

# 大木枣叶柄愈伤组织分化培养研究

齐向英, 陈宗礼, 王 英, 杨娅娅, 薛 皓

(陕西省红枣繁育工程重点实验室, 延安大学 生命科学院, 陕西 延安 716000)

**摘 要:**以 KT、ZT、IAA 为外源激素, 采用正交实验法, 对由枣树叶柄诱导出的继代培养 1 代的愈伤组织进行分化培养研究。结果表明: 在愈伤组织分化培养过程中 3 种外源激素对枣树愈伤组织分化率和死亡率的影响是一致的, 均为  $ZT > KT > IAA$ 。分化率最高达到 58.82%, 最低为 0%; 死亡率最高达到 43.42%, 最低为 15.07%。F 检验 3 种外源激素对分化率和死亡率的影响都不显著, 通过极差分析最终确定分化培养合适的激素组合为  $KT\ 4.0\ mg/L + ZT\ 1.0\ mg/L + IAA\ 0.03\ mg/L$

**关键词:**枣; 愈伤组织; 分化

中图分类号: S 665.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)19-0118-03

枣树是我国特有果树, 因其含大量的维生素而被誉为“天然维生素丸”<sup>[1]</sup>。枣树是栽培果树种中极为耐旱、耐寒、抗胁迫的树种, 一直旱涝保收, 在我国北方地区被誉为“铁杆庄稼”<sup>[2]</sup>。但枣树繁育技术相对落后, 在主产区新品种选育大多采用芽变苗优中选优的方式。枣树愈伤组织诱导和培养已有报道<sup>[3-7]</sup>。通过枣树愈伤组织培育新品种也有报道<sup>[8-9]</sup>。愈伤组织诱导所用的材料也各不相同。但对叶柄诱导出的愈伤组织分化研究尚未见报道, 该研究目的是通过一个世代继代培养就开始分化, 以期枣树愈伤组织快速分化提供依据。

第一作者简介: 齐向英(1980-), 男, 陕西宝鸡人, 硕士, 讲师, 研究方向为生物技术与枣树育种。E-mail: yd\_qixiangying@163.com。  
责任作者: 陈宗礼(1954-), 男, 陕西扶风人, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物组织培养与植物遗传育种。E-mail: zongli\_chen@yahoo.com.cn。

基金项目: 陕西省重点实验室专项资助项目(05JS39); 延安大学自然科学基金专项资助项目(YD20010-15)。

收稿日期: 2011-06-25

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料取自陕西省红枣繁育工程重点实验室组培与育种研究室的继代培养 2 代的枣树试管苗叶片诱导出的愈伤组织。

### 1.2 试验方法

将枣树试管苗叶片按陈宗礼<sup>[3]</sup>等筛选的方法, 由叶柄诱导愈伤组织。将诱导出的愈伤组织在陈宗礼等<sup>[4]</sup>筛选的培养基中继带 1 代。然后以  $KT(2.0, 4.0, 6.0\ mg/L)$ 、 $ZT(1.0, 1.5, 2.0\ mg/L)$ 、 $IAA(0.01, 0.02, 0.03\ mg/L)$  作为外源激素, 采用三因素三水平正交实验进行分化研究。无菌条件下将继代培养的愈伤组织切成  $0.5\ cm^2$ , 接种在以 MS 为基本培养基的分化培养基上, 培养基中附加蔗糖  $20\ g/L$ 、琼脂  $5.5\ g/L$ 、在  $121\ ^\circ C$  下灭菌  $22\ min$ , IAA 通过  $0.22\ \mu m$  滤膜过滤灭菌加入培养基中。接种前在培养基在室温下贮存 3 d。接种后在散光条件下培养 7 d 然后转入光下培养, 光照强度为  $(1\ 500 \pm 200)\ lx$ , 每天 12 h 光照。于培养开始每周观察 1 次, 统计分化率和死亡率。统计所有分

## Tissue Culture and Rapid Propagation of *Artemisia capillaris* Thunb.

HUANG Zhen<sup>1</sup>, DING Xue-zhen<sup>2</sup>, REN Pei-hua<sup>2</sup>

(1. Zaozhuang Vocational College, Zaozhuang, Shandong 277800; 2. Weifang Vocational College, Weifang, Shandong 261031)

**Abstract:** The stem tip and stem section of *Artemisia capillaries* Thunb. were used as explants, the influences of matching combinations of exogenous hormone 6-BA and NAA with different concentration on it culture *in vitro* were studied. The results showed that the stem tip suits to do explant more than the stem section; the best medium to induce proliferation was  $MS + BA\ 0.1\ mg/L + NAA\ 0.1\ mg/L$ ; the best subculture medium was  $MS + BA\ 0.1\ mg/L + NAA\ 0.1\ mg/L$ ; While rooting medium was  $1/2MS + NAA\ 0.1\ mg/L$ .

**Key words:** *Artemisia capillaries* Thunb.; tissue culture; rapid propagation

化出的芽体数。数据依据统计学原理在 Excel 2003 中分析。分化率=已分化愈伤组织块数/总接种愈伤组织块数 $\times 100\%$ ;死亡率=死亡愈伤组织块数/总接种愈伤组织块数 $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

经过统计在第 5 周数据不再发生变化,结果见表 1。

### 2.1 不同培养基组合对枣树愈伤组织分化率和死亡率的影响

见光培养 7 d 后,在愈伤组织的下表面就有叶片长出(图 1),随着培养时间的增加,逐渐长出芽、随后慢慢形成无根的枣树试管苗。这一期间形成的试管苗和其分化的愈伤组织块生长在一起。这一过程大约持续 21 d。愈伤组织培养 25 d 后几乎不再分化出芽体,只是随着培养时间的增加,已经分化形成的芽苗开始长高(图 3)。35 d 后在愈伤组织上分化出来的芽体开始慢慢死亡。分化率最高的培养基组合为 F6 达到 58.82%,其次是 F1 达到 53.33%,分化率最小的是 F8 没有分化出芽体。愈伤组织块的死亡过程均是先从和培养基接触的表面开始,随后由四周向中间慢慢死亡,这一过程最快为 3 d,最慢的持续到培养结束(图 3)。所有培养基组合中 F9 死亡率最高达到 43.42%,F6 和 F8 也达到了 30%以上,F1 死亡率最低为 15.07%。

### 2.2 不同激素组合对枣树愈伤组织芽体分化平均数的影响

不同激素组合和对枣树愈伤组织平均分化芽体数的影响明显不同,其中 F1、F6、F7 3 个组合每块愈伤组织分化芽体平均数均超过了 3 个(图 2)。其中 F6 最多,为每块愈伤组织平均分化出 4.7 个。3 个组合中其中 F1 细胞分裂素和生长素的比例为 300:1;F6 为 600:1;F7 为 233.3:1。F8 中没有分化出芽体。另外 F3 平均每块愈伤组织分化出 2.6 个芽体,其细胞分裂素和生长素的比例为 166.7:1。愈伤组织分化芽体数量在时间上呈现先后顺序。较先分化出的芽体愈伤组织上,芽体已经开始伸长生长,分化较晚的愈伤组织才开始芽体分化;而且在同一块愈伤组织上分化速度和时间也是不同步的(图 4)。在研究中这一过程没有规律可循。

### 2.3 不同激素浓度对枣树愈伤组织分化率和死亡率的影响

随着 KT 浓度的增大,枣树愈伤组织的分化率表现出微小的先增大后减小的趋势,KT 的第 2 个水平愈伤组织分化率最高,平均达到 41.1333%;死亡率一直在增大,最大值出现在 KT 的第 3 个水平,平均值达到 31.4933%。随 ZT 含量的增加愈伤组织的分化率出现先降低后增大的现象,最大分化率出现在 ZT 的第 1 个水平,平均值达 43.75%;死亡率一直在增大,最大死亡率出现在 ZT 的第 3 个水平,均值达到 35.8867%。随 IAA 含量的增加,愈伤组织分化率出现先降低后增加的现象,最大分化率出现在 IAA 的第 3 个水平,平均分化率达到 41.25%;死亡率一直在降低,最大值出现



图 1 愈伤组织分化 图 2 同一块愈伤组织上分化出多个芽体

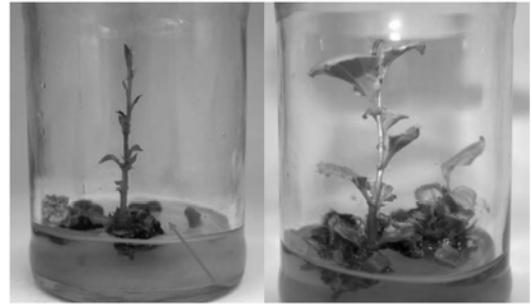


图 3 芽体伸长生长和 图 4 不同步分化愈伤组织死亡

在 IAA 的第 1 个水平,平均值为 28.8667%。

### 2.4 外源激素对枣树愈伤组织分化率和死亡率的极差和 F 检验

由表 1 可知,对枣树愈伤组织分化率和死亡影响最大的是均是 ZT,其次是 KT,然后是 IAA。就分化率而言,ZT 各水平之间的差值达到 24.3067,KT 为 20.0200,IAA 为 16.9433;死亡率 ZT 各水平之间的差值为 18.64,KT 为 11.9833,IAA 为 4.6867。由表 2 可知,KT 对枣树愈伤组织分化率和死亡率的 F 值分别为 1.5282 和 5.8415;ZT 对枣树愈伤组织分化率和死亡率的 F 值分别为 1.9855 和 12.9522;IAA 对枣树愈伤组织分化率和死亡率的 F 值分别为 0.9216 和 0.8190。均小于临界值。说明差异不显著。所以适合枣树愈伤组织分化培养激素组合为 A2B1C3。

## 3 讨论

### 3.1 激素对枣树愈伤组织分化培养的影响

外源激素对枣树愈伤组织分化影响的研究主要集中在高浓度细胞分裂素诱导芽的分化和高浓度生长素诱导根的分化 2 个方面。陈宗礼等<sup>[3]</sup>研究认为,6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 有利于从愈伤组织中诱导芽的形成,细胞分裂素和生长素的比例为 5:1,诱导率为 45%,但其在诱导分化以前对愈伤组织继代培养了 50 代;陈宗礼等<sup>[10]</sup>在沾化冬枣上的研究表明,6-BA 1.8 mg/L+IBA 0.3 mg/L 有利于诱导不定芽的形成,分化率在 40 d 左右。何业华等<sup>[11]</sup>研究发现用 KT 4.0 mg/L+ZT 1.75 mg/L+NAA 0.015 mg/L 可以获得比较好的不定芽分化效果,枣树品种不同不定芽分化效果有所差异,最高达到 30%,在分化培养以前对枣树愈伤组织继代培养了 5 代。胡影等<sup>[12]</sup>研究认

表 1 28 d 后愈伤组织分化培养结果统计

处理	因素水平				分化率%	平均芽数/块	死亡率%
	A(KT)/mg·L <sup>-1</sup>	B(ZT)/mg·L <sup>-1</sup>	C(IAA)/mg·L <sup>-1</sup>	C(空列)			
F1	1(2.0)	1(1.0)	1(0.01)	1	53.33	3.3	15.07
F2	1(2.0)	2(1.5)	2(0.02)	2	25	2	16.88
F3	1(2.0)	3(2.0)	3(0.03)	3	43.75	2.6	26.58
F4	2(4.0)	1(1.0)	2(0.02)	3	31.25	1.1	19.48
F5	2(4.0)	2(1.5)	3(0.03)	1	33.33	1	28.77
F6	2(4.0)	3(2.0)	1(0.01)	2	58.82	4.7	37.66
F7	3(6.0)	1(1.0)	3(0.03)	2	46.67	3.8	17.19
F8	3(6.0)	2(1.5)	1(0.01)	3	0	0	33.87
F9	3(6.0)	3(2.0)	2(0.02)	1	16.67	1	43.42
T <sub>1</sub>	分化率 122.08	131.25	112.15	103.33	Σ=308.82		Σ=238.92
	死亡率 58.53	51.74	86.6	87.26			
T <sub>2</sub>	分化率 123.4	58.33	72.92	130.49			
	死亡率 85.91	79.52	79.78	71.73			
T <sub>3</sub>	分化率 63.34	119.24	123.75	75			
	死亡率 94.48	107.66	72.54	79.93			
x <sub>1</sub>	分化率 40.6933	43.75	37.3833				
	死亡率 19.51	17.2467	28.8667				
x <sub>2</sub>	分化率 41.1333	19.4433	24.3067				
	死亡率 28.6367	26.5067	26.5933				
x <sub>3</sub>	分化率 21.1133	39.7467	41.25				
	死亡率 31.4933	35.8867	24.18				
R	分化率 20.02	24.3067	16.9433				
	死亡率 11.9833	18.64	4.6867				

表 2 愈伤组织分化培养结果的 F 检验

差异来源	平方和	自由度	方差	F 值	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
KT(A)	分化率 784.3704	2	392.1852	1.5282	19	99
	死亡率 235.0569	2	117.5284	5.8415		
ZT(B)	分化率 1 019.0661	2	509.5330	1.9855		
	死亡率 521.1816	2	260.5908	12.9522		
IAA(C)	分化率 473.0269	2	236.5134	0.9216		
	死亡率 32.9571	2	16.4785	0.8190		
误差(e)	分化率 513.2661	2	256.6330			
	死亡率 40.2389	2	20.1194			
总和(T)	分化率 2 789.7294	8	348.7162			
	死亡率 829.4344	8	103.6793			

为,BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L 有利于不定芽的分化,分化率为 50%;BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L 有利于不定根的分化,分化率为 50%,其细胞分裂素和生长素的分化比例分别为 20:1 和 2:1。程佑发等<sup>[13]</sup>在民勤小枣上的研究表明,枣树愈伤组织在含 0.5~1.0 mg/L 的 2,4-D 或 IBA 的培养基上能分化出根。该研究的结果和上述结果有所差别的主要原因可能是所用的材料和分化培养继代次数的差异。该研究分化较好的培养基组合细胞分裂素和生长素的含量比例很大。

一般认为合适浓度的细胞分裂素和生长素会促进植物组织培养过程中的外植体生长,过高浓度的细胞分裂素和生长素会抑制外植体生长。国内文献中没有提及枣树愈伤组织分化培养过程中的死亡和褐化问题,认为在分化培养过程中由于大量的使用了外源激素,又由于使用外源激素的目的是为了获得特定的目的,所以在愈伤组织培养过程中褐化和死亡是不可避免的。

### Study on Petiole Callus Differentiation Culture with Chinese Date Damuzao

QI Xiang-ying, CHEN Zong-li, WANG Ying, YANG Ya-ya, XUE Hao

(Key Laboratory of Breeding Engineering of Jujube in Shaanxi, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000)

**Abstract:** Used orthogonal experiment and ZT, IAA and KT as external source hormones to study on petiole callus differentiation culture, before the callus subculture a generation. The results showed that exogenous hormones was the same influence in callus differentiation rate and death rate, there was ZT > KT > IAA. Differentiation rate highest was reached 58.82%, lowest was 0%, death rate highest was reached 43.42%, lowest was 15.07%. F test was not significant, poor analysis for the exogenous hormones was KT 4.0 mg/L+ZT 1.0 mg/L+IAA 0.03 mg/L.

**Key words:** jujuba; callus; differentiation

### 参考文献

- [1] 曲泽洲,王永蕙. 中国果树志:枣卷[M]. 北京:中国林业出版社,1993
- [2] 陕西省果树研究所. 陕西果树志[M]. 西安:陕西人民出版社,1978.
- [3] 陈宗礼,张向前,齐向英,等. 枣树叶片愈伤组织培养与再生植株的研究[J]. 福建林业科技,2007,34(3):23-27.
- [4] 张存智,王发林,赵秀梅,等. 枣树胚乳愈伤组织诱导和细胞学观察[J]. 甘肃农业大学学报,2006(3):48-51.
- [5] 伍成厚,何业华,谢碧霞,等. 枣树愈伤组织继代培养的研究[J]. 临沂师范学院学报,2004,26(3):59-61.
- [6] 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.
- [7] 武晓红,王玖瑞,刘孟军,等. 不同预处理对枣花药愈伤组织诱导的影响[J]. 华北农学报,2008,23(增刊):43-45.
- [8] 刘贵仁,严仁玲,张磊,等. 金丝小枣愈伤组织诱导植株再生及染色体变异的研究[J]. 天津农学院学报,1995,2(1):1-8.
- [9] 张磊,王震星,刘贵仁. 小枣发育枝愈伤组织类型及细胞学观察[J]. 华北农学报 1998,13(2):117-121.
- [10] 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.
- [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] 胡影,崔建国,施茜,等. 枣叶片愈伤组织的诱导和器官分化[J]. 甘肃林业科技,1993(4):18-20.
- [13] 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.