

灵武长枣高效继代增殖体系的建立

张存智¹, 魏天军², 魏鹏¹, 任杰¹, 王敏¹

(1. 宁夏职业技术学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏农林科学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:对灵武长枣茎段离体培养、高效继代增殖体系进行了研究。结果表明:以灵武长枣当年萌发幼嫩枣头为外植体,诱导腋芽萌发,细胞分裂素/生长素的比值为5倍时,腋芽萌发率最高;将萌发的嫩梢进行继代增殖培养,继代增殖茎段不同的放置方式、茎段不同位置、培养基的相对对增殖倍数有影响。

关键词:枣;腋芽萌发;继代增殖

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)16-0095-03

灵武长枣(*Zizyphus jujube* Mill cv. Lingwuchangzao)是宁夏具有地方特色的优良鲜食枣品种,果大整齐、果色紫红、质地细脆、汁液较多、甜中带酸^[1],综合性状优良,宁夏回族自治区人民政府将灵武长枣作为自治区优势果品产业大力发展。灵武长枣组织培养研究起步较晚,利用离体茎段建立起高效的继代增殖体系,现少见研究报道,试验对灵武长枣茎段离体培养高效继代增殖体系进行了研究,以期为工厂化快速无性繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 灵武长枣优良母株由宁夏农林科学院提供,为种植于灵武枣园6a生的灵武长枣枣树。

1.1.2 培养基 在预备试验的基础上,选用MS改良培养基(降低硝酸铵的浓度),均附加蔗糖20 g/L,琼脂4.0 g/L,pH 6.2及不同浓度的NAA(萘乙酸)、BA(细胞分裂素)、IBA(吲哚丁酸)。培养条件光照强度为2 000~3 000 lx,光照时间16 h/d,温度27~30℃。

1.2 试验方法

1.2.1 启动培养 春季5月份中旬在田间剪取当年萌发幼嫩枣头,洗衣粉液刷洗灰尘后,自来水冲洗4 h,适当修剪后至于超净工作台上,用75%酒精浸润杀菌30 s,无菌水冲洗3~4次;再用0.1%升汞灭菌18 min,最后用无菌水冲洗3~4次,将嫩枝切成4.0 cm左右带芽的

茎段,腋芽朝上接种于MS改良附加BA和IBA不同素配比的诱导培养基上,腋芽距培养基高度(h)有2种情况:h>1.0 cm和h<1.0 cm。

1.2.2 继代增殖 将启动培养抽出的嫩梢长至2.0~3.0 cm时,切下转入增殖MS改良培养基,附加IBA(0.1~0.5 mg/L)和NAA(0.05~0.5 mg/L)上进行继代增殖培养。待继代材料长至瓶高约5 cm左右,切成含顶芽茎段和含2个叶腋芽茎段进行增殖培养,采用垂直插和斜插2种方式,斜插与培养基倾斜15°~30°。每次无根苗上面一部分转接继代后,留下至少1个芽长度,倒入适量液体增殖培养基,采用固液两相培养。30~40 d继代1次。30 d后记录结果。

1.2.3 生根培养 将继代苗剪成茎段接种在1/2MS(改良)+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖20 g/L生根培养基上进行生根培养。

2 结果与分析

2.1 启动培养结果

将外植体插入MS改良附加不同激素配比的诱导培养基上。由表1可知,腋芽距培养基的高度和不同激素浓度配比的茎段腋芽诱导率不同。

表1 外植体腋芽萌发情况

处理	激素 /mg·L ⁻¹		腋芽距培 养基高度 /cm	外植体 腋芽 个数/个	腋芽萌 发数 /个	腋芽萌 发率 /%	愈伤组织 诱导率 /%
	BA	IBA					
1	1.5	0.3	>1.0	16	14	87.5	0.0
			<1.0	16	4	25.0	5.2
2	1.0	0.1	>1.0	18	12	66.7	0.0
			<1.0	12	4	33.3	1.3
3	1.0	0.4	>1.0	20	10	50.0	80.0
			<1.0	20	4	20.0	100.0

第一作者简介:张存智(1973-),女,硕士,副教授,现主要从事果树生物技术育种方面的研究工作。E-mail: zhangcunzhi72@126.com.

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关资助项目。

收稿日期:2012-04-12

在植物组织培养时,细胞分裂素/生长素的比值控制器官发育模式,比值高时,诱导芽的分化;低时,诱导根的分化,否则,诱导愈伤组织^[2]。该试验细胞分裂素/生长素的比值分别为 10、5、2.5 倍,在 $h>1.0$ cm 时腋芽萌发率分别为 66.7%、87.5%、50.0%,可以看出细胞分裂素/生长素的比值为 5 倍时,腋芽萌发率最高,胞分裂素/生长素的比值为 2.5 倍时,腋芽萌发率最低,且容易诱导愈伤组织。研究发现腋芽距培养基高度太近时,在外植体接触培养基的一端周围长出黄绿色、质地松软的愈伤组织,抑制腋芽萌发。由表 1 可以看出,当 $h<1.0$ cm 时,3 种激素处理配方均出现不同程度的愈伤组织诱导率,当细胞分裂素/生长素的比值为 2.5 倍时,愈伤组织诱导率为 100.0%(图 1)。



图 1 腋芽萌发

2.2 继代增殖培养

将诱导培养抽出的嫩梢切下来,转入增殖培养基,即 MS 经改良附加 IBA (0.1~0.5 mg/L) 和 NAA (0.05~0.5 mg/L) 上进行继代增殖培养。随着灵武长枣继代次数的增加,所得无根苗植株茎变的粗壮,叶变大。发现茎段不同的放置方式、茎段不同位置、培养基的相态对增殖倍数有影响。

2.2.1 茎段不同的放置方式对试管苗增殖倍数的影响 在组培苗继代茎段插入培养基时,采用垂直插和斜插 2 种方式。由图 2 可知,斜插与培养基倾斜 $15^{\circ}\sim 30^{\circ}$,试管苗斜插时,茎段可萌发 1~2 个腋芽,前者一般只有 1 个腋芽能萌发。试管苗增殖倍数差异极显著,由表 2 可看出,试管苗斜插,增殖倍数可以达到 5.1 倍,直插的增殖倍数为 2.9 倍,在 $\alpha=0.01$ 水平达到差异极显著。这可能是斜插后茎段与培养基接触面大,养分充足,芽体发育良好的缘故,这与朱文勇等^[3]的研究结果一致。



图 2 茎段不同放置方式增殖情况

表 2 茎段不同的放置方式对试管苗增殖倍数的影响

放置方式	茎段数/个	腋芽萌发数	增殖倍数
斜插	30	38	5.1a
直插	27	20	2.9a

注:当试管苗长到 5 cm 时,至少可以剪成 4 个含 2 个叶片的茎段,即增殖倍数为 $4 \times \text{腋芽萌发数} / \text{茎段数}$ 。

2.2.2 培养基的相态对试管苗增殖倍数的影响 在植物组织培养中,诱发丛生芽增加增殖倍数,是提高繁殖效率的关键环节之一。在以茎段和茎尖为外植体建立的快繁体系中,诱发叶腋丛生芽是较为理想的方式^[3]。该试验在组培苗长到瓶高时,剪去无根苗上面一部分转接进行增殖,留下至少 1 个芽长度,倒入适量液体增殖培养基,采用固液两相培养,诱发腋芽丛生芽发生(图 3),可以反复多代切割,大大提高繁殖系数。



图 3 固液培养基继代增殖情况

2.2.3 激素浓度及配比对组培苗继代增殖的影响 以 MS 改良附加不同浓度的激素为基本培养基进行增殖培养,试管苗经过反复切割继代培养后,逐渐适应试管培养环境,性状逐渐稳定,植株生长加快,分化系数提高,且生根能力增强,灵武长枣的组培快繁过程中易出现“驯化”现象,即培养材料对生长素的要求有逐渐减弱的趋势,这与刘贵仁等^[4]的研究结果一致。在同一浓度下多次继代,组培苗长势逐渐变差,苗矮,叶弱小、黄化,苗基部长出许多愈伤组织,应根据枣组培苗生长分化情况及时调整配方。

2.2.4 接种茎段的部位对试管苗继代增殖的影响 一株组培苗可以剪成长含有顶芽茎段(2 片以上叶片)和含叶腋芽茎段(2 片叶片)2 种继代材料,这 2 种材料的生长速度、继代潜力和生根能力有所不同。从表 3 可看出,相比之下,含顶芽茎段的生长速度快于茎段,具有较高的生根率和较大的茎生长量,分析其原因,是由于顶端优势的存在,越靠近顶芽的位置生长素浓度越高,对侧芽的抑制作用就越强,含叶腋芽的茎段最初受原顶芽优势的抑制,生长速度较含顶芽茎段慢。这与柴慈江研究结果一致^[5]。该研究发现,枣组培苗从 4 代开始,枣苗出现二次枝,并生长旺盛,从表 3 可看出,

组培苗的含顶芽茎段和含叶腋芽茎段在继代时都有二次枝出现,含顶芽茎段更容易产生二次枝,生长速度快于含叶腋芽茎段二次枝的生长速度。分析其原因,枣树的枣头即一般果树所谓的发育枝,是形成树体骨架和结果单位枝的主要枝条。在自然状态下,枣头基部的副芽长成脱落性的二次枝,上部的副芽长成永久性的二次枝,再由二次枝抽生枣吊。含顶芽茎段易产生二次枝与枣树生长习性有关。在试管中出现二次枝,将会大量消耗体内及培养基中的养分,所以在继代培养时,应去掉二次枝。在相同的外源激素浓度下,含顶芽茎段基部更容易产生愈伤组织。分析原因,植物合成生长素最活跃的部位是具有分生能力的组织,特别是芽顶端的分生组织。顶芽处产生的生长素浓度通过主动运输而不断地运到茎中,就造成含顶芽茎段基部生长素浓度大于含叶腋芽茎段基部,含顶芽茎段基部更容易产生愈伤组织。因此含叶腋芽茎段更适宜作为继代增殖材料,王玖瑞等^[6]研究发现,在枣的快繁中,多次继代的材料叶腋芽容易萌发,且能发生丛生芽,同时无根苗生根潜能增加,易被诱导生根。

表3 接种茎段的部位对试管苗继代增殖的影响

茎段部位	组培苗株数/株	平均新生叶		分支		底部愈伤大小	根数/个
		片数/片	数/个	平均叶片数/片	数/个		
含顶芽茎段	14	10.3	1.0	4.7		大	0.6
含叶腋芽茎段	12	9.0	0.3	2.5		小	0.0

2.3 诱导生根

继代增殖培养出大量植株,通过生根培养基的筛选对比试验,筛选出最佳的生根培养基。由图4可知,将组培苗剪成茎段接种在 1/2MS(改良)+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 20 g/L 生根培养基上,可有效诱导试管苗生根。

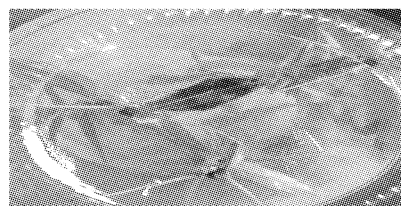


图4 枣苗生根

3 结论与讨论

枣幼嫩茎段作外植体,提高腋芽萌发率,细胞分裂素/生长素的比值要适当,该研究发现,腋芽距离培养基不能太近,否则容易诱导愈伤组织,抑制腋芽萌发。刘贵仁等^[4]在研究金丝小枣茎段离体培养与快繁研究中发现,随着世代的增加,其浓度应逐渐减少,可见外源激素在体内有逐渐积累的作用,组培苗随着继代次数增加,应逐步降低激素浓度。增加继代材料与营养物质的接触面积,可以提高植株吸收营养量,刺激腋芽萌发,提高增殖倍数。该试验将试管苗斜插,增殖倍数可以提高到5.1倍。采用固液两相培养,诱发腋芽丛生芽发生,可反复多代切割,大大提高繁殖系数。

参考文献

- [1] 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,2004(6):30-33.
- [2] 曹改义,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.
- [3] 朱文勇,杜学梅,郭黄萍,等.影响枣试管苗生长分化的因素[J].植物生理学通讯,1995,31(4):276-278.
- [4] 刘贵仁,王震星,严仁玲,等.金丝小枣茎段离体培养与快繁研究总结[J].天津农学院学报,1995(3):1-5.
- [5] 柴慈江,苏卫国,张美静.接种茎段的部位与长度对无核枣试管苗生长的影响[J].山西果树,2008,7(4):5-6.
- [6] 王玖瑞,刘孟军,代丽.枣组培中的品种差异及辣椒枣的组培快繁[J].河北农业大学学报,2003(4):59-61.

Establish the Efficient System of Subculture Proliferation About *Zizyphus jujube* Mill cv. Lingwuchangzao

ZHANG Cun-zhi¹, WEI Tian-jun², WEI Peng¹, REN Jie¹, WANG Min¹

(1. Ningxia Polytechnic, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The efficient subculture proliferation system and stem section *in vitro* culture *Zizyphus jujube* Mill cv. Lingwuchangzao were studied. The results showed that with the germination young jujube head of lingwuchangzao as explants, induced axillary buds, when cytokinin/auxin ratio was 5 times, the rate of axillary buds was the highest. Germination of young shoots was subcultured, the proliferation of multiples was different about stem segments of different placement, the different position of the stem and solid-liquid of the medium.

Key words: jujube; axillary buds; subculture proliferation