	pH 5.5			pH 6.0			pH 6.5			pH 7.0		
时间/min	30	60	90	30	60	90	30	60	90	30	60	90
平均 pH 值	5.20	5.30	5.40	5.60	5.80	5.86	6.0	6.20	6.40	6.40	6.70	6.80
差值	0.30	0.20	0.10	0.40	0.2	0.14	0.5	0.30	0.10	0.60	0.30	0.20

注: 平均 pH 值指在冷却一段时间后, 测量样本的 pH 值所得的平均数值。

2.4 pH 值对培养基硬度的影响

pH 值为 5.0 时的培养基呈软糊状, 无法接种。pH 值为 7.0 时的培养基硬而脆, 接种时手感组织苗难以插进去, 接种后, 培养基表面往往出现裂缝, 甚至在搬动培养瓶时也很容易导致裂缝的出现。pH 值为 5.5 的培养基有小部分在搬动后呈软糊状, 无法接种, 大部分较软易于接种。pH 6.0 时手感最好, 软硬适中, 易于接种。

2.5 不同 pH 值对台湾青枣愈伤组织的影响

从表 4 看出, 处理间存在显著的差异 ($F=3.61>F_{0.05}=3.23$)。说明 pH 值对愈伤组织的产生存在一定

的影响。SSR 检验表明,pH6.0 与 pH5.5、pH6.5、pH7.0 存在显著的差异($P<0.05$)。pH5.5 与 pH6.5、pH7.0 差异不显著。在试验范围内,pH 值越接近 6.0,越有利于愈伤组织的产生。

表 4 不同 pH 值对台湾青枣幼果愈伤组织的影响

pH 值	愈伤组织平均增重/g	SSR 检验	
5.5	0.378	a	A
6.0	0.531	b	A
6.5	0.482	a	A
7.0	0.346	a	A

3 讨论

3.1 光照和温度对台湾青枣愈伤组织的影响

无论是在自然条件还是在离体条件下,光和温度信号总是互相联系的;植物既以定性的、又以定量的方式对温度和光照做出反应^[3]。当组织培养诱发植物在培养基中被重建时,需要较高的光照水平。此时的光合作用必须协调温度及生长培养基已提供的营养,一起维持植物新的生长。具体讲,温度和光照条件是通过植物体内包括基因功能的控制、各种酶活性的控制、膜特性的控制以及某些物质如激素水平的控制等调节来影响植物生长发育的生理生化代谢过程从而影响生长的,而这种影响是因植物在遗传和环境上的不同而不同的。换言之,在不同自然环境下生长的不同的植物,在离体条件下对温度和光照的反应是有差异的^[4]。我们在台湾青枣离体培养中采用了较高的温度和光照条件,说明了台湾青枣是一种喜光喜温植物,这与其在自然条件下生长反应相一致。在光照周期的研究中,6 h 与 12 h 的光照差异不明显,而 24 h 的光照明显有助于愈伤组织的产生。

光可能通过光合作用在特殊的细胞里累积淀粉,并经一定量的淀粉聚集,直接或间接地扣动器官发生的光诱导扳机。在培养中的植物材料,其光周期反应可能受内源生长素和细胞分裂素水平的影响,整体植物具有一定的光周期需要。例如,已经发现对短日照敏感的葡萄品种的茎段,只有在短日照条件下形成根,而对日照长度不敏感的品种则在各种光暗交替条件下均可形成根^[5]。并非光照越长越好,如果不断光照,则愈伤组织不能转绿,芽也不能产生。虽然 24 h 光照有利于愈伤组织的产生,但愈伤组织不能转绿,芽不能形成。故建议不采用 24 h 光照。

3.2 高压灭菌后不同时间 pH 值的变化

高压灭菌后培养基 pH 值的变化取决于多种因素,如灭菌时间、浓度差(一般下降 0.1~0.2^[6])。本试验表明,pH 值的变化还与培养基灭菌前调整的 pH 值有关,即灭菌后下降的幅度随灭菌前 pH 值的调高而加剧,这表明灭菌前用于调整培养基 pH 值的酸、碱液加入量也影响灭菌后的变化幅度,调节偏碱的培养基灭菌后降低幅度较大,这与黄斌的结论一致。另外还观察到,pH 值的变化还与培养基灭菌后冷却时间有关,随着冷却时间的延长,pH 值的变化幅度逐渐缩小^[6,7]。

3.3 不同 pH 值对台湾青枣愈伤组织的影响

pH 值为 5.5 时,培养基偏酸。不但接种较为困难,而且培养基有小部分在搬动后呈软糊状,难于接种,愈伤组织的产生也较少。pH 值为 7.0 时,由于培养基硬而脆,接种时手感茎段难以插进去,接种后,培养基表面往往出现裂缝,愈伤组织的产生也不是太理想。pH 值为 6.0 时,不但接种时手感好,而且愈伤组织的产生也较多,并且 pH 值越接近 6.0,越有利于愈伤组织的产生。本研究表明,台湾青枣组培的适宜 pH 值为 6.0。这与朱文勇等^[7]培养红枣茎段的培养基 pH 相一致。而与严仁玲^[8]等的报道有差别。分析其中原因,除了与培养基条件有关外,可能与枣的品种及生态类型间差异有关系。研究不同培养基在灭菌后的 pH 值变化幅度有助于正确的调整培养基的 pH 值和掌握灭菌条件,对提高培养效果非常重要。

参考文献:

- [1] 许奕进.台湾青枣栽培技术[M].广州:广东经济出版社,2000.
- [2] 黄雪莲.一种有开发价值的热带珍稀果树——台湾青枣[J].云南热作科技,2000(23):41-42.
- [3] 陈宗礼,延志莲,齐 龙,等.温度、光照和密度对红枣组培苗影响的研究[J].延安大学学报,1996,15(1):56-57.
- [4] 陈宗礼,李占鹏,延志莲,等.pH 值对红枣组培苗快速繁殖的影响[J].陕西农业科学,2001(3):9-11.
- [5] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991.127-128.
- [6] 梁海曼.高压灭菌对培养基成分的影响[J].植物生理学通讯,1995,31(5):329-339.
- [7] 朱文勇,杜学梅,郭黄萍,等.影响枣试管苗生长分化的因素(简报)[J].植物生理学通讯,1996,3(4):276-278.
- [8] 严仁玲,张 磊.外源植物激素对枣树试管苗快速繁殖的影响[J].果树科学,1990,7(4):231-233.