

灵武长枣优系试管繁殖生根培养基优化研究

魏 鹏, 张存智, 任 杰

(宁夏职业技术学院 生物与制药技术系, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以 1 a 生枣头为外植体,研究了灵武长枣优系试管繁殖生根优化培养基对其生根指标的影响。结果表明:培养基中 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 维持一定水平, KNO_3 与 NH_4NO_3 浓度比值介于 0.9~2.0 之间,长枣试管苗生根率明显提高,与对照 1/2MS 相比,生根率由 56.7% 升至 84% 以上,生根数、根长等反映生根质量的指标也明显提高。

关键词:灵武长枣;微繁;生根率; $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{NO}_3$

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0111-03

灵武长枣(*Zizyphus jujuba* Mill cv. Lingwuchangzao)是宁夏知名的经济林果,果形喜人,汁多脆甜,营养价值极高,被誉为鲜食枣品的上品^[1]。2008 年宁夏回族自治区政府做出了扩大红枣栽培面积的重大决定,尤其是灵武长枣,计划未来几年内栽培面积由 5 667 hm^2 增至 10 000 hm^2 ,大规模繁殖灵武长枣优系势在必行。

利用试管快繁技术繁殖灵武长枣一直是长枣产业链中的研究热点,它制约着品种复壮、更新,从源头上影响长枣的经济效益。由于长枣自身结构特性,相对于国内其它知名枣树品种如狗头枣^[2]、梨枣^[3]、木枣^[4]等,关于长枣组培研究一直鲜见报道,实践中广大农民、相关工作仍仍以传统的播种育苗与根蘖育苗繁殖灵武长枣^[5]。

长枣试管内生根困难,生根率较低是制约试管苗成功入地移栽、组培快繁技术规模化应用的瓶颈,极有必要对灵武长枣优良品种试管内生根技术进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据喻菊芳等^[6]灵武长枣种质资源调查和品种选优研究,试验材料鉴定为枣刺退化型灵武长枣,该品种的形态特点是针刺明显退化,当年枣头上的针刺比一般小、短,2 a 生枣头和枣股无针刺。2011 年 3 月剪取该优系的 1 a 生枣头为外植体,建立了该优系的组培快繁无菌体系。长枣试管内生长分枝较多,侧枝类型多样,继

代培养时始终剪取主枝茎段培养,3 代以后试管苗生长、分化稳定。

1.2 试验方法

以 MS 培养基中 KNO_3 、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用量为基础,各化合物含量设置 4 个水平, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 固定为 370 mg/L,利用均匀设计共组成 11 个处理,对照处理大量元素采用 1/2MS。以上 12 个配方铁盐含量与 MS 培养基一致, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 为 37.3 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 27.8 mg/L;微量元素与有机物含量以陈宗礼等^[2]研究结果为主, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L (MS 为 22.3), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L (MS 为 8.6), H_3BO_3 10 mg/L (MS 为 10), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L, $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 KI 为 0;肌醇 100 mg/L,盐酸硫胺素 10 mg/L (MS 为 0.1),盐酸吡哆醇 0.5 mg/L,烟酸 0.5 mg/L,甘氨酸 2 mg/L。试验配方处理见表 1。

所有试验配方均加入 IBA 0.1 mg/L,琼脂粉 4.2 g/L,葡萄糖 20 g/L,培养基灭菌前 pH 6.8,各配方配制 0.5 L,利用高压灭菌锅灭菌,121℃ 与 0.11 MPa 条件下灭菌 15 min。剪取继代培养试管苗主枝茎切段,切段着生 2 个芽,接种在试验培养基上,每瓶接种 4~5 株,每个配方接种 10 瓶左右,随机摆放在培养架上。培养瓶为圆柱形玻璃瓶,瓶口直径为 6 cm,光照强度为 2 000 lx,光照时间为 18 h/d。33 d 后统计试管苗各配方生根率、生根数(条)/株、根长(cm)/株、根生物量(g)/株,各指标每配方统计 6 瓶以上,每瓶统计 4~5 株,取平均值。

1.3 数据分析

同一指标不同配方之间利用 SPSS 13.0 做方差分析,利用 LSD 法表示方差分析的结果。

第一作者简介:魏鹏(1981-),男,硕士,讲师,现主要从事植物组培快繁与植物生理生态等的研究工作。E-mail: weipeng135@126.com.

基金项目:宁夏职业技术学院科研资助项目;宁夏回族自治区科技攻关计划资助项目(宁科技[2010]168号)。

收稿日期:2012-09-17

表 1 试验各配方处理大量元素含量

Table 1 The concentration of five kinds of compounds in different medium mg/L

处理 Treatments	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂ · 2H ₂ O	MgSO ₄ · 7H ₂ O
S1	2 300	370	112	272	370
S2	2 070	925	252	544	370
S3	1 840	1 480	84	68	370
S4	1 610	0	224	340	370
S5	1 380	555	56	612	370
S6	1 150	1 110	196	136	370
S7	920	1 665	28	408	370
S8	690	185	168	680	370
S9	460	740	0	204	370
S10	230	1 295	140	476	370
S11	0	1 850	280	0	370
CK(1/2MS)	950	825	85	220	185

2 结果与分析

2.1 不同试验配方 N、P、K、Ca 浓度的比较

由表 2 可知,配方 S1 KNO₃ 含量最高,为 22.75 mmol,从配方 S1 至配方 S11 KNO₃ 含量逐渐降低,相邻配方相差约 2.3 mmol 左右。NH₄⁺ 由 NH₄NO₃ 提供,相邻配方浓度差别较大。培养基中 NO₃⁻ 由 KNO₃ 与 NH₄NO₃ 2 个部分提供,排在前 2 位的为 S3 与 S2。培养基中总 NO₃⁻ 与 NH₄⁺ 比值变化规律不明显,S1 最高,接近 6, S3、S6、S7、S9、S10、S11 均大于 1 小于 2。P 与 Ca 浓度相对较低,S11 P 最高,除去 S9 未加 KH₂PO₄,浓度为 0 外,最低为 S7。培养基中 Ca 由 CaCl₂ · 2H₂O 供给,排在前 2 位的为 S8 与 S5,2 个配方 Ca 浓度均大于 4.1,除去 S11 未加 CaCl₂ · 2H₂O 外,配方 S3 Ca 浓度最低,为 0.46。

2.2 不同试验配方试管苗生根性状的比较

由表 3 可知,各配方生根特征差异较大。培养基中

未加 NH₄NO₃ 的 S4 与未加 KNO₃ 的 S11 生根率为 0,试管苗接种 12 d 后黄化枯死。对照 CK 生根率居中,S2 与 S3 生根率较高,均大于 84%,生根苗中 S8 最低,为 18%。生根数、根长与生根率一致,S2 与 S3 排在前 2 位,只是 S3 大于 S2。对照 CK 生根数、根长在所有配方中居中。根生物量与生根数、根长变化规律一致,S3 最大,S2 次之,S8 最低。

表 2 各配方中 N、P、K、Ca 的浓度

Table 2 The concentration of N,P,K,Ca in different medium mmol

处理 Treatments	NO ₃ ⁻				总 NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	P	K	Ca
	NH ₄ ⁺	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	总 NO ₃ ⁻				
S1	4.62	22.75	4.62	27.37	5.92	0.82	23.57	1.85
S2	11.56	20.47	11.56	32.03	2.77	1.85	22.33	3.70
S3	18.49	18.20	18.49	36.69	1.98	0.62	18.82	0.46
S4	0.00	15.92	0.00	15.92	0.00	1.65	17.57	2.31
S5	6.93	13.65	6.93	20.58	2.97	0.41	14.06	4.16
S6	13.87	11.37	13.87	25.24	1.82	1.44	12.82	0.93
S7	20.80	9.10	20.80	29.90	1.44	0.21	9.31	2.78
S8	2.31	6.82	2.31	9.14	3.95	1.23	8.06	4.63
S9	9.24	4.55	9.24	13.79	1.49	0.00	4.55	1.39
S10	16.18	2.27	16.18	18.45	1.14	1.03	3.30	3.24
S11	23.11	0.00	23.11	23.11	1.00	2.06	2.06	0.00
CK(1/2MS)	10.31	9.40	10.31	19.70	1.91	0.62	10.02	1.50

2.3 不同配方 N 素对枣树试管苗生根率的影响

培养基中 N 素由 KNO₃ (提供 NO₃⁻) 与 NH₄NO₃ (提供 NO₃⁻ 与 NH₄⁺) 供给,分析表 2 与表 3,培养基中总 NO₃⁻ /NH₄⁺ 比值与试管苗生根率并未出现明显的规律特点,而培养基中 KNO₃ 与 NH₄NO₃ 浓度比值对枣树生根影响显著(图 1),KNO₃ /NH₄NO₃ 比值介于 0.9~2.0 之间,生根率较高,最高为 87.8%。单一地看 KNO₃ 由 S1 至 S11 逐渐降低,生根率变化规律不明显,NH₄NO₃ 也未出现明显的特征变化规律。

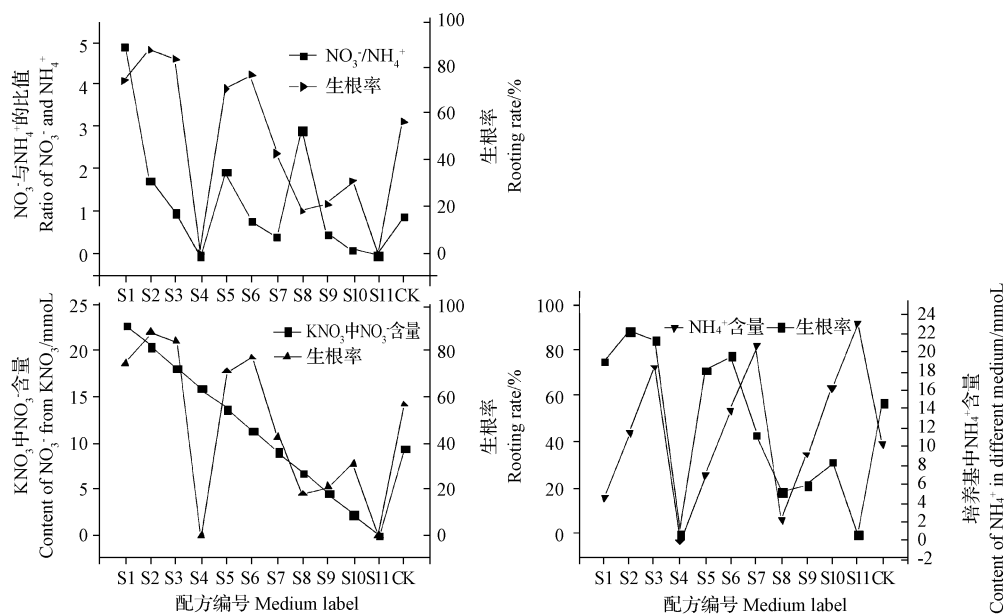
图 1 不同配方 KNO₃ 与 NH₄NO₃ 浓度比值对试管苗生根率的影响

表3 不同试验配方试管苗各生根指标的比较

Table 3 Comparison of rooting trait of tube plantlets among different medium

处理 Treatments	生根率 Rooting rate /%	生根数 Rooting number per plantlet/条	根长 Root length per plantlet/cm	根生物量 Root mass per plantlet/g
S1	74.7b	3.26a	1.98b	0.053b
S2	87.8a	3.48a	2.04b	0.063a
S3	84.1a	3.60a	3.66a	0.079a
S4	0	0.00	0	0
S5	71b	1.94c	1.97b	0.043bc
S6	77b	3.09ab	2.12b	0.054b
S7	43c	1.66c	1.57bc	0.037c
S8	18d	0.83c	0.45d	0.018d
S9	21d	0.80d	0.16d	0.022cd
S10	31cd	0.92d	1.04c	0.036c
S11	0	0.00	0	0
CK(1/2MS)	56.7bc	2.70b	1.97b	0.051b

3 结论与讨论

长枣属难生根经济木本植物,试管内生根极为困难^[7]。许多学者针对长枣试管内生根将基本培养基惯性地固定为1/2MS、1/3MS、WPM等,浪费大量精力聚焦在生长素的种类与浓度上,试管苗生根效果不甚理想,生根率不能满足实践标准。

关于N素营养影响木本植物试管内生根已有多例报道,如培养基中总N的水平^[8]、总 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ^[9]对试管苗生根率的影响,这些文献为后续木本植物改善生根状况开辟了新的途径。该试验分析了试验配方中总 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 水平与试管苗生根率的关系,并未得出理想结论,而通过 $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{NO}_3$ 特征值研究生根率,发现 $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{NO}_3$ 比值介于0.9~2.0之间,生根率较高,得出了生根率大于87%的枣树生根配方S2:IBA 0.1 mg/L+ KNO_3 2 070 mg/L+ NH_4NO_3 925 mg/L+ KH_2PO_4 252 mg/L+ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/L+ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 544 mg/L+ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 37.3 mg/L+

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg/L+ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 mg/L+ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L+ H_3BO_3 10 mg/L+ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L+ $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L+肌醇 100 mg/L+盐酸硫胺素 10 mg/L+盐酸吡哆醇 0.5 mg/L+烟酸 0.5 mg/L+甘氨酸 2 mg/L+琼脂粉 4.2 g/L+葡萄糖 20 g/L。

强调 KNO_3 与 NH_4NO_3 浓度比值对枣树生根的影响有一定局限,因为植株切段根的分化、发育受营养元素N、P、K、Ca、Mg共同作用^[10],若将P、K、Ca对试管苗生根的影响考虑进去,得到优良生根配方S2、S3则论文更具说服力与合理性。

参考文献

- [1] 喻菊芳,朱连成,魏天军,等.灵武长枣品种特性及规范化栽培技术研究示范[J].宁夏农林科技,2007(2):1-4.
- [2] 陈宗礼,薛皓,延志莲,等.枣树试管苗一次成苗培养基的研究[J].西北植物学报,2005,25(1):57-63.
- [3] 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):457-457.
- [4] 延志莲,陈宗礼,薛皓,等.木枣的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,38(6):585.
- [5] 朱连成,魏天军,周全良,等.灵武长枣苗木繁殖技术的研究与探讨[J].宁夏农林科技,2007(2):30-32.
- [6] 喻菊芳,魏天军,陈卫军,等.灵武长枣种质资源调查和品种选优研究[J].中国果树,2008(1):56-57.
- [7] 曹夜义,刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃技术出版社,1996:128-129.
- [8] Gu X F, Zhang J R. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants[J]. Plant Cell Rep, 2005(23):775-779.
- [9] Feng J C, Yu X M, Shang X L, et al. Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Zizyphus jujuba* Mill. 'Huizao' [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2010(18):77-81.
- [10] 刘彤,魏鹏,赵新俊,等.应用均匀设计优化香梨脱毒苗生根培养基[J].果树学报,2006,23(4):635-637.

Research on Optimizing Rooting Medium for Superior Stocks of *Zizyphus jujuba* Mill cv. Lingwuchangzao Plantlets *in vitro* Propagation

WEI Peng, ZHANG Cun-zhi, REN Jie

(Department of Biological and Pharmaceutical Techniques, Ningxia Professional and Technical College, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking one-year-old jujube head of *Zizyphus jujuba* Mill cv. Lingwuchangzao as explant, the effect of rooting *in vitro*, optimizing medium for superior stocks of plantlets propagation were studied. The results showed that maintain the content of KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at a certain level, control the concentration rate of KNO_3 and NH_4NO_3 between 0.9 to 2.0, the rooting rate of plantlets will increase obviously, comparing with the conventional medium 1/2 MS, the rooting rate will ascend from 56.7% to 84% above, some characteristics such as root No. per plantlet and root length per plantlet which were correlated to rooting quality rised significantly too.

Key words: *Zizyphus jujuba* Mill cv. Lingwuchangzao; micropropagation; rooting rate; the concentration ratio of KNO_3 and NH_4NO_3