

枣不定芽再生体系研究进展

王国平^{1,2}, 李晓梅², 马会勤¹

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院 100094

2. 山西农业科学院果树研究所, 030815)

摘要: 对枣的茎段、叶片、幼胚、花药等不同器官以及原生质体培养不定芽再生体系的研究进展进行了综述。到目前为止, 已有 20 多个枣品种获得了不定芽再生。在对枣不定芽再生体系研究进展综述的基础上, 提出了今后在枣不定芽方面进一步研究的领域。

关键词: 枣; 不定芽; 再生

中图分类号: S 665.103.6 **文献标识码:** A

文章编号: 1001-0009(2007)03-0071-02

枣(*Ziziphus jujube* Mill.) 属鼠李科 (Rhamnaceae), 枣属 (*Ziziphus* Mill) 植物。具有抗旱、耐瘠薄、适应性强等特点, 果实营养丰富, 具有一定医疗作用。随着我国人民生活水平的逐步提高及人们对果品需求的多样化, 枣树在近 20 年来得以迅速发展。同时, 韩国、美国等国也开始少量栽培。在枣树生产不断发展的同时, 国内学者相继开展了枣不定芽再生体系的研究, 主要在枣树茎段、叶片、体细胞胚形成和胚挽救等方面取得了很大的进展, 在花药培养和原生质体培养方面也取得了一定的进展, 从而为今后基因工程、原生质体融合等现代育种技术在枣品种改良中的应用奠定了技术基础。

1 枣茎段不定芽再生体系研究进展

1983 年张福泉^[1] 首次报道了用枣茎段离体培养, 获得再生小植株。枣茎段不定芽再生是指诱导茎段分化不定芽。主要在无核小枣、尖枣、相枣、梨枣^[2] 和鸡蛋枣^[3] 以及民勤小枣^[4] 等品种上获得了再生植株。影响因素主要包括外植体来源、外植体采集季节、生长调节物质影响和不同基因型间的差异。

从枣头茎段、枣头茎端(带主芽茎段)和二次枝茎段 3 种外植体诱导不定芽的结果看, 枣头茎段可以从切口直接诱导出不定芽, 而枣头茎端和二次枝茎段均不能诱导不定芽^[2]。程佑发等^[4] 在民勤小枣试验中发现, 不同生长季节的外植体其愈伤组织的诱导率不同。冬季水培枝条长出的幼茎和自然萌发的幼茎切段出愈率高。而 6 月份取材, 诱导率低。原因是不同生长季节的材料生理状态不同, 新材料代谢旺盛而且组织分化水平低, 因此, 脱分化形成愈伤组织较容易。伍成厚^[2] 等

研究发现, 在细胞分裂素一定的情况下, 随着 NAA 添加浓度由低向高 (0.015~0.05 mg/L), 形成的不定芽量也在增加。当 NAA 浓度超过 0.1 mg/L 时, 不定芽分化量减少, 当 NAA 浓度达到 2.0 mg/L 时, 茎段切口仅能形成愈伤组织, 而不定芽的分化则受到限制。枣不同品种明显影响枣茎段不定芽的诱导。在培养基及植物生长调节物质一定的情况下, 尖枣的不定芽诱导率最低, 其次是相枣、无核小枣, 鸡蛋枣最高^[2]。

2 叶片不定芽再生体系研究进展

枣离体叶片培养起步较晚, 开始于 1988 年^[5], 主要在梨枣^[6]、民勤小枣^[7]、赞皇大枣^[8]、六月鲜枣^[9]、狗头枣^[10] 等品种试管苗离体叶片上获得不定芽, 但再生率都很低, 不能满足作为基因转化受体的要求。

现有资料表明: 枣叶片再生都是间接再生的, 即通过脱分化, 再分化过程。陈宗礼^[10] 等对狗头枣的叶片进行了培养, 使用 MS 基本培养基, 在 BA 0.3 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 时, 诱导产生愈伤组织, 经愈伤组织的增殖和芽的分化, 在 1/2 MS+IBA 0.4 mg/L 的培养基上长出了不定根, 获得了完整植株。胡影等^[7] 对民勤小枣叶片愈伤组织的培养进行了研究, 使用了改良 B₅ 培养基 (CaCl₂·2H₂O 300 mg/L, 烟酸 2.0 mg/L, 维生素 B₆ 2.0 mg/L), 其结果表明: 叶片外植体能有效的进行再分化产生愈伤组织, 主要受培养基中植物生长调节物质种类和浓度的影响。何业华等^[11] 就枣树愈伤组织不定芽的分化条件进行了探讨, 发现只有结构保持紧密, 正面绿色的胚性愈伤组织才能形成不定芽。植物生长调节物质的种类、绝对含量及生长素与细胞分裂素的比值, 是影响枣树愈伤组织不定芽分化的重要因素。此外, 培养基的基本成分对愈伤组织的形成和不定芽的分化也有影响。梨枣^[9] 在 MS 培养基上, 愈伤组织诱导率为 99%, 六月鲜枣^[9] 在 1/2 MS 培养基中愈伤组织诱导率最高, 达 71.11%。

一般叶片再生都是先形成不定芽, 再诱导根。但李云等^[8] 先由叶片诱导不定根, 然后从不定根诱导出不定芽, 形成完整植株。试验结果表明: 1/2MS 培养基作为基本培养基效果较好, 叶片生根受 BA 影响最大, 最高生根率 68.0%, 诱导不定芽时仍用 1/2MS 基本培养基, 最高植株再生率为 18.5%。

3 枣体细胞胚形成和胚抢救研究进展

胚抢救技术是对由于营养或生理原因, 造成难以播种成苗或在发育早期阶段就败育或退化的胚进行早期离体培养^[12]。胚抢救的焦点是利用胚抢救技术使退化的胚变成有生命力的植株, 是获得植物新品种的有力手段。近年来, 把通过组织培养产生的体细胞胚也归于胚抢救范畴^[13]。

枣树的胚在发育早期阶段就败育甚至退化。据对《中国果树志·枣卷》中种仁发育情况有记载的 471 个品种进行统计, 败育率高于 50% 的品种占 58%^[14]。大部分主栽品种都为高度败育。如苹果枣、赞皇大枣、辣椒

第一作者简介: 王国平, 男, 1971 年生, 助理研究员, 主要研究方向为果树生物技术研究。

收稿日期: 2006-10-10

枣出现 100% 的败育^[15]。且败育程度随年份变化明显。由于胚发育不良或中途败育而不能获得种子, 这些都给枣树杂交育种带来极大的困难。国内科研工作者为了使枣树杂交育种能顺利进行, 对枣体细胞胚诱导和胚抢救进行了研究。通过此项技术可以获得生长发育正常的杂交后代, 最终选育出综合性状优良的枣树新品种, 真正使杂交育种工作高效、快速、定向, 具有重要意义。祁业凤等^[16]对枣胚抢救作了初步试验, 对枣品种“冬枣”和“金丝丰”的幼胚进行培养。结果表明, 坐果后 7~10d 的幼胚一直没有得到成活材料。坐果后 20d 的幼胚成苗率低于 10%, 坐果后 40~55d 的幼胚是枣胚抢救的最佳时期。枣体细胞胚胎的发生主要由枣幼胚或子叶为外植体进行诱导。程佑发等^[4]以临泽小枣子叶切块为外植体, 在附加 IBA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上培养一周后, 切块边缘长出白色胚性愈伤组织, 继续培养一个月后愈伤组织中产生体细胞胚。经过细胞学观察发现, 其发育途径与合子胚相似, 也经历球形胚、心形胚和子叶胚等阶段, 胚状体转移至无植物生长调节物质的培养基后, 可发育成完整植株。李登科等^[17]对 6 月鲜枣子叶和幼胚进行了培养, 获得大量胚状体, 且胚状体最终可发育成植株。

4 花药培养研究

我国通过花药培养选育出的作物新品种与新品系已经超过 20 个^[18]。然而, 枣的花药培养报道较少。王震星等^[19]用了 3 年时间对金丝小枣的花药进行培养, 诱导产生了愈伤组织, 并再生试管小苗。李登科等^[9]对 6 月鲜枣冷藏 5 d 后的花药进行了培养, 较适宜的培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 6%。金丝小枣的花药愈伤组织培养存在倍性突变的问题, 在同一块愈伤组织上存在有单倍体细胞、二倍体、三倍体、四倍体细胞, 对愈伤组织形成的小苗进行镜检, 结果表明大部分为二倍体, 单倍体比率较低^[20]。

5 原生质体培养研究

枣树原生质体培养开始于 1999 年, 何业华等^[21]以无核小枣和鸡蛋枣为试材进行了研究。在原生质体分离技术成熟后, 培养基成为影响原生质体培养成功的关键因素。何业华等采用不同种类的培养基、不同含量的组合及不同原生质体密度, 对无核小枣和鸡蛋枣进行了原生质体培养, 可获得 1 mm 的愈伤组织。将其先后转入低渗 KM8p+NAA 3.0 mg/L+0.2 mg/L ET 和 MS (1/2NO₃⁻)+NAA 3.0 mg/L+ZT 2.0 mg/L 两种固体培养基上增殖, 再转入枣分化培养基中, 可获得完整的原生质体再生植株。

6 结束语

目前, 枣树育种进程十分缓慢, 主要原因是: 枣花小, 一般直径在 6 mm 左右; 花药和雄蕊难以剥离, 去雄和人工授粉操作困难, 容易伤花, 加之枣坐果率只有 0.5%~1.0%, 有的甚至更低; 枣胚败育严重。这些都给枣树杂交育种带来极大的困难。在现存枣树 700 多个

品种中, 没有一个品种是经过杂交选育而来的, 都是从地方品种中优中选优而选出的。20 世纪 90 年代转基因植物研究的快速发展为育种提供了新的技术和手段, 植物转基因主要是应用农杆菌介导法, 而该方法成功的首要因素是植物受体材料必须有稳定、高效的不定芽再生体系。在枣不定芽再生体系研究取得一定成绩的基础上, 结合枣未来的发展, 提出进一步研究的领域: 进一步提高枣叶片、茎段、子叶等转基因受体的不定芽再生率, 提高枣体细胞胚的诱导率和体细胞胚的萌发率, 建立枣高效、稳定的再生体系, 为枣的基因工程育种和诱变育种奠定基础; 应用原生质体融合技术创造枣的种质资源和培育丰产、优质、多抗新品种; 系统研究枣不定芽发生及其调控机制, 从而更好的利用植物细胞的全能性; 深入开展枣再生植株遗传变异的研究, 从理论上指导更多枣种质的产生。

参考文献:

- [1] 张福泉, 王嘉长, 李峰, 等. 枣茎段离体培养初报[J]. 中国果树, 1983(3): 46-47.
- [2] 伍成厚, 何业华, 谢碧霞, 等. 枣茎段组织培养的研究[J]. 果树学报, 2004, 21(6): 609-611.
- [3] 伍成厚, 何业华, 谢碧霞, 等. 鸡蛋枣的组织培养与快速繁殖技术[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2004, 25(1): 26-28.
- [4] 程佑发, 王勋陵. 枣树体细胞胚发生和组织学研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(1): 142-145.
- [5] 韩新柱, 王志心, 张世圣, 等. 枣树组织培养获得再生植株[J]. 林业科技通讯, 1988, 13(10): 28.
- [6] 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.
- [7] 胡影, 崔建国, 施满, 等. 枣叶片愈伤组织的诱导和器官分化[J]. 甘肃林业科技, 1993, 18(4): 18-19, 29.
- [8] 李云, 王宇, 田视亭, 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.
- [9] 李登科, 杜学梅. 枣不同器官的愈伤组织诱导及植株再生. 干果研究进展(172-176)[M]. 北京: 农业出版社, 2003, 43-45.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 伊华林, 邓秀新, 付春华, 等. 胚抢救技术在果树上的应用[J]. 果树学报, 2001, 18(4): 224-228.
- [13] 赵艳华, 李春敏, 吴雅琴. 植物的胚抢救[J]. 河北农业科学, 2003, 7(增刊): 55-58.
- [14] 祁业凤, 刘孟军. 两个胚败育率不同的枣品种果实生育期内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 800-802.
- [15] 祁业凤, 刘孟军. 枣的胚败育及幼胚培养研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 78-80.
- [16] 祁业凤, 刘孟军. 两个胚败育率不同的枣品种果实生育期内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2004, 31(6): 800-802.
- [17] 李登科, 杜学梅, 王永康, 等. 六月鲜枣愈伤组织诱导及胚状体发生[J]. 果树学报, 2004, 21(5): 414-418.
- [18] 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.
- [19] 王震星, 杨恩芹. 金丝小枣花药离体培养再生植株研究[J]. 河北果树, 1996, 60(3): 9-10.
- [20] 王震星, 刘贵仁, 杨恩芹, 等. 金丝小枣花药培养及染色体倍性的观察[J]. 落叶果树, 1996, 23(2): 26-28.
- [21] 何业华, 胡芳名, 谢碧霞, 等. 枣树原生质体培养及其植株再生[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(3): 29-31.