

枣叶片再生试管苗生根研究

周瑞金, 刘孟军

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要: 利用冬枣叶片再生试管苗进行生根试验。研究结果表明, 在最适宜冬枣生根的培养基 1/2 MS + IAA 1.5 mg/L + 20 g/L 蔗糖 + 3.5 g/L 琼脂中培养, 并给予根底部黑暗条件, 培养室温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度 1 000 lx, 每天光照 14 h, 生根率达 95.3%。

关键词: 冬枣; 试管苗; 生根; 组织培养

中图分类号: S 665.1

文献标识码: A

Study of rooting on the tube seedlings from regeneration of Chinese jujube leaves

ZHOU Rui-jin, LIU Meng-jun

(Department of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The tube seedlings from regeneration of Dongzao leaves were used in rooting experiment. The results indicated that the rooting rate was the highest (95.3%) if the rooting medium was 1/2 MS + IAA 1.5 mg/L supplemented with 20 g/L sucrose and 3.5 g/L agar, with the base of glass bottle given in dark condition, the temperature at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, and the illumination, 1 000 lx and 14 h/d.

Key words: Dongzao; tube seedling; rooting; tissue culture

枣树原产于中国, 因其栽培容易、早实、富含 Vc 和糖类、耐干旱和对 pH 适应性强等特性, 越来越受到人们关注^[1]。枣树的组织培养研究开始于 20 世纪 80 年代初, 但直到 1995 年以后有关研究才迅速增多。快繁是枣树组培开展最早且最成功的方面, 生根培养是建立快繁体系必不可少的环节。对于枣组培苗生根研究较多, 但多是用以枣头为外植体快繁的试管苗为试材^[2-5], 对叶片再生试管苗的生根研究还很少^[6-8]。而高效的生根体系是建立叶片再生体系成功与否的关键之一。本试验选用冬枣叶片

再生组培苗, 对影响其生根的几个因素进行了分析, 并研究了不同生根培养基对组培苗生根的作用效果, 以期为提高枣叶片再生试管苗的有效生根率提供技术支持。

1 材料与方 法

供试品种为冬枣(采自黄骅)叶片再生植株。

将组培苗在 MS + BA 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养基中继代培养 40 d 左右, 切取长约 2~3 cm、粗壮一致的试管苗茎尖, 接种在生根

收稿日期: 2005-06-01

基金项目: 国家科技攻关项目(2001BA502B09-04); 河北省科技攻关项目; 河北农业大学科技将帅计划和河北农业大学科学发展基金资助

作者简介: 周瑞金(1977-), 女, 河北张家口人, 在读博士生, 主要从事果树生物技术研究。

通讯作者: 刘孟军(1966-), 男, 河北望都人, 理学博士, 教授, 博士生导师, 科技部红枣咨询专家。

E-mail: kjliu@mail.hebau.edu.cn

培养基中,每个处理 10~20 瓶,每瓶接 3 个茎尖,重复 3 次。接种后将三角瓶底部铺牛皮纸,给予瓶底部黑暗条件,上部光照强度 1 000 lx、光照时间 14 h/d、温度(25±2)℃,培养 30 d 后,调查生根株数、每株根数、根长,计算生根率和平均根长。百分数均经过反正弦值转化。方差分析采用邓肯氏新复极差测验法,显著水平 0.05。

试验中生根培养基附加蔗糖 20 g/L,琼脂 3.5 g/L,pH 值 5.8~6.0。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对生根的影响

表 1 叶片再生植株在不同基本培养基的生根率

Table 1 Effect of basic medium on rooting rate

基本培养基 Basic medium	IBA/(mg·L ⁻¹)				IAA/(mg·L ⁻¹)			
	0.5	1.0	1.5	3.0	0.5	1.0	1.5	3.0
1/2 MS	82.2±2.17a	72.3±1.65a	83.3±1.07a	73.4±3.12a	55.6±3.09a	87.0±2.30a	95.3±5.40a	75.8±8.15a
MS	19.2±1.54c	20.7±0.88c	21.3±3.85b	40.0±1.04b	13.2±2.55b	10.1±3.31c	63.4±4.19b	48.7±2.24b
大量减半 MS	36.0±2.14b	52.0±3.43b	77.0±2.37a	80.1±2.41a	60.0±3.20a	56.7±4.01b	44.4±3.41c	85.2±1.81a

注:数据为 3 次重复平均值±标准误,0.05 水平下差异显著性检验,以下表同。

2.2 激素对生根的影响

2.2.1 IAA、NAA 对生根的影响 以 1/2 MS 为基本培养基,分别加入 IAA 1.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、IAA 1.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L,比较 3 个处理中组培苗生根情况,结果见表 2。不添加 NAA 的生

由本研究结果发现,接种后 10 d 左右有根生成,15 d 时大部分根长至 1 cm 长。有些苗长出 4~5 条丛生根,有些仅长出 1~2 条,只长出 1~2 条根的组培苗移栽不易成活。

由本研究结果表 1 可见,1/2 MS 基本培养基中生根率显著高于 MS 基本培养基。个别处理如 IBA 3.0 mg/L 和 IAA 0.5 mg/L 及 3.0 mg/L 浓度下,大量元素减半 MS 基本培养基中生根率稍高于 1/2 MS 基本培养基,但差异不显著。在作用效果相近的前提下,选择 1/2 MS 培养基比选择大量元素减半 MS 基本培养基节约试验成本。所以,选用 1/2 MS 培养基作为诱导生根的基本培养基。

根培养基中,根部生成的愈伤组织少,生根率最高达 95.0%,平均根长和平均生根数都较高,并且须根较多,利于生根苗移栽成活。所以,单独使用 IAA 诱导生根效果好。

表 2 IAA、NAA 对试管苗生根的影响

Table 2 Effect of IAA and NAA on rooting

激素/(mg·L ⁻¹) Hormone		接入数/个 No. of shoots	主芽伸长量/cm Elongation of buds (X±SD)	根部愈伤 Callus	生根率/% Percentage of rooting (X±SD)	根均长/cm Elongation of root (X±SD)	均生根数/条 No. of roots per plantlet(X±SD)	有须根率/% Fibrous root rate (X±SD)
IAA	NAA							
1.5	0	108	1.30±0.37a	极少	95.0±3.63a	0.40±0.03a	4.42±0.31a	40.0±0.91a
0	0.5	108	0.49±0.16b	很多	38.9±2.81c	0.25±0.03b	3.90±0.16b	0c
1.5	0.5	108	0.99±0.22ab	多	51.4±2.20b	0.33±0.04a	1.90±0.23c	12.2±1.14b

2.2.2 IBA、IAA 对生根的影响 在 1/2 MS 基本培养基中附加不同浓度的 IBA 或 IAA 诱导生根,结果见表 3。由表 3 可知,不同浓度的 IBA、IAA 均可有效诱导冬枣试管苗生根,其中以 IAA 1.5 mg/L 诱导生根率最高,达 95.3%,平均生根数最多,4.67 条,平均根长 1.18 cm。其他浓度的 IAA 处理中其生根率、平均生根条数和平均根长均低于 IAA 1.5 mg/L。IBA 在处理的 4 个浓度中诱导生根率相近,差异不大,但 IBA 使用浓度越高,根平均伸长越短。

试验发现,IBA 诱导生根时不同浓度间诱导效果差异不大,稳定性强;IAA 不同浓度间诱导效果差异较大,但经 IAA 诱导的试管苗根部形成的愈伤组织较少,利于移栽成活。所以在 1/2 MS 培养基中,宜选用 IAA 诱导生根,其中以 IAA 1.5 mg/L 作用效果好。

在 MS 基本培养基中诱导生根发现,IBA 以较高浓度(3.0 mg/L)诱导效果最好,为 40.0%,显著高于其他 3 个浓度处理。IAA 以 1.5 mg/L 诱导生

根效果最好,生根率为 63.4%,平均根长 1.45 cm,平均根数 4.84 个。所以,在 MS 基本培养基中,宜选用 IAA 诱导生根,其中以 IAA 1.5 mg/L 诱导生根最好。

表 3 IBA、IAA 对冬枣叶片再生植株生根的影响
Table 3 Effect of IBA and IAA on rooting of shoots

激素/ (mg·L ⁻¹) Hormone		1/2MS			
IBA	IAA	接人数/个 Number of shoots	生根率/% Percentage of rooting (X ± SD)	平均根长/cm Length (X ± SD)	平均生根数/条 No. of root (X ± SD)
0.5	0	112	82.2 ± 2.17bcd	1.57 ± 0.13a	3.35 ± 0.19d
1.0	0	108	72.3 ± 1.65d	1.16 ± 0.10b	4.42 ± 0.11ab
1.5	0	108	83.3 ± 1.07bc	0.80 ± 0.06de	3.33 ± 0.14d
3.0	0	90	73.4 ± 3.12cd	0.65 ± 0.06e	3.86 ± 0.27c
0	0.5	108	55.6 ± 3.09e	0.90 ± 0.04cd	3.00 ± 0.40d
0	1.0	93	87.0 ± 2.30b	1.46 ± 0.10a	4.30 ± 0.33abc
0	1.5	114	95.3 ± 5.40a	1.18 ± 0.08b	4.67 ± 0.31a
0	3.0	120	75.8 ± 8.15cd	1.04 ± 0.07bc	3.97 ± 0.32bc

激素/ (mg·L ⁻¹) Hormone		MS			
IBA	IAA	接人数/个 Number of shoots	生根率/% Percentage of rooting (X ± SD)	平均根长/cm Length (X ± SD)	平均生根数/条 No. of root (X ± SD)
0.5	0	104	19.2 ± 1.54de	1.44 ± 0.09b	2.20 ± 0.14e
1.0	0	116	20.7 ± 0.88d	0.88 ± 0.04c	1.50 ± 0.25f
1.5	0	112	21.3 ± 3.85d	0.71 ± 0.05c	2.33 ± 0.22e
3.0	0	110	40.0 ± 1.04c	0.79 ± 0.03c	5.82 ± 0.15a
0	0.5	120	13.2 ± 2.55ef	2.10 ± 0.44a	1.25 ± 0.02f
0	1.0	116	10.1 ± 3.31f	0.98 ± 0.10c	2.67 ± 0.06d
0	1.5	120	63.4 ± 4.19a	1.45 ± 0.09b	4.84 ± 0.13b
0	3.0	111	48.7 ± 2.24b	0.79 ± 0.05c	4.22 ± 0.06c

激素/ (mg·L ⁻¹) Hormone		大量元素减半 MS 1/2 mass - element of MS			
IBA	IAA	接人数/个 Number of shoots	生根率/% Percentage of rooting (X ± SD)	平均根长/cm Length (X ± SD)	平均生根数/条 No. of root (X ± SD)
0.5	0	100	36.0 ± 2.14e	0.97 ± 0.11c	2.33 ± 0.10ef
1.0	0	100	52.0 ± 3.43cd	0.62 ± 0.01d	2.54 ± 0.10e
1.5	0	104	77.0 ± 2.37b	0.70 ± 0.03d	3.80 ± 0.18bc
3.0	0	110	80.1 ± 2.41ab	0.64 ± 0.05d	4.00 ± 0.13ab
0	0.5	100	60.0 ± 3.20c	1.18 ± 0.05ab	3.73 ± 0.14c
0	1.0	106	56.7 ± 4.01c	1.11 ± 0.08abc	2.27 ± 0.09f
0	1.5	90	44.4 ± 3.41de	1.04 ± 0.07bc	3.40 ± 0.04d
0	3.0	94	85.2 ± 1.81a	1.23 ± 0.13a	4.10 ± 0.19a

在大量元素减半 MS 培养基中,IBA 生根效果随着浓度的增加而增加,如 IBA 浓度从 0.5 mg/L 增加到 3.0 mg/L,则生根率从 36.0% 增到 80.1%,平均生根数从 2.33 条增到 4.00 条,增幅较大。

IAA 诱导生根效果在 4 个处理中以 3.0 mg/L 最好,其次为 0.5 mg/L,中间浓度的生根效果不佳,1.5 mg/L 时诱导效果最差,仅有 44.4% 的生根率。所以,在该基本培养基中,3.0 mg/L 的 IAA 诱导效果好。

综合比较 3 种基本培养基中最优激素及激素浓度,IAA 诱导生根效果好于 IBA。其中 1/2 MS + IAA 1.5 mg/L 中生根效果最好。

3 讨论

在众多的木本植物快繁中,一般先要培养成无根苗,再将无根苗在生根培养基中诱导生根^[9],长苗和生根分别在两种不同培养基中进行。本试验中 1/2 MS 培养基诱导生根率最高,MS 培养基生根率最低,大量元素减半 MS 培养基居中,反映出枣试管苗生根时对营养物质需求的特点。1/2 MS 培养基中营养物质较少,对生根反而有利。而 MS 全量却不是最好的生根条件,这可能是因为过多的营养物质同时造成了渗透压比较高,对细胞生理状态不利,限制了细胞分裂^[8]。ETIENNE 等研究发现,高渗透压可以改变细胞的生理状态^[10]。韩新柱^[11]发现枣茎段培养和丛生芽培养中,以 MS 全量为宜,在生根诱导时以 1/2 MS 培养基为宜。该结果与本试验结果基本一致,说明培养方式不同,枣生长分化所需的营养物质不同。

另外,如果生长素种类和质量浓度使用不合适,很可能会导致愈伤组织生根,愈伤组织生根与组培苗的主茎没有维管联系,容易脱落^[12]。试验中 NAA 诱导生根时,在苗基部形成较多白色松散的愈伤组织,不定根生长在愈伤组织上,粗而短,没有须根,或从愈伤组织上分化许多较长的细根,移栽时根容易脱落。IAA 诱导生根时,不仅生根率显著高于其它处理,而且根系生长均匀白嫩,平均根长、根数、平均生根条数达最高值,组培苗整齐健壮,利于移栽。可见,IAA 最适于用作冬枣叶片再生植株生根培养。

(下转第 29 页)

本研究在胁迫 72 h 时,加入鞘氨醇的处理中 POD 活性均较其他处理组及对照组的活性要高,可能随着干旱胁迫进程的发生,POD 活性变化复杂,但结果显示,胁迫 72 h 鞘氨醇在一定程度上进一步增强了 POD 这种保护酶的活性。同时,经鞘氨醇处理的苜蓿愈伤组织在生活力、长势等方面也显示比对照的好。推测鞘氨醇作为一种信号分子在愈伤组织诱导阶段可能激发了某种防御机制,或是增强了苜蓿在渗透胁迫下对 O_2^- 的消除能力,但在以 PEG 作为渗透胁迫剂时,是鞘氨醇与其相互作用共同使酶活性发生变化,还是鞘氨醇单独来完成这种保护作用的机理尚待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] MERRILL A H J R, SCHMELZ E M, DILLEHAY D L, *et al.* Sphingolipids - the enigmatic class lipid: biochemistry, physiology, and pathophysiology [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 142(1): 208 - 251.
- [2] DBAIBO G S, WOLFF R A, OBEID L M, *et al.* Activation of a retinoblastoma protein dependent pathway by sphingosine [J]. *Biochem J*, 1995, 310(2): 453 - 459.
- [3] JARVIS W D, FORNARI F A J R, AUER K L, *et al.* Coordinate regulation of stress and mitogen activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 52(6): 9352 - 9471.
- [4] PETRA SPERLING, EMST HEINZ. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 11 - 12.
- [5] 谢芬, 郭顺星. 真菌来源鞘脂的结构及其活性研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(7): 481 - 484.
- [6] 张志良. 植物生理实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 154 - 155.
- [7] 李柏林, 梅慧生. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系 [J]. *植物生理学报*, 1989, 10(15): 6 - 9.
- [8] ASADAK. Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 422 - 429.
- [9] 徐朗莱, 叶茂炳. 过氧化物酶活力连续记录测定法 [J]. *南京农业大学学报*, 1989, 12: 82 - 83.
- [10] 陈星, 肖尊安, 张崇浩. 植物蛋白激酶 C 初探 [J]. *植物生理学报*, 1996, 22(4): 437 - 440.
- [11] 赵敏, 王钢, 姜若兰. 鞘氨醇调节人胰腺癌细胞株 JF305 生长和钙代谢 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2001, 13(4): 152 - 154.

(编辑: 李 川)

(上接第 21 页)

参考文献:

- [1] 曲泽洲, 王永惠主编. 中国果树志·枣卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993.
- [2] 金芳. 枣试管苗适宜生根培养基的选择研究 [J]. *甘肃农业科技*, 1996(4): 20.
- [3] 陈江. 鸣山大枣离体培养的研究 [J]. *甘肃林业科技*, 1992(2): 8 - 11.
- [4] 罗晓芳, 田砚亭, 李云, 等. 金丝小枣组织培养快速繁殖的研究 [J]. *北京林业大学学报*, 1996, 18(2): 9 - 15.
- [5] 金芳. NG 在临泽小枣试管苗继代繁殖中的应用研究 [J]. *甘肃农业科技*, 1996(4): 21 - 22.
- [6] 陈宗礼, 延志莲, 薛皓, 等. 沾化冬枣叶片培养和植株再生 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(6): 584.
- [7] 何振艳, 王玉国, 石武良, 等. 山西特有品种梨枣叶片的组织培养及植株再生 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5): 457.
- [8] 程佑发, 安黎哲, 浦铜良, 等. 枣愈伤组织诱导和再生植株 [J]. *西北植物学报*, 2000, 20(3): 364 - 369.
- [9] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986: 435 - 436.
- [10] ETUENNE H, BERGER A, CARRON M P. Water stress of callus from *heave brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis [J]. *Physiologia Plantarum*, 1991(82): 213 - 218.
- [11] 韩新柱, 王素心, 张世荃, 等. 枣树组织培养获得再生植株 [J]. *林业科技通讯*, 1998(10): 28 - 29.
- [12] 袁小环, 彭向永, 李青, 等. 甜樱桃组培苗的生根研究 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2004, 32(4): 71 - 74.

(编辑: 郭桂仙)