

骏枣叶片组织培养及植株再生技术研究

梁国栋, 王玉国 (山西农业大学研究生院, 山西太谷 030801)

摘要 通过对骏枣叶片诱导愈伤组织、愈伤组织诱导不定芽、不定根的分化及再生植株移植的最佳条件的探讨, 建立了稳定的骏枣叶片离体培养及再生植株体系。

关键词 叶片; 组织培养; 愈伤组织; 不定芽; 不定根; 再生植株

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)05-01313-02

Tissue Culture and Plant Regeneration of Jun Jujube Leaf

LIANG Guo-dong et al (School of Graduate, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shaanxi 030801)

Abstract The optimum conditions of leaf induced callus of Jun jujube, callus induced adventitious bud, differentiation of adventitious bud and root, transplant of regenerate plant were studied in this paper. Therefore, the stable tissue culture in vitro and the plant regeneration system of Jun jujube leaf were established.

Key words Leaf; Tissue culture; Callus; Adventitious bud; Adventitious root; Plant regeneration

1 材料与方

1.1 材料 骏枣试管苗叶片。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制。基本培养基为 MS 培养基, 蔗糖 3.0%, 琼脂 0.8%, pH 值 5.8, 并添加不同浓度的 6-BA、2,4-D、IBA 及活性炭。培养基用 100 ml 三角瓶分装, 每瓶 20 ml, 封口膜包扎, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2.2 愈伤组织的诱导。用不同浓度配比的 6-BA、2,4-D 诱导愈伤组织, 其配比见表 1; 不同光、暗条件诱导愈伤组织, 分别为光培养、暗培养、前期光培养(2 d)后期暗培养、前期暗培养(2 d)后期光培养(叶片背面向下放置^[1])。

1.2.3 愈伤组织诱导不定芽。将紧密而坚硬的愈伤组织切成 0.5 cm 见方, 质量约为 0.15 g 的小块, 接种在不同的分化培养基上, 加入不同种类和浓度的生长素 (IBA) 与细胞分裂素 (6-BA) 诱导不定芽^[2], 其不同浓度配比见表 2。培养温度为 (28±1) °C, 每天光照 14 h, 光照强度为 2000 lx, 培养期为 42 d。

1.2.4 不定根的分化。将小植株基部插入 MS 培养基中, 培养基中附加有不同浓度的激素^[3], 其配比见表 3。在 (28±1) °C 下培养。每处理为 20 个, 4 次重复。将分别保留有 3、2、1、0 枚叶片的茎, 接种在添加浓度 1.0 mg/L IBA 的 MS 培养基中进行不定根诱导。

1.2.5 再生植株的移植。首先在自然光下封口炼苗 7-10 d, 然后将试管苗基部琼脂洗净, 栽至用浓度为 0.2% 的高锰酸钾消毒过的蛭石中, 浇透水后, 置于 23~30 °C 温室中。2 周后, 将苗木栽于营养钵中, 在遮光 50% 的荫棚下生长 5 d, 全光条件下生长 2 周后, 定植于大田。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 及 2,4-D 配比对愈伤组织诱导的影响 (表 1) 从表 1 可以看出, 适当浓度的 6-BA 或 2,4-D 都能显著地促进枣树愈伤组织的形成, 且两者同时添加时效果更佳^[3]。培养基中在只有生长素 2,4-D, 而无 6-BA 的情况下, 诱导效果较差, 诱导出来的愈伤组织体积小且颜色发白, 组织松散; 添加 6-BA 后, 诱导效果得到显著改善, 愈伤组织逐渐增大, 组织紧密且色泽鲜亮而嫩绿; 而随着 6-BA

表 1 不同浓度 6-BA、2,4-D 配比及对愈伤组织诱导的影响

6-BA//mg/L	2,4-D//mg/L	出愈率//%	大小	色泽	紧密程度
0	0	0	-	-	-
0.5	1.0	16.9	小	乳白	松散
	1.5	18.6	小	乳白	松散
	2.0	10.5	小	乳白	松散
1.0	0	6.2	小	乳白	松散
	1.0	90.0	大大	嫩绿	紧密
	1.5	96.2	大大	嫩绿	紧密
1.5	2.0	81.2	大大	嫩绿	紧密
	0	4.2	小	乳白	松散
	1.0	88.6	大大	嫩绿	紧密
1.5	1.5	91.4	大大	嫩绿	紧密
	2.0	82.6	大大	嫩绿	紧密
	0	7.6	小	乳白	松散
	1.0	66.2	大大	嫩绿	紧密
	1.5	46.8	大大	嫩绿	紧密
	2.0	10.8	小	乳白	松散

浓度的逐步增加, 诱导效果在达到最佳诱导后又逐步降低, 最后出现和不添加 6-BA 一样的诱导效果。因此, 诱导愈伤组织的最佳配比是 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L。

2.2 不同光、暗培养对愈伤组织诱导的影响 (表 2) 从表 2 可以看出, 在诱导愈伤组织的过程中, 光、暗条件都是极其重要的, 在全光培养中, 出愈率较低, 出愈时间较长, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例要高且褐化率也比较低; 在全暗培养中, 出愈率高, 出愈时间短, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例要低且褐化率也较高; 在前期光培养后期暗培养中, 出愈率有所增加, 出愈时间较全光培养要短, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例比全光培养要低而且褐化率也相对较高; 而在前期暗培养后期光培养中, 出愈率达到最高, 出愈时间也相对要短, 且愈伤组织色泽嫩绿的比例极高而且褐化率也相对较低。因此, 最适诱导应该是前期光培养后期暗培养。

表 2 不同光、暗培养对愈伤组织诱导的影响

光照条件	出愈率//%	诱导速度//d	色泽	紧密程度	褐化//%
光培养	80.6	21	乳白(12%) 嫩绿(88%)	松散 紧密	12
暗培养	96.2	9	乳白(76%) 黄绿(34%)	松散 松散	61
前期光培养(2d)	84.8	18	乳白(32%) 嫩绿(68%)	松散 紧密	42
前期暗培养(2d)	95.4	12	黄绿(8%) 嫩绿(92%)	松散 紧密	16
后期光培养					

2.3 不同浓度 6-BA、IBA 配比对愈伤组织诱导不定芽的影响 (表 3) 从表 3 可以看出, 在只有生长素 IBA 的情况下

作者简介 梁国栋(1981-), 男, 山西朔州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物生理学及组织培养。

收稿日期 2006-11-12

愈伤组织基本不分化,而在添加了细胞分裂素 6-BA 之后,愈伤组织的分化率有了明显的提高,逐步增加 6-BA 的浓度,分化率逐步升高。在 6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L 的激素配比下,芽分化个数和苗高达到最高,继续增加 6-BA 浓度的情况下,芽分化率和苗高都有所下降。因此,MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L 的激素配比为最佳配比。在试验中,愈伤组织的褐化率比较高,但在培养基中加入 1.5 g/L 的活性炭,能有效地利用活性炭良好的吸附特性,及时吸附植物材料分泌出的褐色物质,减少褐变愈伤组织的抑制作用,使外植体尽快分生,进入分化阶段^[4-5]。

表 3 不同浓度 6-BA、IBA 对比对愈伤组织诱导不定芽的影响

6-BA	IBA	分化率//%	芽分化数	苗高//cm
0	0	0	-	-
	0.02	0	-	-
	0.05	0	-	-
	0.08	0	-	-
	0.10	0	-	-
	0.20	0	-	-
0.5	0	0	-	-
	0.02	12.6	1.7	0.8
	0.05	6.8	1.4	0.6
	0.08	4.0	1.2	0.8
	0.10	1.2	0.8	1.0
	0.20	-	-	-
1.0	0	3.2	1.2	1.0
	0.02	16.8	2.2	1.6
	0.05	30.6	4.8	2.8
	0.08	20.4	1.8	1.4
	0.10	3.4	1.0	0.8
	0.20	-	-	-
1.5	0	2.8	1.2	0.6
	0.02	4.6	1.6	0.8
	0.05	11.4	1.8	1.0
	0.08	14.2	2.0	0.7
	0.10	2.1	1.4	1.0
	0.20	-	-	-

注:不定芽再生情况和褐变程度在培养后第 40 天记录。

2.4 不同浓度 IBA、6-BA 对比对不定根分化的影响

2.4.1 不同浓度的 IBA、6-BA 对不定芽形成的茎进行不定根诱导(表 4)。从表 4 可以看出,当 6-BA 浓度 ≥ 0.1 mg/L 时,无论 IBA 浓度高低如何,均未分化出不定根;当 6-BA 浓度降至 0.05 mg/L 时,有 5%~11%左右的茎产生了 1~2 条不定根,可见细胞分裂素 6-BA 对不定根分化有抑制作用。在未添加 6-BA 的情况下,添加 1.5 mg/L IBA 的生根率最高,达到 95.4%;1.0 mg/L 时的生根率亦高达 92.9%;但低于 1.0 mg/L 或高于 1.5 mg/L 时,生根率和生根系数都会降低。另外,高浓度的 IBA 和 6-BA 组合生根率低。

表 3 不同浓度 IBA、6-BA 对比对不定根分化的影响 mg/L

IBA	6-BA	生根率//%
3.0	0.10	0
	0.05	5.0
	0	16.7
2.0	0.10	0
	0.05	6.8
	0	54.6
1.5	0.10	0
	0.05	11.2
	0	95.4
1.0	0.10	0
	0.05	10.4
	0	92.9
0.5	0.10	0
	0.05	0.3
	0	43.2

2.4.2 茎上的叶片数量对不定根分化的影响。叶片数量对枣树不定根的形成有着重大的影响。当茎上不保留叶片时,生根率只有 13%,每个茎上仅有 1~2 条根;保留 1 片叶后,生根率达到 68%,每个已生根的茎上可产生 4~5 条不定根;随着保留的叶片增多,生根率、生根系数及不定根壮实程度都会增高,保留 3、4 枚叶的效果最好,达到 96%。

2.5 不同叶龄叶片的再生效果(图 1) 由图 1 可知,随着叶龄增加,叶片再生频率最高达到 96%,叶龄小于 20 d 时,叶片难以抽生不定芽,叶片坏死率较高,多是失水过快,褐变坏死;而叶龄超过 40 d 的叶片诱导反应迟钝,愈伤紧凑,量较少,再生频率和芽数显著下降。故 30~40 d 的叶片是最佳再生外植体。

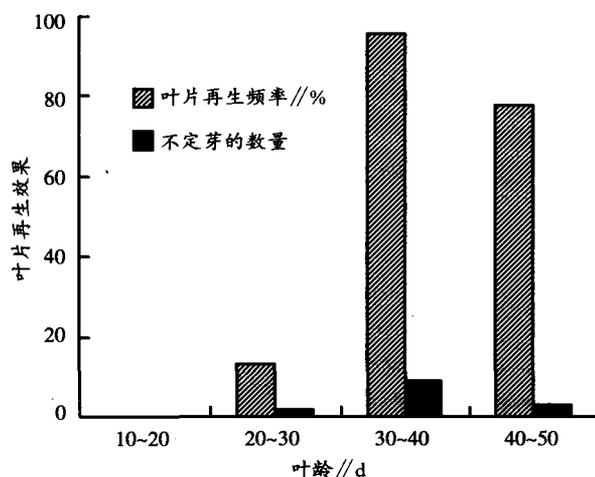


图 1 不同叶龄叶片的再生效果

2.6 试管苗的移栽情况 将再生植株从琼脂培养基中移植到含有 MS 培养基的无机盐营养土中,在人工气候室内生长 3 d 后,再移栽到带有荫棚的野外,7 d 后逐渐解除遮阴设施,成活率在 98% 以上。

3 结论与讨论

(1) 适当浓度的细胞分裂素或生长素都能显著地促进枣树愈伤组织的形成,且两者同时添加时效果更佳,诱导愈伤组织的最佳配比是 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L。

(2) 在诱导愈伤组织的过程中,光、暗条件都是极其重要的,而最适诱导应该是前期光培养后期暗培养。

(3) 叶片质量也是保证再生频率稳定提高的关键因素,许多相关报道都充分强调了叶片选择的重要性。Gu 等研究证明,20 d 叶龄的叶片再生率最高^[6];在周瑞金的研究中,30~40 d 叶龄更有利于不定芽的高效再生^[7]。该研究认为,使用 30~40 d 叶龄充分生长的金昌枣叶片可达到接近 96% 的再生频率,成熟的维管组织提供了良好的营养物质吸收途径,如果叶片没有充分发育,维管组织缺乏吸收营养的能力,也易造成叶片失水过快而死亡。

总之,试验中骏枣叶片在适宜激素浓度下诱导的愈伤组织洁白、致密、有光泽,光照培养后可以很快转成绿色,并且可以形成不定芽,不定芽伸长成枝条后可以通过诱导生根而形成完整植株^[8]。何振艳等、刘翠云等也分别报道,从梨枣、黑山晋枣叶片、茎诱导的愈伤组织可以通过诱导器官发生形成再生植株^[9-10]。因此,枣树茎、叶等成熟器官诱导的愈伤组织在植株再生上也是具有意义的。这些成熟器官诱导

(下转第 1328 页)

段的生根情况有所不同,基段的生根效果明显好于中段。

2.3 生根剂处理对桑树扦插发芽生根的影响 由图3可以看出,用生根剂处理后,发芽情况和对照相比基本上是一致的,而生根情况明显好于对照,说明生根剂处理对发芽基本上没有影响,而对生根有一定的影响,生根剂处理促进了插穗的生根,从而提高了扦插的成活率。

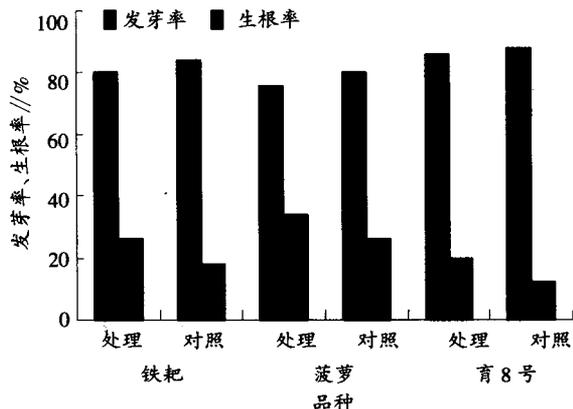


图3 生根剂处理对桑树不同品种扦插发芽生根的影响

2.4 不同品种的扦插成活率 由图4可见,菠萝的成活率最高,达27%;铁耙次之,为18%;育8号最低,为16%。

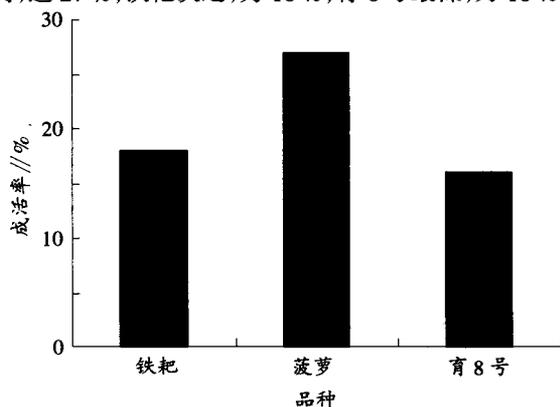


图4 3种桑树品种扦插成活率的比较

3 讨论

3.1 应选择冬芽饱满、发育良好的枝条作插穗 插穗扦插后主要依赖枝条中贮藏的养分供应其生根、发芽,所以扦插生根的条件主要是插穗有充足的养分和适宜的外界环境^[6,7]。插穗体内的C/N高者,生根率高,一般要求插穗粗壮、充实和有一定的长度。所以选择发育良好、无病虫害的枝条,对于提高扦插成活率是十分重要的,该试验结果与陆小平^[1]的研究结果一致,即扦插枝条饱满容易生根。

3.2 保证适宜的环境条件 外界环境中光照、温度和通气状况对生根影响较大。穗芽萌发后,必须有适当的光照,一般要求光照强度在2000 lx左右。生根温度范围在10~35℃,最适范围为25~28℃。根原基生根型的生根起点温度为10℃,最适温度范围为20~25℃。插穗扦插生根成活还与气温有关。气温低、温床高,温差在15~20℃的插穗生根率高且插穗成活率高^[8]。插床的通气条件对生根也很重要,一般要求含氧量在15%以上。该试验选择向阳的地方,采用地膜覆盖的方式,基本满足了光照和温度的要求^[9]。扦插采用塑料袋法,选用沙土壤,能够更好地保证氧气的需求量。同时在扦插过程中应注意防止剪口感染,最好在扦插前用多菌灵处理插穗数秒钟,并且保证插床上不要积水^[10]。

参考文献

- [1] 陆小平.激素对桑树扦插生根的影响[J].江苏蚕业,1997(3):7-11.
- [2] 陈雪峰.杂交桑硬枝扦插技术[J].农村实用技术,2002(4):14-15.
- [3] 李东.湖桑硬枝扦插育苗[J].蚕桑茶叶通讯,1999(3):39.
- [4] 薛志民.桑树硬枝扦插育苗技术[J].陕西农业,1995(2):6.
- [5] 李胜山,林寿康.湖桑硬枝扦插育苗技术研究[J].蚕桑通报,1986,17(4):14-17.
- [6] 沈增学.桑树扦插的生根生理[J].植物生理学通讯,1997,33(6):485-488.
- [7] 李继华.扦插的原理与应用[M].上海:上海科学技术出版社,1987:23-116.
- [8] 谈焕成,周成使.影响湖桑硬枝扦插育苗成活率的原因分析[J].江苏蚕业,2000,22(2):28-29.
- [9] 林怀仁,林波.桑树地膜覆盖硬枝扦插育苗试验初报[J].江苏蚕业,1997(2):55-56.
- [10] 景,2002(12):29-30.
- [5] 刘用生.植物组织培养中活性炭的使用[J].植物生理学通讯,1994,30(3):214.
- [6] X F,ZHANG J R. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill) using leaf explants[J].Plant Cell Reports,2005(23):775-779.
- [7] 周瑞金.枣离体叶片高效再生体系的建立[D].保定:河北农业大学,2004.
- [8] 何业华,胡芳名,谢碧霞,等.枣树愈伤组织培养时不定根的分化[J].经济林研究,1999,17(3):11-13.
- [9] 何振艳,王玉国,石武良,等.山西特用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.
- [10] 刘翠云,李艳,马洪明,等.黑山晋枣芽培养及植株再生研究[J].西北植物学报,1997,17(3):362-367.
- [11] 何业华,熊细满,谢碧霞,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.

(上接第1314页)

的愈伤组织分化不定根较容易^[11],而分化不定芽则较困难,需要多次继代培养后才能完成分化过程。对枣树愈伤组织的继代培养过程进一步进行组织学和生理生化的研究,可能有助于了解枣树非胚性愈伤组织向胚性愈伤组织转化的机理,从而为其他木本植物成年型器官的再生研究提供参考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 崔丽华.植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J].辽宁师专学报,2000,2(2):97-99.
- [3] 王玫瑞,刘孟军,代丽,等.枣树组织培养研究进展[J].果树学报,2002,19(5):336-339.
- [4] 王东霞,李长杰.如何对抗植物组织中的组织褐变[J].中国花卉盆

科技论文写作规范——作者

论文署名一般不超过5个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写,姓氏字母与名字的首字母分别大写;外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。