

# 优质脱毒枣苗工厂化育苗技术研究

任东植 徐兆飞 王文琪 白 莉 曲运琴 李 峰 李富华  
(山西省农业科学院小麦研究所, 临汾 041000)

**摘 要** 应用生物技术从优质枣苗的脱除类菌原体(MLO)到启动组培技术、增殖培养技术、生根培养技术、组培苗无土栽培技术和温室营养钵栽培及室外炼苗大田绿叶移栽技术进行了系统试验。完成了脱毒枣苗工厂化育苗开发研究。结果生根率达到94%,大田绿叶移栽成活率达到98%,枣苗当年生长高度达到40~80cm,第二年生长高度可达到115~180cm。该项技术对于长期以来红枣生产中遇到的繁殖慢、品质差、枣疯病日趋严重三大难题提供了有效的解决途径。

**关键词** 枣 工厂化育苗 类菌原体脱除 绿叶移栽

应用生物技术进行优质枣苗的组织培养、脱毒和快繁,实现优质脱毒枣苗工厂化快繁,是解决长期以来红枣生产中遇到的繁殖慢、品质差、枣疯病日趋严重三大难题的有效途径。过去在组织培养技术方面虽有广泛应用,但枣树组培研究较少,多是零星单项技术试验,未见有对优质脱毒枣苗工厂化快繁技术进行系统化工程研究的报道。我所枣树组培开发研究中心对该套技术进行了系统化工程研究。现将研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

试验材料以优质名贵品种苹果枣为主,兼用赞皇大枣、相枣、梨枣、胜利枣等品种。所用的外植体为嫩枝、休眠枝、水培芽3种,均采用1~2年生根蘖苗。

试验用的基本培养基为MS和WP,添加有植物生长素和细胞分裂素,其他添加物还有水解乳蛋白、真菌细菌抑制剂等。

研究方法采用室内组织培养和温室无土及有土栽培相结合;室外组培苗驯化壮苗与大田绿叶移栽成苗相结合。

## 2 结果与分析

### 2.1 热处理与组织培养相结合,脱除枣疯病原类菌原体(MLO)

2.1.1 热处理脱除MLO 将秋天落叶后采的带有枣疯病的1~2年生优质根蘖条截成20cm

左右,经肥皂水洗后用自来水冲洗净,以20根为一捆,置于恒温水浴锅内,进行热处理。水温保持在 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ ,时间为1h。处理后置于培养室内保温水培,温度保持在 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 之间,相对湿度为70%~90%,经水培10~15d后,全部萌发出新芽,继续生长到1~3cm,均无发病现象。试验表明,利用温水处理可以钝化MLO,降低枣疯病原密度或将其脱除。

**2.1.2 茎尖分生组织培养脱毒** 经过热处理的水培芽,用肥皂水冲洗后,自来水冲洗20~30min,移至超净工作台上无菌操作。经70%酒精消毒20s,0.1%HgCl<sub>2</sub>消毒5~10min,剪去伤口,接在启动培养基上。将长出的新芽切割转接两次后,转移至增殖培养基中反复增殖。并将试管苗在 $38\sim 40^{\circ}\text{C}$ 高温的环境中培养两周,以后转入正常培养。

**2.1.3 脱除效果** 采用迪纳氏染色法检测。用脱除MLO处理的试管苗作成徒手切片(厚度约 $100\mu\text{m}$ ),并用健株和具有典型枣疯病症状的丛枝切片作对照,同时置于载玻片上,用0.2%的迪纳氏染色液滴染10min,经蒸馏水冲洗3遍后封片,置于光学显微镜下观察。病株切片的韧皮部筛管中有很明显被染成深蓝色的颗粒团聚物,这此团块大多存在于形成层附近的新生韧皮部区域。健株及脱MLO苗的韧皮部基本不着色。证明热处理结合茎尖分生组织培养有效地脱除枣疯病病原MLO。此外,据有关试验证明枣疯病的潜伏期在25~382d。1996年在大田栽植的脱毒组培苗均生长健壮,无枣疯病发生。

## 2.2 启动培养技术

将优质脱毒枣苗或无病健株枣苗的茎尖和茎段,作为外植体来源,进行无性系的启动培养。在启动培养中,外植体接种污染率高,生长缓慢,死亡率高是技术难点。针对此难点采取了灭菌催芽和不同类型启动培养基的试验。

**2.2.1 外植体休眠枝催芽处理** 将优质枣的幼龄粗壮的根蘖条截成20cm左右长,先用洗衣粉水刷洗,再用自来水冲洗干净。在温度 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ ,光照2500lx的条件下,放在大烧杯中,用塑料膜保湿水培,每天换水1次,并将外植体硬枝用干净水轻轻洗刷一遍,去掉滋生的各种杂菌,每隔5d用多菌灵1000倍液灭菌1次,10~15d后即又长出健壮的枣芽,供启动使用。

**2.2.2 启动培养表面消毒处理** 在非生长季节用上述灭菌催芽法获得的优质枣芽为材料,在生长季节用连日阳光好的中午在室外采的优质枣芽为材料,进行表面消毒。先用清水浸泡洗净,再用洗衣粉水刷洗,此后,自来水冲30min,然后在无菌条件下,用70%~75%的酒精表面消毒30~60s,再用0.1%HgCl<sub>2</sub>消毒5~15min或2%次氯酸钠消毒5~20min,最后用无菌水清洗5~8遍。切去材料与药液接触的伤口,切分为2cm的芽尖或带节茎段,接种于启动培养基上,进行无菌培养。试验证明,这可使启动培养的污染率由过去的80%~100%降低到10%~30%。

**2.2.3 启动培养条件** 试验证明,启动培养温度在 $25\sim 27^{\circ}\text{C}$ ,光照1500~2500lx,室内湿度60%~70%,试管内湿度以90%以上的条件下较好。在启动培养中发现,不仅不同品种对培养基的适应性差异很大,而且同一批材料之间的个体差异也很显著,同时接入相同启动培养基的80瓶梨枣,在15d后观察,有45瓶生长缓慢,有18瓶生长良好,有17瓶几乎没有生长,渐渐死亡。这是由于外植体的内源激素和营养储备物质等的差异造成的。所以我们在初始启动培养时,针对性地采用了激素种类和量不同的3种培养(b<sub>4</sub>, b<sub>5</sub>, b<sub>6</sub>),然后再根据培养过程中其内源激素和营养储量的变化,转入相应的培养基进行继续培养,这对启动培养的效果有了较大的改进。启动培养的外植体,当其茎节上的腋芽长高后,切分为1.5cm的茎段,反复切割培养3~

5代后, 外植体材料就可逐渐适应试管培养环境

### 2.3 增殖培养技术

在枣树增殖培养中分化率低的重要原因是枣苗在生长过程中的营养分配和运转规律具有很强的不均性和集中性, 使得营养分配在极性位置高的顶端优势强, 侧芽的产生和生长很难, 造成单茎伸长生长为主, 其分枝和丛生量极少, 使得分化率提高成了难题。根据这一规律, 我们认为单一增殖培养基要使伸长和分枝丛生都达到很好的状态是极困难的。于是采用了“双型培养基法”来提高枣树的分化率, 即先将增殖培养的分割茎段, 接在 B 型培养基上, 使其基部产生的愈伤组织形成大量不定芽原基分生组织细胞, 进而促进其分化成为多个芽原基或芽尖。第二步将有大量芽原基的茎段转入 C 型培养基, 促进其长成许多新芽呈丛状, 一起伸长生长, 使得分化率大大提高。试验证明, 这种“双型培养基法”有效地提高了分化率, 丛生分芽数最多的达到 17 个, 平均 6 个; 伸长高度 3~21 cm, 平均 6 cm, 分化增殖倍数平均达到 12 倍。

### 2.4 生根培养技术

以提高生根率和生根质量为目的, 对试管苗的生根培养基和环境因子 (湿度、光照、透气性) 进行了试验。结果表明, 在以 1/2 MS 为基本培养基的生根基质上, 温度在 28℃ 左右, 光照强度 2500 lx, 光照时间 12 h, 提高培养室的通气性的条件下, 组培苗生根好, 叶片伸展量大, 生根率可达到 94%, 有效地提高了苗的健壮程度和对外界环境的适应能力。

### 2.5 试管苗的驯化炼苗及无土栽培技术

试验表明, 生根试管苗从培养室的恒温高湿无菌条件下到出瓶移栽, 要先经过闭口炼苗 2 周。炼苗条件为: 散射日光, 温度在 20~30℃ 范围内逐渐达到室外温度。经过弱光和近室外气温的锻炼, 幼苗变得油绿, 移栽后恢复生长快。然后用蛭石无土栽培 20 d。方法是先洗净试管苗根部琼脂 (移栽用的蛭石要用 0.1% 高锰酸钾消毒, 以防止栽后烂根, 引起大批死亡), 然后移栽到育苗盘或育苗杯中, 放置在温室里, 用塑料膜覆盖保湿 1 周, 逐步放风揭膜, 温度保持在 25~30℃, 湿度 80%~90%, 逐渐降低到温室常规湿度。试验证明可使成活率达到 98%, 幼苗不但生长健壮, 而且生根也比出瓶时增加 60%~120%。

### 2.6 组培苗营养钵栽培及大田绿叶移栽成苗技术

将经无土栽培的组培苗, 移入温室或保护地放置的营养钵中, 基质为砂土和腐殖质配成的营养土。移栽后用塑料膜保温 5 d, 湿度 80% 左右, 温度保持在 20~32℃, 以后逐渐通气揭膜。在管理上要注意喷水、除草和定期叶面追肥。1 个月左右后, 苗高大约在 10~12 cm 左右, 移入有遮阳装置的露地, 大约 1 周的时间, 逐渐将遮阳网撤去达到全光照露天环境, 使苗充分适应, 然后带土绿叶移入大田苗圃, 栽后立即浇水, 光照强烈时可辅助叶面喷水, 以保证叶片不发生萎蔫。移入大田后第 5 d 第 10 d 各浇透水 1 次, 此后根据土壤墒情及时浇水、追肥、中耕除草, 防治苗期虫害、注意越冬管理等, 进入常规苗圃管理。试验表明, 组培苗大田绿叶移栽成活率可达到 98%, 当年生长高度可达 40~80 cm, 第 2 年生长高度可达 115~180 cm。

## 参 考 文 献

- 1 田砚亭. 枣树脱除类菌原体(MLO)技术研究. 北京林业大学学报, 1993(2): 20~ 26
- 2 裘文达. 园艺植物组织培养. 上海: 上海科技出版社, 97~ 107
- 3 戴洪义, 沈德绪, 林伯年. 枣疯病热处理脱毒初步研究. 落叶果树, 1988(4): 1~ 2
- 4 王祈楷, 徐绍华. 枣疯病的研究. 植物病理学报, 1981, 11(1): 15~ 18
- 5 赵明光. 迪纳氏染色技术可行性研究. 森林昆虫通讯, 1991(4): 10~ 11
- 6 金开璇. 组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究. 植物病理学报, 1991(3): 185~ 188
- 7 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. 华北农学报, 1988 3(4): 116~ 119
- 8 马建华. 枣嫩茎的组织培养. 植物生理通讯, 1988(6): 16
- 9 罗晓芳. 金丝小枣组织培养快速繁殖的研究. 北京林业大学学报, 1996(2): 11~ 15

## A Study on the Industrial Breeding Technology of High-quality Virus-free Date Seedlings

Ren Dongzhi Xu Zhao-fei Wang Wen-qi Bai Li Qu Yun-qin Li Feng Li Fu-hua  
(Institute of Wheat, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Linfen 041000)

**Abstract** The present study applied biotechnology on the industrial breeding of virus-free date on a small scale. The study completed systematic researches from the removal of MLO to tissue culture initiation, proliferative culture, root inducing culture, the soil-less cultivation of tissue cultured seedling, greenhouse pot cultivation, field acclimation and transplanting technology of greenleaf plants to fields. The rooting rate was 94%. The survival rate of transplanting was 98%. The high-quality date seedling could develop to 40~ 80 cm high in one year, and the next year it could reach 115~ 118 cm high. This technology provided effective ways for solving the three baffling problems, i.e. slow propagation, lower-quality and serious virus diseases found in the jujube production.

**Key words** Date; Industrial breeding; MLO removal; Transplanting