枣树叶片愈伤组织培养与再生植株的研究

陈宗礼, 张向前, 齐向英, 延志莲, 薛 皓

(延安大学生命科学学院、陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

摘要: 为探讨枣树组织培养育种及快繁技术, 以木枣、骏枣和狗头枣组培苗叶片为外植体, 通过诱导愈伤组织形成再分化出不定芽, 从而建立高效的再生系统。试验结果表明, 不同基因型或同一基因型的不同部位的材料其培养效果间有差异; 试管枣苗茎尖倒数1~3片叶是合适的外植体材料; 6-BA与2,4-D在枣树叶片愈伤组织诱导中有极显著的交互作用, 二者的配比浓度水平影响愈伤组织的诱导增殖和质量; 枣树叶片愈伤组织诱导和继代增殖培养适宜的培养基是3/4MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+琼脂0.55%+蔗糖3%。6-BA、IBA与TDZ在枣树愈伤组织分化培养中有显著的协同作用, 不定芽诱导的适宜培养基是CYI+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+TDZ 0.015 mg·L⁻¹。

关键词: 枣树; 叶片; 愈伤组织; 再生植株

中图分类号: S665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2007)03-0023-04

Callus culture from leaves and plant regeneration of *juzube* trees

CHEN Zong-li, ZHANG Xiang-qian, QI Xiang-ying, YAN Zhi-lian, XUE Hao

(College of Life Science, Yan'an University, and Shanxi Research Center of Engineering Technology for Conservation and Utility of Regional Biological Resources, Yan'an, Shanxi 716000, China)

Abstract: In order to study the rapid propagation technique of *Zizyphus jujuba* by tissue culture, take the leaf of tissue culture seedlings of Chinese dates named as Muzao, Junzao and Goutouzao as explants. Through adventitious bud redifferentiated from the calli, a highly effective plant regeneration system was established. The results showed that explants of different genotype or different position of same genotype are different in cultured effects. The first to third leaves backwards from shoot-tip to down are suitable to be as explants. The 6-BA and 2,4-D have great significant interaction in callus induction and culture from jujube leaves. Their compounded ratio effected callus induction proliferation quantity and quality. The suitable medium is 3/4MS + 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA + 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.55% agar + 3% sucrose for callus induction and subculture from jujube leaves. The 6-BA, IBA with TDZ in callus differentiation culture of jujube trees showed they have significant effect in conjunction each other. The suitable medium is CY I + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ IBA + 0.015 mg·L⁻¹ TDZ for inducing adventitious buds from jujube leaves.

Key words: *Zizyphus jujuba* Mill; leaf; callus; plant regeneration

枣树 (*Zizyphus jujuba* Mill) 是我国很重要的特有果树, 具有很高的生态和经济价值。但由于枣树种子高度不育, 难以进行有性繁殖和杂交育种。生产中多采用选择自然芽变与根蘖苗分株、扦插和嫁接等方法进行繁育, 极大地限制了良种繁育和推广。利用组织培养技术进行枣树的良种繁育是提高枣树生产水平的一条有效途径。由枣树茎尖、茎段进行组培快繁国内外已进行了不同程度的研究^[1-4, 11, 13]。枣树叶片具有取材方便、培养可塑性大等优点, 从理论上讲, 是进行枣树组织培养育种快繁的很好的外植体材料。枣树叶片培养的研究也有一些报道^[5-11], 但其愈伤组织培养再生植株的系统研究报道极少。我们从1995年以来进行了枣树叶片培养的系统研究, 旨在为枣树组织培养育种及快繁提供技术资料。

1 材料与方法

1.1 材料

木枣 (*MuZao*)、骏枣 (*JunZao*) 和狗头枣 (*GouTouZao*) 组培苗叶片来自延安大学红枣繁育工程重点实验室^[3]。

收稿日期: 2007-01-08; 修回日期: 2007-03-06

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目(2002K02-G3)与陕西省教育厅重点科研计划项目(00JK001)共同资助

作者简介: 陈宗礼(1954-), 男, 陕西扶风人, 延安大学教授, 硕士生导师, 从事红枣遗传育种研究和遗传学教学工作。

1.2 方法

1.2.1 枣树叶片愈伤组织的诱导 以生长调节物质、基本培养基、基因型和不同部位叶片为主要试验因子分别设计实验处理(表 1~表 5)。在无菌条件下,取继代培养至 25~28 d 的试管苗的幼嫩叶,切成 0.4 cm² 叶块,接种在设计的培养基上,每培养瓶随机接种 8 块,于培养室进行避光培养^[3~5](无透射阳光不开光源的条件下)约 20 d 左右,等愈伤组织生长到黄豆粒大小时转入弱光培养。

1.2.2 枣树叶片愈伤组织的增殖培养 在无菌条件下将初代培养诱导的愈伤组织(以下简称愈组)切成约 0.4 cm² 见方的愈组块,接种在设计的培养基上(表 6),每培养瓶随机接种 6 块,于培养室进行避光培养^[3~5](无透射阳光不开光源的条件下)约 20 d 左右,等新生愈伤组织产生后转入弱光培养。

1.2.3 枣树叶片愈伤组织的分化培养 在无菌条件下将继代培养的愈伤组织切成约 0.5 cm² 的愈组块,接种在设计的培养基上(表 7),每培养瓶随机接种 6 块,于培养室进行培养^[3~5]。

1.2.4 培养条件与调查方法 培养室温度 24~28℃,相对湿度 65%~70%,光照 12 h·d⁻¹,光强 1 500~2 000 lx。定期观察记录,以出愈率(长出愈组叶片数/接种叶片数×100%)、褐化率(褐化叶片或愈组块数/接种叶片或愈组块数×100%)、增生率(可增生愈组块数/接种愈组块数×100%)、分化率(出芽愈组块数/接种愈组块数×100%)、平均分化芽数(总出芽数/出芽愈组块数),并辅以感官评定标准等指标进行评价。调查时,随机取未污染的组培叶片(8 瓶)或继代的愈组(5 瓶)或分化培养的愈组(10 瓶)进行观察记录。

2 结果与分析

2.1 生长调节物质对枣树愈伤组织诱导的影响

接种叶片培养 5 d 后,叶片普遍肿胀卷曲,10 d 左右,叶切口、叶缘和表面周界开始萌生霜样白色或淡绿色愈伤组织颗粒,以切口和叶缘产生较早较多,15 d 左右可长到米粒大小,25 d 左右可长到黄豆粒大小。此时可将培养物放在约 1 500 lx 的弱光下培养,40 d 左右可长成 1 cm² 左右大小不规则的愈伤组织。愈伤组织从形态和质地上可分为以下 3 种类型:Ⅰ型,淡绿色或绿色,表面呈凹凸不平的光滑瘤状小颗粒,质地致密,需切割分离;Ⅱ型,黄褐色或白色,表面呈较光滑的小颗粒,质地致密,需切割分离;Ⅲ型,灰白色或灰色,质地松软。

试验考察了 6-BA 与 2,4-D 对枣树愈伤组织诱导的影响(如表 1),方差分析结果(表 2)表明,二者对枣树愈伤组织的诱导效果存在极显著的交互。对出愈率的多重比较与愈伤组织生长程度的分析表明,在保持 6-BA 浓度不变情况下,2,4-D 的浓度水平以 2.0 mg·L⁻¹ 的愈伤组织诱导效果为好,当为 1.0 时愈伤组

表 1 生长调节物质对愈伤组织诱导的影响

生长调节物质*		出愈率/%				均数显著性检验		愈组主要类型	愈伤组织生长量
6-BA/mg·L ⁻¹	2,4-D/mg·L ⁻¹	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	平均	0.05	0.01		
0.2	1.0	37.5	40.6	37.5	38.53	e	E	Ⅰ	++
0.2	2.0	78.1	68.8	71.9	72.93	a	A	Ⅰ	++++
0.2	3.0	59.4	56.2	59.4	58.33	c	CC	Ⅱ,Ⅲ	++
0.3	1.0	43.8	46.9	46.9	45.87	d	D	Ⅰ,	+++
0.3	2.0	65.6	59.4	62.5	62.50	c	BC	Ⅰ,	++++
0.3	3.0	68.8	75.0	65.6	69.80	ab	AB	Ⅱ,Ⅲ	++
0.4	1.0	53.1	56.2	59.4	56.23	c	C	Ⅰ,Ⅱ	+++
0.4	2.0	62.5	59.4	59.4	60.43	c	C	Ⅰ,Ⅱ	+++
0.4	3.0	68.8	65.6	62.5	65.63	bc	AB	Ⅱ,Ⅲ	++

注:* 基本培养基为 MS+琼脂 0.55%+蔗糖 3%,pH 6.0。表中的小写和大写字母表示经差异显著性检验在 0.05 及 0.01 水平上的差异。Ⅰ型:淡绿色或绿色,质地致密;Ⅱ型:黄褐色或白色,质地致密;Ⅲ型:灰白色或灰色,质地松软;++++:生长旺盛;+++ :生长较旺盛,++ :生长一般(后表同)。

织诱导率显著降低,为3.0时愈伤组织的质量明显下降,表现为II、III型愈伤组织发生率有所增高。而2,4-D在1.0水平时,随6-BA由0.2增加到0.4,诱导率增加显著,愈伤组织硬度也增加;2,4-D在2.0水平时,随6-BA由0.2增加到0.4,诱导率降低;2,4-D在3.0水平时,随6-BA由0.2增加到0.4,诱导率增加。以6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹的组合诱导效果最好。

表2 生长调节物质对愈伤组织诱导率的F检验

变异来源	平方和(SS)	自由度(DF)	均方(MS)	F值	F
6-BA(A)	81.1119	2	40.5559	4.16*	0.05, (2, 18) = 3.55
2,4-D(B)	1959.4274	2	979.7137	94.33**	0.01, (2, 18) = 6.01
A×B	864.9348	4	216.2337	22.18**	0.01, (4, 18) = 4.58
误差(E)	175.4867	18	9.7493		
总和	3080.9607	26			

注:*,差异显著;**,差异极显著。

2.2 基本培养基对枣树愈伤组织诱导的影响

以MS、3/4MS、1/2MS和B₅为基本培养基进行单因素试验,结果见表3。由表中可知,在设计4种基本培养基中,以3/4MS诱导愈组的效果为好,其诱导率高且I型愈组较多,B₅次之,MS再次,1/2MS差。

2.3 基因型对枣树愈伤组织诱导的影响

以木枣、骏枣和狗头枣组培苗叶片为材料进行单因素试验,结果如表4。由表4可知,参试3个品种枣树中,愈伤组织诱导的优序是木枣>骏枣>狗头枣。

2.4 不同部位叶片对枣树愈伤组织诱导的影响

以试管苗展开叶为材料,取正向第1、2、3、4片叶进行单因素试验,结果如表5。由表5可知,以试管枣苗展开的倒1~3叶的愈伤组织的诱导效果好,倒4叶的诱导效果差,并且出现一定频率的II、III型愈伤组织。

2.5 培养基组成对愈伤组织增殖培养的影响

将初代培养诱导的愈伤组织,于无菌条件下切成约0.4 cm²左右的小块,转接在继代培养基上进行增殖培养。继代培养的愈伤组织生长速度较快,转接5 d左右可开始增生,以周界横向增生最快,15~20 d增殖达高峰期。前述3类型愈伤组织在继代培养中,I型新增生的愈伤组织起初为白色或淡绿色,随着培养时间延长逐渐变为淡绿色或绿色;当继代培养超过35 d以后,愈组块中心变硬并出现黄绿色,继续延长培养可出现褐化组织,继代增殖培养周期约为25~30 d;II型较I型增殖速度慢,仍为较致密的黄褐色或白色瘤状;III型增殖速度介于I、II型之间,仍为松软的灰白色或灰色不规则团球状,培养时间延长,个别则出现松散状的黄褐色或褐色愈伤组织;多次继代培养中,II、III型很难转化成I型,I型随着培养基组成、温度、光照和转继代数等条件的不同可出现低频率的II型或III型。以I型愈伤组织为材料进行继代增殖培养试验,其结果如表6。由表中看出,设计培养基在保持2,4-D或2,4-D与NAA浓度不变时,随6-BA浓度增高,愈伤组织的增生率降低而褐化率升高,以6-BA 0.2+2,4-D 2.0的组合培养效果

表3 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基	试验愈伤组织数	出愈率/% ± SE	愈伤组织生长量
MS	64	46.9 ± 1.11	+++
3/4MS	64	60.9 ± 1.31	++++
1/2MS	64	40.6 ± 1.10	++
B ₅	64	54.7 ± 1.43	+++

*:基本培养基均附加6-BA 0.2 mg·L⁻¹,2,4-D 2.0 mg·L⁻¹,琼脂0.55%,蔗糖3%,pH 6.0。

表4 基因型对愈伤组织诱导的影响

基因型	试验愈伤组织数	出愈率/% ± SE	愈伤组织生长量
木枣	64	84.4 ± 1.56	++++
骏枣	64	78.1 ± 1.39	++++
狗头枣	64	70.3 ± 1.16	+++

*:基本培养基为MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+琼脂0.55%+蔗糖3%,pH 6.0(表5同)。

表5 叶位对愈伤组织诱导的影响

叶位	试验愈伤组织数	出愈率/% ± SE	愈伤组织生长量
倒1	64	65.6 ± 1.38	++++
倒2	64	68.8 ± 0.84	++++
倒3	64	70.3 ± 1.16	+++
倒4	64	46.9 ± 1.11	++

*:叶位由木枣试管苗茎尖向下倒数叶。

为好。愈伤组织经继代培养 50 代仍保持旺盛增殖。

表 6 培养基对愈伤组织继代培养的影响

培养基组成/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	试验愈伤组织数	增生率/ $\% \pm \text{SE}$	褐化率/ $\% \pm \text{SE}$	愈伤组织生长量
6-BA 0.2+2,4-D 2.0	30	93.3 $\pm$ 1.67	6.7 $\pm$ 1.67	++++
6-BA 0.3+2,4-D 2.0	30	83.3 $\pm$ 2.15	16.7 $\pm$ 2.15	+++
6-BA 0.4+2,4-D 2.0	30	73.3 $\pm$ 3.47	26.7 $\pm$ 3.47	+++
6-BA 0.1+2,4-D 0.5+NAA 0.05	30	90.0 $\pm$ 1.64	10.0 $\pm$ 1.64	++++
6-BA 0.5+2,4-D 0.5+NAA 0.05	30	76.7 $\pm$ 1.64	23.3 $\pm$ 1.64	++

*:培养基为 3/4MS 基本培养基 + 琼脂 0.55% + 蔗糖 3%, pH 6.0。

2.6 愈伤组织不定芽的分化与再生植株的培养及移栽

分化试验中, II 型和 III 型愈伤组织均未有芽的分化, 只有 I 型愈伤组织可分化出芽。以 I 型愈伤组织为材料研究培养基对其分化率的影响。将继代培养 50 代的 I 型愈伤组织纵切成约 0.5 cm^2 左右接种于分化培养基上(表 7)培养, 愈伤组织可继续生长。培养至 20~30 d, 愈伤组织表面形成小米粒般大小的瘤状颗粒, 继续培养可出现一些绿色芽点并进一步分化出不定芽。由表 7 看出, 以 CYI + 6-BA 1.0 + IBA 0.2 + TDZ 0.015 的培养基组成的分化培养效果较好, 分化率达 45% (34.43%~55.57%), 平均每块愈伤组织分化芽数达 3.48 $\pm$ 0.18 个。

当不定芽长到 3~4 cm 左右, 按陈宗礼等的方法进行继代与生根培养^[6], 以及炼苗移栽^[4], 可获得组培枣树苗。

表 7 培养基对愈伤组织分化培养的影响

培养基组成/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	试验愈伤组织数	分化率/ $\% (95\% \text{置信区间})$	平均出芽数
①6-BA 1.0 + IBA 0.2 + TDZ 0.015	60	45(34.43~55.57)	3.48 $\pm$ 0.18
②6-BA 1.0 + IBA 0.2 + AC 0.5%	58	25.86(16.40~35.32)	2.13 $\pm$ 0.21
③6-BA 2.0~2.5 + IBA 0.2~0.3	60	38.33 (32.05~44.61)	2.65 $\pm$ 0.18

*:①为 CYI 基本培养基^[6], ②、③为 MS 基本培养基, 培养基附加蔗糖 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 5.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.0。外植体为木枣叶片愈伤组织。

3 讨论

基因型、不同部位材料和培养基组成是影响枣树叶片愈伤组织发生、增殖和分化的几个主要因素。试验表明, 组培枣苗茎尖倒数 1~3 片叶是诱导愈伤组织的合适的外植体材料。参试 3 个枣树品种与不同部位叶片的愈伤组织的诱导效果有差异, 说明不同基因型甚至同一基因型的不同部位的材料其培养效果是不同的。这是由于不同基因型及其不同部位材料其内源激素与营养水平不同, 所处生态环境(包括微生态环境)不同, 细胞和组织的生理状态亦不同, 从而表现出组织培养差别的特点。一般而言, 对于同一基因型, 处于幼态型或幼嫩期的组织或器官, 其细胞的分裂与分化活性强, 易于响应培养因素的反应而变化。何业华等^[7]、程佑发等^[11]、何振艳等^[8]的试验结果也支持这一结论。说明在组织培养过程中, 对不同基因型和不同部位组织、器官材料进行研究是有重要意义的。

培养基中的外源植物激素主要通过细胞分裂中基因的表达与活性调控影响细胞的脱分化、分化和生长发育过程, 其适宜的种类和配比水平反映了植物组织和器官的内源激素水平的不同与其脱分化及分化生长对这些物质的需求特点。试验表明, 6-BA 与 2,4-D 在枣树叶片愈伤组织诱导和继代增殖中有极显著的互作作用, 二者的配比浓度水平影响愈伤组织的诱导增殖和质量, 单独使用的效果差, 通过试验, 确定出其合适的配比浓度水平为 6-BA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 2,4-D 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。6-BA、IBA 与 TDZ 在枣树愈伤组织分化培养中有显著的协同作用, 适宜的配比浓度水平为 6-BA 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IBA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + TDZ 0.015 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

培养基中的盐浓度水平既反映出枣树叶片愈伤组织发生和增殖对营养需求的特点, 又影响培养基中渗透压的变化, 从而影响到细胞、组织和器官生长发育的生理生化代谢过程。一般而言, (下转第 35 页)

较多,但仍有部分家系小于对照,且不同家系生长的差异明显,变异系数较大,F值与遗传力较高,说明表型选择后的遗传测定是非常重要的,利用子代测定结果,选择出28个优良家系,可获得树高3.3%、胸径13.4%、单株材积31.8%的遗传增益。

2)优良家系与优良单株联合选择可获得双层次的改良增益。所选出103个优良单株的平均树高12.4 m,平均胸径17.7 cm,平均单株材积0.144 0 m³,可获得遗传增益分别为4.5%、23.9%、69.1%,可显著提高用材林产量。

3)LSD法进行家系选择,将显著大于对照的家系入选,会受对照生长情况影响。如对照生长性状表现不稳定,则有明显的局限性。用各家系分重复与平均值比较,校正LSD法因对照生长性状不稳定造成入选偏多或偏少的问题,效果良好。

参考文献:

- [1]张广炎.马尾松优树子代测定及优良家系评选[C]//马尾松种子园建园技术论文集.北京:学术书刊出版社,1990:203-206.
- [2]王章荣,陈天华.福建省马尾松优树自由授粉子代及其亲本的初步评选[J].南京林业大学学报,1989,13(4):48-55.
- [3]林思京.福建省马尾松优树子代初步评选[J].福建林学院学报,1997,17(3):255-258.
- [4]江瑞荣.马尾松优树自由授粉子代容器苗生长性状研究[J].福建林业科技,2003,30(1):23-37.
- [5]邱文金.马尾松种子园单亲本子代测定研究[J].福建林业科技,2003,30(3):59-61.
- [6]洪永辉.马尾松种子园单亲子代测定[J].福建林学院学报,2003,23(1):73-74.
- [7]胡集瑞.马尾松种子园自由授粉子代苗期多性状分析[J].林业科技开发,1999(5):28-30.

(上接第26页)速生树种宜用高盐培养基,慢生树种需要适当降低盐浓度。枣树是慢生树种,适当降低盐分对其组织生长分化有利^[8]。本试验表明,枣树叶片愈伤组织培养中,MS全量盐浓度偏高,1/2 MS盐浓度又偏低,以3/4 MS盐浓度较适宜,分化培养则以CYI^[5]盐浓度较适宜。

参考文献:

- [1]王红梅,续九如.枣树离体培养研究进展[J].河北林果研究,2003,18(4):377-383.
- [2]王玖瑞,刘孟军,代丽.枣树组织培养研究进展[J].果树学报,2002,19(5):336-339.
- [3]陈宗礼,薛皓,延志莲.红枣脱毒试管苗无性系建立的研究[J].西北农业学报,2001,10(1):17-21.
- [4]陈宗礼,延志莲,薛皓,等.红枣组培苗优化配套移栽技术的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(4):63-69.
- [5]陈宗礼,延志莲,齐龙.枣叶片离体培养再生植株[J].植物生理学通讯,1996,32(1):27-28.
- [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]何业华,熊细满,谢壁霞,等.枣树组织培养愈伤组织诱导的研究[J].中南林学院学报,1997,17(1):13-18.
- [8]何业华,伍成厚,胡中沂,等.枣树愈伤组织培养时不定芽的分化[J].中南林学院学报,1998,18(3):44-50.
- [9]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(6):457.
- [10]李云,王宇,田砚亭,等.赞皇大枣叶片再生植株的初步研究[J].核农学报,2003,17(3):187-190.
- [11]程佑发,安黎哲,蒲铜良,等.枣愈伤组织诱导和植株再生[J].西北植物学报,2000,20(3):364-369.
- [12]Rathore. T. S, Singhet. R. P, Deora. N. S. al. Clonal propagation of *Zizyphus specis* through tissue culture[J]. Scientia Horticulturue, 1992, (51):165-168.
- [13]Mitrofanova IV, Mitrofanova OV, Pandei DK. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zizyphus hijuba* Mlii. invitro [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 1997, 44(1):94-99.