

‘孔府酥脆’枣试管苗离体叶片不定梢诱导和再生

孙清荣^①, 孙洪雁, 周广芳

(山东省果树研究所, 山东 泰安 271000)

Induction and regeneration of adventitious shoot from *in vitro* leaves of *Zizyphus jujuba* ‘Kongfusucui’ plantlet
SUN Qing-rong^①, SUN Hong-yan, ZHOU Guang-fang (Shandong Institute of Pomology, Tai’an 271000, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 83-85

Abstract: Using *in vitro* leaves of *Zizyphus jujuba* ‘Kongfusucui’ plantlet as explants, effects of culture method, phytohormone proportion and culture time on induction rate of adventitious shoot from leaves and effects of sucrose concentrations in rooting media on rooting of adventitious shoot were studied. The results show that induction rate of adventitious shoot by two-step culture method (firstly cultured on medium I for four weeks then cultured on medium II for three weeks) is significantly higher than that by one-step culture method (cultured continuously on medium I for seven weeks). Phytohormone proportion in medium I has an obviously influence on induction rate of adventitious shoot, which gradually increases with increasing of TDZ concentration in medium I. And adding $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ in medium I leads to induction rate with above 80%. With culture time prolonging (cultured for 1, 2, 3 or 4 weeks on medium I, respectively), induction rate increases gradually. Sucrose concentration has a significant effect on rooting of adventitious shoot, sucrose with higher concentration ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) is beneficial to rooting. According to induction rate and growth status of adventitious shoot, it is determined that optimal culture method of adventitious shoot induction from *Z. jujuba* ‘Kongfusucui’ leaves is two-step culture method, that is, leaves firstly cultured on WPM medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA for four weeks, and then cultured on WPM medium containing $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ till adventitious shoot produced.

关键词: ‘孔府酥脆’枣; 离体叶片; 不定梢诱导; 植株再生; 两步培养法

Key words: *Zizyphus jujuba* ‘Kongfusucui’; *in vitro* leaf; adventitious shoot induction; plantlet regeneration; two-step culture method

中图分类号: Q943.1; S665.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0083-03

红枣营养丰富、富含维生素,深受广大消费者喜爱,但由于枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)树在生长过程中经常受到细菌、真菌等病害的危害,制约了红枣的产量。通过品种改良可以获得优良的枣树品种,但由于枣胚败育率高及落花落果严重等因素,导致利用常规杂交育种方法很难达到品种改良的目的。基因工程的外源基因遗传转化技术为植物抗病品种的选育提供了育种新途径,而遗传转化技术的成功应用则主要依赖于植物高效再生体系的建立。因此,建立枣树的高效再生体系是实现其分子育种的首要步骤,对枣树的品种选育至关重要。

‘孔府酥脆’枣(*Zizyphus jujuba* ‘Kongfusucui’)是优良的鲜食枣品种之一,但该种植株在种植过程中易感染枣疯病,严重影响其产量。有关枣及其不同品种离体叶片不定梢诱导的研究较多^[1-5],但由于基因型的不同,这些研究成果均不适用于‘孔府酥脆’枣叶片不定梢再生。迄今为止,尚未见有关‘孔

府酥脆’枣离体叶片不定梢再生方面的报道。作者研究了培养方法和外源植物激素添加量对‘孔府酥脆’枣离体叶片不定梢再生的影响,以期获得‘孔府酥脆’枣叶片不定梢再生的最佳培养条件,为将抗枣疯病基因转入‘孔府酥脆’枣的遗传转化研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用‘孔府酥脆’枣试管苗由作者所在实验室培养,在增殖培养基(含 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂的MS培养基,pH 5.8)上继代保存约30 d。

1.2 方法

1.2.1 不定梢诱导培养基激素配比 根据预实验结果,选择

收稿日期: 2010-09-13

基金项目: 国家林业科技支撑计划项目(2008BAD92B03); 山东省农业良种工程项目(2008LZ010和2009LZ010); 山东省农业科学院博士科研启动基金项目(2007YBS004); 泰安市科技发展计划项目(20093021)

作者简介: 孙清荣(1963—),女,山东无棣人,博士,研究员,主要从事果树生物技术育种研究。

^①通信作者 E-mail: sunqr@sdlp.cn

WPM培养基^[6]为基本培养基,均含有30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂,并在灭菌前将培养基酸碱度调整至pH 5.8。根据添加植物激素的种类及质量浓度分为2组培养基(I和II),分别用于愈伤组织诱导和不定梢诱导。培养基I共6种,分别添加不同质量浓度的TDZ(0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹)和IAA(0.1、0.5 mg·L⁻¹): I1含0.1 mg·L⁻¹TDZ和0.1 mg·L⁻¹IAA; I2含0.1 mg·L⁻¹TDZ和0.5 mg·L⁻¹IAA; I3含0.5 mg·L⁻¹TDZ和0.1 mg·L⁻¹IAA; I4含0.5 mg·L⁻¹TDZ和0.5 mg·L⁻¹IAA; I5含1.0 mg·L⁻¹TDZ和0.1 mg·L⁻¹IAA; I6含1.0 mg·L⁻¹TDZ和0.5 mg·L⁻¹IAA。培养基II共2种: II1含0.1 mg·L⁻¹IAA和1.0 mg·L⁻¹GA₃; II2含0.5 mg·L⁻¹IAA和1.0 mg·L⁻¹GA₃。

1.2.2 不定梢诱导培养流程的筛选 不定梢诱导培养基本流程为:从试管苗顶端摘取刚展开的幼嫩叶片,将叶片垂直于中脉横切后接种于培养基I上,叶片近轴面接触培养基;叶片在培养基I上培养4周后转移到培养基II上培养3周。在培养基I上的培养条件为:暗培养,培养温度为(25±2)℃;在培养基II上的培养条件为:培养温度为(25±2)℃,光照时间为14 h·d⁻¹,光照度为2 500 lx。

为确定不同培养方法对不定梢诱导的影响,在上述基本培养流程的基础上设置2种培养方式18种培养组合,分别为一步培养方式(在6种培养基I上连续培养7周)和两步培养方式(在6种培养基I上培养4周后再分别转接到2种培养基II上培养3周)。另外,为研究愈伤组织诱导培养时间对不定梢诱导的影响,对两步培养方式中叶片在培养基I上的培养时间进行了不同的设置(分别为1、2、3和4周)。

每处理接种3瓶,每瓶接种10个外植体,各处理均重复3次。在培养基II上培养3周后,记录再生不定梢的叶片数并计算不定梢的诱导率,结果取平均值。

1.2.3 不定梢的增殖和生根培养 将在培养基II上获得的不定梢(芽)转移到增殖培养基(含2.0 mg·L⁻¹BA、0.4 mg·L⁻¹IBA、30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂的MS培养基,pH 5.8)上进行继代和增殖培养,待不定梢在增殖培养基上长至1.5 cm以上时分别转移至2组生根培养基上进行生根诱导。生根培养基分别为:含0.5 mg·L⁻¹IBA、20 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂的1/4MS培养基(pH 5.8);含0.5 mg·L⁻¹IBA、30 g·L⁻¹蔗糖和6 g·L⁻¹琼脂的1/4MS培养基(pH 5.8)。不定梢增殖和生根培养条件与不定梢诱导的光照培养条件相同。

每处理4瓶,每瓶转接15个不定梢,每处理重复3次,培养30 d后观察并统计生根的不定梢数量,计算生根率。生根率的计算公式为:生根率=(生根不定梢数/接种的不定梢总数)×100%。

1.3 数据分析

采用DPS V3.01数据处理软件对实验数据进行分析,采用Duncan's新复极差法进行多重比较,并对差异显著性(P=0.05)进行检验。

2 结果和分析

2.1 ‘孔府酥脆’枣叶片不定梢诱导的3个影响因素分析

采用不同的培养方式,‘孔府酥脆’枣叶片在激素配比不同的培养基上诱导培养不同时间后不定梢的诱导率见表1。

表1 培养方式、激素配比及培养时间对‘孔府酥脆’枣叶片不定梢诱导率的影响($\bar{X}\pm SD$)

Table 1 Effects of culture method, phytohormone proportion and culture time on induction rate of adventitious shoot from leaves of *Zizyphus jujuba* ‘Kongfusucui’ ($\bar{X}\pm SD$)

培养方式 ¹⁾ Culture method ¹⁾	不同培养时间的诱导率/% ²⁾ Induction rate at different culture times ²⁾			
	1周 One week	2周 Two weeks	3周 Three weeks	4周 Four weeks
I 1				0.0g
I 1- II 1	4.6±1.2e	6.0±1.3d	18.8±6.2cd	39.5±4.3f
I 1- II 2	4.9±1.8e	6.1±0.9d	18.2±4.2d	40.2±3.7f
I 2				0.0g
I 2- II 1	15.7±2.5d	18.3±2.5c	25.2±1.9abcd	48.0±3.3e
I 2- II 2	27.3±2.5ab	30.1±3.2a	29.7±3.5ab	49.0±3.3e
I 3				0.0g
I 3- II 1	5.0±2.6e	7.3±3.1d	23.7±4.0bcd	58.0±2.2d
I 3- II 2	9.6±3.1e	10.9±2.0d	26.3±3.0abc	58.6±3.3d
I 4				0.0g
I 4- II 1	29.3±4.0a	30.3±2.5a	31.7±1.5a	65.2±3.5c
I 4- II 2	15.7±3.8d	18.3±3.8c	25.1±4.9abcd	68.2±2.6c
I 5				0.0g
I 5- II 1	9.3±3.5e	10.6±2.7d	28.1±1.6ab	81.6±1.7b
I 5- II 2	20.3±4.0cd	21.0±4.4bc	28.3±4.1ab	82.8±3.0b
I 6				0.0g
I 6- II 1	25.3±4.5abc	28.7±3.2a	29.9±4.6ab	88.5±1.3a
I 6- II 2	23.3±3.5abc	25.3±4.7ab	27.8±5.2ab	86.2±2.2ab

¹⁾ I 1: 0.1 mg·L⁻¹TDZ-0.1 mg·L⁻¹IAA; I 2: 0.1 mg·L⁻¹TDZ-0.5 mg·L⁻¹IAA; I 3: 0.5 mg·L⁻¹TDZ-0.1 mg·L⁻¹IAA; I 4: 0.5 mg·L⁻¹TDZ-0.5 mg·L⁻¹IAA; I 5: 1.0 mg·L⁻¹TDZ-0.1 mg·L⁻¹IAA; I 6: 1.0 mg·L⁻¹TDZ-0.5 mg·L⁻¹IAA; II 1: 0.1 mg·L⁻¹IAA-1.0 mg·L⁻¹GA₃; II 2: 0.5 mg·L⁻¹IAA-1.0 mg·L⁻¹GA₃。

²⁾ 数据为叶片在培养基I上连续培养7周或分别培养1、2、3或4周后再转接至培养基II上培养3周后的不定梢诱导率。These data indicate induction rate of adventitious shoot from leaves cultured continuously on medium I for seven weeks, or cultured on medium I for one, two, three or four weeks, respectively and then cultured on medium II for three weeks; 同列中不同的小写字母表示差异显著(P<0.05) Different small letters in the same column indicate the significant difference (P<0.05)。

2.1.1 培养方式的影响 由表1可见,采用一步培养法在6种培养基I上连续培养7周后叶片均没有分化出不定芽,仅能产生由黄白色变为褐色的愈伤组织;而采用两步培养法,将在培养基I上培养不同时间的外植体转移到培养基II上后,所有处理组都能诱导产生不定梢,但各处理组不定梢的诱导率不同。说明两步培养法对‘孔府酥脆’枣叶片不定梢诱导是有效的。

2.1.2 培养基中激素配比的影响 由表1还可见,叶片在培养基I上培养4周后,培养基I中TDZ的质量浓度对不定梢的诱导率有显著影响,随着TDZ质量浓度提高,不定梢的诱导率显著增加。培养基I中生长素IAA的质量浓度对叶片不定梢的诱导率也有明显影响,在TDZ质量浓度较低(0.1和0.5 mg·L⁻¹)的培养基中添加0.5 mg·L⁻¹ IAA,不定梢的诱导率显著高于添加0.1 mg·L⁻¹ IAA的培养基;但在TDZ质量浓度较高(1.0 mg·L⁻¹)的培养基中添加不同质量浓度的IAA,不定梢诱导率的差异不大。

培养基II中IAA的质量浓度对提高不定梢诱导率基本没有作用,但对不定梢的生长势有一定影响。在添加了0.5 mg·L⁻¹ IAA的培养基II上诱导培养比在含0.1 mg·L⁻¹ IAA的培养基II上更有利于不定梢的伸长生长,这可能与一定浓度的生长素具有促进细胞伸长、刺激生长的功能有关^[7-8]。

2.1.3 在培养基I上不同培养时间的影响 由表1可见,叶片在培养基I上培养1、2或3周后再转接到培养基II上培养,不定梢的诱导率均较低,绝大部分处理组的不定梢诱导率在30%以下;而在培养基I上培养4周的叶片不定梢的诱导率则大幅度提高,表明适当延长在培养基I上的培养时间对不定梢诱导率的提高有一定作用。另外,为明确TDZ在‘孔府酥脆’枣叶片不定梢诱导培养过程中的作用,作者还将叶片在含1.0 mg·L⁻¹ TDZ的培养基I上的培养时间延长至3个月和4个月,均没有观察到不定芽形成,但将叶片转移到培养基II上培养1周后即可观察到不定梢,转接2周后不定梢的诱导率可达60%以上,说明培养基II与‘孔府酥脆’枣叶片不定芽分化启动有关。

2.2 不定梢的增殖和生根

将获得的不定梢转移到增殖培养基上继续培养,不定梢的增殖生长和伸长生长状况均较好,月增殖倍数约为3。生根培养基中其他成分保持一致,分别添加30和20 g·L⁻¹蔗糖,不定梢的生根率分别为89.9%和81.4%,每株生根数分别为2.8和2.3,显示生根培养基中蔗糖的质量浓度对不定梢的生根有显著影响,较高的蔗糖浓度有利于不定梢生根。

3 讨论和结论

虽然枣树叶片不定梢诱导已在一些品种或类型上获得了成功^[1-4, 9-10],但因基因型的不同,所采用的不定梢诱导方法也有所不同,获得的再生率也各不相同。陈宗礼等^[1]以MS为基本培养基,采用两步培养方法获得了‘沾化冬枣’不定梢,不定梢的再生率为40%;而Gu等^[2]以WPM为基本培养基,采用一步培养方法使‘沾化冬枣’不定梢再生率最高可达89.5%;以MS为基本培养基,采用两步培养方法获得的‘黄骅冬枣’不

定梢的再生率达92.5%^[3];而以WPM为基本培养基,采用两步培养方法获得的酸枣不定梢的再生率为100%^[4-5];通过先诱导叶片不定根,再由不定根诱导不定芽也成功获得了‘赞皇大枣’不定梢植株,但再生率很低,在20%以下^[9]。这些结果均表明,基因型和培养方法对枣树叶片不定梢的再生都有重要影响。本研究中,采用两步培养法的‘孔府酥脆’枣叶片不定梢的再生率较高,与已报道的能获得较高不定梢再生率的两步培养方法相似^[3-5],都在含细胞分裂素的培养基上培养一定的时间,然后转接至含生长素和赤霉素的培养基上培养。

综合考虑不定梢诱导率及其生长势,确定‘孔府酥脆’枣离体叶片不定梢诱导的最佳培养方法为采用两种培养基(培养基I和培养基II)的两步培养法。其中,最佳培养基I为含1.0 mg·L⁻¹ TDZ和0.5 mg·L⁻¹ IAA的WPM培养基,最佳培养基II为含0.5 mg·L⁻¹ IAA和1.0 mg·L⁻¹ GA₃的WPM培养基。本实验结果为‘孔府酥脆’枣的工厂化育苗及采用生物技术手段改良品种提供了技术基础。这一培养方法也为不同枣品种叶片的不定梢诱导提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 陈宗礼, 延志莲, 薛皓, 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] Gu X F, Zhang J R. An efficient adventitious shoot regeneration system for Zhanhua winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) using leaf explants[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23(12): 775-779.
- [3] 周瑞金, 刘孟军. 枣离体叶片高效再生植株的研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 625-628.
- [4] 王妍, 孙清荣, 王元征, 等. 泰山酸枣离体叶片再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2009, 29(10): 2118-2122.
- [5] 孙清荣, 孙洪雁, 张力思, 等. 酸枣叶片不定梢形成及玻璃化的影响因素[J]. 西北植物学报, 2010, 30(5): 1039-1044.
- [6] Lloyd G B, McCown B H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture[J]. Proceedings of the International Plant Propagators' Society, 1980, 30: 421-427.
- [7] 叶梅荣, 甘立军, 夏凯. 生长素和赤霉素对离体水仙花茎切段伸长的影响[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(5): 421-426.
- [8] 叶梅荣, 甘立军, 夏凯. 源于大蒜花苞的生长素对蒜薹伸长的促进作用[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1241-1245.
- [9] 李云, 王宇, 田砚亭, 等. 赞皇大枣叶片再生植株的初步研究[J]. 核农学报, 2003, 17(3): 187-190.
- [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.

(责任编辑: 佟金凤)