

# “贵妃枣”组织培养与快速繁殖技术研究\*

李俊<sup>1,2</sup> 钟宇<sup>1</sup> 陈礼清<sup>1</sup> 张健<sup>1\*\*</sup>

(1 四川农业大学林学院园艺学院 雅安 625014; 2 北京林业大学生物科学与技术学院)

贵妃枣(现在更名为调元枣)是四川省德阳地区的地方优良品种,也是川中丘陵区优良的多用途树种之一,目前市场价值很高。该品种的审定及相关的科学研究工作尚未见报道,而且繁殖速度缓慢、繁殖系数低也限制了该地方优良品种的大面积推广应用。通过组织培养技术建立起快繁再生体系,可以为贵妃枣的开发提供技术保证。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与处理** 供试材料取自德阳地区地方优良品种贵妃枣2~3年生嫁接苗的带芽茎段。

外植体处理:选取长势好的枝条→剪去叶片→放于自来水下冲洗2~3小时→洗衣粉浸泡5分钟→用软刷刷洗干净→流水冲洗30分钟→置于超净工作台上。

外植体消毒:70%酒精浸泡15秒→无菌水冲洗3次→0.1%升汞浸泡5~8分钟→无菌水冲洗5次→滤纸吸干,以备接种,建立无菌材料。

**1.2 培养条件** 据已有文献报道及枣的自然生态习性状况(枣树春天萌动发芽时间晚,发芽所需的温度稍高<sup>[1-2]</sup>),设定培养条件为温度 $27 \pm 2$ ℃,湿度75%,光强2000 lx,光照14小时/天。

**1.3 初代诱导培养基筛选** 外植体经过表面灭菌后,首先采用适当的培养基诱导其生长和分化。启动培养基筛选试验采用3因素3水平正交设计,30天后统计接种各处理的启动率。培养基中附加蔗糖30 g/L,琼脂粉7.5 g/L,pH值5.7。每试管接种1个外植体,每处理7管,重复3次。

**1.4 继代增殖培养基筛选** 将初代培养阶段获得的无菌组培苗接种在增殖培养基上,注意观察统计组培苗生长变化情况。试验采用4因素4水平正交设计,以30天为周期,在相同培养基上连续转接,3个月后统计其月平均增殖系数。培养基中附加蔗糖30 g/L,琼脂粉7.5 g/L,pH值5.7。每试管接种1个外植体,每处理7管,重复3次。

**1.5 壮苗培养基筛选** 增殖阶段获得的组培苗生长细弱,不利于进行下一步的生根试验,因此将组培苗单苗接种在壮苗培养基上进行壮苗培养。试验采用3因素3水平正交设计,30天后观察生长状况。

培养基中附加蔗糖30 g/L,琼脂粉7.5 g/L,pH值5.7。每试管接种1个外植体,每处理每次接种7管,重复3次。

**1.6 生根培养基筛选** 把长势良好、单株高于2 cm的健壮组培苗接种在生根培养基上。试验采用4因素3水平正交设计,50天时统计各处理的生根率。培养基中附加琼脂粉7.5 g/L,pH值5.7。每试管接种1个外植体,每处理7管,重复3次。

**1.7 炼苗移栽基质筛选** 本试验采用逐步炼苗法。先将已生根的试管苗试管的瓶口打开,在培养箱里驯化5~7天,随后取出生根苗洗净根部培养基,注意不要伤根;然后在温室里把苗移栽到各基质中,用多菌灵100倍液喷雾保苗,并用玻璃杯或透明塑料袋将幼苗罩住。待其生长良好时便可移栽至大田<sup>[6-8]</sup>。基质类型设:河沙,腐殖质土,一般壤土,蛭石+珍珠岩+腐殖质土(1:1:1)。

## 2 结果与分析

**2.1 初代启动培养** 茎段接入培养基10天后腋芽萌动,嫩叶细长、扭曲,黄绿色;20天后萌出新的侧枝,叶稍展,绿色并且茎粗壮。启动率方差分析的F检验结果表明:基本培养基类型、BA和IBA之间差异都达到极显著水平。采用新复极差法。进一步对3因素各水平进行多重比较,并结合极差分析,发现影响启动率最大的因素为BA,其次是IBA,再次为基质培养基类型。选取各因素的最优水平并结合初代培养正交试验方案,确定最佳组合为9号处理H+BA 1.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L,启动率达到71.93%(见表1)。

**2.2 继代培养** 继代培养10天后,叶舒展,植株长高;20天后芽苗数量增多,基部芽原基逐渐显露;30天后丛生苗簇生、拥挤,表现良好的增殖状况。F检验表明:基本培养基类型、BA、KT和IBA对丛生芽增殖系数的影响都达到极显著水平。综合各因素不同水平间的多重比较结果,推测出2MS+BA 2.0 mg/

\* 国家十五重大科技攻关课题(2004BA606A-06)资助。

\*\* 通讯作者,教授,博导。

E-mail: auldkgk@sicau.edu.cn

表1 不同培养基和植物生长调节剂对贵妃枣外植体启动培养的影响

处理编号	基本培养基	BA/ mg·L <sup>-1</sup>	IBA/ mg·L <sup>-1</sup>	启动率/ %
1	MS	0.5	0.1	25.07±2.24 f
2	MS	1.0	0.3	66.83±4.92 ab
3	MS	1.5	0.5	51.70±4.50 d
4	1/2MS	0.5	0.3	52.23±3.87 d
5	1/2MS	1.0	0.5	59.93±5.91 bc
6	1/2MS	1.5	0.1	56.40±6.06 bc
7	H	0.5	0.5	42.37±3.81 e
8	H	1.0	0.1	49.93±2.20 d
9	H	1.5	0.3	71.93±4.34 a

注:均值±标准误后的字母表示按照邓肯氏新复极差法在P=0.05水平上的显著差异性。下表同。

L+KT 0.05 mg/L+IBA 0.4 mg/L 或 2MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.05 mg/L+ IBA 0.8 mg/L 为较好的丛生芽增殖配方组合。多重比较方差分析结合极差分析的结果表明,对芽增殖效果影响力由大到小依次为基本培养基>BA>IBA>KT。在试验处理中,可确定 17 号处理 2MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.3 mg/L+ IBA 0.4 mg/L 为最佳丛生苗增殖配方,增殖系数能达到 9.3(见表 2)。

表2 不同培养基和植物生长调节剂对贵妃枣组培苗增殖效果的影响

处理	基本培养基	BA/ mg·L <sup>-1</sup>	KT/ mg·L <sup>-1</sup>	IBA/ mg·L <sup>-1</sup>	增殖系数
10	3MS	0.5	0.05	0.2	2.4±0.35 h
11	3MS	1.0	0.1	0.4	3.0±0.30 gh
12	3MS	1.5	0.3	0.6	2.0±0.29 ij
13	3MS	2.0	0.5	0.8	4.6±0.56 de
14	2MS	0.5	0.1	0.6	4.8±0.26 de
15	2MS	1.0	0.05	0.8	8.0±0.40 b
16	2MS	1.5	0.5	0.2	6.9±0.35 c
17	2MS	2.0	0.3	0.4	9.3±0.36 a
18	MS	0.5	0.3	0.8	4.9±0.25 d
19	MS	1.0	0.5	0.6	4.1±0.85 ef
20	MS	1.5	0.05	0.4	7.0±0.46 c
21	MS	2.0	0.1	0.2	5.2±0.31 d
22	H	0.5	0.5	0.4	1.7±0.31 j
23	H	1.0	0.3	0.2	1.9±0.36 ij
24	H	1.5	0.1	0.8	2.6±0.26 h
25	H	2.0	0.05	0.6	3.5±0.20 fg

2.3 壮苗培养 壮苗阶段主要是培养健壮的无根单苗,基部分化芽苗或显露根原基都不利于壮苗;又由于枣树芽较复杂,均为复芽,易萌发侧枝,因此,培养健壮的单苗成为进行生根试验的首要条件。本试验将由继代培养阶段所获得的芽苗在壮苗培养基上培养,大多数苗木高均有所增加,其他外部形态指标也有相应变化。试验结果表明,30号处理 1/2MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的植株生长状况

最好,此培养基壮苗后的植株可有效地进行根的诱导(见表 3)。

表3 不同培养基和植物生长调节剂对贵妃枣组培苗单苗壮苗培养的影响

处理编号	株高/ cm	叶色	叶形	基部膨大	侧枝萌发
26	2.5	鲜绿	小,平展	无	无
27	3.0	深绿	平展	无	无
28	4.0	深绿	叶缘稍卷	有	无
29	5.0	黄绿	小,平展	无	有
30	4.5	鲜绿	大,平展	无	无
31	4.0	深绿	平展	无	有
32	3.5	黄绿	平展	无	无
33	5.0	鲜绿	平展	有	无
34	2.5	黄绿	叶缘内卷	有	无

注:试验采用 3 因素 3 水平正交设计,基本培养基设 MS、1/2MS 和 1/4MS;KT 设 0.1、0.5、0.8 mg/L, NAA 设 0.05、0.2、0.5 mg/L。

2.4 生根培养 生根比较困难,20 天左右植株基部才开始膨大,并显露白色根原基,生长缓慢。F 检验结果表明:培养基类型、IBA、NAA、蔗糖对生根率的影响均达到极显著水平。多重比较方差分析结合极差法分析结果可知,试验中 4 个因素对根的生根影响效果大小依次为蔗糖>培养基类型>IBA>NAA。综合各因素不同水平间的多重比较结果,推测出 1/8MS+IBA1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 10 g/L 为诱导生根阶段最佳组合。考虑到降低药品耗费,确定生根培养中 43 号处理 1/8MS+IBA 1.0mg/L+NAA 0.3mg/L+蔗糖 10 g/L 为最佳生根配方,生根率能达到 81.8%(见表 4)。

表4 不同培养基和植物生长调节剂对贵妃枣组培苗生根诱导的影响

处理编号	基本培养基	IBA/ mg·L <sup>-1</sup>	NAA/ mg·L <sup>-1</sup>	蔗糖/ g·L <sup>-1</sup>	生根率/ %
35	1/2MS	0.5	0.1	10	61.0±3.61 cd
36	1/2MS	0.7	0.3	15	43.6±5.34 f
37	1/2MS	1.0	0.5	20	53.2±2.82 e
38	1/4MS	0.5	0.3	20	33.0±3.61 g
39	1/4MS	0.7	0.5	10	72.6±4.01 b
40	1/4MS	1.0	0.1	15	54.5±1.96 de
41	1/8MS	0.5	0.5	15	63.6±3.59 c
42	1/8MS	0.7	0.1	20	60.1±3.81 cd
43	1/8MS	1.0	0.3	10	81.8±2.60 a

2.5 炼苗移栽 炼苗移栽 30 天后,观察到在腐殖质土和蛭石+珍珠岩+腐殖质土上的植株表现较好,有新叶抽出且叶色鲜绿、平展,苗高和根长都有所增加,部分苗还有新根长出,成活率也都超过 80%。但考虑到植株移栽初期需要更多的营养成分,最终确定腐殖质土作为组培苗移栽的最佳基质,

能够保证得到较高的移栽成活率。

### 3 讨论

枣树具有组织坚硬、生长量小、增粗缓慢等特点;枣树的芽是复芽,有主芽、侧芽之分,萌发后能产生枣头、枣股、枣吊、叶片、一次侧枝、二次侧枝等;所以在枣树增殖培养时,要剪除无用枝条,保留枣头枝条萌发,提高有效增殖倍数。枣树的组织培养研究存在一定的难度<sup>[2]</sup>。本研究建立了贵妃枣完整的组织培养再生体系,得到了不同培养阶段的最佳配方。壮苗培养阶段,一般是将组培苗接种在没有植物生长调节剂的培养基上进行培养,但由于枣枝条细弱,增殖阶段难以粗壮,所以添加适当浓度的KT并配合一定浓度的NAA,对培养材料生物量的增加起到促进作用。王宇等用两种植物生长调节剂相配合对赞皇大枣进行壮苗试验,效果显著,而且实际研究中也确实表现良好的生长状况<sup>[6]</sup>。虽然一定浓度的NAA对培养材料生物量的增加有促进作用,但为防止出现生根现象,浓度不宜太高,否则达不到壮苗目的,所以NAA 0.05mg/L的较低浓度效果最佳。后期的炼苗移栽,是保证组培苗转化为田间正常生长

苗木的关键环节。移栽时,选在组培苗移栽最佳季节春、夏季进行,保证有较高的成活率;而且移栽基质中含有较多的腐殖质成分。虽然,研究结果表明河沙和一般壤土中的移栽成活率也很高,但植株外部表现比在前两种基质中稍差,也许是因为后两种基质中腐殖质含量少、营养成分不够充足,未能及时补充给移栽苗所需要的营养成分。

#### 参考文献

- [1] 陈宗礼, 陈志莲, 齐 龙, 等. 温度、光照和密度对红枣组培苗影响的研究[J]. 延安大学学报(自然科学版), 1996, 15(1): 56-61
- [2] 邓成军, 张少华, 巴音克西克, 等. 正交实验在红枣组培快繁中的应用[J]. 新疆林业, 2003(5): 35-36
- [3] 徐化凌, 陈纪香, 于德花, 等. 沾化冬枣组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技, 2003(5): 29-30
- [4] 李承水. 冬枣试管苗移栽炼苗研究[J]. 湖北林业科技, 2001(4): 13-14
- [5] 邢跃东. 移植基质对枣组培苗移植成活率的影响[J]. 中国林副特产, 2000, 55(4): 4
- [6] 王 宇, 李 云, 田砚亭. 枣树叶片的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 350-350

收稿日期: 2007-12-29; 修回日期: 2008-04-03

作者简介: 李俊(1979-), 女, 北京林业大学在读博士, 主要研究方向为林木基因工程。

## 欢迎订阅 2009 年下列农业期刊

**《河北果树》** 河北省果树学会主办, 河北省农林科学院昌黎果树研究所、河北农业大学、河北科技师范学院、河北工程大学、河北省农林科学院石家庄果树研究所、河北省林业科学院协办的果树专业技术期刊, 主要刊登落叶果树的品种资源、栽培管理、病虫害防治、贮藏加工等方面的新成果、新技术、新知识和新信息。开设栏目有: 专题论述、试验研究、经验交流、百花园、工作历、广告与信息。本刊特色是通俗易懂、科学实用、技术先进、内容丰富、信息量大、可读性强、发行面广。读者对象为果树科研和推广人员、农林院校师生、各级涉农领导和广大果农。本刊国内外公开发行, 双月刊, 单月 15 日出版, 大 16 开本, 64 页, 每期定价 5 元, 全年共 30 元。欢迎广大果农和果树科技工作者到当地邮局(所)订阅, 邮发代号 18-247。未能从邮局订上本刊的读者, 全年都可随时汇款至编辑部订阅, 免费邮寄。编辑部尚有 2002、2003、2004、2005、2006、2007 年合订本可邮购。同时欢迎投稿和发布广告。

地址: 河北省昌黎果树研究所《河北果树》编辑部, 邮编: 066600, 电话/传真: (0335) 2987632

**《南方农业》** 邮发代号 78-102。是重庆市农业科学院主办的面向全国公开发行的农业技术类期刊, 国内统一刊号 CN 50-1186/S, 国际标准刊号 ISSN 1673-890X。双月刊。大 16 开本, 100 页。每期定价 8 元, 全年 48 元。主要刊登农业新技术、新方法、农业经济管理、乡村发展、新农村建设、城乡统筹发展等方面内容。适合基层农技推广人员、种植专业大户、基层领导、科研人员、院校师生等阅读。

**《南方农业(园林花卉版)》** 邮发代号 78-120。是重庆市农业科学院主办的全国第一本既综合了花卉、园林, 又兼顾学术、技术、赏析的公开发行期刊。办刊导向: 科技+欣赏。是一本图文并茂的画册式、具有收藏价值的杂志。双月刊。大 16 开本, 80 页。每期定价 8 元, 全年 48 元。主要栏目: 园林设计、创新研究、专题论述、花田农技、花与生活、花与人、品花苑、新优植物、广告信息等。

地址: 重庆市九龙坡区白市驿镇. 市农科院内

《南方农业》编辑部

邮编: 401329

电话: (023) 65706728

E-mail: nfnzyz@163.com (农业版)

nfyllh@163.com (园林花卉版)