

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.05.006

武隆猪腰枣的组织培养研究^①

夏清清¹, 刘蓝筠¹, 孙海艳¹, 何桥¹,
李晓林¹, 梁国鲁¹, 朱恒星², 郭启高¹

1. 南方山地园艺学教育部重点实验室/西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 重庆市林业科学院, 重庆 400036

摘要: 以武隆猪腰枣为试材, 以茎尖、带芽茎段、节间和叶片为外植体, 开展了组织培养研究. 结果表明, 外植体以带芽茎段最好; 适宜的初代培养基以 1/2 MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA, 接种的带芽茎段萌芽快, 其愈伤组织的不定芽再生率达 53.3%; 最佳不定芽继代培养基为 MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA, 增殖系数达 3.77; 不定芽在 1/2 MS+0.3 mg/L IBA 和 1/2 MS+0.3 mg/L IBA+10 g/L AC 培养基上生根效果较好, 生根率达 90%~96.67%.

关键词: 武隆猪腰枣; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S665.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0037-06

枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)是原产我国且独具特色优势的重要果树^[1], 是一种以无性繁殖为主的树种. 武隆猪腰枣因产自武隆、形似猪腰(猪肾)而得名, 是重庆市目前唯一通过省级审定的适合南方栽培的早熟鲜食优良枣品种^[2], 颇受消费者青睐, 2011 年荣获国家农产品地理标志认定^[3], 种植面积逐年增加. 但在生产上, 由于长期采用根蘖繁殖, 出现了株系之间良莠不齐、枣疯病频发和枣果变小等问题^[2]; 同时, 猪腰枣花小、座果率低、胚败育率高, 传统杂交育种难以实现种质创新. 因此, 品种的提纯复壮与改良, 进而为生产上提供优质种苗, 已成为猪腰枣产业可持续发展的关键所在.

组织培养是植物脱毒复壮和快繁种苗的有效手段. 目前, 红枣、金丝小枣和酸枣等枣属植物的组织培养已获成功^[4], 而猪腰枣的研究基础十分薄弱, 仅有其分布状况、品种特性、栽培技术、优良单株筛选和遗传多样性分析等方面的研究^[2, 5-7], 尚无组织培养的相关报道. 本试验开展了猪腰枣的组织培养研究, 以期建立其离体再生体系, 为猪腰枣的离体快速繁殖和品种改良奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为武隆猪腰枣(*Zizyphus jujuba* Mill. cv. Wulongzhuyaozao)枝条, 采自西南大学果树学重点实验室种质资源圃.

1.2 方法

1.2.1 外植体的表面消毒

选取生长健壮、无病虫害的一年生枝条为试材. 将采集的枝条, 用 0.1% 洗涤剂溶液浸泡 15 min, 自来水洗净, 剪成长约 10 cm 的枝段. 无菌条件下, 枝条去叶, 剪取长 1~2 cm 的茎尖、带芽茎段和节间, 幼叶剪成 0.5×0.5 cm² 叶片. 然后将茎尖、带芽茎段、节间和叶片等 4 种外植体分别用 75% 乙醇和 0.1% HgCl₂ 消毒不同时间(表 1), 无菌水冲洗 4~5 次, 沥干后接种到 1/2 MS 培养基上培养. 每个处理接种不同

① 收稿日期: 2016-02-20

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目(cstc2013yykfB80009).

作者简介: 夏清清(1989-), 女, 重庆渝北人, 硕士研究生, 主要从事果树遗传育种相关研究.

通信作者: 郭启高, 副研究员.

外植体 10 个, 重复 3 次. 20 d 后统计污染率和成活率, 未被污染的外植体转入初代培养.

1.2.2 初代培养基的筛选

预试验结果表明, 带芽茎段在 B₅ 和 MS 基本培养基中比在 1/2 MS 培养基中萌芽慢、长势弱、愈伤少. 因此, 本试验初代培养中, 以 1/2 MS 为基本培养基. 初代培养基由 1/2 MS 添加不同浓度的 BA、NAA 和 2, 4-D 组成(表 2). 每个培养基接种茎尖等外植体各 10 个, 重复 3 次. 30 d 后统计愈伤组织诱导率(出愈率)、芽萌动率和不定芽再生率(再生率).

$$\text{出愈率}(\%) = \text{产生愈伤组织的外植体数} / \text{接种外植体数} \times 100\%$$

$$\text{芽萌动率}(\%) = \text{侧芽萌发的外植体数} / \text{成活的外植体数} \times 100\%$$

$$\text{再生率}(\%) = \text{愈伤组织产生不定芽的外植体数} / \text{接种外植体数} \times 100\%$$

1.2.3 不定芽继代培养基的筛选

无菌条件下, 将初代培养获得的不定芽幼茎(长 1~2 cm)切成长 0.5~1.0 cm 的单个不定芽, 分别接种到含不同浓度 BA 和 IBA 的 MS 培养基(表 3)培养. 每个培养基接种不定芽 10 个, 重复 3 次. 30 d(形成丛芽)后统计繁殖系数.

$$\text{繁殖系数(倍)} = \text{分化产生的总芽数} / \text{接种外植体数}$$

1.2.4 不定芽生根培养基的筛选

无菌条件下, 分离、切割丛芽. 选取长势良好、长 3~4 cm 的健壮不定芽接入含不同浓度 IBA 及活性炭(AC)的 1/2 MS 培养基中(表 4). 每个培养基接种不定芽 10 个, 3 次重复. 培养 30 d 后统计生根率、平均根数和根长.

1.2.5 试管苗的炼苗与移栽

将试管苗培养瓶从光照培养箱中取出, 置于温度为 25 ℃ 左右、相对湿度为 70%~80% 的实验室内, 逐渐揭开封口炼苗 5~7 d, 随后洗净试管苗根部琼脂, 移栽到盛蛭石和腐殖质土(体积比为 1:1)的营养钵中, 30 d 后统计成活率.

1.2.6 培养条件与数据处理

培养基中添加蔗糖 30g/L, 卡拉胶 7g/L; 培养温度为 25±2 ℃, 光照强度为 2 500~2 600 lx(14 h/d), 相对湿度 70%~80%.

采用 SPSS 12.0 软件对试验数据进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 外植体表面消毒

采用不同浓度的表面消毒剂处理, 随着消毒时间的延长, 外植体的污染率降低, 但成活率也随之降低(表 1). 在不同消毒处理中, 节间和茎尖外植体以 75%乙醇 10 s+0.1% HgCl₂ 8 min 效果最好, 成活率分别达 90%和 60%; 带芽茎段以 0.1% HgCl₂ 10 min、75%乙醇 10 s+0.1% HgCl₂ 8 min 或 75%乙醇 20 s+0.1% HgCl₂ 5 min 效果最好, 成活率达 53.3%~66.7%; 叶片以 0.1% HgCl₂ 5 min 和 75%乙醇 10 s+0.1% HgCl₂ 5 min 效果最好, 成活率达 46.7%~56.7%.

表 1 不同消毒处理对外植体污染率、成活率的影响

消毒处理时间		节 间		带芽茎段		茎 尖		叶 片	
75%乙醇	0.1% HgCl ₂	污染率/%	成活率/%	污染率/%	成活率/%	污染率/%	成活率/%	污染率/%	成活率/%
0	5 min	50.00A*	40.0E	76.7 A	16.7 E	63.3 A	33.3 D	43.3 A	56.7 A
0	8 min	30.00B	70.0C	36.7 B	63.3 AB	43.3 BC	43.3 BCD	26.7 AB	43.3 BC
0	10 min	20.00BC	56.7D	26.7 BC	66.7 A	33.3 CD	50.0 AB	13.3 BC	33.3 CD
10 s	5 min	23.33BC	76.7 BC	43.3 B	43.3 CD	50.0 B	46.7 BC	26.7 AB	46.7 AB
10 s	8 min	10.0 CDE	90.0 A	33.3C	56.7 AB	40.0 BC	60.0 A	20.0 B	30.0 DE
10 s	10 min	10.0CDE	83.3AB	23.3 BC	46.7 BCD	36.7 C	43.3 BCD	6.7 CD	20.0 DEF
20 s	5 min	16.7 BCD	70.0 C	26.7 BC	53.3ABCD	23.3 D	50.0 AB	3.3 D	26.7 DEF
20 s	8 min	6.7 DE	66.7 CD	20.0 C	36.7 D	23.3 D	43.3 BCD	0.0 D	16.7 FG
20 s	10 min	3.33 E	70.0 C	6.7 D	40.0 D	10.0 E	36.7 CD	0.0 D	10.0 G

注: * 大写字母为 1%极显著差异水平. 下表同.

2.2 初代培养基筛选

在不同初代培养基中,叶片外植体在转接2 d后开始大量黄化,10 d后全部死亡;茎尖15 d后全部死亡.而节间和带芽茎段培养30 d后能够产生愈伤组织和再生不定芽(表2).其中,带芽茎段在1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA培养基中,侧芽萌动率达83.3%,且76.7%的外植体在切口或表皮产生大量愈伤组织,并有53.3%的外植体能由其愈伤组织再生不定芽.因此,猪腰枣组织培养的最佳外植体为带芽茎段,其适宜初代培养基为1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA.

表2 植物生长调节剂对猪腰枣外植体脱分化和再分化的影响

初代培养基 (1/2 MS+, mg/L)	节 间		带芽茎段		
	出愈率/%	再生率/%	芽萌动率/%	出愈率/%	再生率/%
BA 0.5	10.0C*	0.0	33.3B	3.3E	0.0B
BA 0.5+NAA 0.1+2, 4-D 0.1	10.0C	0.0	20.0B	13.3DE	0.0B
BA 0.5+NAA 0.2+2, 4-D 0.2	33.3B	0.0	16.7B	30.0CD	0.0B
BA 1.0+2, 4-D 0.1	33.3B	0.0	20.0B	46.7BC	10.0B
BA 1.0+NAA 0.1+2, 4-D 0.2	60.0A	0.0	20.0B	56.7B	6.7B
BA 1.0+NAA 0.2	63.3A	0.0	83.3A	76.7A	53.3A
BA 2.0+2, 4-D 0.2	46.7AB	0.0	13.3B	30.0CD	0.0B
BA 2.0+NAA 0.1	10.0C	0.0	13.3B	23.3D	0.0B
BA 2.0+NAA 0.2+2, 4-D 0.1	30.0BC	0.0	16.7B	26.7CD	3.3B

在初代培养过程中,茎尖4 d后开始缢缩白化(图1-a),15 d后全部死亡;部分节间15 d后表皮和切口可形成大量愈伤,但未见不定芽的再生(表2);带芽茎段5 d左右侧芽开始萌动,15 d可长至2~3 cm(图1-b, c),部分外植体在表皮和切口形成大量愈伤,15 d左右开始抽生不定芽(图1-d),30 d后可长至1 cm左右(图1-e, f).



a. 茎尖缢缩白化; b-c. 带芽茎段芽萌动抽生; d. 茎段愈伤及不定芽发生; e-f. 茎段不定芽生长.

图1 猪腰枣茎尖、带芽茎段的初代培养

2.3 不定芽继代培养基筛选

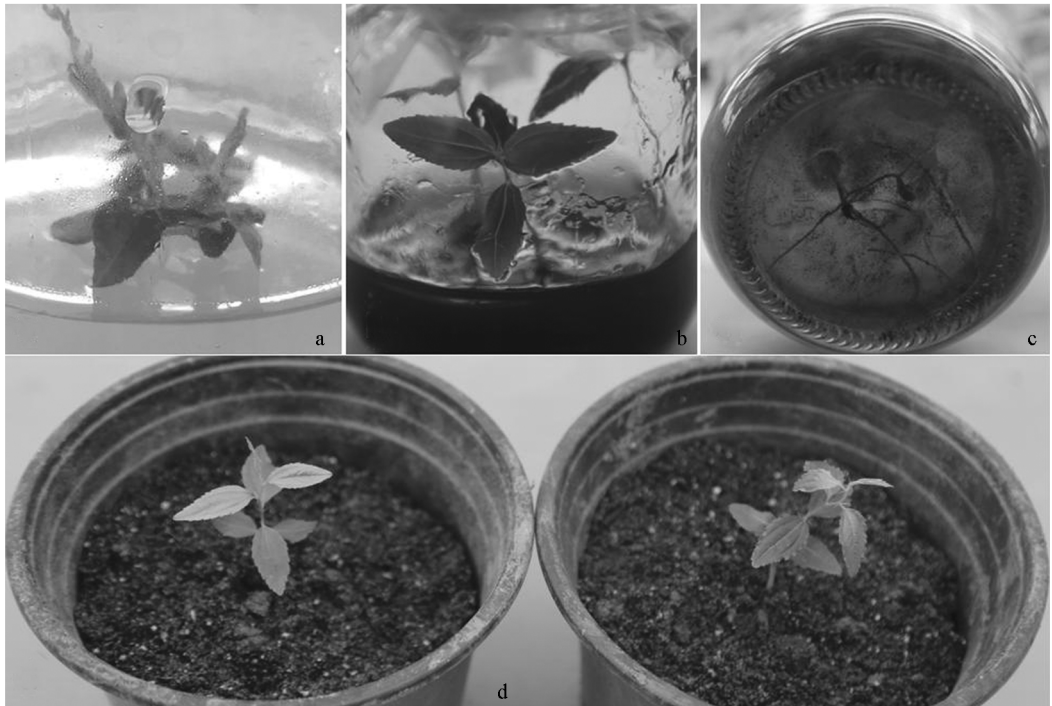
不定芽在继代培养过程中,7~10 d开始伸长,基部长出愈伤组织,15~20 d愈伤组织产生淡绿色芽

点,并逐渐分化出不定芽,30 d 形成明显丛芽。

1 代(30 d)的继代培养表明,不同继代培养基之间不定芽的繁殖系数间差异极显著($p \leq 0.01$),丛芽生长状况存在差异(表 3)。其中,以 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IBA 培养基继代效果最好,平均繁殖系数达 3.77,且不定芽生长健壮,叶色深绿(图 2-a)。因此,猪腰枣不定芽继代培养的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IBA。

表 3 植物生长调节剂对猪腰枣不定芽增殖的影响

继代培养基/(mg·L ⁻¹)	分化总芽数/个	平均繁殖系数/倍	丛芽生长状况
MS+BA 0.5+IBA 0.1	12 BC *	0.90 C	芽少、健壮
MS+BA 0.5+IBA 0.2	6 C	0.70 C	芽少、健壮
MS+BA 0.5+IBA 0.4	3 D	0.33 C	芽少、细弱
MS+BA 1.0+IBA 0.1	19 AB	2.20 B	芽多、细弱
MS+BA 1.0+IBA 0.2	24 A	3.77 A	芽多、健壮
MS+BA 1.0+IBA 0.4	6 C	0.53 C	芽少、细弱
MS+BA 2.0+IBA 0.1	7 C	0.63 C	芽少、细弱
MS+BA 2.0+IBA 0.2	5 C	0.47 C	芽少、健壮
MS+BA 2.0+IBA 0.4	16 BC	0.77 C	芽少、健壮



a. 由单个不定芽增殖形成的丛芽; b-c. 不定芽的生根; d. 营养钵中成活的试管苗。

图 2 猪腰枣的不定芽继代、生根和试管苗移栽

2.4 不定芽生根培养基筛选

将长 3~4 cm 的单个不定芽接种到生根培养基后,7~10 d 不定芽基部开始产生不定根,30 d 可达 3 cm 以上。

试验结果表明,生根培养基中 IBA 和 AC 含量对不定芽生根有显著影响(表 4)。其中,1/2 MS+0.3 mg/L IBA+10 g/L AC 培养基和 1/2 MS+0.3 mg/L IBA 培养基效果最好,生根率达 90%~96.67%,不定根数量平均 3 条,不定根长度平均 3.4 cm 以上,但二者间差异不极显著($p > 0.01$)。因此,猪腰枣不定芽生根的适宜培养基为 1/2 MS+0.3 mg/L IBA+10 g/L AC,或 1/2 MS+0.3 mg/L IBA。

表 4 不同浓度 IBA 与活性炭(AC)组合对猪腰枣不定芽生根的影响

生根培养基/(mg·L ⁻¹)	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
1/2 MS+IBA 0.1	36.37 D*	2.22 C	1.43 D
1/2 MS+IBA 0.1+1%AC	53.33 CD	2.50 BC	1.57 D
1/2 MS+IBA 0.2	63.33 C	2.74 AB	2.56 C
1/2 MS+IBA 0.2+1%AC	73.33 BC	2.82 AB	2.63 BC
1/2 MS+IBA 0.3	90.00 AB	3.03 AB	3.40 A
1/2 MS+IBA 0.3+1%AC	96.67 A	3.17 A	3.47 A
1/2 MS+IBA 0.4	70.00 BC	2.89 AB	2.93 B
1/2 MS+IBA 0.4+1%AC	73.33 BC	2.69 AB	2.90 B

2.5 试管苗炼苗及移栽

经炼苗、洗苗后的试管苗移栽到营养钵后, 30 d 成活率达 85% 以上, 生长正常. 植株叶平展、色浓绿, 株高增加, 部分抽生新叶(图 2-d).

3 讨 论

枣树组织坚硬、生长量小、增粗缓慢, 组织培养较为困难^[8]. 近年来, 枣树的组织培养及应用研究进展迅速. 人们在 30 余个品种的无菌短枝扦插、近 30 个品种的器官发生、少数品种的体胚发生^[4]、花药培养^[9]、胚乳培养^[10]、离体多倍体诱导^[11-13]和人工种子^[14]研究等方面均取得了可喜进展. 随着枣全基因组测序的完成^[15], 采用基因工程技术将加速枣的种质创新和新品种选育. 而离体再生体系的建立是植物基因工程的基础与前体. 目前, 枣不同基因型、不同外植体的再生体系尚不稳定, 培养基、培养条件需要优化. 同时, 通过外植体经愈伤组织直接再生植株的报道不多, 这对提高枣的离体繁殖效率有一定限制.

同一植物中由于组织成熟度不同, 脱分化能力也存在一定差异, 一般越幼嫩的组织较成熟组织容易脱分化. 因此, 枣茎段培养时一般是取幼嫩茎段作外植体. 枣的初代培养多采用 MS 培养基为基本培养基, 而不同品种组织培养所需激素存在差异, 灰枣的幼嫩茎段添加 1.0 mg/L 6-BA 即可获得较高出愈率, 俊枣却需要添加 4.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA^[16]. 在猪腰枣的组织培养预试验中, 1/2MS 培养基培养效果较好, 而在添加 1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 的条件下能获得较高出愈率及芽萌动率, 与酸枣启动率相当(83.33%)^[17], 高于贵妃枣(71.93%)^[18]. 本试验中虽生根率可达 90% 以上, 与金丝小枣的研究结果相同^[19], 明显高于坛坛枣(75%)^[20], 但增殖系数较金丝枣(4.5)^[19]、梨枣(6.0)^[21]、贵妃枣(9.3)^[18]均较低.

本研究初步建立了猪腰枣的离体再生体系, 获得了不同培养阶段的适宜培养基, 这为猪腰枣的离体快繁、无毒苗繁殖和种质创新后续奠定了基础. 但在本试验中, 不定芽的再生率、继代培养代数(1代)和繁殖系数(3.77)还较低, 不定芽诱导和继代培养基还需进一步筛选, 培养条件还需优化, 继代代数还需增加, 以提高若干无性世代的平均繁殖系数和再生体系的繁殖效率. 另外, 本研究还发现, 猪腰枣茎段可通过形成愈伤, 再形成不定芽的方式进行增殖, 在民勤小枣^[22]及金丝小枣^[23]上也有相同报道, 该发生方式对于构建转化体系具有重要意义.

参考文献:

- [1] 刘孟军, 汪 民. 中国枣种质资源 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2009.
- [2] 陈清华, 罗 平, 程 霞. 武隆猪腰枣产业发展存在的问题及对策研究 [J]. 重庆林业科技, 2010(1): 14-18.
- [3] 孙志国, 黄莉敏, 熊晚珍, 等. 重庆武陵山片区特产的地理标志与文化遗产 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16966-16969.
- [4] 赵 宁, 冯建灿, 叶 霞, 等. 枣组织培养及相关生物技术研究进展 [J]. 果树学报, 2015, 32(6): 1241-1252.
- [5] 洪忠明. 武隆猪腰枣种植技术要点 [J]. 吉林农业, 2011(12): 139.
- [6] 辜夕容, 陈 勇, 李洪飞, 等. 武隆猪腰枣优良单株果实品质的主成分分析及综合评选 [J]. 食品科学, 2012, 33(15): 79-82.
- [7] 孙海艳, 党江波, 何 波, 等. 武隆猪腰枣遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(12):

30—35.

- [8] 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.
- [9] 武晓红, 王玖瑞, 刘孟军, 等. 不同预处理对枣花药愈伤组织诱导的影响 [J]. 华北农学报, 2008, 23(增刊): 43—45.
- [10] 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 1978—1984 [J]. 山东果树, 1985(1): 1—3.
- [11] 王娜, 刘孟军, 代丽, 等. 秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体 [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1008—1012.
- [12] 王娜, 刘孟军, 秦子禹, 等. 提高冬枣和酸枣组培苗诱变效率的几种途径 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 42—44.
- [13] 刘学生, 陈龙, 王金鑫, 等. “苹果枣”自然三倍体倍性的发现与鉴定 [J]. 园艺学报, 2013, 40(3): 426—432.
- [14] 胡芳名, 何业华, 胡中沂. 枣树人工种子的研制 [J]. 林业科学, 2004, 40(6): 181—184.
- [15] LIU M J, ZHAO J, CAI Q L, et al. The Complex Jujube Genome Provides Insights Into Fruit Tree Biology [J]. Nature Communications, 2014(5): 5315.
- [16] 杨伟, 杨宇, 徐崇志, 等. 影响红枣幼茎组培增殖因子的研究 [J]. 北方园艺, 2012(11): 116—119.
- [17] 赵薇. 枣组织培养技术体系的建立 [D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- [18] 李俊, 钟宇, 陈礼清, 等. “贵妃枣”组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. 中国南方果树, 2008, 37(4): 60—62.
- [19] 罗晓芳, 田砚亭, 李云, 等. 金丝小枣组织培养快速繁殖的研究 [J]. 北京林业大学学报, 1996(2): 9—15.
- [20] 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.
- [21] 朱文勇, 杜学梅, 郭黄萍, 等. 梨枣组织培养快繁技术研究 [J]. 中国农学通报, 2001, 17(4): 34—36.
- [22] 程佑发, 王勋陵. 枣愈伤组织诱导和再生植株 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 364—369.
- [23] 聂晓红, 刘贵仁, 严仁玲. 金丝小枣愈伤组织的诱导植株再生以及染色体变异的研究 [J]. 落叶果树, 1990, 22(1): 8—12.

Tissue Culture of Jujube (*Zizyphus jujuba*) Mill. cv. Wulongzhuyaozao

XIA Qing-qing¹, LIU Lan-jun¹, SUN Hai-yan¹, HE Qiao¹,
LI Xiao-lin¹, LIANG Guo-lu¹, ZHU Heng-xing², GUO Qi-gao¹

1. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education /
School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Chongqing Academy of Forestry, Chongqing 400036, China

Abstract: The shoot-tips, mature stem segments with buds, internodes and leaves were used as explants in a study of the tissue culture of jujube (*Zizyphus jujuba*) Mill. cv. Wulongzhuyaozao. The mature stem segments with buds were shown to be the most suitable explants. In the primary culture, 1/2MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA was the best medium, in which the bud sprouted fast, and the rate of adventitious shoot regeneration from the induced calli was 53.3%. The best medium for proliferation was MS+1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA, and the bud multiplication coefficient was as high as 3.77. The adventitious shoots rooted readily on 1/2MS+0.3 mg/L IBA+10 g/L activated carbon, with a rooting percentage of 90%—96.67%. The identification of suitable conditions for tissue culture of Wulongzhuyaozao laid a good foundation for virus elimination, rejuvenation and variety improvement of this jujube cultivar.

Key words: jujube (*Zizyphus jujuba*) Mill. cv. Wulongzhuyaozao; tissue culture; rapid propagation

