

“中宁小枣”组培快繁技术研究

柳金凤, 李永华, 伍会萍

(宁夏林业研究所 股份有限公司, 种苗生物工程国家重点实验室, 宁夏 银川 750004)

摘要:以宁夏“中宁小枣”种仁为外植体,进行了愈伤组织、不定芽诱导、分化、生根试验研究。结果表明:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为最适合种子萌芽诱导的培养基;MS+KT 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L 为最佳试管苗分化的培养基;IBA 和 NAA 能明显促进难繁植物生根反应,1/2MS+IBA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为最适合试管苗生根培养基。

关键词:枣树;不定芽;组织培养

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)16-0098-03

枣树(*Ziziphus jujuba* Mill)原产我国,是我国特有的经济树种,在区域经济发展中占有举足轻重的地位,已成为枣区人民脱贫致富的稳定支柱产业^[1]。同时,枣树也是我国第一大干果树种,其耐干旱、瘠薄、适栽地广,是群众公认的“木本粮食”。枣果的营养丰富,素有“维生素 C 之王”之称^[2]。

近几年,中国已成为世界上唯一的枣生产大国和出口国,但枣树种子的不育及优良品种生产的供不应求严重阻碍了枣产业的健康快速发展^[3]。而传统的枣树分株、扦插、嫁接 3 种繁殖方法虽然使其成活率大大提高,但繁殖系数依然较低^[4-6]。不能进行周年生产,且费工费时,远远不能满足生产的大量需求。在此形势下,枣树组织培养则成了快速培育良种苗木的有效途径。枣树的组织培养研究始于 20 世纪 70 年代末,1978 年山东农学院首次利用枣胚乳培养获得三倍体植株^[7];之后,中国科学院植物所利用组织培养方法诱导酸枣产生胚状体^[8];1983 年,张福泉等^[9]以坛坛枣当年生幼嫩茎段为试材获得枣树组培苗。迄今为止,已有 20 多个品种以不同类型外植体建立了无菌离体繁殖体系。但有研究报道,枣的组织培养较困难,不同品种间的繁殖条件差异较大^[10]。该试验主要以宁夏平原枣树主栽品种、难繁树种之一——“中宁小枣”为研究对象,以种仁为外植体,寻找最佳的萌芽诱导、分化及生根培养条件,以期突破完成“中宁小枣”的组培快繁体系的建立,该研究在国内外尚报道。该研究的完成将为宁夏其它优良枣品种的组培体系奠定前期试验基础,最终加快宁夏优

良枣品种产业的快速发展,提高宁夏红枣在国内外市场的竞争力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 2010 年 2 月下旬采自宁夏银川植物园种植的“中宁小枣”果实。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 取“中宁小枣”种仁为外植体,进行萌芽诱导培养试验。将种仁洗净后,用 75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 2~3 遍,用 0.1%升汞消毒 2 min,再用无菌水冲洗 4~5 遍,接入种仁萌芽诱导培养基内,共接种 300 个种仁。

1.2.2 培养基设计 诱导萌芽培养基:M1:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;M2:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;M3:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;M4:MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L。分化培养基:M1:MS+KT 2.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L;M2:MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L;M3:MS+6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;M4:MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.6 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L;M5:MS+KT 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L;M6:MS+KT 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L;M7:MS+KT 1.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.5 mg/L;M8:MS+KT 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L。生根培养基:M1:1/2MS+IBA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L;M2:1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;M3:1/2MS+IBA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

1.2.3 培养条件 以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的细胞分裂素及生长素。诱导萌芽及分化培养基中的蔗糖浓度为 30 g/L,诱导生根培养基内的蔗糖浓度设为

第一作者简介:柳金凤(1983-),女,硕士,助理研究员,现主要从事难繁植物组培快繁及植物基因工程技术研究工作。E-mail:liujin-feng_317@163.com。

收稿日期:2012-05-07

15 g/L,琼脂均为 7 g/L,pH 控制在 5.8~6.0 之间。培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间为 12 h/d,光照强度为 2 000~2 500 lx。

2 结果与分析

2.1 “中宁小枣”不定芽的诱导

将进行无菌消毒后的种仁接种在配置好的设有不同激素比例的萌芽培养基上,7~15 d 内观察种仁萌芽情况。由表 1 及图 1 可知,M1:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为“中宁小枣”最适合萌芽的培养基。M1 诱导的萌芽率最高,为 88.7%,萌芽快且长势好,20 d 后部分芽还伴有根生成。此结果与通常萌芽培养基的激素配方有所不同,用 NAA 替换了平常使用的 IAA,结果发现 NAA 对种仁萌芽有明显的促进作用,而 IAA 则适合平常所开展的以茎段为外植体的萌芽培养试验。

表 1 不同激素水平对“中宁小枣”萌芽的影响

培养基	接种量 /株	萌芽时 间/d	萌芽数 /个	萌芽率 /%	成活率 /%	备注
M1	71	9	63	88.7	87.3	萌芽快,且长势很好,20 d 后有 3 株伴随生根
M2	76	12	52	68.4	75.0	萌芽较慢,芽长势弱且细
M3	72	13	45	62.5	60.0	萌芽慢,芽长势很弱
M4	70	15	20	28.6	48.0	萌芽很慢且芽长势不好

2.2 “中宁小枣”芽分化培养

将萌芽后的小苗接种在附加有不同浓度不同激素如 KT、6-BA、IBA、NAA、 GA_3 的培养基上,15~25 d 观察“中宁小枣”芽分化情况。由表 2 及图 2 可知,M8:MS+KT 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+ GA_3 1.0 mg/L 为最适合“中宁小枣”芽分化培养基。在此培养基上,“中宁小枣”分化率最高,为 66.7%,长势好且快,可进行切断繁殖,分化系数 2~3。从该试验结果还发现,对于难繁木本植物枣树来说,细胞分裂素 KT 和生长素 IBA 较 6-BA 和 IAA 对枣树分化有明显的促进作用,再配合 GA_3 一起使用,打破枣树自身休眠期,能加快分化苗进行伸长生长。

表 2 不同激素水平对“中宁小枣”分化的影响

培养基	接种量/株	分化数/个	分化率/%	备注
M1	46	21	45.6	分化较慢,部分叶色发黄
M2	24	10	41.6	分化较慢,有几株叶色发黄
M3	20	9	45.0	苗长势较弱,部分叶片发黄
M4	35	16	45.7	苗长势较弱,部分叶片发黄
M5	22	10	45.4	苗生长缓慢,部分叶片发黄
M6	26	12	46.1	苗长势较弱,部分叶片发黄
M7	40	16	40.0	分化慢,部分叶片发黄脱落
M8	45	30	66.7	苗伸长生长,长势好且叶色绿

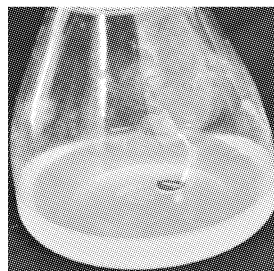


图 1 种仁不定芽诱导



图 2 “中宁小枣”分化培养

2.3 “中宁小枣”生根培养

将长至 2.0~3.0 cm,且具有 3~4 片叶的分化苗切下,接种到生根培养基上进行生根诱导。15 d 后观察生根情况。由表 3 及图 3、4 可知,M3:1/2MS+IBA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为“中宁小枣”最适合生根的培养基,在此培养基上,“中宁小枣”生根率为 64%,根粗大且根系最多。从生根结果还发现,IBA 在组织培养里具有促进生根的作用,但是在该试验中,可能浓度不够或是作用不强导致没有生根现象发生。当加入一定浓度的生长素 NAA 时,有生根。试验表明,对于难生根的植物来说,2 种不同浓度的生长素混合使用才能起到促进生根的作用。

表 3 不同激素水平对生根的影响

培养基	接种苗数/个	生根数/个	生根系数	生根率/%	备注
M1	25	12	2~3	48	根较细且根系较少
M2	25	14	2~3	56	根较粗且根系较多
M3	25	16	4~5	64	根粗大且根系多

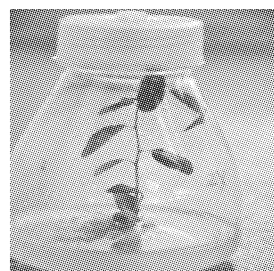


图 3 “中宁小枣”生根侧面图



图 4 “中宁小枣”生根正面图

2.4 “中宁小枣”生根试管苗练苗移栽

当“中宁小枣”生根试管苗生长至 4~6 cm、根长到 0.8~1.0 cm 时,选取生长健壮的组培苗 40 株放置温室,练苗温度为 $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 、光照强度 5 000~7 000 lx,练苗 1 周后,再敞口练苗 1 d。取出小苗,洗净根上的培养基,移栽至配制好且消过毒的 128 穴盘基质中,基质一般为草炭:蛭石:珍珠岩=2:1:1。移栽后,温度控制在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 。每隔 4~5 d 浇 1 次水,湿度控制在 80%以上。基质的含水量控制在 80%~90%,避免阳光直射。1 个月后观察生长情况。30 d 后经统计移栽苗成活率为 85%(图 5)。



图5 “中宁小枣”移栽状况

3 结论与讨论

通过对“中宁小枣”种仁组培快繁技术的研究,最终确定了适合“中宁小枣”种仁诱导萌芽、分化、生根的培养基。根据诱导萌芽率得出, M1 培养基上的种仁萌芽率最高,为 88.7%,即 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 为“中宁小枣”最适合萌芽的培养基;由芽分化率及长势情况得出 M8: MS+KT 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L 为最适合“中宁小枣”芽分化的培养基,分化率达到 66.7%。其次,在继代过程中,初期一直出现只分化不生长现象,当加入一定浓度的 GA₃ 以后发现,“中宁小枣”分化系数达 2~3,且生长状况良好,这与赤霉素打破休眠,促进植物生长作用相符;当培养基为 M3(1/2MS+IBA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L)时,生根率最高,为 64%,试管苗根系多而粗壮,便于后续移栽成活,该培养基被确定为最适合“中宁小枣”生根的培养基。

随着枣产业的不断发展,枣树组培快繁技术体系的建立越来越受到很多研究学者的高度重视。目前除了开展常规的茎段组织培养外,有研究学者还通过开展枣树原生质体、胚及胚培养形成完整植株来完成枣树的组培快繁体系的建立^[11-13],利用不同外植体开展组培技术研究,加快优良品系的繁殖速度及产业化应用。同时,在枣树大力种植的今天,枣树种子的高度不育还受到了枣疯病的危害^[14-16],因此目前有很多研究学者利用组织培养技术脱除枣疯病植原体,以期获得无毒良种枣树^[17]。在宁夏地区,“中宁小枣”枣树是适应性最强的丰产枣树之一^[18],因此,“中宁小枣”组培快繁体系的建立,

将为宁夏其余主栽品种组培快繁技术的突破奠定扎实的理论技术基础,也对未来利用该体系进行基因工程操作获得新品种、无毒枣品种的获得及优新品种的快速繁育具有重要意义。

参考文献

- [1] 赵薇,李健营. 枣树组织培养研究进展[J]. 生物技术通报, 2007(3): 57-61.
- [2] 孙浩元. 中国枣树优良品种资源的保存、繁殖技术及毛叶枣引种研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2001.
- [3] 张向前,陈宗礼,齐向英,等. 枣树组织培养技术应用现状及展望[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(10): 2908-2910.
- [4] 郭裕新,王斌,姚胜蕊. 枣圃地嫁接育苗技术[J]. 落叶果树, 1994(1): 30-32.
- [5] 孙世正,袁廷孝,王当山,等. 枣树露地弥雾绿枝扦插育苗[J]. 落叶果树, 1993(2): 43-44.
- [6] 王当山,孙世英,袁廷孝,等. 枣树绿枝全光照弥雾扦插育苗试验[J]. 山东林业科技, 1992(4): 13-15.
- [7] 林伯年. 果树组织培养综述[J]. 中国果树, 1978(4): 19-27.
- [8] 陈维纶,郭东红. 酸枣组织培养中胚状体的行程[J]. 植物生理学报, 1981, 7(1): 83-84.
- [9] 张福泉,王嘉长,李峰,等. 枣茎段离体培养初报[J]. 中国果树, 1983, (3): 46-47.
- [10] 孙清荣. 枣的组织培养与快繁[J]. 落叶果树, 2003(3): 1-3.
- [11] 石荫坪,耿如震,白瑞云,等. 枣胚乳三倍体的育成及生物学细胞学研究[J]. 落叶果树, 1985(1): 241-245.
- [12] 李登科,杜学梅,王永康,等. 六月鲜枣愈伤组织诱导剂胚状体发生[J]. 果树学报, 2004, 21(5): 414-415.
- [13] 陈维纶,郭东红. 酸枣组织培养中胚状体的形成[J]. 植物生理学报, 1982, 7(1): 38.
- [14] 李云,王宇,田砚亭. 枣树离体培养和脱除枣疯病原 MLO 技术研究进展[J]. 果树学报, 2001, 18(2): 115-119.
- [15] 潘青华. 枣疯病研究进展及防治措施[J]. 北京农业科学, 2002(3): 4-9.
- [16] 王锦艳,宋晓芳. 枣疯病的发生规律与综合防治技术[J]. 西北园艺, 2006(6): 31.
- [17] 田砚亭,王红艳,牛辰,等. 枣树脱除类菌原体(MLO)技术的研究[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15(2): 20-25.
- [18] 朱学祥. 中宁圆枣花期管理技术[J]. 宁夏农林科技, 2011, 52(8): 24-25.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation Technology of *Ziziphus jujuba* Mill

LIU Jin-feng, LI Yong-hua, WU Hui-ping

(The State Key Laboratory of Seedling and Bioengineering, Ningxia Forestry Institute, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: Taking *Ziziphus jujuba* acinus as explants, the induction of the buds, differentiation, taking roots and transplants were studied. The results showed that MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L was the most suitable medium for the induction of adventitious buds. MS+KT 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L was the most suitable medium for differentiation. IBA and NAA promoted root formation, 1/2MS+IBA 0.8 mg/L+NAA 0.2 mg/L was the most suitable condition for inducing roots.

Key words: *Ziziphus jujuba* Mill; adventitious buds; tissue culture