

郎家园小枣组织培养的研究

纪书琴¹, 冯社章¹, 陈兰芬¹, 顾志亮²

(1. 北京农业职业学院, 北京 102442; 2. 北京市房山区林果科技服务中心, 北京 102400)

摘要:对郎家园小枣进行消毒、组培苗增殖以及促进生根试验, 结果表明: 水培休眠期一年生枝的幼芽作为外植体材料, 升汞处理 5~6 min, 其污染率仅为 5%; 继代培养 30 d 期间, MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 + CM 50 mL/L 增殖培养基处理的组培苗生长最快, 其生长高度为 (4.30 ± 0.46) cm, 且生长健壮, 叶色正常; 0.5 MS + IBA 1.5 的生根培养基在产生愈伤组织、产生根系数量以及根系生长长度三个方面均表现出良好的效果。处理 21 d 后的愈伤组织直径达 (0.45 ± 0.04) cm; 根系数量多达 (5.0 ± 0.82) 条。

关键词: 郎家园小枣; 组培; 增殖; 生根; 培养基; 外植体

中图分类号: S665.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0113-05

Study on Tissue Culture Technology of *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan'

JI Shu-qin¹, FENG She-zhang¹, CHEN Lan-fen¹, GU Zhi-liang²

(1. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China;

2. Forestry Fruit Science and Technology Service Center of Beijing Fangshan District, Beijing 102400, China)

Abstract: For quickly establishing the virus-free lines of *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan', the different explants and surface sterile methods, the effects of different media on the proliferation and the rooting were studied. The results showed that the explants from the water-culturing one-year young shoot tips in dormancy and the surface-sterilization with hydrargyrum solution for 5-6 min showed the best results, which contaminating rate was only 5%. During the 30 d subculture, the plantlets proliferated the best on the medium of MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 + CM 50 mL/L. The plantlet grew (4.30 ± 0.46) cm height and strong with normal leaf color. The rooting medium of 0.5 MS + IBA 1.5 performed good efficiency on callus-inducing, rooting and root length. The diameter of the calli reached to (0.45 ± 0.04) cm and the root number was more than (5.0 ± 0.82) after 3-week culture. The length of the new roots was (4.4 ± 0.33) cm after 6-week culture. Therefore, the explants from the 1-year's shoot tips in dormancy after water-culture, the surface sterile method with hydrargyrum for 5-6 min were proved as the best choice. The better proliferation medium was MS + AC 0.3 g/L supplemented with BA 1.5, KT 0.5 and CM 50 mL/L for the sub-culture and the rooting medium was 0.5 MS + IBA 1.5 in *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan' respectively.

Key words: *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan'; Tissue culture; Proliferation; Rooting; Culture medium; Explant

郎家园小枣 (*Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan') 原产于北京市, 该品种树势中等, 果实长圆形, 果重 8~11 g, 皮薄, 颜色鲜艳, 核小肉厚, 可食率 96%, 肉质细嫩而脆, 汁多味甜, 含水率 68.4%, 含酸率 0.82%, 每 100 g 果肉含维生素 C 95.25 mg, 成熟早, 品质极上, 为中外闻名的鲜食品种^[1]。虽然该品种具有良好的经济性状, 但易患枣疯病^[2], 目前, 已经在茎尖^[3]、茎段^[4]和芽^[5]的培养、花药培养^[6]、原生质体培养^[7]、叶片培养^[8]、胚乳培养^[9,10]等方面

都取得了重要进展。利用组织培养的方法, 不仅可以建立郎家园小枣的脱毒系, 同时还可以加速郎家园小枣苗木的繁育速度。本试验主要对郎家园小枣进行消毒、组培苗增殖以及促进生根试验。

1 材料和方法

1.1 外植体类型筛选及其不同消毒方法试验

1.1.1 休眠期一年生枝茎段病菌污染试验 以冬季已木质化茎段作为外植体材料, 以分别用 70% 酒

收稿日期: 2007-09-10

作者简介: 纪书琴(1973-), 女, 北京人, 在读硕士, 主要从事园林方面的教学与研究工作

通讯作者: 冯社章(1956-), 男, 河北石家庄人, 研究员, 主要从事果树栽培方面的教学与研究工作。

精、0.1%升汞、3%~5%次氯酸钠、吐温 20、无菌蒸馏水等做为消毒材料进行消毒。试验共设置 13 个处理,每个处理试验 20 个茎段。

1.1.2 生长季新梢茎段病菌污染试验 选取生长季嫩茎作外植体材料,用 0.1%升汞($HgCl_2$)以不同的消毒时间进行消毒。试验共设置 6 个处理。

1.1.3 水培休眠期一年生枝幼芽病菌污染试验 该项试验共安排 6 个处理,于休眠期选取已木质化茎段,在纯净水中水培至萌发,用肥皂水冲洗 10~20 min 后,再用自来水冲洗 20~30 min。首先用 70%乙醇进行 30 s 消毒,然后再用 0.1%升汞($HgCl_2$)以不同的消毒时间进行消毒。

1.2 增殖培养基对郎家园小枣组培苗的生长影响试验

1.2.1 不同基础培养基对郎家园小枣组培苗的生长影响 试验共设置 MS + AC 0.3 g/L、0.5 MS + AC 0.3 g/L 和 Vw + AC 0.3 g/L 3 种培养基配方试验处理,于处理后 15 d 调查各处理的苗木生长高度

及苗木生长壮弱程度。

1.2.2 添加不同类型的植物生长调节剂对郎家园小枣增殖的影响 在 MS + AC 0.3 g/L 基础培养基的基础上,再添加不同类型的植物生长调节剂,进行增殖试验分别于处理后 15,30 d 调查各处理的苗木生长高度及苗木生长壮弱程度。

1.2.3 添加不同浓度椰汁培养基对郎家园小枣增殖的影响 本项试验在增殖效果较好的 MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 培养基的基础上,进行了添加 50,100 和 150 mL/L 三种浓度椰汁(CM)增殖试验,分别于处理后 15,30 d 调查各处理的苗木生长高度及苗木生长壮弱程度。

1.3 生根培养基对郎家园小枣组培苗的生根影响试验

该项试验共安排 6 个促进生根的培养基配方处理,每处理接种郎家园小枣组培苗 30 株,试验设置见表 1。于 3 月 6 日在各培养基上进行接种,接种后每隔 7 d 定期调查一次郎家园小枣组培苗的愈伤组织及新根生长情况。

表 1 不同生根培养基对郎家园小枣组培苗的生根试验设置

Tab.1 The arranging of rooting experiment on different of rooting medium for *Ziziphus jujube* Mill CV. Langjiayuan

| 处理 Processes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 培养基配方 Medium formula | 0.5MS + IBA 0.5 | 1/2MS + NAA 0.5 | 1/2MS + NAA 0.5 + 活性炭 | 1/2MS + IBA 1.0 | 1/2MS + NAA 1.0 | 1/2MS + IBA 1.5 |
| 样本数量/株 Sample quantity | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

2 结果与分析

2.1 外植体类型筛选及其不同消毒方法试验

2.1.1 休眠期一年生枝茎段病菌污染试验结果 通过对郎家园小枣休眠期一年生枝的 13 个处理消毒试验,外植体污染率均为 100%。

2.1.2 生长期新梢茎段病菌污染试验结果 通过对冬枣新梢速长期茎段的 8 个处理消毒试验,结果表明,8 个处理的外植体污染率以处理 4 最低为 30%。处理 3,5 次之为 45%。处理 1,2,8 最高,污染率均为 100%(表 2)。

表 2 生长季嫩茎消毒试验结果统计

Tab.2 Theresult analysis on disinfecting experiment on youth stem for growing

| 处理 Processes | 升汞/min $HgCl_2$ | 段数/支 Stem section quantity | 污染段数/支 Pollution quantity | 污染率/% Pollution rate |
|-----------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | 1 | 20 | 20 | 100 |
| 2 | 2 | 20 | 20 | 100 |
| 3 | 3 | 20 | 9 | 45 |
| 4 | 4 | 20 | 6 | 30 |
| 5 | 5 | 20 | 9 | 45 |
| 6 | 6 | 20 | 11 | 55 |
| 7 | 7 | 20 | 16 | 80 |
| 8 | 8 | 20 | 20 | 100 |

2.1.3 水培休眠期一年生枝幼芽病菌污染试验结果 通过对郎家园小枣水培休眠期一年生枝幼芽的 6 个消毒处理试验,结果表明,处理 2,3,4 的外植体

污染率均在 20% 以下,以处理 2,3 最低,污染率仅为 5%(表 3)。

表 3 水培休眠期一年生枝幼芽病菌污染试验结果统计

Tab.3 The result analysis on disinfecting experiment on the water-culturing one-year young shoot tips in dormancy

| 处理 Processes | 酒精/s C ₂ H ₅ OH | 升汞/min HgCl ₂ | 段数/支 Stem section quantity | 污染段数/支 Pollution quantity | 污染率/% Pollution rate |
|-----------------|--|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1 | 30 | 2 | 20 | 6 | 30 |
| 2 | 30 | 4 | 20 | 4 | 20 |
| 3 | 30 | 5 | 20 | 1 | 5 |
| 4 | 30 | 6 | 20 | 1 | 5 |
| 5 | 30 | 7 | 20 | 8 | 40 |
| 6 | 30 | 8 | 20 | 14 | 70 |

2.2 增殖培养基对郎家园小枣组培苗的生长影响试验

2.2.1 不同基础增殖培养基对郎家园小枣的增殖效果 通过对3种基础增殖培养基的增殖效果对比试验,由表4看出,处理1,2的组培苗生长健壮,增殖效果较好,但从叶色分析,处理一的综合效果最好。

2.2.2 不同增殖培养基对郎家园小枣生长长度的影响

通过对添加不同植物生长调节剂和添加不同浓度椰汁的增殖培养基对郎家园小枣生长长度的生长影响试验,可以看出继代培养15d时,处理9苗木极显著高于其他各处理,苗高为(2.74 ± 0.32)cm。继代培养30d时处理7苗木最高,为(4.30 ± 0.46)cm。说明在继代培养前15d期间,以处理9生长最快,继代培养15~30d期间,以处理7生长最快(表5)。

表 4 三种基础增殖培养基的增殖效果

Tab.4 The effect of three kinds of basic proliferation culture medium

| 处理 Processes | 培养基配方 Medium formula | 样本数 Sample quantity | 15 d 平均苗木高度/cm 15 d average altitude | 生长势 Growth |
|-----------------|-------------------------|------------------------|---|---------------|
| 1 | MS + AC 0.3 g/L | 10 | 1.21 ± 0.11 aA | 生长健壮、叶色较绿、呈黄色 |
| 2 | 0.5 MS + AC 0.3 g/L | 10 | 0.94 ± 0.09 aA | 生长衰弱叶色发黄 |
| 3 | Vw + AC 0.3 g/L | 10 | 0.83 ± 0.19 bB | 生长衰弱叶色发黄 |

注:小写字母代表5%的差异显著性;大写字母代表1%的差异显著性,下同

Note: Small letter means difference significance of 5%; Capital letter means difference significance of 1%, the same below

表 5 不同增殖培养基对郎家园小枣生长长度的影响

Tab.5 The effect on length of the different proliferation culture medium for *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan'

| 处理 Processes | 1(CK) | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|---|---|
| 培养基配方 Medium formula | MS + AC 0.3 g/L | MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 | MS + AC 0.3 g/L + KT 0.5 | MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 | MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 + CM 50mL/L | MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 + CM 100 mL/L | MS + AC 0.3 g/L + BA 1.5 + KT 0.5 + CM 150 mL/L |
| 样本数 Sample quantity | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 继代培养 15 d Subculture 15 d | 苗木高度/cm 0.097f | 1.28dD | 0.20f | 1.00eE | 1.99cC | 2.50bB | 2.74aA |
| 标准差/cm | 0.007 | 0.123 | 0.01 | 0.12 | 0.14 | 0.20 | 0.32 |
| 继代培养 30 d Subculture 30 d | 苗木高度/cm 0.10fE | 1.47 dC | 0.49eD | 1.51dC | 4.30 aA | 4.01bA | 3.23cB |
| 标准差/cm | 0.003 | 0.19 | 0.09 | 0.25 | 0.46 | 0.26 | 0.26 |

表 6 不同增殖培养基对郎家园小枣生长势的影响

Tab.6 The effect on growth of the different proliferation culture medium for *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan'

| 处理 Processes | 1(CK) | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|----------|----|----|----|----|----|----|
| 继代培养 15 d 生长势 Growth of 15 d subculture | 衰弱 | 健壮 | 健壮 | 健壮 | 旺盛 | 旺盛 | 旺盛 |
| 继代培养 30 d 生长势 Growth of 30 d subculture | 衰弱叶片即将脱落 | 健壮 | 健壮 | 健壮 | 旺盛 | 旺盛 | 旺盛 |

2.2.3 不同增殖培养基对郎家园小枣生长势的影响 在继代培养15d和30d时,通过对添加不同植物生长调节剂和添加不同浓度椰汁的增殖培养基对郎家园小枣生长势的2次定期调查,可以看出处理4,5,6生长健壮。处理7,8,9生长旺盛。处理1生长衰弱(表6)。

2.2.4 不同增殖培养基对郎家园小枣叶片色泽的影响 在继代培养15d和30d时,通过对添加不同植物生长调节剂和添加不同浓度椰汁的增殖培养基对郎家园小枣叶片色泽2次定期调查,可以看出处理4,5,6叶片色泽浓绿。处理7,8,9叶片色泽正常。处理一叶片色泽呈黄色(表7)。

表7 不同增殖培养基对郎家园小枣叶片色泽的影响

Tab.7 The effect on color and luster of blade of the different proliferation culture medium for *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan'

| 处理 Processes | 1(CK) | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------------------------|-------|----|----|----|----|----|----|
| 继代培养 15 天 Growth of 15 d subculture | 黄 | 浓绿 | 浓绿 | 浓绿 | 正常 | 正常 | 正常 |
| 继代培养 30 天 Growth of 30 d subculture | 黄 | 浓绿 | 浓绿 | 浓绿 | 正常 | 正常 | 正常 |

2.3 生根培养基对郎家园小枣组培苗的生根影响试验

2.3.1 不同生根培养基对郎家园小枣组培苗产生愈伤组织的影响 通过对6种生根培养基使郎家园小枣产生愈伤组织效果的定期调查,可以看出,6个处理开始产生愈伤组织的时间均在4~5d之间,从各处理产生愈伤组织的直径来看,由于第1周刚开

始产生愈伤组织,各处理在第1周无明显差异,从第2周开始,除处理3愈伤组织产生较慢外,其余5个处理都能迅速产生愈伤组织。调查结果显示,处理4,5,6愈伤组织产生的最快,第3周愈伤组织的直径分别为(0.48±0.03)cm、(0.45±0.04)cm、(0.40±0.03)cm(表8)。

表8 六种生根培养基使郎家园小枣产生愈伤组织情况调查表

Tab.8 The investigation of *Ziziphus jujube* Mill cv. 'Langjiayuan' callus-inducing on six kinds of the rooting medium

| 处理 Processes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 开始产生愈伤组织时间/d Callus-inducing outset time | 4~5 | 4~5 | 4~5 | 4~5 | 4~5 | 4~5 |
| 第1周愈伤组织的直径/cm The diameter of the calli of 1st week | 0.1 aA | 0.1 aA | 0.1 aA | 0.1 aA | 0.1 aA | 0.1 aA |
| 第2周愈伤组织的直径/cm The diameter of the calli of 2nd week | 0.29±0.02 aA | 0.28±0.03 aA | 0.15±0.10bA | 0.37±0.03 aA | 0.35±0.02 aA | 0.31±0.04 aA |
| 第3周愈伤组织的直径/cm The diameter of the calli of 3rd week | 0.40±0.02 aA | 0.38±0.04 aA | 0.17±0.03bA | 0.48±0.03aA | 0.40±0.03 aA | 0.45±0.04 aA |

2.3.2 不同生根培养基对郎家园小枣组培苗产生根系数量的影响 为了了解各种处理对郎家园小枣组培苗产生根系数量的影响,我们于接种后第5周对各处理的新根数量进行了调查,结果表明,处理6,4产生根系数量极显著多于其他几个处理,为(5.0±0.82)条、(4.5±0.53)条,处理3极显著的少于各处理(表9)。

长,为(4.8±0.30)cm,处理6次之,为(4.4±0.33)cm,处理1较短(2.2±0.20)cm,而处理3始终未发出新根。经显著性测验各处理间均存在着极显著的差异(表10)。

表9 不同处理产生新根数量

Tab.9 The numbers of the new roots at the different processing

| 处理 Processes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|--------|-------|-----|--------|-------|-------|
| 平均根数/条 Average numbers of the new roots | 2.2 cC | 2.3cC | 0dD | 4.5 aA | 3.5bB | 5.0aA |
| 标准差/条 Standard deviation | 0.79 | 0.82 | 0 | 0.53 | 0.53 | 0.82 |

2.3.3 不同生根培养基对郎家园小枣组培苗根系生长长度的影响 为了了解各种处理对郎家园小枣组培苗根系生长长度的影响,我们于接种后第1周开始,每周对各处理的最长新根进行一次定期调查,调查结果表明,接种后第6周,处理4新根生长最

表10 不同的处理对产生新根长度调查统计

Tab.10 The investigation on length of thenew roots at the different processing

| 处理 Processes | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|--------------|-------------|--------|-------------|--------------|--------------|
| 第1周根长 Roots length of 1st week | 0aA | 0 aA | 0 aA | 0aA | 0 aA | 0 aA |
| 第2周根长 Roots length of 2nd week | 0 aA | 0 aA | 0 aA | 0 aA | 0 aA | 0 aA |
| 第3周根长 Roots length of 3rd week | 0 aA | 0 aA | 0 aA | 0.1 aA | 0.1 aA | 0.1 aA |
| 第4周根长 Roots length of 4th week | 0.92±0.35 cC | 1.6±0.18 bB | 0±0 dD | 1.8±0.25 aA | 1.7±0.17 aAB | 1.7±0.13 aAB |
| 第5周根长 Roots length of 5th week | 1.8±0.29 cC | 2.6±0.37 bB | 0±0 dD | 3.7±0.31 aA | 3.0±0.16 bB | 3.8±0.27 aA |
| 第6周根长 Roots length of 6th week | 2.2±0.20 eE | 3.1±0.25 dD | 0±0 fF | 4.8±0.30 aA | 3.5±0.27 cC | 4.4±0.33 bB |

3 讨论

综合休眠期一年生枝茎段、生长期新梢茎段、水培休眠期一年生枝的幼芽三种外植体材料的消毒试验,可以看出外植体为水培休眠期一年生枝的幼芽

的消毒处理污染率较低;在水培休眠期一年生枝的幼芽作为外植体材料消毒试验结果表明,二、三最低。因此,在进行郎家园小枣组培中,应选择以水培休眠期一年生枝的幼芽作为外植体材料,升汞处理5~6min效果最好。

该项研究通过对增殖培养基添加 50 ~ 150 mL/L 椰汁, 极显著的提高了郎家园小枣的增殖系数, 其中添加 50 mL/L 的增殖效果最为明显。该试验结果将为其他枣树品种在增殖培养中提供借鉴。

综合分析几种增殖培养基对苗高、叶色及生长势的影响, 从中发现, 处理 4, 5, 6 虽然生长势健壮、叶色浓绿, 但苗木高度却不及处理 7, 8, 9, 且处理 7, 8, 9 叶色仍处在正常范围。就苗木高度而言, 在继代培养中处理七苗木最高。因此, 用 MS + AC 0.3 g/L 基础培养基添加 BA 1.5、KT 0.5 和 CM 50 mL/L 进行郎家园小枣继代培养效果最佳。

通过对 6 种生根培养基在产生愈伤组织、产生根系数量以及根系生长长度调查结果的综合分析, 处理 4 虽然第 6 周根系生长最长, 但平均根数较少; 处理 1 虽然平均产生根数较多, 但第 6 周根系生长却较短; 而处理 6 在产生愈伤组织、产生根系数量以及根系生长长度三个方面均表现出良好的效果。因此, 0.5MS + IBA 1.5 培养基可以用来作为郎家园小枣组培进行生根培养的培养基。

本试验的 6 个生根处理均在处理 20 d 后才初发新根, 这与大沙枣培养后 10 ~ 13 d 长出新根^[11]晚 10 d 左右, 是否由于品种间在诱导生根时间上存在

差异, 有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 陆承志. 10 个鲜食枣优良品种[EB/OL]. 特色林果网, 2007-6-01.
- [2] 朱文勇, 杜学梅, 郭黄萍, 等. 骏枣茎尖培养脱除枣疯病[J]. 园艺学报, 1996, 23(2): 197-198.
- [3] 王玉珍. 冬枣茎尖离体培养成苗[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(1): 26-32.
- [4] 刘贵仁, 王震星, 严仁玲, 等. 金丝小枣茎段离体培养与快繁研究[J]. 天津农学院学报, 1995, 2(3): 1-5.
- [5] 刘翠云, 李 艳, 马洪明, 等. 黑山晋枣芽培养及植株再生研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(3): 362-367.
- [6] 杨恩芹, 王震星, 刘贵仁, 等. 金丝小枣花药离体培养再生植株研究[J]. 河北果树, 1996(3): 9-10.
- [7] 何业华, 胡芳名, 谢碧霞, 等. 枣树原生质体培养及植株再生[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(3): 29-31, 47.
- [8] 陈宗礼, 延志莲, 齐 龙. 枣叶片离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(1): 27-28.
- [9] 刘贵仁, 严仁玲, 王震星, 等. 金丝小枣茎段离体培养及胚培养的研究[J]. 华北农学报, 1988, 3(4): 116-119.
- [10] 石荫坪, 耿如霞, 白瑞云, 等. 枣胚乳三倍体的育成及生物学细胞学研究[J]. 山东果树, 1985(1): 1-245.
- [11] 李 康, 陶秀冬. 大沙枣组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 新疆农业科学, 1997(05): 231-233.