

# 酸枣成熟胚离体培养研究

韩丽媛, 管少花, 张娅君, 李继东, 冯建灿\*

(河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了建立酸枣成熟胚离体培养再生体系, 以酸枣成熟胚为试验材料, 研究启动培养基和增殖培养基对不同贮藏处理酸枣成熟胚萌芽率及增殖的影响。结果表明: 以常温保存 1 a 的成熟胚萌芽率较高(57.78%), 最佳启动培养基为不添加任何植物激素的 MS 培养基, 而最适增殖培养基为 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+1.5 g/L PVP。

**关键词:** 酸枣; 成熟胚; 组织培养

中图分类号: S665.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0118-04

## Culture of Mature Embryo of Sour Jujube (*Zizyphus spinosa* Hu.) in Vitro

HAN Li-yuan, GUAN Shao-hua, ZHANG Ya-jun, LI Ji-dong, FENG Jian-can\*

(College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The regeneration system of sour jujube (*Zizyphus spinosa* Hu.) in vitro, including the optimal initiation and proliferation medium, were investigated by using mature embryos as explants to estimate the germination rate and proliferation rate. The results showed that the higher germination rate of mature embryos was obtained by cultivation of mature embryos kept a year at normal temperature on MS medium. The optimal medium for starting culture was hormone-free MS. The appropriate medium for proliferation of seedlings was 1/2MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA, 0.3 mg/L NAA and 1.5 g/L PVP.

**Key words:** *Zizyphus spinosa* Hu.; mature embryos; tissue culture

酸枣(*Zizyphus spinosa* Hu.)为鼠李科枣属植物,原产我国,古称棘或棗,也称“野枣”。酸枣多为灌木、少乔木,其资源分布较广,具有很强的适应性和抗性,常作为栽培枣的砧木及枣树选种的原始材料<sup>[1]</sup>。酸枣花期长,是很好的蜜源植物,且果肉营养丰富,其叶和种仁均可入药。但是长期以来,由于酸枣一直处于野生状态,其性状类型繁多,很难得到其性状均一的个体。而植物组织培养技术的出现为利用组织培养快速繁殖大量苗木提供了可能<sup>[2-7]</sup>。基于此,本研究以酸枣成熟胚为试验材料,研究不同贮藏条件和启动培养基对酸枣成熟胚萌芽率的影响,以及不同增殖培养基对酸枣胚培苗增殖率的影响,

以期建立酸枣种胚离体组织培养快繁体系,为栽培枣提供性状整齐一致的优良砧木奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以酸枣成熟胚为外植体。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获取 分别将室温保存 1 a 的酸枣成熟胚(带果肉,处理 1)和当年生酸枣成熟胚(处理 2)破壳取出,选取内种皮完整的种胚备用。在超净工作台上,分别将不同贮藏处理的成熟胚用 70%乙醇消毒 30 s,用无菌水冲洗 2 次,然后用

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 河南省杰出青年基金项目(084100410021)

作者简介: 韩丽媛(1986-),女,河南郑州人,在读硕士研究生,研究方向: 生物技术与遗传育种。E-mail: 2286955806@qq.com

\* 通讯作者: 冯建灿(1963-),男,河南新密人,教授,博士,主要从事果树和经济林栽培及良种选育工作。

E-mail: jcfeng@henau.edu.cn

0.1%升汞消毒 5 min,再用无菌水冲洗 3 次后用镊子剥去种皮,备用。

1.2.2 启动培养基的筛选 将不同处理的酸枣成熟胚分别接种于 I 号(MS)、II 号(MS+6-BA 1.0 mg/L)、III 号(1/2MS+6-BA 1.0 mg/L)培养基上,培养基中蔗糖为 30 g/L,琼脂为 6 g/L,pH 值为 5.9。每个处理接种 15 个种胚,重复 3 次;3 周后统计各处理成熟胚在不同培养基上的萌芽率。萌芽率=萌发成熟胚数/接种总胚数×100%。

1.2.3 增殖培养基的筛选 将常温保存 1 a 的种胚再生植株从子叶以上截取接种到不同培养基中,所用培养基以 1/2MS 为基本培养基并添加不同质量浓度的 6-BA、NAA 和聚乙烯吡咯烷酮(PVP),分别如下:IV 号(6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.0 mg/L)、V 号(6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.5 mg/L)、VI 号(6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 2.0 mg/L)、VII 号(6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L+

PVP 1.5 mg/L)、VIII 号(6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.5 mg/L)、IX 号(6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.5 mg/L)、X 号(PVP 1.5 mg/L)。培养基中添加蔗糖 35 g/L,琼脂 6 g/L,pH 值为 5.9。培养 30 d 后观察比较不同培养基对酸枣组培苗增殖及褐化、玻璃化的影响。

1.2.4 培养条件 培养条件均为温度 28℃,光照强度 1 400~1 600 lx,光照时间 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同贮藏条件和启动培养基对酸枣种胚萌芽率的影响

酸枣成熟胚接种 1 周后开始萌发(图 1A 和 B),10 d 后真叶出现(图 1C),且室温保存 1 a 的成熟胚萌芽率高于当年生成成熟胚(表 1)。分析产生这种现象的原因是常温休眠处理可使种胚充分后熟,可以适当提高种胚活力,从而提高萌芽率。



A、B:刚萌发的胚; C:由胚长出的幼嫩植株

图 1 酸枣种胚萌发及成苗情况

从表 1 可以看出,室温保存 1 a 的成熟胚在 I、II、III 号培养基上的平均萌芽率分别为 57.78%、47.79%和 33.33%,以 I 号的萌芽率最高;当年生成成熟胚在培

养基 I 号、II 号和 III 号上的平均萌芽率分别为 51.11%、42.22%和 31.11%,也以 I 号的萌芽率最高。因此,酸枣胚培养以空白 MS 为最佳启动培养基。

表 1 不同贮藏处理酸枣成熟胚在不同启动培养基中的平均萌芽情况

处理方式	启动培养基类型					
	I		II		III	
	萌芽数/个	萌芽率/%	萌芽数/个	萌芽率/%	萌芽数/个	萌芽率/%
当年生成成熟胚	7.67±0.58	51.11a	6.33±0.58	42.22b	4.67±0.58	31.11c
常温保存 1 a 成熟胚	8.67±1.15	57.78a	7.33±0.58	47.79a	5.00±0.00	33.33b

注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

2.2 不同增殖培养基对酸枣不定芽增殖培养的影响

由表 2 可知,在含有 6-BA 2.0 mg/L 的各种培养基上不定芽均出现不同程度的玻璃化现象,不利于不定芽的生长及增殖,而在 0.5、1.0、1.5 mg/L 时几乎不存在玻璃化现象,但在 6-BA 0.5、1.5 mg/L 时不定芽增殖率较低。6-BA 1.0 mg/L 处理既有效地避免了玻璃化又达到了较好的增殖效果(图 2 A)。酸枣不定芽

在含有 1.0 g/L PVP 的培养基上褐化现象严重,而在含有 1.5、2.0 g/L PVP 的培养基上褐化现象均得到了有效的抑制,考虑到试验成本,以 1.5 g/L PVP 为宜。VIII 号培养基(1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.5 g/L)为最佳增殖培养基。

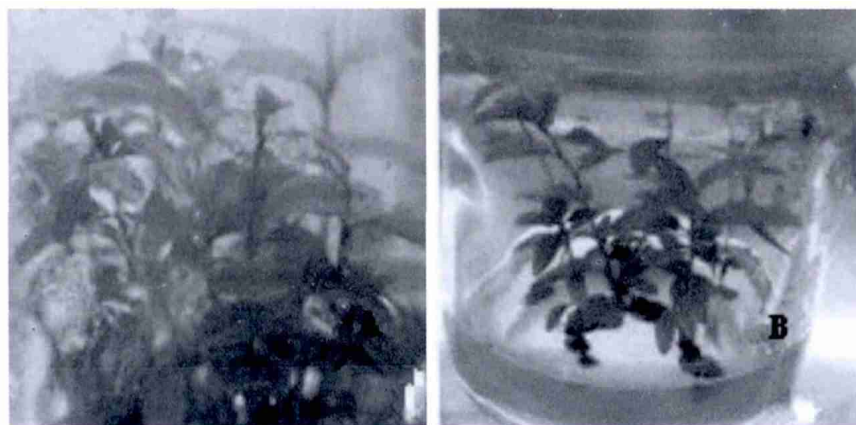
同时发现,不定芽在 X 号培养基(即 1/2MS+PVP 1.5 g/L)上叶片较大,呈深绿色,叶脉清晰

(图 2B),但其增殖率很低,这可能与酸枣的特性有关。因此,在酸枣的组织培养中,以Ⅷ号培养基进

行增殖培养,此后可将扩繁出的不定芽接种在Ⅹ号培养基上进行壮苗培养。

表 2 不同增殖培养基对酸枣不定芽增殖率的影响

培养基编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	PVP/(g/L)	不定芽生长情况
Ⅳ	2.0	0.3	1.0	褐化现象严重,有玻璃化,增殖倍数低
Ⅴ	2.0	0.3	1.5	叶片较小,有玻璃化,增殖倍数低
Ⅵ	2.0	0.3	2.0	叶片较小,有玻璃化,增殖倍数低
Ⅶ	1.5	0.3	1.5	增殖倍数一般,叶片较小
Ⅷ	1.0	0.3	1.5	增殖倍数高,长势好
Ⅸ	0.5	0.3	1.5	叶片较小,增殖倍数很低
Ⅹ	0	0	1.5	叶片深绿,叶脉清晰,但不增殖



A: Ⅷ号培养基上的不定芽; B: Ⅹ号培养基上的不定芽

图 2 酸枣成熟胚增殖培养情况

### 3 结论与讨论

本试验结果表明,经过室温保存 1 a 的酸枣成熟胚的萌芽率高于当年生成熟胚的萌芽率,这可能是由于酸枣果实成熟时种子内有抑制其萌发的物质存在,而通过贮藏过程中的生理生化变化,抑制物得到分解、转化的缘故。另外,不同启动培养基对种胚萌芽率的影响也有所不同,本试验所设定的 3 种启动培养基中,种胚在空白 MS 和附加 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上的平均萌芽率差别不大,而在附加 1.0 mg/L 6-BA 的 1/2MS 培养基上的萌芽率相对较低,表明酸枣种胚萌发时需要较高浓度的无机盐,这一结果与张存智等<sup>[8]</sup>、祁业凤等<sup>[9-10]</sup>的试验结果相一致;外源激素对酸枣种胚的萌芽率无明显的促进作用,这与段乃彬等<sup>[11]</sup>的研究结果相同;祁业凤等<sup>[9]</sup>研究也表明,添加激素组合的培养基培养效果不如无激素培养基,这说明种胚的萌发主要依靠子叶提供的内源激素。

本试验研究了不同质量浓度 6-BA 对酸枣组培苗增殖的影响,结果发现酸枣组培苗在 6-BA 2.0 mg/L 时玻璃化现象严重,且增殖率较低,以 1.0

mg/L 的 6-BA 较适宜,这与王国平等<sup>[12]</sup>、孙清荣等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。但赵薇<sup>[14]</sup>和代丽等<sup>[15]</sup>研究指出,酸枣茎段再生植株的最佳增殖培养基为附加 6-BA 2.0 mg/L 的 MS 培养基,这可能是因为不同部位外植体诱导出的新生苗分化时对营养条件的需求存在差异。

此外,针对酸枣组培苗培养过程中出现的褐化现象,金竹萍等<sup>[16]</sup>在进行六月鲜胚培养时分别在培养基中加入活性炭(AC)、维生素 C 和 PVP 3 种抗褐化剂,结果显示,以 PVP 的抗褐化效果最好。本试验以 PVP 作为抗褐化剂,比较了不同质量浓度 PVP 对褐化的抑制效果,结果证明,PVP 在 1.0 g/L 时褐化现象严重,而 1.5 g/L 和 2.0 g/L 处理均可有效防止褐化。综合考虑,认为在酸枣的增殖培养基中加入 1.5 g/L PVP 可有效预防褐化现象。

综上所述,适合酸枣胚培养的启动培养基为 MS 培养基,增殖培养基为 1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+PVP 1.5 g/L。

#### 参考文献:

[1] 王永惠. 中国果树志——枣卷[M]. 北京:中国林业出

- 版社,1993.
- [2] 郑艳红,王姝,刘仲齐. 番茄下胚轴和子叶组织培养及植株再生的研究[J]. 天津农业科学,2012,18(1):16-18.
- [3] 孙宁,赵新海,陈小强,等. 小麦成熟胚离体培养研究[J]. 天津农业科学,2011,17(2):15-17.
- [4] 郝建平,裴雁曦. 甜荞离体胚培养研究[J]. 山西农业科学,1999,27(2):20-22.
- [5] 戴桂林,田建宝. 早熟杏胚培养技术研究[J]. 山西农业科学,1996,24(4):17-19.
- [6] 王彦霞,王省芬,马峙英. 影响棉花幼胚(珠)离体培养及植株建成的因素分析[J]. 华北农学报,2006,21(增刊):37-40.
- [7] 李宏潮,胡道芬. 影响小麦成熟胚培养因素的研究[J]. 华北农学报,1990,5(1):22-27.
- [8] 张存智,王发林,牛彩霞,等. 陇东马牙枣幼胚培养[J]. 果树学报,2008,25(3):418-421.
- [9] 祁业凤,刘孟军. 枣胚培养影响因素研究[J]. 果树学报,2004,21(1):25-28.
- [10] 祁业凤. 枣胚败育机理及胚培养研究[D]. 保定:河北农业大学,2002.
- [11] 段乃彬,王永清. 枣树胚离体培养的研究[J]. 四川林业科技,2002,23(2):42-45.
- [12] 王国平,李晓梅,马会勤. 枣幼胚子叶再生植株的研究[J]. 核农学报,2008,22(2):152-155.
- [13] 孙清荣,刘庆忠,赵红军. 酸枣的组织培养与快繁[J]. 落叶果树,2001(6):1-2.
- [14] 赵薇. 枣组织培养技术体系的建立[D]. 保定:河北农业大学,2007.
- [15] 代丽,刘孟军,王玖瑞,等. 酸枣组培快繁研究[J]. 河北农业大学学报,2005,28(2):19-22.
- [16] 金竹萍,王永康,郝建平,等. 六月鲜枣的幼胚培养[J]. 生物技术通报,2006(6):108-110.

(上接第 116 页)

- [4] 高水平. 芍药切花采后技术研究[D]. 北京:北京林业大学,2006.
- [5] 王荣花,赵海军,庞冉琦,等. 低温贮藏对芍药切花衰老生理的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(9):55-59.
- [6] 魏潇潇,刘燕,高荣孚. 芍药切花贮存过程中抗氰呼吸变化及其作用的研究[J]. 北京林业大学学报,2007,29(6):206-210.
- [7] 王荣花,刘雅莉,李嘉瑞. 不同发育阶段牡丹和芍药切花开花生理特性的研究[J]. 园艺学报,2005,32(5):861-865.
- [8] 李霞,张玉刚,郑国生. 芍药切花瓶插期衰老进程及膜脂过氧化研究[J]. 园艺学报,2007,34(6):1491-1496.
- [9] 史国安,郭香凤,张国海,等. 芍药花开放与衰老过程中生理指标的变化[J]. 西北植物学报,2008,28(3):506-511.
- [10] 成仿云,高水平,于晓南. 芍药花蕾成熟及开花的阶段划分与形态类型[J]. 园艺学报,2009,36(4):611-613.
- [11] 刘亚丽,范红军. 生长调节剂对牡丹切花保鲜及生理效应的影响[J]. 湖北农业科学,2006,45(5):627-630.
- [12] 魏秀俭,刘秀婷. 外源 NAA 对芍药切花衰老的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(16):7658-7670.
- [13] 魏秀俭,闫美香,王珍. 水杨酸对芍药切花水分代谢和瓶插寿命的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(28):13808-13809.
- [14] 郭绍霞. 生长调节剂对芍药切花瓶插期渗透调节物质的影响[J]. 北方园艺,2010(14):179-181.
- [15] 孟敏锡. 糖分在玫瑰花采后保鲜中的有害作用[J]. 农业工程学报,2001,1(1):105-109.
- [16] O'Donoghue E M, Somerfield S D, Heyes J A. Vase solutions containing sucrose result in changes to cell walls of sandersonia (*Sandersonia aurantiaca*) flowers[J]. Postharvest Biology and Technology,2002,26(3):285-294.
- [17] 陆奎眉,林金水,谢志明. 不同保鲜液对龙船花切花的保鲜效果[J]. 园艺学报,2010,37(8):1351-1356.
- [18] 蔡蕾,张晓红,沈红香,等. 乙烯对不同切花月季品种开花和衰老的影响[J]. 园艺学报,2002,29(5):467-472.
- [19] 郭秀璞,史国安,李雪英. 保鲜剂对牡丹切花水分状况及衰老的影响[J]. 经济林研究,2005,23(2):27-29.
- [20] 贾培义,周琳,董丽. 瓶插液对储藏后牡丹“洛阳红”切花瓶插品质的影响[J]. 中国农学通报,2006,22(2):267-270.