

灵宝大枣无菌外植体的建立及茎段不定芽的诱导

王小国

(三门峡职业技术学院 食品园林学院,河南 三门峡 472000)

摘要:为建立灵宝大枣的快速繁殖体系,以灵宝大枣枣头一次枝上萌发的嫩枝为外植体,对外植体的消毒、茎尖的生长和茎段不定芽的诱导进行了研究。结果表明:灵宝大枣外植体采用乙醇和升汞结合的常规消毒方法较好,污染率较低;适宜茎尖生长的培养基为 $MS+6-BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+AC0.3\%$ +蔗糖 3%+琼脂粉 $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,培养基 $MS+TDZ0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $MS+6-BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+AC0.3\%$ 适宜枣茎段不定芽诱导,活性炭可以明显减轻褐变,TDZ 诱导茎段不定芽的能力明显高于 6-BA。

关键词:灵宝大枣;茎尖;茎段;不定芽;诱导

中图分类号:S665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)05-0013-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.05.0013

枣为鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus* Mill.)植物^[1],其果实可食用或药用^[2],花期较长,芳香多蜜,是良好的蜜源植物;枣木木质坚硬,纹理细密,是雕刻和制作家具的优良木材;而且还是优良的水土保持树种,耐瘠薄,可以防风固沙,改善小气候。我国枣的品种资源很丰富,据《中国果树志·枣卷》(1993)记载^[3],我国共有枣树品种 700 多个。其中,灵宝大枣以其果个大,果肉厚,含糖量高,制作成的干枣富有弹性,压扁可还原,适于长途运输而驰名全国^[4-5]。灵宝大枣的繁殖方法有有性繁殖和无性繁殖,有性繁殖的后代易发生分离和变异,很难保持母株的优良性状。无性繁殖主要有扦插、嫁接和组织培养,扦插一般难生根,成活率低,嫁接需选择砧木、时间和嫁接方式,繁殖速度也较慢。本研究采用植物组织培养技术对灵宝大枣进行快繁,探索不同培养基配方对外植体生长和不定芽诱导的影响,以期对灵宝大枣优良品系的快速繁殖和推广提供理论依据和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为枣头一次枝上萌发的长约 10 cm 的当年生嫩枝,于 2014 年 4 月底至 5 月初采自灵宝大王镇某枣园。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 分别对顶芽和茎段进行清

洗和常规消毒。首先,流水冲洗 12 h,在无菌条件下,75%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 1 次,0.1%升汞消毒 7~8 min,无菌水冲洗 3 次后,将嫩枝剪切成约 2 cm 的茎段接种到培养基上。

1.2.2 初代培养 将消毒后的外植体分别接种在 6 种初代培养基上进行培养。培养基配方分别为:(1) $MS+6-BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;(2) $MS+6-BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.3\%AC$;(3) $MS+6-BA1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;(4) $MS+KT1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;(5) $MS+TDZ0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;(6) $MS+2,4-D0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其中蔗糖浓度 3%,琼脂粉 $7.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养温度 $25^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$,光照强度 4 400 lx,光照时间 $8\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.2.3 测定项目与方法 培养 7 d 后统计污染率,生长 1 个月和 4 个月后观察长势。

$$\text{污染率}(\%) = \frac{\text{污染瓶数}}{\text{接种总瓶数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 外植体污染率

当年生外植体常规消毒后,茎段的污染率为 38%,茎尖的污染率为 46%,表明将 75%酒精和 0.1%升汞结合起来消毒的方法较为理想。

2.2 不同培养基对茎段生长的影响

从图 1 可以看出,2 号 $MS+6-BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+0.3\%AC$ 培养基上的茎段接种 1 个月后,从切口部位长出了绿色愈伤组织。3 号 $MS+6-BA1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上茎段切口部位变黑,没有长出愈伤组织。5

收稿日期:2015-01-05

作者简介:王小国(1977-),男,山西省长治市人,硕士,讲师,从事生物技术及其应用研究。E-mail:314087922@qq.com。

号 MS+TDZ0.5 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹培养基上虽长出了愈伤组织,但愈伤组织褐化严重。表明培养基中添加活性炭可以明显减轻褐化。而

1号、4号、6号培养基培养结果与3号培养基相同,无愈仿组织长出。



图1 不同培养基对茎段生长的影响
Fig.1 The effect of different mediums on the growth of stem

由图2可看出,4个月后,2号 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+0.3% AC 培养基上从茎段切口处诱导出了长约1 cm 的不定芽,长势较健壮。5号 MS+TDZ0.5 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹培养基褐化较严重,但从边缘绿色的愈伤组织处也诱导出了不定芽(见箭头所指处),植株较小,但数量较2号培养基多,表明TDZ诱导茎段不定芽的能力明显高于6-BA。

2.3 不同培养基对茎尖生长的影响

从图3中可以看出,茎尖在2号 MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+0.3% AC 培养基上长势较好,有明显的生长,而在不加活性炭的1号培养基上生长的茎尖基部则出现了发黑的

症状,表明枣的离体培养易发生褐化,而添加活性炭可以明显减轻褐化。



图2 茎段在2号和5号培养基上诱导出的不定芽
Fig.2 The adventitious bud inducing from stem with medium 2 and medium 5



图3 不同培养基对茎尖生长的影响
Fig.3 The effect of different mediums on the growth of stem tip

3 结论与讨论

本研究结果表明,灵宝大枣外植体采用乙醇和升汞结合的常规消毒方法较好,污染率较低。

适宜茎尖生长的培养基为 MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+AC0.3%+蔗糖3%+琼脂粉7.0 g·L⁻¹,培养基 MS+TDZ0.5 mg·L⁻¹+

NAA0.2 mg·L⁻¹ 和 MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+AC0.3% 适宜枣茎段不定芽诱导,活性炭可以明显减轻褐变,TDZ 诱导茎段不定芽的能力明显高于 6-BA。

褐化是植物组织培养中由于酶促反应而引起的导致培养基变褐,并对植物材料产生毒害作用,严重时使之死亡的一种现象^[6]。其机理是外植体切面细胞受到机械损伤时,外溢的酚类物质和多酚氧化酶接触并发生反应,形成醌类物质,醌又经非酶促聚合,形成深色物质羟醌的过程。褐变程度因外植体材料的基因型、所处生理状态、培养基中无机盐浓度、培养温度和光照不同而异,目前常采用的方法是加吸附剂 AC 和抗氧化剂,如抗坏血酸 VC (50~100 mg·L⁻¹)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 AgNO₃ 等。

从本研究芽和茎段的初代培养情况来看,培养基中添加 AC,可以明显减轻外植体的褐化。诸多研究者^[7-8]的试验结果也证明了这一点。张曼^[9]等以雪枣早期幼胚为试材,对影响胚挽救的激素和光照条件及抗褐化剂的效果进行了研究。结果表明添加活性炭 1 g·L⁻¹ 的培养基早期幼胚的褐化率为 35.9%,褐化程度明显轻于添加 VC10 mg·L⁻¹ 的培养基,而不加抗褐化剂的培养基幼胚的褐化率高达 77.1%,加入合适的活性炭可以有效降低褐化发生。

不同的植物生长调节剂类型对外植体不定芽诱导的影响不同。细胞分裂素 6-BA、TDZ 和 ZT 均可以诱导外植体再生^[10-11]。一般 6-BA 诱导的不定芽数量少,但芽体健壮,TDZ 和 ZT 诱导的不定芽数量多,但形体较小,需经过壮苗培养才能成

苗。王艳^[12]研究结果表明,不同植物生长调节剂对酸枣叶片再生诱导的影响不同。细胞分裂素 6-BA 和 TDZ 都可以诱导酸枣叶片再生,6-BA 诱导叶片形成的愈伤组织少,叶片直接再生不定芽,大多数生长为枣吊,TDZ 诱导叶片形成的愈伤组织多,叶片通过愈伤组织再生不定芽,大多数生长为枣头,细胞分裂素宜选用 TDZ,浓度为 0.5 mg·L⁻¹,因此 TDZ 诱导叶片再生不定芽的效果显著优于 6-BA。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 48 卷第一册)[M]. 北京:科学出版社,1982.
- [2] 冯艳风. 大枣多糖体外抗凝血活性研究[D]. 郑州:河南农业大学,2013.
- [3] 王永惠. 中国果树志:枣卷[M]. 北京:中国林业出版社,1993.
- [4] 梁启伟. 灵宝大枣遗传多样性的表型与 ISSR 分析[D]. 郑州:河南农业大学,2010.
- [5] 于磊. 灵宝大枣栽培技术[J]. 中国林副特产,2012(4):53-55.
- [6] 陈世昌. 植物组织培养[M]. 重庆:重庆大学出版社,2006.
- [7] 朱金英,王友平,高风菊,等. 金丝小枣组织培养中的抗褐化研究[J]. 农业工程技术·温室园艺,2008(2):50-51.
- [8] 徐明,代培红,罗淑萍,等. 哈密大枣叶片不定芽再生体系研究[J]. 新疆农业大学学报,2014(3):185-190.
- [9] 张曼,王玖瑞,刘孟军,等. 枣早期幼胚挽救影响因素研究[C]//中国园艺学会干果分会第 4 届研讨会论文集,2007:173-175.
- [10] 黄建,马锋旺,樊军锋,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.
- [11] 周小丽. 酸枣叶片再生和阜平大枣无芽茎段再生不定芽的研究[D]. 保定:河北农业大学,2009.
- [12] 王艳. 枣、酸枣离体培养研究[D]. 保定:河北农业大学,2011.

Establishment of Sterile Explant and Induction of Adventitious Bud from Stem of Lingbao Jujube

WANG Xiao-guo

(College of Food and Landscape Architecture, Sanmenxia Polytechnic, Sanmenxia, Henan 472000)

Abstract: In order to establish rapid proliferation for Lingbao jujube, taking sprout shoots from jujube first branch as the explants, the disinfection of explant, the growth of stem tip and adventitious bud induction from stem were studied. The results showed that the combination of 75% alcohol and 0.1% HgCl₂ had better effect of disinfecting explants, and the pollution rate was low. The suitable medium for stem tip was MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+0.3% AC+3% Sugar+Agar 7.0 g·L⁻¹, the mediums of MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ and MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹+0.3% AC were suitable for inducing adventitious buds, activated carbon added to medium could reduce browning significantly, the ability of inducing adventitious bud of TDZ was higher than that of 6-BA obviously.

Keywords: Lingbao jujube; stem tip; stem section; adventitious bud; induction