

# 无核君迁子离体叶片的植株再生

周瑞金, 张晓娜, 扈惠灵, 李桂荣, 宋如慧

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

**摘 要:**以“赞圆无核”君迁子组培苗叶片为试材,研究了基本培养基类型、植物生长调节物质浓度和暗期处理对离体叶片不定芽再生的影响,并获得了完整的再生植株。结果表明:最适宜的基本培养基为 MS(1/2N),最佳的生长调节剂组合为  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT+ $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA,其愈伤组织诱导率、不定芽形成率及平均出芽数分别达到 99.1%、87.3%和 5.4 个;暗培养 4 周,再转为光下培养 2 周效果最佳;将叶片再生植物转入(1/2N)MS+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 培养基中继代培养,以 1/2MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA+ $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖+ $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂培养基诱导生根,生根率 60.5%;生根苗大田移栽成活率 63%。

**关键词:**君迁子;叶片培养;植株再生

**中图分类号:**S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0104-03

君迁子(*Diospyros lotus* Linn.) 属柿树科(Ebenaceae) 柿树属(*Diopyros kaki*)植物<sup>[1]</sup>,又名黑枣、软枣,原产于中国。君迁子根系发达,生活力强,寿命长,是中国北方常用的柿树砧木。君迁子分为有核和无核 2 种类型,其中无核类型以其营养价值高、可食部分多而成为研发食品、饮料、保健品的理想原料<sup>[2]</sup>。君迁子多采用播种繁育,但无核君迁子没有种子,自然繁殖较慢。近年来柿属植物研究多集中于其功能成分分析,叶片再生体系研究较少,但也取得一定进展<sup>[3-6]</sup>,但不同基因型之间再生体系存在较大差异,而关于无核君迁子类型的研究尚鲜见报道。该试验在甜柿组织培养及叶片再生技术基础上,以“赞圆无核”君迁子无菌苗的幼嫩叶片为外植体,研究了不同浓度配比的植物生长调节剂对离体叶片植株再生的影响,以期建立高效稳定的叶片再生体系,以为无核君迁子规模化生产提供技术支撑,同时为叶盘法基因转化奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的“赞圆无核”君迁子采自河北赞皇,取休眠芽培养获得组培苗无性系群体,在(1/2N)MS+

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 继代培养基中继代培养 10 代后,作为供试材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 不同基本培养基对不定芽诱导的影响 选择苗龄 30 d 的继代组培苗,在无菌条件下切取中上部第 3~4 片幼嫩叶片,垂直主脉方向横切 3~5 刀,但不切断,随机将叶片分为 3 组,分别接种至以 MS、(1/2N)MS、1/2MS 为基本培养基,添加  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 的诱导培养基上,叶片上表面朝下,对比观察基本培养基种类对叶片不定芽诱导的影响。愈伤组织诱导率(%)=形成愈伤组织的叶片数/接种叶片数×100。

1.2.2 不同激素组合对不定芽诱导的影响 以(1/2N)MS 为基本培养基,附加不同浓度的 ZT(3.0、4.0、5.0、6.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 IAA(0.01、0.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),叶片上表面朝下接种于培养基上,确定不同浓度 ZT 和 IAA 组合对叶片不定芽诱导的影响,统计平均出芽数。平均出芽数=再生芽总数/再生叶片数。

1.2.3 暗处理时间对叶片不定芽诱导的影响 取组培苗中上部叶片,上表面朝下接种于添加  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT 和  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 的(1/2N)MS 培养基上,随机分成 9 组,暗处理 0~8 周后转至光照下培养,对比观察暗处理时间对叶片不定芽诱导的影响,2 周后统计叶片不定芽再生情况。不定芽再生率(%)=再生叶片数/接种叶片数×100。

1.2.4 培养条件 以上各处理每瓶接种 6~8 片叶,每个处理 6 瓶,2 瓶为 1 区组重复。培养期间不更换培养基,所有培养基均添加 PVP  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

**第一作者简介:**周瑞金(1977-),女,博士,副教授,研究方向为果树种质资源与生物技术。E-mail:persimmonzhou@163.com.

**基金项目:**河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(2010A210008);河南省科技厅基础与前沿技术研究计划资助项目(122300410133);河南科技学院大学生创新训练资助项目(2014CX047)。

**收稿日期:**2016-08-12

和琼脂  $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8~6.0,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min, 培养室温度  $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ , 空气相对湿度 70% 左右, 光照强度为  $1\,500\sim 2\,000\text{ lx}$ , 光周期  $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.2.5 生根与移栽 切取生长健壮的茎段接入生根培养基中( $1/2\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖 +  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.8~6.0) 诱导生根, 培养条件同上。生根苗炼苗后移栽入基质(蛭石:腐殖土:田园土 = 2:1:2)中。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 叶片不定芽再生过程

叶片接种后 1 周, 叶片伤口处变黑, 其它部位仍呈翠绿色; 接种后 2 周, 叶片边缘膨胀翘起, 变褐(图 1-A); 接种后 3 周, 部分叶片伤口处形成黑亮色且致密的愈伤组织; 接种后 4 周, 愈伤组织体积不断膨大, 且组织变得蓬松(图 1-B); 接种后 5 周, 伤口愈伤组织表面形成米黄色茸毛状的芽点, 并逐渐分化出丛生芽(图 1-C); 接种 6 周以后, 不定芽继续分化, 不断伸长(图 1-D)。

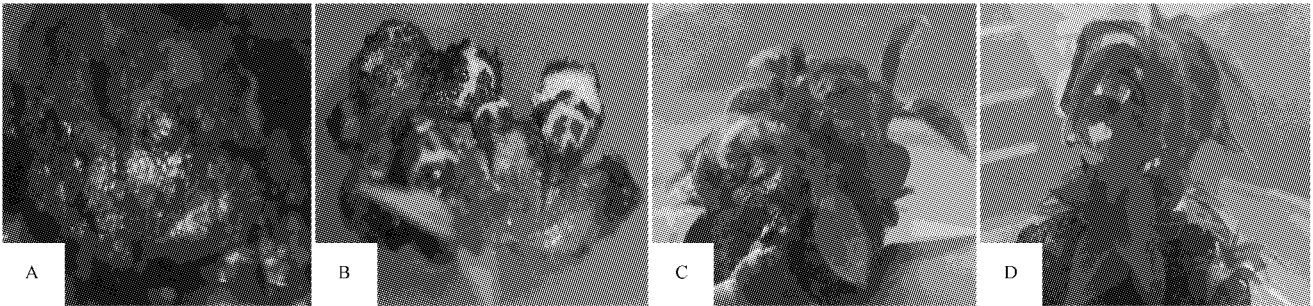


图 1 叶片不定芽再生过程

Fig. 1 Regeneration process of shoot regeneration

2.2 基本培养基对不定芽再生的影响

由表 1 可知, 3 种基本培养基中, 以  $(1/2\text{N})\text{MS}$  诱导形成不定芽效果最好, 不定芽形成率最高,  $\text{MS}$  次之,  $1/2\text{MS}$  效果最差。 $(1/2\text{N})\text{MS}$  培养基中叶片愈伤组织诱导率、不定芽形成率及平均出芽数分别达到 99.0%、78.5% 和 4.2 个, 显著高于其它处理。大部分柿组织培

养最适培养基为  $1/2\text{MS}$  和  $(1/2\text{N})\text{MS}$ <sup>[7]</sup>, 该试验中无核君迁子更适宜  $(1/2\text{N})\text{MS}$  培养基, 与谢启鑫等<sup>[6]</sup> 的研究结果不同, 说明无核君迁子叶片再生需要较低的氮素培养环境。

2.3 不同浓度的 ZT 和 IAA 组合对不定芽再生的影响

由表 2 可知, 诱导效果最好的组合为  $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ , 不定芽形成率和平均出芽数分别为 87.3% 和 5.4 个。效果最差的组合为  $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}$ 、 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ , 不定芽形成率和平均出芽数仅为 28.3% 和 1.2 个。随着 ZT 浓度的升高, 愈伤组织诱导率及不定芽形成率均较高, 但 ZT 浓度过高时, 形成的不定芽容易产生玻璃化现象。

表 1 基本培养基对不定芽再生的影响

Table 1 Effect of basal mediums on shoot regeneration

基本培养基 Basal medium	愈伤组织诱导率 Callus percentage / %	不定芽形成率 Shoot percentage / %	平均出芽数 Adventitious buds per leaf disc / 个
MS	87.1b	46.3b	$1.0\pm 0.2\text{c}$
$(1/2\text{N})\text{MS}$	99.0a	78.5a	$4.2\pm 1.2\text{a}$
$1/2\text{MS}$	84.6b	33.7c	$2.8\pm 1.1\text{b}$

表 2 不同浓度的 ZT 和 IAA 组合对不定芽再生的影响

Table 2 Effect of ZT and IAA with different concentrations on shoot regeneration

ZT 浓度 ZT concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	IAA 浓度 IAA concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	愈伤组织诱导率 Callus percentage / %	不定芽形成率 Shoot percentage / %	平均出芽数 Adventitious buds per leaf disc
3.0	0.01	62.2f	28.3g	$1.2\pm 0.3\text{g}$
3.0	0.10	69.4e	35.7f	$1.5\pm 0.8\text{g}$
4.0	0.01	74.3e	49.4e	$2.0\pm 0.8\text{f}$
4.0	0.10	87.8d	53.9e	$2.7\pm 1.0\text{e}$
5.0	0.01	91.0bc	79.1b	$3.1\pm 0.9\text{d}$
5.0	0.10	99.1a	87.3a	$5.4\pm 1.3\text{a}$
6.0	0.01	93.7abc	62.5d	$4.8\pm 1.1\text{b}$
6.0	0.10	95.1ab	65.2d	$4.3\pm 1.4\text{c}$
7.0	0.01	90.5cd	73.7c	$4.7\pm 0.9\text{b}$
7.0	0.10	96.2ab	77.8bc	$4.6\pm 1.2\text{bc}$

## 2.4 暗处理时间对不定芽再生的影响

由表3可知,暗处理6、7、8周时愈伤组织诱导率均较高,但其不定芽形成率和平均出芽数均较暗培养4、5周时产生少,综合比较,暗处理4周诱导效果最佳。

## 2.5 生根与移栽成苗

将以上试验中分化的不定芽继代培养于伸长培养基(1/2N)MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT+0.01 mg·L<sup>-1</sup> IAA+30 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂中,继续培养40 d,切取生长健壮的茎段移至生根培养基1/2 MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> IAA+20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖+7 g·L<sup>-1</sup> 琼脂中,30 d后生根率60.5%,平均不定根数4.7条,平均根长1.4 cm。当小苗有3条以上正常根,苗高至3~5 cm时,开瓶练苗7 d后移栽。移栽基质为蛭石:腐殖土:田园土=2:1:2,保湿培养。过渡30 d后,将小苗移入大田,移栽成活率63%。

表3 暗处理时间对不定芽再生的影响

Table 3 Effect of dark period on shoot regeneration

暗处理时间 Dark period	愈伤组织诱导率 Callus percentage	不定芽形成率 Shoot percentage	平均出芽数 Adventitious buds
/周	/%	/%	per leaf disc
0	53.4f	42.1h	1.0±0.3g
1	86.5e	57.3g	1.7±0.3f
2	90.2d	61.7f	2.5±1.0e
3	93.0c	69.6e	2.8±0.5e
4	96.0b	88.4a	5.4±1.1a
5	97.3b	84.2b	5.0±1.0ab
6	99.8a	75.0d	4.6±1.3bc
7	100.0a	72.3de	4.1±0.9d
8	100.0a	78.9c	4.3±0.9cd

## 3 讨论

柿属植物组织培养和叶片再生体系建立相关研究较少,多集中于甜柿研究,如马俊莲等<sup>[5]</sup>对“富有”和“次

郎”甜柿叶片再生植株进行研究时发现,TDZ可诱导离体叶片产生大量愈伤组织,且随着浓度增加,愈伤组织分化率和平均不定芽数增加,但当TDZ达1.0 mg·L<sup>-1</sup>时,诱导形成的不定芽多为丛状苗,节间短,不利于后期生长。在诱导培养基中加入NAA后,愈伤组织诱导率达100%,愈伤组织较大,颜色较深,但几乎没有不定芽的再生。而课题组在选用其最佳培养基(1/2DKW+1.0 mg·L<sup>-1</sup> ZT+1.0 mg·L<sup>-1</sup> TDZ)对君迁子叶片进行诱导时,并未获得成果,说明君迁子虽与甜柿同属,但种间差异较大,不能直接选用甜柿叶片再生培养基进行叶片再生诱导。而ZT是较为适宜君迁子组培快繁和诱导叶片再生不定芽的细胞分裂素<sup>[6]</sup>。

君迁子叶片组织培养过程中“褐化”现象会影响愈伤组织和不定芽形成,是阻断培养的一大障碍,在该试验在培养基中加入0.5 g·L<sup>-1</sup> 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)有效防止了褐化现象,有利于叶片愈伤组织的诱导和不定芽再生。

## 参考文献

- [1] 杨勇,阮小凤,王仁梓,等. 柿种质资源及育种研究进展[J]. 西北林学院学报,2005,20(2):133-137.
- [2] 肖万魁. 黑枣开发利用的探讨与研究[J]. 现代农村科技,2011(8):57.
- [3] 师校欣,杜国强,马俊莲,等. 磨盘柿离体叶片愈伤组织发生及不定芽诱导[J]. 果树学报,2004,21(4):376-378.
- [4] 马俊莲,刘晓娜,张子德. 甜柿上早生叶片不定芽再生的研究[J]. 中国农业科学,2004,37(12):2016-2018.
- [5] 马俊莲,刘恺,张子德. “富有”和“次郎”甜柿叶片再生植株的研究[J]. 园艺学报,2006,33(5):1048-1050.
- [6] 谢启鑫,黄美连,吴晓萍,等. 君迁子叶片培养再生植株的研究[J]. 中国农业科学,2008,41(2):607-612.
- [7] 王海光,张国良,张淑云,等. 柿组织培养技术研究进展[J]. 河北农业大学学报,2001,24(4):93-97.

Plant Regeneration From Leaves of Seedless Date Plum (*Diospyros lotus* L.)

ZHOU Ruijin, ZHANG Xiaona, HU Huiling, LI Guirong, SONG Ruhui

(School of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing, Henan 453003)

**Abstract:** Taking seedless *Diospyros lotus* L. ‘Zanyuan wuhe’ as test material, factors affecting *in vitro* leaf regeneration including basal medium, plant growth regulator and dark period were studied. The results showed that a high efficient system of *in vitro* leaf regeneration was established. The superior induction medium was (1/2N)MS+5.0 mg·L<sup>-1</sup> ZT+0.10 mg·L<sup>-1</sup> IAA, dark incubated for the first four weeks and then transferred to light was the most optimum for plant regeneration, and the callus percentage, the shoot percentage and the adventitious buds per leaf disc were 99.1%, 87% and 5.4, respectively. (1/2N)MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT+0.01 mg·L<sup>-1</sup> IAA was suitable for subculture of shoot. The regenerated plantlets rooted well in 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> IAA+20 g·L<sup>-1</sup> sugar+7 g·L<sup>-1</sup> agar, of which rooting percentage was 60.5%. The survival rate of rooted plantlets in the field was 63%.

**Keywords:** date plum (*Diospyros lotus* L.); leaf culture; plantlet regeneration