

灰枣高效再生体系的建立

杨录军, 王慧瑜, 赵海红

(河南省郑州市农林科学研究所 450005)

摘要:以新郑红枣“灰枣”(Ziziphus jujuba cv. Huizao)的茎段为外植体,分别进行了启动诱导、快速繁殖和壮苗生根研究,并且获得了完整的再生植株。结果表明:5~7月份是外植体取材的最佳季节。外植体启动诱导的最佳培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L+AC 0.1g/L,启动率可达72.7%。将诱导出的芽苗转入MS+6-BA 1.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃2 mg/L培养基中,pH为6.5时,其增殖系数达7.8。以1/2MS+IBA 1.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L培养基诱导生根,生根率90.3%。生根苗大田移栽成活率达80%以上。

关键词:灰枣;茎段培养;再生植株

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)03-0180-02

灰枣(Ziziphus jujuba cv. Huizao)是我国特有的一个枣品种,盛产于河南新郑、郑州和中牟等地^[1],其果实较大,风味独特,且品质优良,特别适合加工成乌枣^[2]。近些年来,由于国内外许多地区都纷纷引种试栽,造成对灰枣优良苗木的需求量逐年增加。灰枣组织培养研究起步较晚,利用离体茎段建立起高效的再生体系,国外迄今尚未见研究报道,国内也仅有几篇论文进行过报道,但均存在不定芽再生困难、增殖率低等问题^[3,4,5],用于遗传转化、快速扩繁有很大局限性。试验针对上述问题,通过研究影响茎段离体再生的主要因素,建立了灰枣的高效再生体系,为基因转化和市场需求提供了技术支撑。

1 材料与方法

灰枣优良母株由河南省新郑枣树科学研究所提供。取一年生带腋芽的茎段,用75%酒精表面灭菌30 s,再用0.1%升汞溶液浸泡3 min,无菌水冲洗3~4次。将嫩枝切成2.0 cm左右带腋芽的茎段,腋芽朝上接种。从芽苗的诱导、增殖到壮苗生根,调整基本培养基及植物生长调节剂的浓度,观察其对各个阶段芽苗状况的影响。如无特别说明,培养条件由人工气候箱调控:光照强度为2 000 Lx,光照时间14 h/d,温度(25±2)℃,湿度(65±5)%。试验所用的培养基如无特别说明均附加蔗糖25 g/L,琼脂7.3 g/L,pH除在增殖阶段有所调整外,其余均取5.8。每次接种30个外植体,试验重复3次,取平均值。采用正交试验设计进行培养基的优选,试验

数据用新复极差法进行差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 外植体的启动和芽苗诱导

2.1.1 取材季节对外植体成活的影响 由表1可以看出,在5~7月份取材,外植体不但数量多,而且污染率、死亡率和褐化率都较低,同时此时的芽生长最为活跃,作为外植体最为适宜。外植体启动后,生长速度快,长势也很旺,能很快建立起无菌体系。尤以5月份接种的材料为最佳,污染率最低,死亡率和褐化率仅有7.26%和2.35%。3~4月份取材,外植体数量少,同时外植体内部的生理状态不是最佳启动状态,启动比较缓慢。8~10月份取材,接种以后其污染率、死亡率和褐化率都很高。尤其是10月份最为严重,其死亡率和褐化率差不多为5月份的7倍,而污染率高达45%。

表1 取材季节不同对外植体成活的影响

季节	接种数	污染率(%)	死亡率(%)	褐化率(%)
3月	20	21.32	10.31	9.22
4月	18	22.54	9.52	8.14
5月	63	19.65	7.26	2.35
6月	55	21.49	11.80	9.84
7月	56	25.13	16.26	8.45
8月	45	36.97	39.61	18.32
9月	41	38.26	41.23	18.57
10月	33	45.06	45.72	23.75

注:表中数据是培养30 d后的结果。

2.1.2 基本培养基和植物生长调节剂对外植体启动的影响 外植体启动培养基的正交试验结果及其极差分析如表2所示。从表2可以看出,B因子(6-BA)极差(R)最大,C因子(IAA)和A因子(基本培养基)次之,D因子(AC)最小。这反映6-BA对启动培养影响最大,其次是IAA和基本培养基,AC影响最小。考察各因子

第一作者简介:杨录军,男,1971年生,主要从事植物脱毒与组织培养。

收稿日期:2006-10-10

水平均值发现, A、B 因子均以第 2 水平均值最大, C 因子和 D 因子分别以第 3 水平和第 1 水平均值最大, 故最佳培养条件组合为 A₂B₂C₃D₁, 处理 5 满足此条件, 而处理

5 的结果也证明这个组合是所有组合中的最佳组合, 即启动培养的最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L+AC 0.1g/L。

表 2 基本培养基和不同植物生长调节剂配比对启动的影响 L₉(3⁴)

处理序号	A	B	C	D	启动率 (%)
	基本培养基	6-BA(mg·L ⁻¹)	IAA(mg·L ⁻¹)	AC(g·L ⁻¹)A ₁	
A ₁	1(改良 MS)	1(0.5)	1(0.00)	1(0.1)	0
A ₂	1(改良 MS)	2(1.0)	2(0.05)	2(0.5)	32.1
A ₃	1(改良 MS)	3(2.0)	3(0.10)	3(1.0)	45.2
A ₄	2(MS)	1(0.5)	2(0.05)	3(1.0)	22.8
A ₅	2(MS)	2(1.0)	3(0.10)	1(0.1)	72.7
A ₆	2(MS)	3(2.0)	1(0.00)	2(0.5)	11.3
A ₇	3(H)	1(0.5)	3(0.10)	2(0.5)	0
A ₈	3(H)	2(1.0)	1(0.00)	3(1.0)	13.3
A ₉	3(H)	3(2.0)	2(0.05)	1(0.1)	20
K ₁	77.3	22.8	24.6	93.3 *	
K ₂	106.8 *	118.1 *	75.5	43.4	
K ₃	33.9	77.1	117.9 *	81.3	
X ₁	25.8	7.6	8.2	31.1 *	
X ₂	35.6 *	39.4 *	25.2	14.5	
X ₃	11.3	25.7	39.3 *	27.1	
R 值	24.3	31.8	31.1	16.6	

* 表示极差最大值。

2.2 芽增殖与伸长

2.2.1 生长调节剂对增殖和苗高的影响 将以上试验中诱导出的芽苗继代于不同的增殖与伸长培养基中继续培养, 结果见表 3。6-BA 对芽丛生增殖有极显著的促进作用, 但对苗伸长作用不大, IAA 对芽增殖和苗伸长都有极显著的促进作用, GA₃对苗伸长有极显著作用, 也对芽增殖有显著作用。处理 5 所得到的增殖系数最大和苗高最高, 所以适宜的增殖与伸长培养基为: MS+6-BA 1.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA₃2 mg/L。

表 3 不同植物生长调节剂组合对灰枣芽增殖生长的影响 L₉(3³)

处理序号	6-BA	IAA	GA ₃	增殖系数	平均苗高(cm)
B ₁	1(1.0)	1(0.0)	1(0)	2.69	4.70
B ₂	1(1.0)	2(0.1)	2(1)	3.66	5.25
B ₃	1(1.0)	3(0.2)	3(2)	2.57	5.80
B ₄	2(1.5)	1(0.0)	2(1)	3.22	4.90
B ₅	2(1.5)	2(0.1)	3(2)	4.15	6.45
B ₆	2(1.5)	3(0.2)	1(0)	2.53	5.20
B ₇	3(2.0)	1(0.0)	3(2)	1.63	5.45
B ₈	3(2.0)	2(0.1)	1(0)	1.80	5.00
B ₉	3(2.0)	3(0.2)	2(1)	1.00	6.10
F 值	6-BA			121.59 **	1.49
	IAA			40.21 **	8.25 **
	GA ₃			6.29 *	13.70 **

注: MS 为基本培养基; *p<0.05 **p<0.01

2.2.2 不同 pH 值对增殖和苗高的影响 pH 值对枣树的增殖影响很大^[6], 调节增殖培养基中的 pH 值, 观察苗的增殖和伸长状况, 结果见表 4。当 pH 调至 6.5 时, 芽苗的增殖系数可达到 7.8, 苗的高度也相应增长。

表 4 不同 pH 值对灰枣苗增殖和苗伸长的影响

pH	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	6.9
增殖系数	1.3	2.6	3.1	5.6	7.8	6.2	3.2	2.4	1.6
平均苗高 (cm)	3.1	3.6	4.1	4.4	5.3	4.2	4.0	3.8	3.3

2.3 生根及移栽成苗

切取生长健壮的茎段移至生根培养基(1/2MS+IBA 1.5 mg/L+ IAA 0.3 mg/L+ 蔗糖 20 g/L+ 琼脂 7.5 g/L, pH 5.8), 生长 20~25 d, 可见白色根点长出, 40~45 d 可长出较长的根, 生根率达 88.2%, 平均每株不定根数达 4.10 条, 平均根长为 1.56 cm。当小苗有 3 条以上正常根, 苗高达 4~5 cm 时, 即可进行移栽。移栽基质为珍珠岩:蛭石=1:1, 保湿栽培。过渡移栽 30 d 后, 将小苗移入大田, 遮荫覆盖。移栽成活率达 80%以上。

参考文献:

[1] 杨丰年. 新编枣树栽培与病虫害防治[M]. 北京: 中国农业出版社 1996: 31.

[2] 曲泽洲, 王永惠. 中国果树志·枣卷[M]. 北京: 中国林业出版社 1993.

[3] 王慧瑜, 张晓申. 灰枣的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2002 38(6): 595.

[4] 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.

[5] 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): 11-14.

[6] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996 126-130.