

# 枣离体叶片高效再生植株的研究

周瑞金 刘孟军\*

(河北农业大学中国枣研究中心, 河北保定 071001)

**摘要:** 以‘黄骅冬枣’组培苗叶片为试材, 研究了叶片幼嫩程度、叶片来源、组培苗状态以及植物生长调节剂等对离体叶片诱导不定芽再生的影响, 并获得了完整的再生植株。结果表明, 以未生根组培苗中上部叶片再生效果较好; TDZ诱导叶片再生不定芽的效果显著优于BA; 离体叶片在MS + TDZ  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中诱导培养28 d后, 转入MS + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中二次培养, 叶片再生效果最好, 再生率可达92.45%。将叶片再生植株转入MS + BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + KT  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中继代增殖培养, 增殖系数达3.64。以1/2MS + IAA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基诱导生根, 生根率87.1%。生根苗大田移栽成活率达到57%。

**关键词:** 枣; 叶片培养; 植株再生

**中图分类号:** S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 03-0625-04

## Establishment of High-efficient in Vitro Leaf Regeneration System in Chinese Jujube

Zhou Ruijin and Liu Mengjun\*

(Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** Factors affecting in vitro leaf regeneration including age of leaf, source of leaf, condition of tube-plantlet and hormones in culture medium were studied in *Ziziphus jujuba* ‘Huanghua Dongzao’. A high-efficient system of in vitro leaf regeneration was established. The upper and middle leaves from rootless tube-plantlet were easier to regenerate than those from rooted tube-plantlet. The efficiency of TDZ was significantly higher than BA in the induction of adventitious bud from leaf. Leaves should be first induced on MS medium supplemented with TDZ ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and BA ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 28 days, and then transferred to medium MS + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . In this way, the regeneration rate reached 92.45%. MS + BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + KT  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  was suitable for subculture of shoots, with the multiplication coefficient of 3.64. The regenerated plantlets rooted well in 1/2MS medium plus IAA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), with rooting percentage of 87.1%. The survival rate of rooted plantlets in the field was 57%.

**Key words:** Chinese jujube; Leaf culture; Plantlet regeneration

### 1 目的、材料与方法

枣树组织培养研究起步较晚且主要集中于茎尖和茎段培养, 目的多是建立快繁体系。利用离体叶片建立枣的再生体系, 国外迄今尚未见研究报道, 国内也仅在少数几个品种<sup>[1~6]</sup>中有过报道, 但均存在不定芽再生困难、再生率低的问题, 再生率多数只有40%左右, 用于遗传转化有很大局限性。本试验针对上述问题, 通过研究影响叶片离体再生的主要因素, 建立了枣叶片的高效再生体系, 为叶盘法基因转化打下了基础。

收稿日期: 2005 - 05 - 19; 修回日期: 2005 - 07 - 14

基金项目: 国家科技攻关项目 (2001BA502B09-04); 河北省科技攻关项目 (04220111D); 河北农业大学科技将帅计划项目; 河北农业大学科学发展基金项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: kjliu@mail.hebau.edu.cn)

试验材料为优良鲜食枣品种‘黄骅冬枣’（简称冬枣）继代培养 16 代左右的组培苗叶片。继代培养基为 MS+BA  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ （单位下同）+BA 0.2, 45 d 继代 1 次。取组培苗中上部（幼嫩程度试验除外）叶片，垂直于叶中脉横切 3~5 刀，叶背面接触培养基接种于再生培养基上。诱导叶片再生的培养基为 MS+TDZ 2.0+BA 0.5（植物生长调节剂试验除外）。叶片首先在再生培养基中暗培养两周，然后转至光下培养。28 d 后转入分化培养基（MS+BA 0.1+GA<sub>3</sub> 0.05）中进行二次培养。7~10 d 后统计再生情况。不定芽再生率（%）=（不定芽再生叶片数/接种叶片数） $\times 100$ ；平均出芽数=再生不定芽数/接种叶片总数。将分化出的芽丛分割转移到伸长培养基继代培养，30 d 继代 1 次。前述试验所用培养基均附加蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ （北京双旋微生物培养基制品厂生产），pH 5.8，培养温度（25 $\pm$ 2），光照强度 1 000 lx，光周期 14 h $\cdot$ d<sup>-1</sup>。剪取生长健壮的茎段接入生根培养基（1/2MS+IAA 1.0+蔗糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，pH 5.8），培养条件同前。生根苗炼苗后移植于过渡基质（蛭石 腐殖土 田园土=2 1 2）中。试验数据用邓肯氏新复极差法进行差异显著性测验。所有数据分析均采用 SPSS8.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽的诱导和分化

2.1.1 叶片幼嫩程度对再生的影响 由表 1 可以看出，组培苗不同部位的叶片，由于成熟度不同，再生植株的能力存在显著差异。顶部第 1 片嫩叶极易褐化，极少能够甚至不能形成愈伤组织，中部刚刚停长的叶片再生能力最强，上部次之，下部叶片再生能力最弱。

表 1 叶片幼嫩程度对再生的影响

Table 1 Effect of leaf age on bud regeneration of leaf

叶位 Leaf position	叶片外形特征 Character of leaf	接种数 Number of leaf inoculated	再生率 Regeneration rate (%)	平均每叶块出芽数 Adventitious buds per leaf disc
顶部 1 Top Na 1	未展开,黄绿 Folded, yellow-green	70	0	0 b
上部 2~4 Upper Na 2-4	刚伸展开,绿色 Unfolded, green	77	64.94	1.63 $\pm$ 0.27 a
中部 5~7 Middle Na 5-7	刚停长,暗绿 Just stop growing, deep-green	64	71.88	2.41 $\pm$ 0.09 a
下部 8~10 Lower Na 8-10	停长,暗绿 Stop growing, deep-green	43	41.05	1.78 $\pm$ 0.49 a

2.1.2 不同来源叶片对再生的影响 田间植株新生叶片可 100%分化愈伤组织，但愈伤组织呈松散的水浸状，绿色，透明，失水后为白色酥松状，无再生不定芽的能力；田间植株成熟叶片和老叶片也能形成愈伤组织，但出愈率低，分别为 68.6%和 1.1%，亦无分化不定芽的能力。组培苗除顶部未展开的嫩叶外，其它部位叶片均可 100%分化愈伤组织，而且愈伤组织质量高，致密，深绿色，并可分化再生不定芽，再生率均高于 40%。说明冬枣田间叶片不适于用作叶片诱导再生的试材。分析田间植株叶片再生率低的原因，一方面可能是其成熟度高于组培苗叶片，脱分化困难；另一方面，田间叶片接种前必须经过灭菌，可能会降低分化能力。

2.1.3 组培苗生根与否对叶片再生的影响 组培苗在同一种继代培养基中培养时，有个别苗出现生根现象。分别取生根和未生根组培苗的中上部叶片进行诱导，结果出愈率均为 100%。但是，来自生根组培苗的叶片生成愈伤组织较早，前期愈伤组织量较大，浅绿色，致密，后期愈伤组织质量下降，呈松散的颗粒状，无光泽，再生率低，仅为 31.5%，平均每叶块出芽数 1.28 个；而来自未生根组培苗的叶片分化愈伤组织相对较晚，前期量少、颜色较浅、致密，后期愈伤组织颜色深绿、有光泽、致密，再生不定芽较容易，再生率为 54.4%，平均出芽数 2.35 个/叶块。有根试管苗叶片再生不定芽困难，可能是因为试管苗生根后，植株开始走向衰老，体内激素或营养物质发生变化，从而影响叶片再生效果，具体原因还有待于进一步研究。

2.1.4 植物生长调节剂对叶片再生的影响 细胞分裂素类物质 BA 和 TDZ 对诱导叶片再生不定芽的

效果有显著差异，TDZ优于BA。BA与生长素类物质BA结合使用，利于叶片分化不定根，随着BA浓度的增大，不定根再生能力增强。TDZ与BA结合使用时，以TDZ 1.0 + BA 0.1（图版，1）和TDZ 1.0 + BA 0.5再生情况最好，二者差异不显著，从节约成本考虑，认为前者较好。

表 2 不同植物生长调节剂配比对再生的影响

Table 2 Effect of plant growth regulator combination on bud regeneration of leaf

植物生长调节剂 Plant growth regulator(mg · L <sup>-1</sup> )			接种数 Number of leaf inoculated	再生率 Regeneration rate (%)	平均出芽数 Adventitious buds per leaf disc	不定根再生率 Percentage of adventitious root formation (%)
BA	TDZ	BA				
3.0	-	-	48	12.50	0.17 ±0.14 e	0
3.0	-	0.1	40	0	0 e	5.00
3.0	-	1.0	42	0	0 e	50.00
-	0.5	0.1	53	77.36	2.36 ±0.37 c	0
-	0.5	0.5	61	85.24	3.11 ±0.51 b	0
-	1.0	-	53	81.13	2.13 ±0.18 c	0
-	1.0	0.1	53	92.45	4.64 ±0.25 a	0
-	1.0	0.5	51	90.20	4.51 ±0.38 a	0
-	1.0	1.0	62	72.58	1.90 ±0.45 c	0
-	2.0	0.1	59	89.83	1.97 ±0.37 c	0
-	3.0	0.1	51	88.24	0.98 ±0.18 d	0

注：MS为基本培养基。Note: MS as the basic medium.

## 2.2 不定芽的伸长

将以上试验中分化的不定芽继代于不同的伸长培养基中继续培养，结果见表3。BA对试管苗伸长作用不大，高浓度的BA可诱导丛生。但BA浓度为3.0 mg · L<sup>-1</sup>时，试管苗玻璃化现象严重，叶片和茎深绿色，呈水浸状，透明，叶片卷曲。在不附加BA的培养基中，试管苗基部褐化严重，伸长受抑制，尤其在KT 2.0 + BA 0.5中，小老苗现象极为严重。所以KT不宜单独使用，适当浓度的KT和BA结合才能发挥较好的诱导作用。综合比较认为，MS + BA 1.0 + KT 0.5 + BA 0.1为不定芽的最适伸长和增殖培养基（图版，2）。

表 3 不同植物生长调节剂组合对冬枣芽增殖生长的影响

Table 3 Effect of different plant growth regulator combinations on proliferation of plantlet in 'Dongzao'

植物生长调节剂 Plant growth regulator(mg · L <sup>-1</sup> )			接种数 Number of bud inoculated	平均伸长 Elongation (cm)	增殖系数 Multiplication coefficient
BA	KT	BA			
1.0	-	-	141	0.79 ±0.25 c	2.17 ±0.16 e
1.0	-	0.1	120	1.50 ±0.41 b	2.85 ±0.30 d
1.0	-	0.5	138	2.13 ±0.17 ab	2.50 ±0.30 de
1.0	0.5	0.5	129	2.00 ±0.61 ab	2.79 ±0.25 d
-	0.5	0.1	150	0.77 ±0.41 c	2.52 ±0.25 de
1.0	0.5	0.1	150	2.43 ±0.39 a	3.64 ±0.15 c
2.0	-	0.5	150	1.59 ±0.54 b	3.70 ±0.08 c
-	2.0	0.5	120	0.23 ±0.09 c	1.05 ±0.13 f
3.0	-	0.5	159	1.61 ±0.33 b	4.17 ±0.36 b
3.0	0.5	0.5	108	1.82 ±0.25 ab	4.89 ±0.19 a

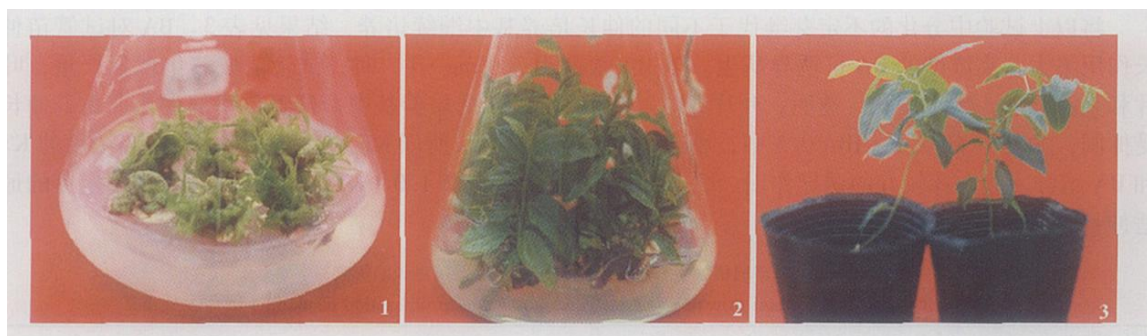
注：MS为基本培养基。Note: MS as the basic medium.

## 2.3 生根及移栽成苗

切取生长健壮的茎段移至生根培养基（1/2MS + IAA 1.0 + 蔗糖 20 g · L<sup>-1</sup> + 琼脂 3.0 g · L<sup>-1</sup>，pH 5.8），生根率达87.1%，平均每株不定根数达4.30条，平均根长为1.46 cm。当小苗有3条以上正常根，苗高达3~5 cm时，即可进行移栽。移栽基质为蛭石 腐殖土 田园土 = 2 1 2，保湿栽培。过渡移栽30 d后，将小苗移入大田，移栽成活率达57%（图版，3）。

## 参考文献:

- 1 陈宗礼, 延志莲, 薛 皓, 冯晓东, 陈国梁, 曹娟云. 沾化冬枣叶片培养和植株再生. 植物生理学通讯, 2002, 38 (6): 584  
Chen Z L, Yan Z L, Xue H, Feng X D, Chen G L, Cao J Y. In vitro culture of leaves and plantlet regeneration of *Ziziphus jujuba* var. Zhanhua Dongzao. Plant Physiology Communications, 2002, 38 (6): 584 (in Chinese)
- 2 何振艳, 王玉国, 石武良, 尹美强. 山西特有品种梨枣叶片的组织培养及植株再生. 植物生理学通讯, 2002, 38 (5): 457  
He Z Y, Wang Y G, Shi W L, Yin M Q. Tissue culture and plantlet regeneration of leaf of *Ziziphus jujuba*. Plant Physiology Communications, 2002, 38 (5): 457 (in Chinese)
- 3 李 云, 王 宇, 田砚亭, 王树芝. 赞皇大枣叶片再生植株的初步研究. 核农学报, 2003, 17 (3): 187 ~ 190  
Li Y, Wang Y, Tian Y T, Wang S Z. A preliminary study on the plant regeneration from leaves of Zanhuan jujube. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2003, 17 (3): 187 ~ 190 (in Chinese)
- 4 程佑发, 安黎哲, 浦铜良, 王勋陵. 枣愈伤组织诱导和再生植株. 西北植物学报, 2000, 20 (3): 364 ~ 369  
Cheng Y F, An L Z, Pu T L, Wang X L. Induction of callus and plant regeneration of *Ziziphus jujuba* Mill. Acta Bot Boreali-Occident Sin, 2000, 20 (3): 364 ~ 369 (in Chinese)
- 5 何业华, 胡芳名, 谢碧霞, 何 钢, 杨 伟, 胡中沂. 枣树愈伤组织培养时不定根的分化. 经济林研究, 1999, 17 (3): 11 ~ 14  
He Y H, Hu F M, Xie B X, He G, Yang W, Hu Z Y. Differentiation of adventitious roots in jujube callus culture. Economic Forest Researches, 1999, 17 (3): 11 ~ 14 (in Chinese)
- 6 李登科, 杜学梅, 王永康, 隋串铃, 贺晋瑜. 六月鲜枣愈伤组织诱导及胚状体发生. 果树学报, 2004, 21 (5): 414 ~ 418  
Li D K, Du X M, Wang Y K, Sui C L, He J Y. Callus induction and embryogenesis of *Ziziphus jujuba* cv. Liuyexian. Journal of Fruit Science, 2004, 21 (5): 414 ~ 418 (in Chinese)



图版说明: 1. 再生不定植株; 2. 分化的不定植株继代增殖培养; 3. 移栽生根再生植株。

**Explanation of plates:** 1. Regeneration shoots of leaf; 2. Elongated shoots in the elongation medium; 3. Regenerated plants were transplanted into vermiculite.