北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

‘京枣39’离体多倍体诱导及其增殖、生根培养体系优化

赵汗青 王强 庞晓明 薄文浩 李颖岳

In vitro polyploid induction and optimization of its proliferation and rooting culture system for ‘Jingzao 39’

Zhao Hanqing, Wang Qiang, Pang Xiaoming, Bo Wenhao, Li Yingyue

引用本文:
赵汗青, 王强, 庞晓明, 薄文浩, 李颖岳. ‘京枣39’离体多倍体诱导及其增殖、生根培养体系优化[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(6):118–126. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230039
Zhao Hanqing, Wang Qiang, Pang Xiaoming, Bo Wenhao, Li Yingyue. In vitro polyploid induction and optimization of its proliferation and rooting culture system for ‘Jingzao 39’[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(6):118–126. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230039

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230039

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究

Study on key techniques of polyploid induction in *Ziziphus jujuba* Mill. cv. ‘Teapot’

北京林业大学学报, 2019, 41(7): 49–56. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190230

有斑百合多倍体诱导及鉴定

Polyploidy induction and identification in *Lilium concolor* var. *pulchellum*

北京林业大学学报, 2017, 39(7): 96–102. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170028

秋水仙碱处理诱导银灰杨2n花粉与杂种三倍体创制

Pollen chromosome doubling induced by colchicine treatment and creation of hybrid triploids in *Populus canescens*

北京林业大学学报, 2020, 42(3): 119–126. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190363

高产优质毛白杨良种组培繁育体系构建

Construction of tissue culture breeding system of high yield and quality species in *Populus tomentosa*

北京林业大学学报, 2019, 41(7): 121–127. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180428

气动生物反应器油松胚性愈伤增殖体系的建立研究

Enhancement of embryogenic callus proliferation in Chinese pine (*Pinus tabuliformis*) by airlift bioreactor

北京林业大学学报, 2019, 41(11): 37–43. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190221

杉木体细胞胚胎发生胚性愈伤组织诱导条件的优化

Optimization of induction conditions for embryogenic callus of somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata*

北京林业大学学报, 2020, 42(2): 79–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190196

DOI:10.12171/j.1000−1522.20230039

‘京枣 39’离体多倍体诱导及其增殖、生根培养体系优化

赵汗青[1] 王 强[2] 庞晓明[1] 薄文浩[1] 李颖岳[1]

（1. 林木遗传育种全国重点实验室，林木花卉遗传育种教育部重点实验室，北京林业大学生物科学与技术学院，北京林业大学，北京 100083；
2. 内蒙古自治区林业和草原种苗总站，内蒙古 呼和浩特 010051）

摘要:【目的】研究秋水仙素溶液质量浓度、处理时间和预培养时间对‘京枣 39’离体多倍体诱导的影响，优化枣树良种‘京枣 39’的增殖和生根培养基，建立‘京枣 39’的离体多倍体诱导体系，获得多倍体植株。**【方法】**采用完全随机区组试验设计，探索不同秋水仙素溶液质量浓度和处理时间组合对‘京枣 39’不定芽再生的影响，不同预培养时间对‘京枣 39’离体多倍体诱导的影响，不同生长调节剂组合对‘京枣 39’增殖培养的影响，不同基本培养基和生长调节剂组合对‘京枣 39’组培苗生根培养的影响。**【结果】**(1)当秋水仙素溶液质量浓度为 80 mg/L、处理 48 h 时‘京枣 39’刻伤叶片存活率为(50.00 ± 7.07)%，分化系数为(2.06 ± 0.17)。(2)最佳预培养时间为 6 d，并施以 80 mg/L 秋水仙素浓度处理 48 h，获得了纯合四倍体‘京枣 39’。(3)最佳增殖培养基为 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8，平均增殖系数为(4.22 ± 0.22)。(4)最佳生根培养基为改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8，平均根长为(5.22 ± 0.19) cm；平均生根数为(3.20 ± 0.22)。**【结论】**初步建立了‘京枣 39’的离体多倍体诱导体系，获得了‘京枣 39’的多倍体植株，并优化了其增殖培养及生根培养方法。本研究为优良枣树品种‘京枣 39’的种质创新提供了切实可行的技术方法，为多倍体诱导在枣树以及其他果树中的应用奠定了试验基础。

关键词：‘京枣 39’；多倍体诱导；秋水仙素；增殖培养；生根培养；体系优化

中图分类号：S665.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2024)06−0118−09

引文格式：赵汗青，王强，庞晓明，等. ‘京枣 39’离体多倍体诱导及其增殖、生根培养体系优化 [J]. 北京林业大学学报，2024，46(6)：118−126. Zhao Hanqing, Wang Qiang, Pang Xiaoming, et al. In vitro polyploid induction and optimization of its proliferation and rooting culture system for ‘Jingzao 39’[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(6): 118−126.

In vitro polyploid induction and optimization of its proliferation and rooting culture system for ‘Jingzao 39’

Zhao Hanqing[1] Wang Qiang[2] Pang Xiaoming[1] Bo Wenhao[1] Li Yingyue[1]

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, School of Biological Sciences and Biotechnology, Beiing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Inner Mongolia General Station of Seed and Seedling of Forestry and Grassland, Hohhot 010051, Inner Mongolia, China)

Abstract: [**Objective**] This paper studies the effects of colchicine solution mass concentration, treatment time and pre-culture time on the induction of polyploidof ‘Jingzao 39’ in vitro, optimizes the proliferation and rooting medium of ‘Jingzao 39’, and an in vitro polyploid induction system for ‘Jingzao 39’ was established and polyploid plants were obtained. [**Method**] Using randomized complete block design, we investigated the effects of different mass concentrations of colchicine solution and treatment time combinations on adventitious bud regeneration of ‘Jingzao 39’, the effects of different pre-culture time on polyploid induction of ‘Jingzao 39’ in vitro, the effects of different growth regulator combinations on the proliferation culture of ‘Jingzao 39’ and the effects of different basic media and growth regulator

收稿日期: 2023−02−24 **修回日期:** 2023−03−14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32271925)，中央高校基本科研业务费专项(QNTD202305)。

第一作者: 赵汗青。主要研究方向：经济林良种繁育。Email: hanqingzhao@bjfu.edu.cn 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 李颖岳，教授，博士生导师。主要研究方向：经济林良种繁育。Email: yingyueli@bjfu.edu.cn 地址：同上。

本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

combinations on the rooting culture of ‘Jingzao 39’. [**Result**] (1) When the mass concentration of colchicine solution was 80 mg/L and treated for 48 h, the survival rate of ‘Jingzao 39’ leaves was (50.00 ± 7.07)%, and the differentiation coefficient was (2.06 ± 0.17). (2) The best pre-culture time was 6 d, and the tetraploid ‘Jingzao 39’ was obtained with 80 mg/L colchicine and treatment for 48 h. (3) The optimal proliferation medium was MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA + 30 g/L maltose, pH = 5.8, and the average proliferation coefficient was (4.22 ± 0.22). (4) The best rooting medium was modified 1/2MS + 0.8 mg/L IBA + 30 g/L maltose, pH = 5.8, and the average root length was (5.22 ± 0.19) cm, and the average rooting number was (3.20 ± 0.22). [**Conclusion**] The polyploid induction system of ‘Jingzao 39’ is established preliminarily, and one polyploid ‘Jingzao 39’ is obtained. The methods of its proliferation and rooting culture are optimized. It provides a feasible technical method for the germplasm innovation of fine jujube variety ‘Jingzao 39’, and provides an experimental basis for the application of polyploid induction in jujube and other fruit trees.

Key words: ‘Jingzao 39’; polyploid induction; colchicine; proliferation culture; rooting culture; system optimization

倍性育种是经济林育种的重要手段之一，在遗传资源拓展、农艺性状改良[1]和生物进化[2]等方面起到了重要作用，对枣树(*Ziziphus jujuba*)、苹果(*Malis domestia*)等以获取果实或代谢产物为目的的果树，其育种价值尤为突出，但在不同的果树或同一果树不同品种之间，其最佳处理组合存在显著差异。以‘寒富’苹果(*Malis domestia* cv. Hanfu)叶片为外植体，60 mg/L 秋水仙素溶液处理 5 d，四倍体诱导效率最高，为 22.20%[3]。以苹果种质‘Pinova’(*Malis domestia* cv. Pinova)叶片为外植体诱导多倍体时发现：125 mg/L 秋水仙素溶液处理 6 d 诱导效率最高，为 20.00%，并获得了 58 株多倍体[4]。以二倍体猕猴桃杂交后代‘HM’(*Actinidia chinensis* cv. HM)茎段为外植体，150 ~ 200 mg/L 秋水仙素溶液震荡培养 48 h，共获得 18 株多倍体后代[5]。在枣树上，‘酸枣’(*Zizyphus spinosus*)[6]、‘冬枣’(*Z. jujuba* cv. Dongzao)[7]等枣树品种已获得了多倍体植株，但在进行多倍体诱导时，不同的枣树品种的最佳处理条件、外植体类型等因素同样存在差异。以‘茶壶枣’(*Z. jujuba* cv. Teapot)叶片为外植体，预培养 8 ~ 9 d 后用 70 mg/L 秋水仙素溶液处理 72 h 诱导效率最高，达 4.11%[8]。以‘沾化冬枣’(*Z. jujuba* cv. Zhanhua)茎尖为外植体，使用 0.05% 秋水仙素处理 48 ~ 72 h，或 0.1% 秋水仙素处理 24 ~ 48 h 的诱导效果最好，诱导效率约为 22.00%[7]。以预培养 10 d 的‘酸枣’组培苗叶片为外植体，使用 80 mg/L 秋水仙素溶液处理 48 h 诱导效率最高，为 6.00%[9]。大量研究表明：在离体诱导多倍体时，不同枣品种和外植体类型的最佳处理条件存在明显差异，需通过大量试验进行探索。

枣(*Ziziphus jujuba*)为鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物，是原产于我国的重要经济树种[10]。枣果实味甜，还含有大量人体所需维生素、矿物质及纤维素等[11]，具有一定的抗氧化、抗衰老作用[12−13]。‘京枣 39’(*Z. jujuba* cv. Jingzao39)是由北京市农林科学院林业果树研究所选育的优良鲜食大枣品种，原产地北京，具有果实品质好、抗病性强、产量大、结实早等特性[14]。‘京枣 39’ 2003 年经国家林业局林木品种审定委员会审定为优良品种，并颁发林木良种证[15]，已在我国河南、新疆等地有较大面积的推广栽培[16−17]。‘京枣 39’品种再生能力强[18]，因而本文选择‘京枣 39’作为离体多倍体诱导的试验材料。在叶片不定芽再生体系的基础上，设计试验，摸索适宜的秋水仙素溶液浓度、处理时间和预培养时间等技术条件，初步建立‘京枣 39’的多倍体诱导体系；同时优化‘京枣 39’的增殖和生根培养体系。本研究通过人工倍性育种的方法，以期获得‘京枣 39’果实更大、抗性更强、代谢产物更优的四倍体新种质；研究结果将为离体多倍体诱导技术在枣树及其他果树中的应用提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

以 2021 年获得的‘京枣 39’组培苗为基础材料，每 45 d 进行继代培养(MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA + 15 g/L 麦芽糖 + 7.5 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂，pH = 5.8)一次，选取生长状态良好、叶片嫩绿且长势相对一致的无菌‘京枣 39’组培苗作为试验材料。

1.2　试验方法

1.2.1　秋水仙素溶液质量浓度和处理时间对叶片存活率和叶片再生的影响

经预试验研究发现，4 ~ 7 d 预培养时间对叶片存活率和叶片再生无显著性影响，而秋水仙素溶液

质量浓度和处理时间对叶片存活率和叶片再生有显著性影响。此外，大量研究[8,19]表明，随着秋水仙素浓度和处理时间的增加，植株多倍体诱导效率和死亡率增加。对枣[8]、无刺刺梨(*Rosa roxburghii* f. *eseiosa*)[20]等部分果树离体多倍体研究表明，当致死率在 50% 左右时多倍体诱导率最高。因此该部分试验探究 7 d 预培养时间下秋水仙素溶液对叶片的毒害作用，并筛选致死率适中、不定芽再生系数较高的秋水仙素质量浓度和处理时间组合，保证秋水仙素的作用和较高的分化系数。

采用完全随机区组试验设计，对比不同质量浓度的秋水仙素溶液(40、60、80 mg/L)与处理时间(48、72 h)对‘京枣 39’不定芽存活率和分化系数的影响。试验因素水平见表 1，试验重复 5 次。在超净工作台中，剪取第 3 ~ 5 叶位叶片，沿主脉垂直方向过主脉而不剪断叶片横切 2 ~ 3 个伤口，以叶正面朝下，置于不定芽再生培养基(1/2MS + 1.0 mg/L TDZ + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 30 g /L 麦芽糖 + 6 g/L 琼脂，pH = 5.8)中预培养 7 d 后，于添加不同质量浓度秋水仙素的液体不定芽再生培养基(培养基配方同不定芽再生培养基，但不添加琼脂)中处理不同时间。处理结束后用无菌蒸馏水冲洗叶片 3 次，用滤纸吸干水分后置于不定芽再生培养基中继续暗培养至 14 d，转移至光下培养。光下培养 45 d 后统计不定芽存活率和分化倍数。存活率为存活叶片数与总叶片数的比值，分化系数为分化不定芽数与存活叶片数的比值。

表 1 ‘京枣 39’秋水仙素处理组合

Tab. 1 Combination of ‘Jingzao 39’ colchicine treatment

水平 Level	因素 Factor	
	秋水仙素质量浓度 Colchicine mass concentration/(mg·L^{-1})	处理时间 Processing time/h
1	40	48
2	60	72
3	80	

1.2.2 预培养时间对多倍体诱导的影响

在 1.2.1 中筛选出的适宜秋水仙素质量浓度和处理时间的基础上，设置不同的预培养时间，使用 1.2.1 中同样的方法刻伤‘京枣 39’叶片，分别于不定芽再生培养基中预培养 4、5、6、7 d 后进行秋水仙素加倍处理，处理后用无菌蒸馏水冲洗叶片 3 次，用滤纸吸干水分后置于不定芽再生培养基中继续暗培养至 14 d，转移至光下培养。光下培养 45 d 后，统计倍性水平。

1.2.3 流式细胞术检测倍性

待诱导后的不定芽生长至 4 ~ 5 cm，在超净工作台中剪取 2 片叶片，在培养皿中加入 2 mL Galbraith’s 裂解液切碎后，40 μm 孔径尼龙滤网过滤后用 Partec CyFlow Cube 6 型号流式细胞仪进行倍性检测。

1.2.4 ‘京枣 39’增殖培养基筛选

采用完全随机区组试验设计，对比不同质量浓度的 6-BA(0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L)与不同质量浓度的 IBA(0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)或 NAA(0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)两种生长素组合对‘京枣 39’组培苗增殖效果的影响。试验因素水平见表 2 和表 3，试验重复 5 次。在超净工作台中，剪取 2 ~ 3 cm 二倍体‘京枣 39’茎段接种于含有不同质量浓度生长调节剂组合(6-BA + IBA，6-BA + NAA)的增殖培养基中，培养 30 d 后统计增殖倍数。增殖倍数为总分蘖数与接种苗数的比值。

表 2 ‘京枣 39’增殖培养中不同质量浓度的 6-BA 和 IBA 处理组合

Tab. 2 Treatment combinations of different mass concentrations of 6-BA and IBA in ‘Jingzao 39’ multiplication culture

水平 Level	因素 Factor	
	6-BA/(mg·L^{-1})	IBA/(mg·L^{-1})
1	1.0	0.5
2	0.8	0.4
3	0.6	0.3
4	0.4	0.2

表 3 ‘京枣 39’增殖培养中不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 处理组合

Tab. 3 Treatment combinations of different mass concentrations of 6-BA and NAA in ‘Jingzao 39’ multiplication culture

水平 Level	因素 Factor	
	6-BA/(mg·L^{-1})	NAA/(mg·L^{-1})
1	1.0	0.5
2	0.8	0.4
3	0.6	0.3
4	0.4	0.2

1.2.5 ‘京枣 39’生根培养基筛选

采用三因素完全随机区组试验设计，对比不同的基本培养基(1/2MS、改良的 1/2MS 培养基)、不同质量浓度的 IBA(0.2、0.4、0.6、0.8 mg/L)和 6-BA(0、0.2 mg/L)对‘京枣 39’生根效果的影响，试验因素水平见表 4，试验重复 5 次。在超净工作台中，剪取 1 ~ 2 cm 茎段，分别置于不同基本培养基和生长调节剂组合的培养基中，培养 45 d，统计根长和生根数。

表 4　‘京枣 39’生根培养处理组合

Tab. 4　Treatment combinations of rooting culture of ‘Jingzao 39’

水平 Level	因素 Factor		
	基本培养基 Basic medium	IBA/(mg·L^{-1})	6-BA/(mg·L^{-1})
1	1/2MS	0.8	0.2
2	改良1/2MS Modified 1/2MS	0.6	0.0
3		0.4	
4		0.2	

注：改良1/2MS培养基参考自文献[21]。Note: modified 1/2MS medium referencd from reference [21].

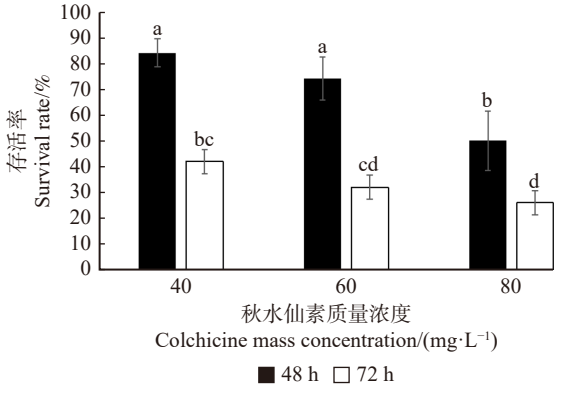
1.2.6　数据统计和分析

使用 Excel 2013 进行数据统计，并使用 IMB SPSS Statistics 19 软件进行方差分析，各因素间显著性差异用小写字母表示，不同小写字母表示具有显著性差异（$P < 0.05$）。

2　结果与分析

2.1　秋水仙素溶液质量浓度和处理时间对叶片存活率和叶片再生的影响

图 1 和图 2 显示：随着秋水仙素质量浓度上升或处理时间增长，‘京枣 39’的存活率逐渐降低，分化系数逐渐下降。当秋水仙素溶液质量浓度为 80 mg/L，处理 48 h 或 40 mg/L 处理 72 h 时接近半致死率（成活率 50%）（图 1），而 80 mg/L 处理 48 h 不定芽分化系数显著高于 40 mg/L 处理 72 h，因此试验认为 80 mg/L 处理 48 h 为较适宜的处理组合。



不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$）。下同。Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

图 1　不同秋水仙素质量浓度和处理时间组合对‘京枣 39’不定芽存活率的影响

Fig. 1　Effects of different colchicine mass concentrations and co-culture time combinations on the survival rate of adventitious buds of ‘Jingzao 39’

在 80 mg/L 秋水仙素溶液中处理 48 h，并置于光下培养 45 d 后的不定芽分化情况如图 3 所示。根据图 3 可以看出：因秋水仙素的毒害作用，经过 45 d 培养，大部分叶片死亡，呈白色，无不定芽分化；有的叶片部分死亡，但未死亡的绿色部分仍能分化出不定芽；少部分叶片完全存活呈绿色，其不定芽再生旺盛，经继代培养产生足够数量叶片后，可进行倍性检测。

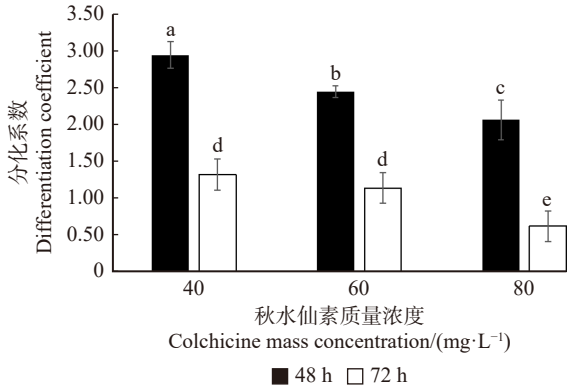


图 2　不同秋水仙素质量浓度和处理时间组合对‘京枣 39’不定芽分化系数的影响

Fig. 2　Effects of different colchicine mass concentrations and co-culture time combinations on differentiation coefficient of adventitious buds of ‘Jingzao 39’



图 3　80 mg/L 秋水仙素溶液中处理 48 h 后光培养 45 d‘京枣 39’不定芽分化情况

Fig. 3　Adventitious bud differentiation of ‘Jingzao 39’ after 45 d of photo-culture under 48 h 80 mg/L colchicine solution treating

2.2　预培养时间对多倍体诱导的影响

叶片刻伤后进行不同时间的预处理，以 2.1 中得出的适宜秋水仙素处理质量浓度和时间，即 80 mg/L 秋水仙素溶液处理 48 h 后进行流式细胞术检测。流式细胞术检测结果（表 5）表明：预培养 4、5 d 的处理未检测出‘京枣 39’多倍体或混倍体；预培养 6 d 的处

表 5　不同预培养时间‘京枣 39’多倍体诱导结果

Tab. 5　Polyploid induction results of ‘Jingzao 39’ under different pre-culture time

预培养天数 Pre-culture day	四倍体数 Number of tetraploids	混倍体数 Number of mixoploid
4	0	0
5	0	0
6	1	0
7	0	3

理检测出‘京枣 39’纯合四倍体 1 株，未检测出混倍体；预培养 7 d 的处理检测出 3 株混倍体‘京枣 39’，未检测出纯合多倍体。

2.3 ‘京枣 39’增殖培养基筛选

图 4 显示：当 6-BA 质量浓度为 0.4 mg/L 时，‘京枣 39’增殖倍数低或几乎不增殖（增殖倍数为 1.0）；随着 6-BA 质量浓度的上升，‘京枣 39’的增殖倍数增加，当 6-BA 质量浓度为 0.8 mg/L 时达到最高值，而更高的 6-BA 质量浓度（1.0 mg/L）会使‘京枣 39’的增殖倍数降低。6-BA 和 IBA 的 16 个处理组合中，0.8 mg/L 6-BA，0.4 mg/L 或 0.5 mg/L IBA 的组合显著优于其他各个组合，而 0.4 mg/L IBA 的药品使用量低于 0.5 mg/L，因此最利于‘京枣 39’组培苗增殖培养的组合是 0.8 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA。

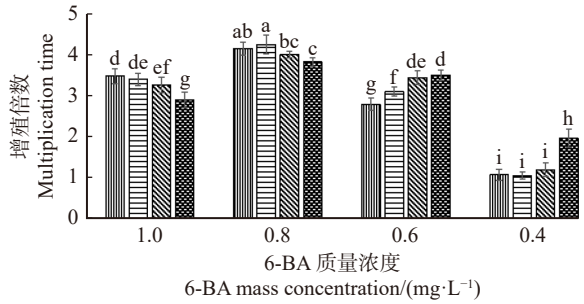


图 4 不同 6-BA 和 IBA 质量浓度组合对‘京枣 39’增殖倍数的影响

Fig. 4 Effects of different 6-BA and IBA mass concentration combinations on multiplication time of ‘Jingzao 39’

图 5 表明：当 6-BA 质量浓度较低（0.4 mg/L）时，‘京枣 39’增殖倍数低或几乎不增殖；随着 6-BA 质量浓度的上升，‘京枣 39’的增殖倍数增加，当 6-BA 质量浓度为1.0 mg/L 时达到最高值。6-BA 和 NAA 的 16 个处理组合中，1.0 mg/L 6-BA，0.3、0.4 或 0.5 mg/L NAA以及 0.8 mg/L 6-BA、0.4 mg/L NAA 的组合显著优于其他各个组合，最利于‘京枣 39’组培苗的增殖培养。

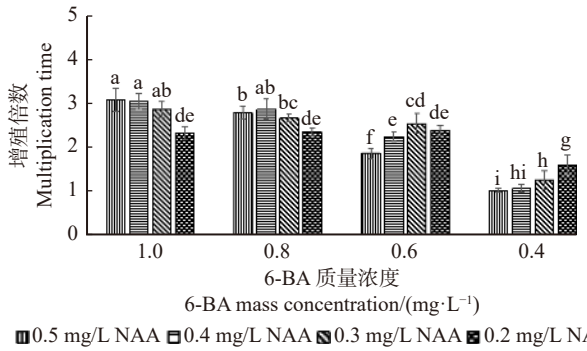


图 5 不同 6-BA 和 NAA 质量浓度组合对‘京枣 39’增殖倍数的影响

Fig. 5 Effects of different 6-BA and NAA mass concentration combinations on multiplication time of ‘Jingzao 39’

对比图 4 和图 5 可以发现：IBA 和 NAA 两种生长素的作用效果存在差异，6-BA 和 IBA 的处理组合相较于 6-BA 和 NAA 的处理组合对‘京枣 39’的增殖效果更好。在 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8 的培养基中培养 30 d 的结果如图 6 所示，其生长状态良好，增殖效果理想。



图 6 ‘京枣 39’增殖培养 30 d 的增殖效果

Fig. 6 Proliferation effects of ‘Jingzao 39’ after 30 d of proliferation culture

2.4 ‘京枣 39’生根培养基筛选

不同处理组合生根培养 45 d 后对‘京枣 39’生根长度和生根数量的影响如表 6 所示。处理 9（改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA）和处理 10（改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA + 0.2 mg/L 6-BA）的根长和生根量分别显著高于其他处理组合，而处理 9 所用药品少于处理 10，因此该试验认为改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA 是‘京枣 39’的最佳生根培养基。

‘京枣 39’生根长度和数量的方差分析如表 7 所示。基本培养基类型、IBA 质量浓度以及基本培养基类型、IBA 质量浓度、6-BA 质量浓度各因素间的两两交互作用均对‘京枣 39’生根长度和生根数量有显著性影响，三者之间的交互作用仅对生根长度有显著性影响，而 6-BA 质量浓度对‘京枣 39’生根长度和生根数量则无显著性影响。

各差异显著因素对根长和根数量的影响如图 7 和图 8 所示。组培苗在改良 1/2MS 中的生根长度和数量均显著好于 1/2MS；随着 IBA 质量浓度的升高，‘京枣 39’组培苗生根长度和数量也随之升高。当 IBA 水平过低时，‘京枣 39’组培苗的生根效果受到了显著的抑制，而 IBA 和 6-BA 的组合会使组培苗基部出现愈伤组织，抑制了生根效果。

综上所述，最佳的生根培养基组合为改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8，平均生根长度为（5.22 ± 0.19）cm，平均生根量为（3.20 ± 0.22）。组培苗在该培养基中生根 45 d 结果如图 9 所示，‘京枣 39’生根效果良好，根粗壮，同时有部分侧根生长，利于后续的驯化移栽。

表 6　培养基组合对‘京枣 39’生根情况的影响

Tab. 6　Effects of culture medium combinations on rooting of ‘Jingzao 39’

处理 Treatment	基本培养基 Basic medium	IBA/(mg·L^{-1})	6-BA/(mg·L^{-1})	根长 Root length/cm	生根量 Rooting number
1	1/2MS	0.8	0.0	3.10 ± 0.19f	1.30 ± 0.14fg
2			0.2	3.46 ± 0.21de	1.46 ± 0.15f
3		0.6	0.0	1.44 ± 0.19i	1.34 ± 0.21fg
4			0.2	1.72 ± 0.33h	1.32 ± 0.08fg
5		0.4	0.0	0.78 ± 0.15g	1.28 ± 0.13fg
6			0.2	0.96 ± 0.23g	1.16 ± 0.11g
7		0.2	0.0	0.42 ± 0.19k	1.44 ± 0.34f
8			0.2	0.46 ± 0.21k	0.96 ± 0.19h
9	改良1/2MS Modified 1/2MS	0.8	0.0	5.22 ± 0.19a	3.20 ± 0.22b
10			0.2	4.56 ± 0.17b	3.54 ± 0.15a
11		0.6	0.0	4.76 ± 0.11b	2.90 ± 0.14c
12			0.2	4.06 ± 0.11c	3.22 ± 0.08b
13		0.4	0.0	3.54 ± 0.23d	2.62 ± 0.13d
14			0.2	3.22 ± 0.19ef	2.64 ± 0.17d
15		0.2	0.0	1.30 ± 0.16i	2.44 ± 0.17de
16			0.2	2.40 ± 0.32g	2.40 ± 0.16e

表 7　培养基组合对‘京枣 39’生根长度和数量的方差分析

Tab. 7　Variance analysis of medium combination on rooting length and number of ‘Jingzao 39’

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom (df)	均方Mean square (MS)		*F*	
		根长 Root length	生根量 Rooting number	根长 Root length	生根量 Rooting number
区组 Block	4	0.056	0.018		
基本培养基 Basic medium (A)	1	87.362	50.403	2 028.726*	2 139.125*
IBA (B)	3	31.355	1.314	728.132*	55.772*
6-BA (C)	1	0.025	0.010	0.569	0.430
A × B	3	2.361	0.581	54.835*	24.677*
A × C	1	0.648	0.378	15.048*	16.048*
B × C	3	0.652	0.255	15.152*	10.828*
A × B × C	3	1.190	0.024	27.634*	1.038
随机误差 Random error	60	0.042	0.024		
总计 Total	79				

注:*表示具有显著性差异($P < 0.05$)。Note: * indicates significant differences ($P < 0.05$).

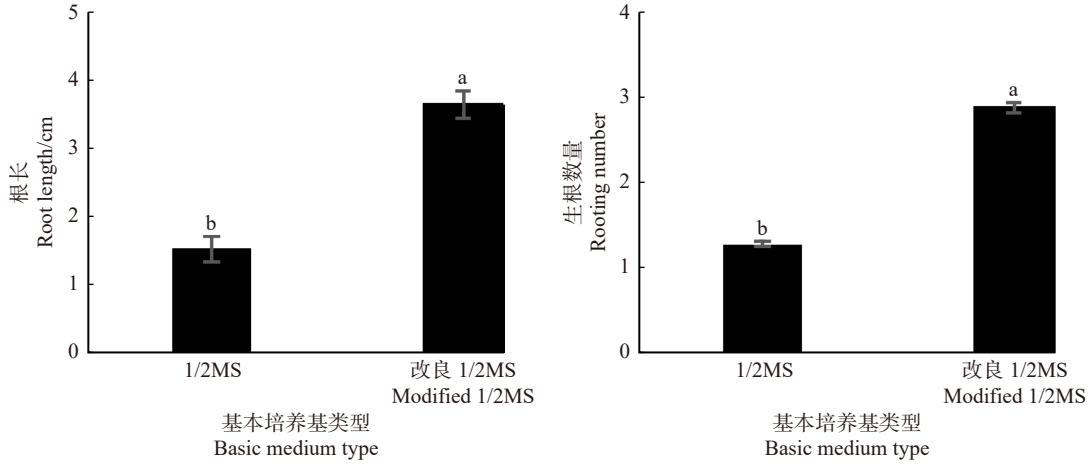


图 7　不同基本培养基类型对‘京枣 39’根长及根数量的影响

Fig. 7　Effects of different basic medium types on rooting length and rooting number of ‘Jingzao 39’

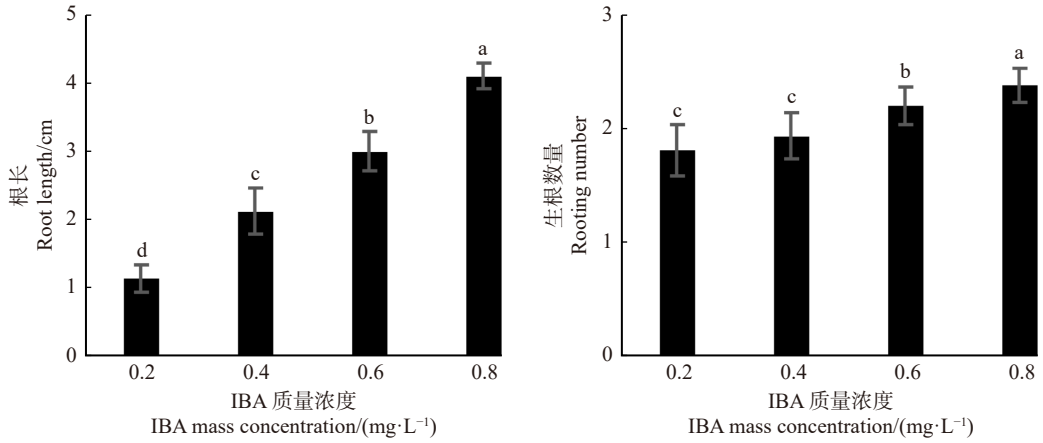


图 8 不同 IBA 质量浓度对‘京枣 39’根长和根数量的影响

Fig. 8 Effects of different IBA mass concentrations on root length and rooting number of ‘Jingzao 39’



图 9 ‘京枣 39’生根培养 45 d 的生根效果

Fig. 9 Rooting effects of 45 d rooting culture of ‘Jingzao 39’

3 讨 论

人工离体多倍体诱导主要包括物理诱导和化学诱导两个途径，其中化学诱导更为常用[21]，而在化学诱变剂中，秋水仙素因其对染色体影响小、诱导效率高以及不利突变低等特性得到了广泛应用[22]。目前已在包括苹果[23]、樱桃（*Prunus pseudocerasus*）[24]以及蓝莓（*Vaccinium* spp.）[25]等经济作物中利用秋水仙素处理获得多倍体植株。

秋水仙素溶液浓度和处理时间会显著影响多倍体诱导效果，较高的秋水仙素浓度和处理时间能提高多倍体的诱导效率，但也会增加植株的死亡率[26]，因此在实际的研究中，应选择适宜的处理组合。马荣群等[23]以红果肉苹果‘红脆甜’叶片为外植体诱导多倍体发现，以 200 ~ 350 mg/L 秋水仙素溶液处理叶片 4 d 可以稳定获得多倍体。而在同样的蔷薇科植物‘库尔勒香梨’（*Pyrus sinkiangensis*）中，使用 0.4% 秋水仙素溶液处理 48 h 效果最好，诱变率为 6.6%[27]。以小青杨（*Populus pseudo-simonii*）叶片为外植体诱导多倍体的研究发现，其最佳秋水仙素处理组合为 200 mg/L 秋水仙素处理 3 d，最高诱导效率达 14.6%[28]。以杂交枫香（*Liquidambar styraciflua* × *fomorsana*）叶片为外植体诱导多倍体的研究发现，其最佳秋水仙素处理组合同样为 200 mg/L 秋水仙素处理 3 d，并获得了 11 个四倍体植株[29]。本研究发现：较适宜的‘京枣 39’叶片多倍体诱导的秋水仙素质量浓度和处理时间组合为 80 mg/L 处理 48 h，与郭烨等[8]以茶壶枣叶片为外植体诱导多倍体的结果相似，而与苹果属植物、杨树以及枫香等植物的结果相差较多，这可能是不同植物间秋水仙素的耐受性和渗透性存在差异所导致的。在本研究中，仅获得一株纯合四倍体植株，这可能是秋水仙素质量浓度或处理时间不够，诱导效率低所导致的。但是在预试验中发现，使用超过 100 mg/L 的秋水仙素溶液处理‘京枣 39’叶片存活率很低，且不定芽生长受到了一定抑制，说明其叶片的耐受性较低，这也是大部分枣品种多以田间诱导愈伤获得多倍体的原因[30−31]。

除秋水仙素浓度和处理时间外，也有大量文献表明，预培养时间对多倍体诱导效率有显著影响[32−33]。本试验的研究表明：预培养时间过短，刻伤叶片未开始分化过程，无法获得多倍体植株；而更长的预培养时间则可能导致秋水仙素溶液处理非单一细胞，从而导致嵌合体的产生，这与许从萍[34]对青杨多倍体诱导的结果相似。在枣树上有关预培养时间对离体多倍体诱导效率的影响的文章较少，郭烨等[8]通过形态学观察和石蜡切片发现：当预培养时间为 8 ~ 9 d 时，伤口处细胞启动分化诱导效率最高；更低的预培养时间时，细胞还未开始分化；而更高的预培养时间会导致芽原基或不定芽，均会影响多倍体的诱导效率。在对酸枣茎段进行多倍体诱导的试验中发现：预培养 4 d 能显著提高多倍体的诱导效率，而更多天

数的预培养反而会导致诱导率的降低[35]，这些试验结果均与本试验存在差异，说明不同枣品种间最佳预培养时间存在差异。

本研究试验还优化了‘京枣 39’的增殖和生根培养基，有利于‘京枣 39’的快速扩繁及保存，此外可为后续获得四倍体植株的扩繁、生根、移栽等工作提供一定的试验基础。对‘京枣 39’增殖培养的研究认为，0.8 mg/L 6-BA 与 0.4 mg/L IBA 组合有利于‘京枣 39’组培苗的增殖，同时显著优于 6-BA 与 NAA 的组合，这与 Costantini Elisa 等[36]的研究一致，但与海棠（*Malus spectabilis*）等植物的离体快繁结果不符[37]，这可能是由于不同树种间内源激素不同，导致其所需外源生长调节剂存在差异，其中 IBA 可以协助植物自身产生的内源生长素 IAA 运输至植物基部[38]；而 NAA 则是促进组培苗中的淀粉水解为还原糖[39]，因此在构建快繁体系时应全面设计试验。

对‘京枣 39’生根培养的研究发现：基本培养基类型和 IBA 质量浓度对组培苗生根长度及数量有显著影响，而 6-BA 质量浓度无显著影响。其中改良 1/2MS 与 0.8 mg/LIBA 组合有利于组培苗生根。与 1/2MS 基本培养基相比，改良 1/2MS 基本培养基中的 VB1 组分提高了 50 倍，VB1 的活性形式 ThDP 是三羧酸循环的重要中间物质，较高的 VB1 有利于植物的呼吸作用，加快植物代谢速率[40]，这可能是以改良 1/2MS 为基本培养基培养的组培苗生根效果更好的原因。

4　结　　论

本研究以优良鲜食大枣品种‘京枣 39’组培苗叶片为外植体，探究了秋水仙素溶液质量浓度、处理时间和预培养时间等技术条件对其不定芽再生的影响，并初步建立了‘京枣 39’离体多倍体诱导体系，获得了‘京枣 39’纯合四倍体植株，研究认为，最佳预培养时间为 6 d，较适宜的秋水仙素处理浓度和时间为 80 mg/L 处理 48 h。同时优化了‘京枣 39’增殖培养和生根培养方法，最佳增殖培养基为 MS + 0.8 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8；最佳生根培养基为改良 1/2MS + 0.8 mg/L IBA + 30 g/L 麦芽糖，pH = 5.8，这为‘京枣 39’二倍体植株以及后续获得多倍体植株的扩繁移栽奠定试验基础。本研究为优良枣树品种‘京枣 39’的种质创新提供了切实可行的技术方法，为多倍体诱导在枣树以及其他果树中的应用提供了试验基础。

参　考　文　献

[1] 王利虎, 卢彦琦, 苏行, 等. 果树多倍化育种研究进展 [J]. 山西农业大学学报 (自然科学版), 2022, 42(3): 14−24.
Wang L H, Lu Y Q, Su X, et al. Research progress on polyploidy breeding of fruit trees[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2022, 42(3): 14−24.

[2] José J D, Javier L, Enrique M, et al. Phenotypic diploidization in plant functional traits uncovered by synthetic neopolyploids[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(15): 5522−5533.

[3] 欧春青, 李林光, 何平, 等. 寒富苹果叶片离体再生及四倍体诱导 [J]. 果树学报, 2008, 25(3): 293−297.
Ou C Q, Li L G, He P, et al. *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(3): 293−297.

[4] Podwyszyńska M, Sowik I, Machlańska A, et al. *In vitro* tetraploid induction of *Malus* × *domestica* Borkh. using leaf or shoot explants[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 226(12): 379−388.

[5] 徐靓. 二倍体猕猴桃资源的离体再生与多倍体诱导 [D]. 铜川: 西北农林科技大学, 2017.
Xu L. *In vitro* regeneration of diploid *Actinidia* and polyploid induction[D]. Tongchuan: Northwest A&F University, 2017.

[6] 王利虎. 枣和酸枣田间愈伤组织途径芽再生技术优化及其在多倍体诱变中的应用 [D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
Wang L H. Optimization of *in vivo* bud regeneration technique via callus and its applicationin polyploidy induction in Chinese jujube and sour jujube[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015.

[7] Gu X F, Yang A F, Meng H, et al. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua[J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(11): 671−676.

[8] 郭烨, 崔艳红, 孔德仓, 等. 茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(7): 49−56.
Guo Y, Cui Y H, Kong D C, et al. Study on key techniques of polyploid induction in *Ziziphus jujuba* Mill. cv. ‘Teapot’[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(7): 49−56.

[9] Cui Y, Hou L, Li X, et al. *In vitro* induction of tetraploid *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* plants from leaf explants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2017, 131(1): 175−182.

[10] 曲泽州, 王永蕙. 中国果树志: 枣卷 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 1−5.
Qu Z Z, Wang Y H. Chinese fruit tree chronicle: jujube roll[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1993: 1−5.

[11] 王向红, 崔同, 刘孟军, 等. 不同品种枣的营养成分分析 [J]. 营养学报, 2002, 24(2): 206−208.
Wang X H, Cui T, Liu M J, et al. Analysis of nutritional composition of different Chinese jujubes[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2002, 24(2): 206−208.

[12] Jin X. Jujuba: *Ziziphus jujuba*[M]. Ballarat: Exotic Fruits, 2018: 263−269.

[13] 张砚垒. 不同品种红枣营养成分分析及抗氧化活性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
Zhang Y L. Nutritional components analysis and antioxidant properties of different varieties of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.)[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2021.

[14] 潘青华, 白金, 郑立梅. 优质鲜食大枣新品种京枣 39[J]. 北京农业, 2003, 23(6): 19.
Pan Q H, Bai J, Zheng L M. High quality fresh jujube new variety Jingzao 39[J]. Beijing Agriculture, 2003, 23(6): 19.

[15] 彭华, 潘青华, 张洪. 京枣 39 的品种特性及丰产栽培 [J]. 林业实用技术, 2005, 48(11): 30−31.
Peng H, Pan Q H, Zhang H. Variety characteristics and high-yield cultivation of Jingzao 39[J]. Forest Science and Technology, 2005, 48(11): 30−31.

[16] 卢翠. 京枣 39 引种表现及丰产栽培技术 [J]. 绿色科技, 2021, 23(13): 183−184.
Lu C. Introduction performance and high-yield cultivation

techniques of Jingzao 39[J]. Journal of Green Science and Technology, 2021, 23(13): 183−184.

[17] 刘志国. 南疆砾质戈壁条件下枣种质资源的评价与筛选 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
Liu Z G. Evaluation and selection of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) germplasmson gravel gobi of south Xinjiang[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2011.

[18] 高艺, 薄文浩, 李颖岳, 等. ‘京枣 39’离体叶片高效再生体系的建立 [J]. 北京林业大学学报, 2023, 45(2): 68−77.
Gao Y, Bo W H, Li Y Y, et al. Establishment of high-efficiency regeneration system from *in vitro* leaves of ‘Jingzao 39’[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45(2): 68−77.

[19] 李玉岭, 闫少波, 毛秀红, 等. 秋水仙素诱导林木多倍体研究进展 [J]. 农学学报, 2022, 12(8): 55−61.
Li Y L, Yan S B, Mao X H, et al. Polyploidy induction by colchicine in forest trees: research progress[J]. Journal of Agriculture, 2022, 12(8): 55−61.

[20] 吴辉晶. 无刺刺梨的组织培养及多倍体诱导 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
Wu H J. Tissue culture and polyploid induction of *Rosa roxburghii* f. *eseiosa* Ku[D]. Guiyang: Guizhou University, 2023.

[21] 崔艳红. 枣组培体系的建立及四倍体诱导和生根研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
Cui Y H. Establishment of jujube tissue culture system and study on tetraploid induction and rooting[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.

[22] 李云, 冯大领. 木本植物多倍体育种研究进展 [J]. 植物学通报, 2005, 22(3): 375−382.
Li Y, Feng D L. Advances in research into polyploidy breeding of woody plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, 22(3): 375−382.

[23] 马荣群, 张蕊芬, 宋正旭 , 等. 红果肉苹果‘红脆甜’多倍体诱导研究 [J]. 果树学报, 2020, 37(10): 1499−1505.
Ma R Q, Zhang R F, Song Z X, et al. A study on the induction of polyploidy in red-fleshed apple ‘Hongcuitian’[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(10): 1499−1505.

[24] 刘庆忠, 马怀宇, 魏海蓉, 等. 秋水仙素诱导樱桃矮化砧木‘吉塞拉 6 号’获得六倍体再生植株 [J]. 园艺学报, 2008, 35(2): 285−288.
Liu Q Z, Ma H Y, Wei H R, et al. Regeneration of hexaploid plants of cherry dwarf rootstock ‘Gisela 6’ from *in vitro* leaves treated with colchicine[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(2): 285−288.

[25] Marangelli F, Pavese V, Vaia G, et al. *In vitro* polyploid induction of highbush blueberry through *de novo* shoot organogenesis[J]. Plants, 2022, 11(18): 2349.

[26] 周慧文, 冯斗, 严华兵. 秋水仙素离体诱导多倍体研究进展 [J]. 核农学报, 2015, 29(7): 1307−1315.
Zhou H W, Feng D, Yan H B. The progress of polyploids induced *in vitro* via colchicine[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015, 29(7): 1307−1315.

[27] 刘晓婷. 库尔勒香梨叶片再生与多倍体诱导研究 [D]. 铜川: 西北农林科技大学, 2015.
Liu X T. Leaf regeneration and polyploid induction of ‘Korla Fragrant’ pear[D]. Tongchuan: Northwest A&F University, 2015.

[28] Cai X, Kang X. *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(9): 1771−1778.

[29] Zhang Y, Wang Z, Qi S, et al. *In vitro* tetraploid induction from leaf and petiole explants of hybrid sweetgum (*Liquidambar styraciflua* × *Liquidambar formosana*)[J]. Forests, 2017, 8(8): 264.

[30] 石庆华. 田间愈伤组织途径诱导枣和酸枣多倍体研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
Shi Q H. *In vivo* polyploid induction via callus in Chinese jujube and sour jujube[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2013.

[31] 闫超, 苏彩霞, 刘晓红, 等. 灰枣田间愈伤组织诱导多倍体的育种方法研究 [J]. 新疆农垦科技, 2016, 39(8): 35−37.
Yan C, Su C X, Liu X H, et al. A study on the breeding method of inducing polyploidy from field callus of grey jujube[J]. Xinjiang Farm Research of Science and Technology, 2016, 39(8): 35−37.

[32] Wu J, Sang Y, Zhou Q, et al. Colchicine *in vitro* tetraploid induction of *Populus hopeiensis* from leaf blades[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 141(2): 1−11.

[33] 邱芬, 林源, 辛培尧, 等. 无籽刺梨多倍体诱导及鉴定 [J]. 中国南方果树, 2017, 46(4): 121−124, 128.
Qiu F, Lin Y, Xin P Y, et al. Induction and identification of polyploidy *Rosa sterilis*[J]. South China Fruits, 2017, 46(4): 121−124, 128.

[34] 许从萍. 青杨四倍体诱导及其营养生长缓慢的分子基础研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
Xu C P. Tetraploid induction and molecular basic of vegetative slowly growth in tetraploid *Populus* spp. (Section Tacamahaca) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.

[35] 王娜. 利用组织培养诱导枣和酸枣多倍体研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2004.
Wang N. Polyploid induction of *Ziziphus jujuba* Mill. and *Ziziphus acidojujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu by tissue culture[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2004.

[36] Costantini E, Landi L, Silvestroni O, et al. Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity[J]. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1689−1694.

[37] 付为国, 韦晨, 王醒. 苹果属植物组织培养的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1320−1325.
Fu W G, Wei C, Wang X. Research progress on tissue culture of *Malus* plant[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(4): 1320−1325.

[38] 王金祥, 严小龙, 潘瑞炽. 不定根形成与植物激素的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 133−142.
Wang J X, Yan X L, Pan R Z. Relationship between adventitious root formation and plant hormones[J]. Plant Physiology Journal, 2005, 41(2): 133−142.

[39] 彭子模, 程伟, 高雁, 等. 萘乙酸对几种植物扦插生根的影响 [J]. 新疆师范大学学报 (自然科学版), 2002, 21(2): 34−38.
Peng Z M, Cheng W, Gao Y, et al. How does the NAA exert effects on root growth of several plants’ cuttage shoots[J]. Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition), 2002, 21(2): 34−38.

[40] Frank R A W, Leeper F J, Luisi B F. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes[J]. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 2007, 64(7−8): 892−905.

（责任编辑 范 娟 赵田芸
责任编委 康向阳）