

金昌枣叶片组织培养及植株再生

梁国栋, 王玉国

(山西农业大学, 山西 太谷 030801)

【摘要】通过对金昌枣叶片诱导形成愈伤组织, 诱导愈伤组织分化形成不定芽、不定根和再生植株及移栽条件的探讨, 建立金昌枣叶片离体组织培养, 形成再生植株的实用技术体系。

【关键词】金昌枣叶片; 组织培养; 再生植株; 移栽条件

【中图分类号】S66 **【文献标识码】**B **【文章编号】**1671-7252(2007)01-0026-04

1 材料与方法

1.1 材料

金昌枣叶片。

1.2 方法

基本培养基为: MS, 蔗糖 3.0%, 琼脂 0.8%, pH 值 5.8, 并添加不同浓度的 BA (6-苄基腺嘌呤)、2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸)、IBA (吲哚丁酸) 及活性炭。将配制好的培养基用 100ml 三角瓶分装, 每瓶 20ml, 封口膜包扎, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min。

1.21 愈伤组织的诱导。取金昌枣苗叶片, 在培养基上背面向下放置, 在 A、B 条件下诱导。

A: 不同浓度配比的 BA、2,4-D 诱导愈伤组织; B: 不同光、暗条件诱导愈伤组织。

1.22 不定芽的诱导。将上述形成的愈伤组织切成边长为 0.5cm, 质量约 0.15g 的小方块, 接种在不同的分化培养基上, 加入不同种类和浓度的生长素与细胞分裂素诱导不定芽, 培养温度为 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天光照 14h, 光照强度为 2000lx, 培养期为 42d。

1.23 不定根的分化。将小植株基部插入 MS 培养基中, 培养基中的附加有不同浓度的激素, 在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 下进行培养。每处理 20 个植株,

重复 4 次。

1.24 再生植株的移植。首先在自然光下封口炼苗 7~10d, 然后将试管苗基部琼脂洗净, 栽至 0.2% 高锰酸钾消毒过的蛭石中, 浇透水后, 置于 23~30℃ 温室中。2 周后, 将苗木栽于营养钵中, 在遮光 50% 的荫棚下生长 5d, 全光条件下生长 2 周后, 定植于大田。

2 结果与分析

2.1 叶片愈伤组织的诱导

A: 不同的生长素及细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响, 试验结果见表 1。

适当浓度的细胞分裂素或生长素都能显著地促进枣树愈伤组织的形成, 两者同时添加时效果更佳。由表 1 知, 培养基中在只有生长素、2,4-D, 而无细胞分裂素的情况下, 诱导效果较差, 诱导出来的愈伤组织体积小而且颜色发白组织松散。添加细胞分裂素后, 诱导效果得到显著改善, 愈伤组织逐渐增大, 组织紧密且色泽鲜亮而嫩绿。而随着细胞分裂素浓度的逐步增加, 诱导效果在达到最佳诱导后又逐步降低, 最后出现和不添加细胞分裂素一样的诱导效果。由此可知, 诱导愈伤组织的最佳配比是 MS + BA0.5 mg/l + 2,4-D1.5 mg/l。

【收稿日期】2006-11-20

【作者简介】梁国栋 (1981-), 男, 山西朔州人, 山西农业大学研究生院硕士研究生。研究方向: 植物生理学及组织培养。

梁国栋等：金昌枣叶片组织培养及植株再生

表1 不同的生长素及细胞分裂素对愈伤组织诱导的结果

BA (mg/l)	2, 4-D (mg/l)	出愈率 (%)	愈伤组织大小	愈伤组织色泽	愈伤组织紧密程度
0	0	0.0	—	—	—
	1.0	16.9	小	乳白	松散
	1.5	18.6	小	乳白	松散
	2.0	10.5	小	乳白	松散
0.5	0	6.2	小	乳白	松散
	1.0	90.0	大	嫩绿	紧密
	1.5	96.2	大	嫩绿	紧密
	2.0	81.2	大	嫩绿	紧密
1.0	0	4.2	小	乳白	松散
	1.0	88.6	大	嫩绿	紧密
	1.5	91.4	大	嫩绿	紧密
	2.0	82.6	大	嫩绿	紧密
1.5	0	7.6	小	乳白	松散
	1.0	66.2	大	嫩绿	紧密
	1.5	46.8	大	嫩绿	紧密
	2.0	10.8	小	乳白	松散

B: 光培养和暗培养对愈伤组织诱导的影响, 试验结果见表2。

表2 光培养和暗培养对愈伤组织诱导的结果

光照条件	出愈率 (%)	愈伤组织诱导速度	愈伤组织色泽	愈伤组织紧密程度	愈伤组织褐化 (%)
光培养	80.6	21 天	乳白 (12%)	松散	12%
			嫩绿 (88%)	紧密	
暗培养	96.2	9 天	乳白 (76%)	松散	61%
			黄绿 (34%)	松散	
前期光培养 (2 天) 后期暗培养	84.8	18 天	乳白 (32%)	松散	42%
			嫩绿 (68%)	紧密	
前期暗培养 (2 天) 后期光培养	95.4	12 天	黄绿 (8%)	松散	16%
			嫩绿 (92%)	紧密	

由表2可知, 在诱导愈伤组织的过程中, 光、暗条件都是极其重要的, 在全光培养中, 出愈率较低, 出愈时间较长, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例要高且褐化率也比较低; 在全暗培养中, 出愈率高, 出愈时间短, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例要低且褐化率也较高; 在前期光培养后期暗培养中, 出愈率有所增加, 出愈时间较全光培养要短, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例比全光培养要低而且褐化率也相对较高; 而在前期暗培养后期光培养中, 出愈率达到最高, 出愈时间也相对要短, 但是愈伤组织色泽嫩绿的比例极高而且褐化率也相对较低。故最适诱导应该是前期光培养后期暗培养。

2.2 愈伤组织诱导不定芽

愈伤组织在一定激素条件下可以再分化不定芽, 试验结果见表3。使用 BA + IBA 配比能有效地增加金昌枣芽分化数目, 由表3可知: 在只由生长素 IBA 的情况下愈伤组织基本不分化, 而在添加了细胞分裂素 BA 之后愈伤组织的分化率有了明显的提高, 逐步增加 BA 的浓度, 分化率逐步升高, 在 MS + BA1.0mg/l + IBA0.05mg/l 的激素配比下, 芽分化个数和苗高达到最高, 再继续增加 BA 浓度的情况下, 芽分化率和苗高都有所下降, 因而得出: MS + BA1.0mg/l + IBA0.05mg/l 的激素配比为最佳配比。但是在实验中, 愈伤组织的褐化率比较高, 在查阅相关资

料后在培养基中加入1~4g/l的活性炭,有效地利用了活性炭良好的吸附特性,及时吸附植物材料分泌出的褐色物质,减少褐变愈伤组织的抑制作用,使外植体尽快分生,进入分化阶段。

表3 愈伤组织诱导不定芽试验结果

BA (mg/l)	IBA (mg/l)	愈伤组织 分化率 (%)	芽分 化数	苗高 (cm)
0	0	0	—	—
	0.02	0	—	—
	0.05	0	—	—
	0.08	0	—	—
	0.1	0	—	—
	0.2	0	—	—
0.5	0	0	—	—
	0.02	12.6	1.7	0.8
	0.05	6.8	1.4	0.6
	0.08	4.0	1.2	0.8
	0.1	1.2	0.8	1.0
	0.2	—	—	—
1.0	0	3.2	1.2	1.0
	0.02	16.8	2.2	1.6
	0.05	30.6	4.8	2.8
	0.08	20.4	1.8	1.4
	0.1	3.4	1.0	0.8
	0.2	—	—	—
1.5	0	2.8	1.2	0.6
	0.02	4.6	1.6	0.8
	0.05	11.4	1.8	1.0
	0.08	14.2	2.0	0.7
	0.1	2.1	1.4	1.0
	0.2	—	—	—

注:不定芽再生情况和褐变程度在培养第40天纪录。显著性检验水平: $P=0.05$ 。

2.3 不定根的分化

2.3.1 激素对不定根分化的影响,试验结果见表4。枣树愈伤组织培养获得不定芽和茎后,还必须使其分化出不定根后,方能成为完整的植株。激素对器官分化的调节起着重要作用。使用IBA与BA的不同浓度组合对不定芽形成的茎进行不定根诱导,结果见表4。当BA浓度 $\geq 0.1\text{mg/l}$ 时,无论IBA浓度高低如何,均未见分

化出不定根;当BA浓度降至 0.05mg/l 时,便有5%~11%左右的茎产生出了1~2条不定根;在未添加BA时,则出现同一IBA浓度下的最高生根率。可见细胞分裂素BA对不定根分化有抑制作用。在未添加BA的情况下,IBA以添加 1mg/l 时的生根率最高,达到95.4%; 0.5mg/l 时的生根率亦高达92.9%;但低于 0.5mg/l 或高于 1mg/l 时,生根率和生根系数都会降低。另外,高浓度的IBA和BA组合生根率低。

表4 激素诱导不定根的结果

激素组别		(mg/L)	生根率 (%)
IBA	+	BA	
3		0.1	0
3		0.05	5.0
3		0	16.7
2		0.1	0
2		0.05	6.8
2		0	54.6
1		0.1	0
1		0.05	11.2
1		0	95.4
0.5		0.1	0
0.5		0.05	10.4
0.5		0	92.9
0.25		0.1	0
0.25		0.05	0.3
0.25		0	43.2

2.3.2 茎上的叶片数量对不定根分化的影响。将分别保留有3, 2, 1, 0枚叶片的茎,接种在添加 1.0mg/l IBA的MS培养基中进行不定根诱导。结果表明,叶片对枣树不定根的形成有着重大的影响。当茎上不保留叶片时,生根率只有13%,每个茎上仅有1~2条根;保留一枚叶后,生根率达到68%,每个已生根的茎上可产生4~5条不定根;此后,随着保留的叶片增多,生根率、生根系数及不定根壮实程度都会增高,保留3、4枚叶的效果最好,达到96%。

2.4 不同叶龄的叶片的再生效果

由图1可知,随着叶龄增加,叶片再生频率最高达到96%,叶龄小于20d时,叶片难以抽生

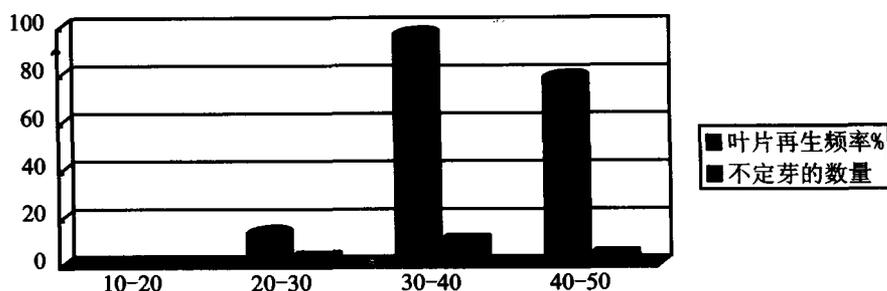


图1 不同叶龄的叶片再生频率与不定芽再生数量

不定芽，叶片坏死率较高，多是失水过快，褐变坏死；而叶龄超过40d的叶片诱导反应迟钝，愈伤紧凑、量较少，再生频率和芽数显著下降。故30~40d的叶片是最佳再生外植体。这与黄健等的研究结果相同。

2.5 试管苗的移栽

将上述再生植株从琼脂培养基中移植到含有MS培养基无机盐的营养土中，在人工气候室内生长3d后，再移栽到带有荫棚的野外，7d后逐渐解除遮荫设施，成活率在98%以上。

3 讨论

3.1 适当浓度的细胞分裂素或生长素都能显著地促进枣树愈伤组织的形成，两者同时添加时效果更佳，诱导愈伤组织的最佳配比是MS + BA0.5 mg/l + 2, 4-D1.5 mg/l。

3.2 在诱导愈伤组织的过程中，光、暗条件都是极其重要的，而最适诱导应该是前期光培养，后期暗培养。

3.3 叶片质量也是保证再生频率稳定和提的关键因素，许多相关报道都充分强调了叶片选择的重要性。有研究证明20d叶龄的叶片再生率最高；在周瑞金的研究中30~40d叶龄更有利于不定芽的高效再生；本研究认为使用30~40d叶龄充分生长的金昌枣叶片可达到接近96%的再生频率，成熟的维管组织提供了良好的营养物质吸收途径，如果叶片没有充分发育，维管组织缺乏吸收营养的能力，也易造成叶片失水过快而死亡。

总之，本文试验中金昌枣叶片在适宜激素浓度诱导的愈伤组织洁白、致密、有光泽，光照培养后可以很快转成绿色，并且可以形成不定芽，不定芽伸长成枝条后可以通过诱导生根而形成完整植株。何振艳等、刘翠云等也报道

从梨枣、黑山晋枣叶片、茎诱导的愈伤组织可以通过诱导器官发生形成再生植株。因此，枣树茎、叶等成熟器官诱导的愈伤组织在植株再生上也是具有意义的。这些成熟器官诱导的愈伤组织分化不定根较容易，而分化不定芽则较困难，需要多次继代培养后才能完成分化过程。对枣树愈伤组织的继代培养过程进一步进行组织学和生理生化的研究，可能有助于了解枣树非胚性愈伤组织向胚性愈伤组织转化的机理，从而对其他木本植物成年型器官的再生研究能够起到参考作用。

【参考文献】

- [1] 陈宗礼等. 沾化冬枣叶片培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(6): 584.
- [2] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师专学报, 2000, 2(2): 97-99.
- [3] 王玖瑞等. 枣树组织培养研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(5): 336-339.
- [4] 陈宗礼, 延志莲, 齐龙. 枣叶片离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1999, 32(1): 27-28.
- [5] 王东霞, 李长杰. 如何对抗植物组织中的组织褐变[J]. 中国花卉盆景, 2002, 12: 29-30.
- [6] 黄建, 马锋旺, 樊军锋, 李新岗, 同金霞, 等. 枣树离体叶片不定芽再生体系建立的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(5): 942-948.
- [7] X F, ZHAXG J R. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill) using leaf explants [J]. Plant Cell Reports, 2005, 23: 775-779.

(责任编辑 张耀川)