

## 4个台湾青枣品种的组培技术研究\*

王红梅<sup>1</sup>, 续九如<sup>2</sup>

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400; 2. 北京林业大学, 北京 100083)

**摘要:** 以种植于大棚内的4个台湾青枣品种2年生嫁接苗嫩梢作外植体, 进行了外植体表面灭菌, 在培养基中添加不同浓度6-BA、IBA、KT、NAA激素的启动、分化、生根培养的组培技术研究。结果表明: 台湾青枣嫩梢外植体表灭菌, 用0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒液二次灭菌的效果为好, 其组培适宜的外植体为一年生健壮枝条的茎尖和带腋芽的茎段, 4月份为最佳的采集时间。台湾青枣4个品种(五千种、黄冠、高朗一号、蜜枣)最适的启动培养基均为MS+6-BA1.0 mg/L+IBA0.1 mg/L。分化培养基则存在显著差异, 不同品种拟选用不同的培养基; 台湾青枣普遍存在组培苗生根困难的问题, 其“五千种”组培的适宜生根培养基为: 1/2MS+IBA0.2 mg/L+NAA0.4 mg/L。

**关键词:** 台湾青枣; 组培技术; 植物激素

**中图分类号:** S 665.1   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1672-8246(2008)04-0065-06

### Study on Tissue Culture of *Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao*

WANG Hong-mei<sup>1</sup>, XU Jiu-ru<sup>2</sup>

(1. Journal of Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong Jiangsu 212400, P. R. China;

2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, P. R. China)

**Abstract:** The tissue culture techniques of four varieties of *Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao* were studied by adopting the tender tips of 2 years old grafted plants as explants. The experiments include the surface sterilization of explant, initial, differentiation and rooting culture, and effects of different hormones adding to rooting culture medium. The experimental results showed that the proper method for surface sterilization was treating the tender tips with 0.1% HgCl<sub>2</sub> for twice, the suitable explants were stem tips or stem parts with one axillary bud collected in spring or autumn. The initial medium for the four tested varieties were all MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.1mg/L. Root inducing of *Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao* was generally difficult, the adaptive medium for the variety 'Wuqiangzhong' was 1/2 MS+IBA0.2mg/L+NAA0.4mg/L.

**Key words:** *Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao*; tissue culture technique; hormone

台湾青枣 (*Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao*) 又名印度枣, 是毛叶枣 (*Z. mauritiana*) 经印度和中国台湾省科学家数代遗传改良和选择、驯化而培育成的新兴果树品种群。其果形优美而兼具苹果、梨、枣的风味, 故享有“热带小苹果”的美誉。台湾青枣还具极晚熟(冬季12月~3月果实成

熟)、果实特大、童期短、结果早和产量高等优点, 而为优良的果树品种, 非常值得推广。

台湾青枣主要采用嫁接繁殖, 由于育苗用种来源困难, 且嫁接费工费时, 故用此法繁殖存在一定困难。而组织培养具有用材少, 繁殖快, 可以常年生产等特点, 是台湾青枣优良品种快速繁殖的有效

\* 收稿日期: 2008-05-20

基金项目: “948” 国家林业局引进项目 (2001-2004)。

第一作者简介: 王红梅 (1976-), 女, 河北任丘人, 讲师, 硕士, 主要从事林木育种方面的教学与研究。

途径。本项目选择台湾青枣的4个品种,进行了其组培技术研究,现将研究结果报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供作组培技术研究的台湾青枣4个品种为:“五千种”、“黄冠”、“高朗一号”、“蜜枣”。其组培材料采自2002年春定植于北京昌平公路局苗圃塑料大棚内4个台湾青枣品种2年生嫁接苗的新生嫩梢。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 外植体的表面灭菌试验

于晴天中午采集4个台湾青枣2年生嫁接苗的新生嫩梢作为其组培用的外植体。首先用软毛笔蘸洗衣粉水刷洗嫩梢,用自来水冲洗干净,把外植体剪成1~2 cm长的茎尖或带有一个腋芽的茎段,经70%酒精处理30 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒液2次灭菌,每次处理3~5 min,最后用无菌水冲洗3~4次,以最大限度地减少HgCl<sub>2</sub>残毒对外植体的影响。在超净工作台上,接种前先剥去顶芽最外层的一片幼叶,并部分地切去茎段的两端,保留茎段长约1 cm左右,采用直立式接种处理的方式,将其外植体基部插入预先准备好的培养基内。本试验接种材料为台湾青枣(五千种)的茎尖和带腋芽的茎段,HgCl<sub>2</sub>灭菌处理时间分别为茎尖:3 min, 3.5 min, 4 min, 4.5 min, (2+2) min, (2+3) min;茎段:4 min, 4.5 min, 5 min, 5.5 min, (2+3) min, (3+3) min。每个处理接种30个,20天后分别统计其的污染率、褐变率和萌芽成活率。

#### 1.2.2 启动培养试验

(1) 激素浓度对启动培养的影响 依据枣组培的相关文献,并结合初步探索的经验得出:在进行4个台湾青枣品种嫩梢组培的启动培养时GA<sub>3</sub>, IAA, KT等激素的作用不明显,协同作用也不大。为了减少试验因子,仅选6-BA, IBA两种作用较大的激素对其进行试验。本项试验采用3因子(品种, 6-BA, IBA)4水平(品种:五千种, 黄冠, 高朗一号, 蜜枣; 6-BA浓度为:0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 4.0 mg/L; IBA浓度为:0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.4 mg/L)的L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交设计。启动培养的基本培养基为MS培养基,其附加3%蔗糖,0.5%琼脂,调节pH值至6.0。各种处理均以茎尖为外植体,分别接种6瓶,每瓶2

棵,重复3次,置于温度为26±2℃,每日光照12 h,光照强度2 000~3 000 Lux,室内湿度40%~70%的组培室中,培养20天,分别统计其污染率、褐化率、萌芽成活率等。

(2) 不同外植体部位对启动培养的影响 选取台湾青枣(五千种)的茎尖和茎段作为外植体,进行接种试验,所用培养基分别为:MS+BA1.0 mg/L+IBA0.1 mg/L; MS+BA1.0 mg/L+IBA0.2 mg/L; MS+BA1.5 mg/L+IBA0.1 mg/L; MS+BA1.5 mg/L+IBA0.2 mg/L。接种后20天统计生长情况。

(3) 外植体的不同采集时间对启动培养的影响 于1月至12月,每月的中旬采集外植体(五千种的茎尖及带腋芽茎段),进行接种试验,所用培养基均为MS+BA1.0 mg/L+IBA0.2 mg/L,每次均20天后统计萌芽率,分析不同采集时间对启动培养的影响。

#### 1.2.3 分化培养试验

(1) 生长素与细胞分裂素对不定芽分化的影响 以MS培养基为分化培养的基本培养基,为研究其基本培养基中所用细胞分裂素和生长素对4个台湾青枣品种嫩梢外植体不定芽分化的影响而进行试验。其试验选用4因子(6-BA, KT, IBA, NAA)3水平(6-BA:0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L; KT:0 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L; IBA:0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.2 mg/L; NAA:0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.4 mg/L)的L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计。对4个台湾青枣品种(五千种, 黄冠, 高朗一号, 蜜枣)分别采用该设计,每一处理分别接种6瓶,每瓶接种4棵,3次重复。30天后统计其苗高及分化成芽数,计算分化率。

(2) 不同部位对不定芽分化的影响 在台湾青枣(五千种)的增殖培养中,将试管苗的茎尖,和带腋芽茎段分别进行转接,转接培养基均为MS+BA2.0 mg/L+IBA0.5 mg/L。30天后分别统计茎尖和茎段的增殖率。

#### 1.2.4 生根培养试验

在组培的诱导生根阶段,一般要求用含较低无机盐离子浓度的培养基。因此,本项研究采用1/2MS(大量元素减半)作为台湾青枣嫩梢外植体组培生根培养的基本培养基,其附加2.0%蔗糖;0.5%琼脂;pH值为6.0。培养基的生长素与细胞分裂素的绝对含量和比例调控着植物组织的形态发生及细胞分化。而根、茎、芽对生长素的敏感性不同,

其中，以根最为敏感。因此，可通过增加培养基中的生长素浓度来诱导其外植体的生根。本研究选取二因子（IBA，NAA）三水平（IBA：0.1 mg/L，0.2 mg/L，0.3 mg/L；NAA：0.3 mg/L，0.4 mg/L，0.5 mg/L）的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行台湾青枣嫩梢外植体组培的生根培养试验。选择生长健壮的台湾青枣（五千种）的组培苗，转入生根培养基进行培养。每个处理接种5瓶，每瓶接种1棵，重复

3次。30天后分别记录其生根情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体表面灭菌的效果

台湾青枣（五千种）嫩梢外植体不同时间表面灭菌的试验结果见表1。

表1 台湾青枣（五千种）嫩梢外植体不同表面灭菌时间处理的效果比较

Tab.1 Surface sterilization effects of 'Wuqiangzhong' under different length of treating time

灭菌时间 /min	茎尖						茎段					
	3	3.5	4	4.5	2+2*	2+3*	4	4.5	5	5.5	2+3*	3+3*
褐变数/个	0	0	12	20	6	16	0	0	8	18	7	16
污染数/个	5	3	2	0	1	0	6	2	1	0	1	0
褐变率/%	0	0	40.0	66.7	20.0	53.3	0	0	26.7	60.0	23.3	53.3
污染率/%	16.7	10.0	6.7	0	3.3	0	20.0	6.7	3.4	0	3.4	0
存活率/%	83.3	90.0	53.3	33.3	76.7	46.7	80	93.3	69.9	40.0	73.3	46.7

注：\*为二次灭菌。每处理的接种数均为30个。

表1结果表明：在其外植体表面灭菌总时间相同的条件下，二次灭菌的褐变率较一次灭菌明显降低，而污染程度几乎没有差异。无论一次灭菌还是二次灭菌，对台湾青枣“五千种”茎尖的灭菌时间只要超过4 min，褐变已经非常严重，表明 $HgCl_2$ 灭菌时间过长会把其外植体杀死，而灭菌时间过短，外植体的污染率又会上升，权衡之下以茎尖作为外植体的灭菌时间采用3.5 min较为适宜。

茎段，因不如茎尖幼嫩，灭菌时间可稍长些。但因其两头均有伤口， $HgCl_2$ 很容易进入组织内，即使是茎段两头的微剪，灭菌时间过长也会使其梢头变褐，而选择4.5 min的灭菌时间，无论是其褐变数还是污染数都可较好控制，其存活率达到93.3%。此外，灭菌时间也要随所采外植体母株

的生长状态及芽的生长状况而作调整。芽较嫩时，灭菌时间要相对缩短。

### 2.2 启动培养的效果

#### 2.2.1 不同浓度的生长素与细胞分裂素对启动培养的影响

组培过程外植体能否正常启动，在某种意义上说，它决定着其组培能否正常进行下去，以及能否以最短的时间，最快的速度培养出优良苗木，以取得最佳的经济和社会效益。在4个台湾青枣品种嫩梢外植体组培的启动过程中，培养基的选择是其组织培养成败的关键，而培养基中植物激素的浓度对其腋芽的萌发极为重要。4个台湾青枣品种嫩梢组培启动培养不定芽产生结果的方差分析见表2。

表2 不同激素浓度对4个台湾青枣品种嫩梢组培启动培养影响的方差分析表

Tab.2 Variance analysis of plant hormone in initial culture

变异来源	自由度	离差平方和	方差	F	$F_{\alpha}$
品种	3	173.3	57.77	3.26	$F_{0.05} = 4.76$
6-BA	3	433.0	144.33	8.15*	$F_{0.01} = 9.78$
IBA	3	499.2	166.40	9.39*	
误差	6	106.3	17.72		
总计	15	1211.8			

试验结果表明：在其组培的启动培养期，随所用培养基中6-BA和IBA浓度的增加，4个台湾青枣品种嫩梢的萌芽率呈先增后减的趋势。这是因为

植物激素的浓度过低对其嫩梢不定芽的分化不起作用，而高浓度的植物激素又抑制了其芽的分化且易引起芽的畸形生长。在组培的启动培养期，培养基

生长素的加入与否对台湾青枣嫩梢的启动影响不大,但以低浓度的生长素配合细胞分裂素对腋芽的萌发有利,可使其萌芽率增高。表2方差分析结果表明:在所取的浓度范围内6-BA, IBA不同用量之间均存在着显著差异。对结果作多重比较,表明6-BA只有在第二水平(1.0 mg/L)与第四水平(4.0 mg/L)间存在显著差异,表明在4个台湾青枣品种嫩梢组培的启动期以在其培养基内用1.0 mg/L的6-BA明显优于4.0 mg/L的6-BA; IBA也只在第二水平(0.1 mg/L)与第四水平(0.4 mg/L)间存在显著差异,表明在4个台湾青枣品种嫩梢组培的启动期以在其培养基内用0.1 mg/L

的IBA明显优于0.4 mg/L的IBA。

又因方差分析结果中不同品种间的差异不显著,说明在进行4个台湾青枣主栽品种嫩梢的组培时都适宜用相同的启动培养基。结合极差分析结果,4个品种的台湾青枣嫩梢组培启动培养所用培养基均以加入激素浓度为6-BA1.0 mg/L + IBA0.1 mg/L的配比较好。

2.2.2 不同部位的外植体对启动培养的影响

外植体的选取部位对于启动培养能否成功具有很大的影响。以台湾青枣“五千种”品种的茎尖,茎段作为外植体,接种20天后的启动生长情况见表3。

表3 台湾青枣“五千种”品种茎尖、茎段的启动培养情况比较

Tab. 3 Initial culture results of different explants of 'Wuqiangzhong' in different media

培养基种类	茎尖			茎段		
	接种数/棵	新生叶数/片	平均叶数/片	接种数/棵	新生叶数/片	平均叶数/片
MS + BA1.0mg/L + IBA0.1mg/L	18	18	1.00	18	15*	
MS + BA1.0mg/L + IBA0.2mg/L	19	22	1.16	16	9*	
MS + BA1.5mg/L + IBA0.1mg/L	18	10	0.65	20	8	0.50
MS + BA1.5mg/L + IBA0.2mg/L	15	9	0.60	18	10*	

注: \*为腋芽萌动数。

表3结果表明:接种20天后,茎尖平均每株长叶数显著高于茎段,茎段大部分有腋芽萌动,但生长较慢,无法用平均叶数计算,只能以腋芽萌动数表示。所以茎尖较茎段具有明显的生长优势,对台湾青枣“五千种”组培的启动培养来说,茎尖的启动较茎段更容易。因为茎尖的形态已基本建

成,其生长速度快且遗传稳定。此种外植体的培养能沿着腋芽萌发的方向发育,且一旦启动培养成功,就会迅速进入生长、增殖阶段。

2.2.3 不同采集时间的外植体对启动培养的影响

不同采集时间的台湾青枣(五千种)品种茎尖、茎段外植体组培启动培养期的萌芽状况见图1。

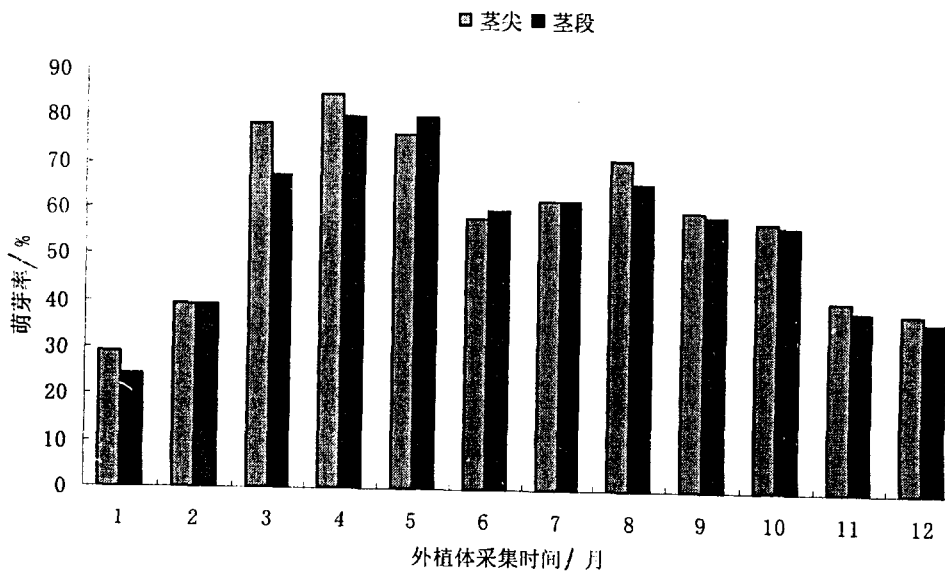


图1 台湾青枣(五千种)茎尖、茎段不同采集时间与启动培养期的萌芽率

Fig. 1 Relationship between explant cutting time and germination in initial culture

图1的结果表明：不管以茎尖还是茎段作为外植体，3~5月的成活率均较高，4月成活率最高，茎尖达85%，茎段达80%。这是因为3~5月为台湾青枣的萌芽期，这个时期营养生长旺盛，内源激素含量高，受外源激素影响小。而3月份要对台湾青枣植株进行截干，新长出的芽较少，采集嫩梢困难；5月份为台湾青枣的第一次开花结实期。因

此，本试验选定的最适宜的外植体采集时间为4月份。

2.3 分化培养的效果

2.3.1 不同浓度的细胞分裂素和生长素对不定芽分化的影响

不同浓度的生长素与细胞分裂素对4个台湾青枣品种试管苗分化影响的试验结果见表4。

表4 4个台湾青枣品种组培分化培养的试验结果统计

Tab. 4 Experimental results of differentiation culture of 4 *Ziziphus mauritiana* cv. *Taiwanqingzao*

处理	苗高/cm				成芽数/个			
	五千种	黄冠	高朗一号	蜜枣	五千种	黄冠	高朗一号	蜜枣
1	1.47	1.80	1.80	1.45	1.00	0.33	1.00	0.00
2	1.58	2.15	1.60	2.20	1.00	0.50	0.33	0.50
3	1.60	1.85	2.81	1.77	1.03	0.75	0.67	0.43
4	1.75	2.13	2.45	1.65	1.15	0.50	1.00	0.00
5	1.65	1.87	1.80	1.87	0.95	0.67	1.00	0.67
6	1.73	1.81	2.01	1.58	1.10	1.00	0.83	0.00
7	1.82	1.60	2.08	1.83	1.25	1.18	0.00	0.00
8	1.70	1.42	1.80	1.47	1.15	1.20	0.40	0.60
9	1.72	1.50	1.62	1.20	1.03	0.87	0.50	0.00

表4的结果表明：从不同台湾青枣品种组培分化培养期试管苗的平均苗高和平均成芽数得出的培养基中的最佳激素组合并不完全一致。考虑到试管苗的生长状态与其培养基中激素的配比有很大关系，所用细胞分裂素的比例过高，愈伤组织增大，苗的生长速度减慢，易出现叶片黄化脱落的现象。综合平均苗高和平均成芽数以及苗的生长状态，台湾青枣4个品种嫩梢组培分化培养基所用的激素应选取如下配方：

- (1) 五千种: 6 - BA1.5 mg/L + IBA0.3 mg/L;
- (2) 黄冠: 6 - BA1.0 mg/L + KTO.5 mg/L + IBA0.3 mg/L;
- (3) 高朗一号: 6 - BA1.0 mg/L + KT1.5 mg/L + IBA0.5 mg/L;
- (4) 蜜枣: 6 - BA0.5 mg/L + KT1.0 mg/L + IBA0.5 mg/L。

2.3.2 不同部位的外植体对增殖的影响

从表5得出，在台湾青枣（五千种）嫩梢组培的增殖培养中，茎尖外植体的增殖率明显低于茎段外植体，茎尖的增殖率只有131.25%，而茎段为136.92%。在转接初期，茎段外植体生长缓慢，茎尖外植体生长旺盛。但是随着培养时间的延长，二者的差距逐渐缩小。茎段增殖率高于茎尖可能是由于茎尖的顶芽抑制了侧芽的萌发，从而影响其增殖效果，此与植物具有顶端优势的特性相一致。

表5 台湾青枣（五千种）茎尖、茎段外植体组培苗的生长和分化状况

Tab. 5 Growth and differentiation of tissue culture plants from stem tip and stem part

外植体	接入苗数/棵	接入苗高/cm	转出苗数/棵	转出苗高/cm	增殖率/%
茎尖	48	1.10	63	2.12	131.25
茎段	65	1.10	89	1.99	136.92

注：增殖率% = (大于1cm的单芽茎段数 - 接入茎段数) / 接入茎段数 × 100%。

表6 不同激素配比的组培生根培养基对台湾青枣“五千种”组培苗生根的影响

Tab. 6 Effects of different hormone concentrations on rooting of 'Wuqiangzhong'

处理	接种数/棵	生根数/棵	生根率/%	根长势
1	15	3	20.0	根细弱,根毛少
2	15	3	20.0	根细弱,根毛少
3	15	5	33.3	根细弱,根毛少
4	15	5	33.3	每棵根数2~3,但长势弱
5	15	9	60.0	平均每棵根数4,长势好
6	15	5	33.3	根基部膨大,愈伤大
7	15	7	46.7	根基部愈伤大
8	15	8	53.3	根基部愈伤大
9	15	6	40.0	根基部愈伤大

## 2.4 生根培养的效果

台湾青枣组培苗的生根较为困难,在所进行的台湾青枣“五千种”组培、生根培养基所用的各激素配比处理中,以处理5的生根效果相对较好,其组培苗的生根率为60.0%,且根数较多,根长势好(见表6)。由此得出台湾青枣嫩梢组培适宜的生根培养基为1/2MS + IBA0.2 mg/L + NAA0.4 mg/L。

## 3 结语

(1)“五千种”、“黄冠”、“高朗一号”、“蜜枣”4个台湾青枣品种组培的嫩梢外植体,采自种植于大棚中的2年生嫁接苗。因棚内湿度大,其叶背及嫩茎上有一层绒毛,表面杂菌不易清除,有的菌类已进入材料内部,成为内生菌,更不易清除。所以嫩梢的表面灭菌是其组织培养的一项关键技术。经试验研究得出嫩梢外植体以用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒液的二次灭菌的效果为好,以茎尖灭菌时间为3.5 min,茎段灭菌时间为4.5 min为宜。清洗茎尖、茎段时,切忌在水中浸泡时间过长,因为台湾青枣的茎尖非常稚嫩,其细胞容易吸水处于饱和状态,此时有一部分菌类可趁机渗入导管,增加了消毒难度。根据经验,用洗衣粉水刷洗茎段,冲洗干净,然后用70%酒精和0.1%升汞灭菌即可。

(2)4个台湾青枣品种嫩梢组培的启动培养基选择的激素浓度为6-BA1.0 mg/L + IBA0.1 mg/L,附加3%蔗糖,其萌芽成活率可达84.6%以上。

(3)宜在4月采集台湾青枣嫩梢的茎尖作为其组培启动培养的外植体材料。

(4)台湾青枣4个品种嫩梢组培的分化培养基最适的激素配方是:①五千种:6-BA1.5 mg/L + IBA0.3 mg/L;②黄冠:6-BA1.0 mg/L + KT0.5 mg/L + IBA0.3 mg/L;③高朗一号:6-BA1.0 mg/L + KT1.5 mg/L + IBA0.5 mg/L;④蜜枣:6-BA0.5 mg/L + KT1.0 mg/L + IBA0.5 mg/L。

(5)对台湾青枣(五千种)而言,获取组培苗高生根率的适宜生根培养基为1/2MS + IBA0.2 mg/L + NAA0.4 mg/L。

## 参考文献:

- [1]沈征言.第23届国际园艺学会学术活动简介[J].园艺学报,1991,18(2):189-192.
- [2]余亚白,林斌,胡雪珍.台湾印度枣实生苗组培快繁技术研究[J].台湾农业探索,1999(3):38-39.
- [3]朱广廉.植物组织培养中的外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [4]续九如,李春立,孙建设.毛叶枣组培快繁技术研究[J].北京林业大学学报,2003,25(2):28-32.
- [5]刘翠云,张小红,马洪明.酸枣微繁技术的研究[J].西北植物学报,1995,15(4):301-306.
- [6]陈贤,龚元圣,杨德,等.野生柱穗醉鱼草嫩芽的组培技术研究[J].西部林业科学,2007,36(4):75-78.
- [7]臧小平,雷新涛.毛叶枣缺镁症的诊断与防治[J].广西热作科技,2000(3):18-19.