果 树 学 报 2025，42（7）：1621-1633
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250126

枣花药培养及植株再生体系的建立

郭凯文[1,2]，徐崇崇[1,2]，胡亚宁[1,2]，黄 建[1,2*]

（[1]西北农林科技大学林学院·国家林业和草原局黄土高原林木培育重点实验室，陕西杨凌 712100；
[2]西北农林科技大学·国家林业和草原局枣工程技术研究中心，陕西杨凌 712100）

摘 要：【目的】建立枣树花药愈伤组织诱导及植株再生技术体系，为枣树遗传改良提供技术支撑。**【方法】**以冬枣、骏枣及七月鲜花药为外植体，采用正交试验与单因素试验相结合的方法，系统研究基因型、碳源、基本培养基类型及植物生长调节剂配比对枣花药离体再生的影响。**【结果】**冬枣、骏枣及七月鲜的花药愈伤组织在添加1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} NAA+30 g·L^{-1}麦芽糖的MS培养基中诱导率最高，分别为59.33%、64.00%和58.67%。适宜冬枣、骏枣及七月鲜花药愈伤增殖的培养基分别为2.5 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} IBA+0.1 mg·L^{-1} NAA、1.0 mg·L^{-1} TDZ+0.8 mg·L^{-1} IBA和1.5 mg·L^{-1} TDZ+0.8 mg·L^{-1} IBA，增殖系数分别为88.89%、81.11%和78.89%；适宜花药愈伤分化的基本培养基为WPM，激素组合分别为0.8 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} IBA+0.2 mg·L^{-1} NAA、1.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.5 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} NAA和1.0 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} IBA+0.2 mg·L^{-1} NAA，分化率分别为48.00%、29.33%和33.33%。生根培养中，添加0.4 mg·L^{-1} IBA和0.3 g·L^{-1}活性炭的1/2MS培养基使冬枣生根率达87.5%。**【结论】**建立了冬枣、骏枣及七月鲜的离体花药培养体系，获得了七月鲜单倍体植株和完整的冬枣再生植株，该技术体系可显著提高愈伤诱导率与植株再生效率，为枣树倍性育种及遗传转化研究奠定了技术基础。

关键词：枣；花药；愈伤组织；流式细胞术；单倍体育种

中图分类号：S665.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1009-9980(2025)07-1621-13

Establishment of jujube anther culture and plant regeneration system

GUO Kaiwen[1, 2], XU Chongchong[1, 2], HU Yaning[1, 2], HUANG Jian[1, 2*]

([1]College of Forestry, Northwest A & F University/Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Silviculture in Loess Plateau, Yangling 712100, Shaanxi, China; [2]Northwest A & F University/Research Center of Jujube National Forestry and Grassland Administration on Silviculture in Loess Plateau, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract:【Objective】*Ziziphus jujuba* is an economically important tree species in China. The establishment of its anther culture regeneration system is of great significance for accelerating genetic improvement and polyploid breeding. However, the existing anther culture system faces challenges such as low callus induction rates and difficulties in adventitious bud differentiation. In this study, three jujube varieties, Dongzao, Junzao and Qiyuexian, were used as materials. By optimizing the ratios of plant growth regulators, carbon sources, and cultivation conditions, an efficient anther culture regeneration system was established.【Methods】Young floral buds of Dongzao, Junzao and Qiyuexian at the green to yellowish- green stage (pollen at the late uninucleate stage) were used as the experimental materials. Flower buds were rinsed with running tap water for 0.5−1 h, transferred to a laminar flow hood, surface-sterilized with 75% ethanol for 30−60 s, followed by immersion in 0.1% (*w*/*V*) $HgCl_2$ solution for 10 min, and rinsed 4−6 times with sterile water. Anthers were aseptically excised from flower buds in a culture dish. The anthers were inoculated onto callus induction media with 9 combinations and concentrations of plant growth regulators (PGRs), with varying durations of pretreatment at 4 ℃ (0, 1, 3, 5, 7 d) and carbon sources (Maltose, Sucrose and Glucose). Callus induction rates were recorded after 30 d of

收稿日期：2025-03-10 **接受日期：**2025-04-18

基金项目：国家重点研发计划项目（2024YFD2200601）

作者简介：郭凯文，女，在读硕士研究生，研究方向为经济林重要性状形成机制。E-mail：guokaiwen.521@nwafu.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. E-mail：huangj@nwsuaf.edu.cn

culture. Induced callus clusters were transferred to MS medium supplemented with distinct PGR types and concentrations for proliferation under dark conditions for 20 d, and then callus proliferation coefficients were calculated. For differentiation, two basal medium (MS and WPM) were used, supplemented with 20 g·L^{-1} maltose and varying PGR combinations (18 treatments in total). Well-growing callus lines of each genotype were inoculated and cultured under light for 50 d to assess adventitious bud differentiation rates. Ploidy of regenerated plantlets was determined via flow cytometry using diploid *Ziziphus jujuba* var. *spinosa* tissue-cultured seedlings as controls. For rooting, 2 cm stem segments of Dongzao with vigorous growth from subcultures were transferred to rooting media, and rooting rates were evaluated after 30 d.【Results】The optimal callus induction medium for anthers of Dongzao, Junzao and Qiyuexian was MS + 30 g·L^{-1} maltose + 1.0 mg·L^{-1} 2, 4-D + 0.4 mg·L^{-1} TDZ + 0.4 mg·L^{-1} NAA, achieving an induction rate of 59.33%, 64.00%, and 58.67%, respectively. The induction rate was higher than those achieved by the individual application of 2, 4-D alone or the sole combination of TDZ and NAA. The effects of different hormones and genotypes on callus induction rates were both significant. The influence of the three hormones on callus induction rates was in the order of 2, 4-D＞ NAA＞TDZ. Calli induced by the addition of maltose were mostly yellowish-white in color and grew fast, with the highest induction rate of callus tissue at a concentration of 30 g·L^{-1}. Pretreatment at 4 ℃ increased the callus induction rates in Dongzao and Qiyuexian, but had no significant effect in Junzao. Among them, the induction rate of Dongzao anthers was higher at 1 to 3 d of low-temperature treatment, with an induction rate of 60.67% in 1 d chilling pretreatment, and significantly decreased to 36.67% under 5 d chilling pretreatment. The induction rate of Junzao anthers showed no significant difference under different low-temperature treatment times, remaining around 47%, indicating that low-temperature treatment had a limited effect on its induction rate. The induction rate of Qiyuexian anthers was highest (38.67%) under 3 d of low-temperature treatment. The culture media suitable for the callus proliferation of the anthers of Dongzao, Junzao and Qiyuexian were 2.5 mg·L^{-1} TDZ + 0.4 mg·L^{-1} IBA + 0.1 mg·L^{-1} NAA, 1.0 mg·L^{-1} TDZ + 0.8 mg·L^{-1} IBA, 1.5 mg·L^{-1} TDZ + 0.8 mg·L^{-1} IBA, respectively, and the proliferation coefficients were 88.89%, 81.11% and 78.89% respectively. WPM basal medium was superior for differentiation, with hormone combinations yielding differentiation rates of 48.00%, 29.33%, and 33.33% for Dongzao (0.8 mg·L^{-1} TDZ + 0.5 mg·L^{-1} IBA + 0.2 mg·L^{-1} NAA), Junzao (1.0 mg·L^{-1} 6-BA + 0.5 mg·L^{-1} TDZ + 0.5 mg·L^{-1} NAA), and Qiyuexian (1.0 mg·L^{-1} TDZ + 0.5 mg·L^{-1} IBA + 0.2 mg·L^{-1} NAA), respectively. Dongzao exhibited the highest callus induction and differentiation rates, with anther-derived callus demonstrating superior morphological quality. Compared to Junzao and Qiyuexian, Dongzao showed significantly higher efficiency in callus and adventitious bud induction, accompanied by vigorous growth of regenerated plantlets. These findings collectively indicate that genotype is a critical determinant in the *in vitro* induction of adventitious buds from anther-derived callus. Among the 36 regenerated plants of Dongzao, 33 (92%) were diploid (2n) and 3 (8%) were haploid-diploid chimeras. All the 5 regenerated plants of Junzao were diploid (2n). Among the 8 regenerated plants of Qiyuexian, 6 (75%) were diploid (2n) and 2 (25%) were haploid (n). For rooting, 1/2 MS medium supplemented with 0.4 mg·L^{-1} IBA and 0.3 g·L^{-1} activated charcoal achieved an 87.5% rooting rate for Dongzao.【Conclusion】This study established an *in vitro* anther culture system for Dongzao, Junzao and Qiyuexian, and obtained regenerated plants. The optimal induction, proliferation, and differentiation media for anthers of Dongzao, Junzao and Qiyuexian were determined, revealing the impact of genotype. Haploid regenerated plants of Qiyuexian were obtained, providing new materials for the breeding of jujube varieties.

Key words: Jujube; Anther culture; Callus; Flow cytometry; Haploid breeding

枣（*Ziziphus jujuba* Mill.）是鼠李科（Rhamnaceae）枣属（*Ziziphus* Mill.）植物，是中国重要的特色经济林树种，其优良品种的培育对实现优质、高产、高效栽培具有关键作用。因此，通过不同育种手段培育出综合性状优良的品种成为枣树生产上迫切需要解决的问题[1]。在植物育种领域，花药离体培养技术作为一种重要的手段，可以进一步获得纯合植物，能够有效提高育种选择效率，也可为枣品种改良和新品种选育提供有力支持[2-3]。

关于离体花药培养的报道始于1964年，印度德里大学学者在毛叶曼陀罗植物[4]上进行并获得单倍体植株。之后逐渐应用于水稻[5]、水葫芦[6]、草莓[7]、茄子[8]和麻风树[9]等植物上。中国花药培养育种开始于20世纪70年代，先后在滇杨[10]、苹果[11]、桑树[12]等植物上应用并得到再生植株。目前有多个枣品种建立了花药组织培养技术体系，冬枣、辣椒枣、月光枣、赞皇大枣、阜平大枣[13]、苹果枣、酸枣、骏枣[14]、长红枣、金丝小枣[15-16]等十几个枣品种获得花药再生植株，其中王震星等[15]的金丝小枣和武晓红[13]的冬枣和阜平大枣得到了单倍体植株。

尽管在枣树花药培养方面取得了一定进展，但不同基因型枣树之间的组培体系存在显著差异，愈伤组织诱导率与再生植株分化率普遍偏低，培养体系存在染色体倍性混杂显著、单倍体发生率不理想等突出问题[17-18]。现有技术体系的低效性已成为制约该技术应用于育种的关键因素，急需优化培养体系的稳定性和重复性。在生产中，冬枣是主要的鲜食品种，骏枣是优质的制干品种，而七月鲜则是早熟且鲜食与制干兼用的品种，3个枣品种对枣产业发展均具有重要产业价值，深入研究枣树花药愈伤组织诱导和再生培养体系，对推动枣树育种进程具有重要意义。除此之外，骏枣的花药培养技术研究基础较为薄弱，再生植株分化率低，还有待进一步优化，而七月鲜花药离体培养技术未见报道。因此，笔者在本研究中选用冬枣、骏枣和七月鲜3个主栽优良枣品种进行花药离体培养，旨在建立高效且完善的离体花药再生体系，为枣树花药离体再生研究提供技术支撑。

1　材料和方法

1.1　试验材料

研究于2022年5月中下旬在西北农林科技大学清涧红枣试验站进行。选取生长健壮、无病虫害的枣树（以酸枣做砧木），采集冬枣、骏枣和七月鲜处于绿色到黄绿色期间的幼嫩花蕾（花粉处于单核靠边期）。将花蕾在自来水下冲洗0.5~1.0 h后置于超净工作台上，用75%的乙醇浸泡30~60 s，用0.1%的$HgCl_2$溶液浸泡杀菌10 min，再用无菌水冲洗4~6次，最后在培养皿中剥开花蕾，将花药接种到不同培养基上进行培养观察。

1.2　试验设计

对3个品种枣花药进行不同时间的低温预处理和不同种类浓度的碳源、激素组合等多个因素设计对比，研究这些因素对枣花药愈伤诱导、增殖和分化培育的影响。

1.2.1　*花药愈伤诱导培养基筛选*　采用L9（3^4）正交试验设计[19]，形成9种不同种类激素组合的MS培养基，所有培养基均添加30 g·L^{-1}麦芽糖和6 g·L^{-1}琼脂，pH=5.8。将3个枣品种的花药接种到各培养基上，每个处理接种3个培养皿（共约50个花药），每组试验3次重复，25 ℃暗培养，30 d后统计不同枣花药处理的愈伤诱导率。

为进一步优化碳源，选择3种碳源（麦芽糖、蔗糖和葡萄糖）分别加到MS+1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} NAA的诱导培养基中，糖源设定4个水平质量浓度（20 g·L^{-1}、30 g·L^{-1}、40 g·L^{-1}、60 g·L^{-1}），共12个处理，每个处理接种3个培养皿（共约50个花药），3次重复，暗培养30 d（25±2 ℃）后统计愈伤诱导率。

1.2.2　*花药预处理*　低温处理可以提高花药愈伤组织的诱导率[20]，因此，在诱导过程中也对花药进行低温预处理，探究其效果。将冲洗过的花蕾放在4 ℃的冰箱中进行低温预处理试验，设定6个低温处理时间长度：0、1、3、5、7、9 d。将预处理过的花药接种到MS+1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} NAA的培养基上进行诱导培养。每个处理接种约30个花药并3次重复，接种后的所有花药置于25 ℃条件下暗培养30 d，30 d后统计各个处理的愈伤诱导率。

1.2.3　*愈伤组织增殖培养基筛选*　将诱导出的愈伤组织块接入到不同浓度激素的MS培养基中，添加30 g·L^{-1}麦芽糖，6 g·L^{-1}琼脂，pH=5.8。每盘接种10个花药愈伤组织块，共接3盘，每个处理3次重复，在（25±2）℃条件下暗培养20 d后统计愈伤增殖系

数。

1.2.4 愈伤分化基本培养基筛选 选用MS和WPM两种基本培养基，在不同分化培养基上，添加20 g·L^{-1}的麦芽糖[21]，接种生长良好的各基因型花药愈伤组织，共设计18种处理组合（表1）。每盘接种9~10个花药愈伤组织块（0.5~1 cm），共接种5盘，每个处理3次重复，26 ℃光照条件下培养，光照度2000 lx，光照时间16 h·d^{-1}，50 d后统计不同处理的愈伤组织分化率。

表1 花药愈伤组织诱导培养基激素组合设计

Table 1 Plant growth regulator combination and concentrations in the induction medium for jujube

基本培养基 Basic medium	愈伤组织数 Callus count	ρ（激素）Plant growth regulator/（mg·L^{-1}）			
		6-BA	TDZ	IBA	NAA
MS1	150	1.0	0.5	0.0	0.5
MS2	150	1.0	0.8	0.0	0.5
MS3	150	1.0	1.0	0.0	0.5
MS4	150	0.5	0.5	0.3	0.0
MS5	150	0.5	0.8	0.3	0.0
MS6	150	0.5	1.0	0.3	0.0
MS7	150	0.0	0.5	0.5	0.2
MS8	150	0.0	0.8	0.5	0.2
MS9	150	0.0	1.0	0.5	0.2
WPM1	150	1.0	0.5	0.0	0.5
WPM2	150	1.0	0.8	0.0	0.5
WPM3	150	1.0	1.0	0.0	0.5
WPM4	150	0.5	0.5	0.3	0.0
WPM5	150	0.5	0.8	0.3	0.0
WPM6	150	0.5	1.0	0.3	0.0
WPM7	150	0.0	0.5	0.5	0.2
WPM8	150	0.0	0.8	0.5	0.2
WPM9	150	0.0	1.0	0.5	0.2

1.2.5 再生植株倍性检测 取3种基因型枣组培苗幼嫩叶片各2份，每份叶片30~50 mg，用流式细胞仪进行倍性鉴定，倍性测试参考王利虎等[22]和田新民等[23]的方法并进行了部分改进，选择WPB裂解液进行细胞裂解。

1.2.6 生根培养基筛选 选取冬枣继代培养中长势良好且一致的2 cm左右带芽茎段，接种到添加不同质量浓度IBA（0.2、0.4、0.6 mg·L^{-1}）的1/2MS培养基中，共3个处理，每个处理4瓶，每瓶2根茎段，培养30 d后观察生长状况，统计生根率，筛选最适IBA质量浓度。

1.3 数据统计处理

采用单因素方差分析（ANOVA）进行数据比较，利用Duncan新复极差法检验处理间差异显著性水平（$p < 0.05$），使用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 培养基的激素种类及浓度对枣花药愈伤组织诱导的影响

3个品种花药暗培养30 d后统计了9个处理的愈伤组织诱导率（表2）。

结果表明，3个枣品种的花药在各处理中都能够诱导出愈伤组织。方差分析结果表明，不同激素和基因型对愈伤诱导率的影响均显著，3种激素对愈伤诱导率影响的主次顺序为：2,4-D，NAA，TDZ。在1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} NAA的激素组合中冬枣、骏枣、七月鲜花药诱导率均最高，骏枣花药的愈伤组织诱导率高于冬枣和七月鲜，其中冬枣、七月鲜在1.5 mg·L^{-1} 2,4-D+0.8 mg·L^{-1} TDZ+0.8 mg·L^{-1} NAA中诱导率最低，骏枣花药在1.5 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ中诱导率最低，不同基因型的花药在相同培养基上诱导结果差异较为明显。因此，在枣花药诱导培养过程中，以添加1.0 mg·L^{-1} 2,4-D最佳，TDZ和NAA以0.4 mg·L^{-1}最佳。

2.2 花药愈伤诱导中碳源的影响

由表3可以看出，不同碳源与浓度对枣花药愈伤组织诱导的效果差异显著。方差分析结果表明，3个影响因素均显著，各因素对愈伤诱导率影响的主次顺序为：碳源种类、碳源浓度、枣花药品种，其中碳源种类对愈伤诱导率影响最大。正交试验结果表明：冬枣、骏枣和七月鲜花药在以麦芽糖为碳源的培养基上愈伤组织诱导率显著高于其他两种碳源，其中冬枣为52.00%，骏枣为57.33%、七月鲜为54.00%，蔗糖次之，葡萄糖最低，且葡萄糖质量浓度为60 g·L^{-1}时3个基因型花药均没有诱导出愈伤组织。以蔗糖为碳源诱导愈伤时，愈伤褐化严重，生长较为缓慢，并逐渐褐化死亡。添加麦芽糖诱导出的愈伤颜色多数呈黄白色，生长速度快，在质量浓度为30 g·L^{-1}时，愈伤组织诱导率最高，其中骏枣在40 g·L^{-1}麦芽糖中诱导率高于30 g·L^{-1}，但愈伤褐化率也高，愈伤质地较硬。因此，麦芽糖更适合作为诱导枣花药愈伤的碳源，30 g·L^{-1}的质量浓度最佳。

2.3 花药愈伤诱导中低温预处理的影响

在本研究中探讨了4 ℃低温预处理时间对冬

表2　激素种类浓度对枣花药愈伤组织诱导的影响

Table 2　Effect of phytohormones on callus induction from jujube anthers

培养基编号 Medium number	ρ(2,4-D)/(mg·L⁻¹)	ρ(TDZ)/(mg·L⁻¹)	ρ(NAA)/(mg·L⁻¹)	冬枣花药愈伤诱导率 Anther callus induction rate of Dongzao/%	骏枣花药愈伤诱导率 Anther callus induction rate of Junzao/%	七月鲜花药愈伤诱导率 Anther callus induction rate of Qiyuexian/%
1	0.5	0.2	0.8	28.00±1.73 c	31.33±2.52 c	30.00±1.73 bc
2	0.5	0.4	0.0	27.33±1.53 c	28.67±1.15 cd	21.33±3.06 c
3	0.5	0.8	0.4	30.67±2.08 bc	32.67±3.06 c	20.67±2.89 c
4	1.0	0.2	0.8	45.33±0.58 b	51.33±1.53 b	40.00±2.65 b
5	1.0	0.4	0.4	59.33±1.15 a	64.00±1.00 a	58.67±0.58 a
6	1.0	0.8	0.0	34.67±2.52 bc	33.33±2.08 c	29.33±2.08 bc
7	1.5	0.2	0.4	26.67±1.53 c	27.33±2.31 cd	25.33±2.52 bc
8	1.5	0.4	0.0	25.33±2.08 cd	22.67±1.53 d	22.00±1.73 c
9	1.5	0.8	0.8	16.67±2.89 d	23.33±2.52 d	12.67±2.08 d

源 Source	Ⅲ类平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	显著性 Significance
2,4-D	2 097.210	2	1048.605	227.449	**
TDZ	556.899	2	278.449	60.397	*
NAA	569.788	2	284.894	61.795	*
品种 Variety	126.988	2	63.494	13.772	**
误差 Error	331.941	72	4.610		
总计 Total	24 507.000	81			

注：**表示差异极显著，$p \leqslant 0.01$；*表示差异显著，$p \leqslant 0.05$；表中小写字母表示差异显著性，$p \leqslant 0.05$。下同。

Note: ** indicates a highly significant difference at $p \leqslant 0.01$; * indicates a significant difference at $p \leqslant 0.05$; Small letters in the Table denote significant differences at $p \leqslant 0.05$. The same below.

枣、骏枣和七月鲜花药愈伤组织诱导率的影响（表4）。结果显示，冬枣花药在低温处理1~3 d时诱导率较高，其中3 d诱导率达66.67%，而处理5 d后诱导率显著下降至36.67%，9 d时最低，仅为13.33%。骏枣花药诱导率在不同低温处理时间下变化较小，整体维持在47%左右，处理5 d与1 d、3 d时诱导率差异分别为9.33%和3.33%，说明低温处理对其诱导率影响有限。七月鲜花药诱导率在低温处理3 d时最高，为63.33%，而1 d和9 d时诱导率分别为60.00%和10.67%，表明其最佳低温处理时间为3 d。综上，不同枣品种花药对低温预处理的响应存在差异，适宜的低温处理时间可显著影响愈伤组织诱导率。

2.4　激素种类及浓度对花药愈伤组织增殖的影响

在愈伤组织增殖试验中以MS为基本培养基，添加30 g·L⁻¹麦芽糖、6 g·L⁻¹琼脂和不同的激素组合，将诱导出的愈伤组织块接种在各增殖培养基上。每块愈伤约0.5 cm大小，3种愈伤组织每盘接10块、每组3盘、3次重复，每个处理共接90块愈伤。暗培养20 d后统计愈伤增殖系数（表5）。统计后发现，冬枣在MS+2.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.4 mg·L⁻¹ IBA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹麦芽糖+6 g·L⁻¹琼脂中愈伤增殖系数最高为88.89%，且褐化率低；骏枣在MS+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.8 mg·L⁻¹ IBA中愈伤增殖效果最好，愈伤组织增殖系数为81.11%；七月鲜在MS+1.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.8 mg·L⁻¹ IBA中愈伤增殖系数最高，达到78.89%，在2.5 mg·L⁻¹ TDZ+1.2 mg·L⁻¹ IBA+0.3 mg·L⁻¹ NAA的激素组合中增殖系数最低，只有40.00%。

2.5　基本培养基和植物生长调节剂对花药愈伤组织分化的影响

愈伤组织的分化培养基以MS和WPM两种基本培养基进行试验，选用6-BA、TDZ、IBA和NAA 4种植物激素，研究枣花药愈伤组织分化中基本培养基与不同激素组合对其的影响（表6，图1）。结果表明，3个枣品种愈伤在WPM培养基中分化率普遍高于MS，其中冬枣在WPM+0.8 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹IBA+0.2 mg·L⁻¹ NAA中分化率最高，达到48.00%；骏枣在WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹ NAA中分化率最高，达到29.33%；七月鲜在WPM+1.0 mg·L⁻¹ TDZ+0.5 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ NAA中分化率最高，达到33.33%。相比之下，冬枣较骏枣和七

表 3 碳源种类浓度对枣花药愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of carbon types on callus induction from jujube anther

处理号 Treatment number	糖源种类 Sugar source type	ρ/(g·L^{-1})	冬枣 Dongzao 愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	冬枣 Dongzao 颜色 Color	骏枣 Junzao 愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	骏枣 Junzao 颜色 Color	七月鲜 Qiyuexian 愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	七月鲜 Qiyuexian 颜色 Color
1	麦芽糖 Maltose	20	42.00±1.00 b	黄白 Yellowish-white	46.67±1.53 b	黄白 Yellowish-white	50.00±2.00 a	黄白 Yellowish-white
2		30	52.00±1.73 a	黄白 Yellowish-white	53.33±2.08 a	白色 White	54.00±1.73 a	白色 White
3		40	27.33±1.53 c	黄白 Yellowish-white	57.33±0.58 a	黄白 Yellowish-white	37.33±0.58 b	黄白 Yellowish-white
4		60	12.67±0.58 d	黄褐 Yellowish-brown	34.67±2.08 c	黄白 Yellowish-white	15.33±2.52 c	黄白 Yellowish-white
5	蔗糖 Sucrose	20	12.00±2.00 a	黄褐 Yellowish-brown	38.67±1.53 a	黄白 Yellowish-white	14.00±1.00 a	黄白 Yellowish-white
6		30	14.67±2.08 a	黑褐 Blackish-brown	34.00±1.00 a	黑黄 Blackish-yellow	16.67±1.53 a	黄褐 Yellowish-brown
7		40	8.00±2.65 ab	黑褐 Blackish-brown	26.67±1.53 b	黑褐 Blackish-brown	11.30±2.08 ab	黑褐 Blackish-brown
8		60	6.00±1.00 b	黑褐 Blackish-brown	17.33±2.08 c	黑褐 Blackish-brown	5.33±3.06 b	黑褐 Blackish-brown
9	葡萄糖 Glucose	20	3.33±2.89 a	黄白 Yellowish-white	2.67±1.15 a	黑黄 Blackish-yellow	0.00±0.00 a	–
10		30	2.00±1.00 a	黑黄 Blackish-yellow	0.00±0.00 b	–	0.00±0.00 a	–
11		40	1.33±1.15 a	黑黄 Blackish-yellow	0.00±0.00 b	–	0.00±0.00 a	–
12		60	0.00±0.00 b	–	0.00±0.00 b	–	0.00±0.00 a	–

源 Source	Ⅲ类平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	*F*值 *F*-value	显著性 Significance
种类 Type	7051.722	2	3 525.861	1 394.846	**
浓度 Concentration	900.667	3	300.222	118.769	**
品种 Variety	596.222	2	298.111	117.934	**
糖源×浓度 Sugar source × Concentration	616.722	6	102.787	40.663	**
糖源×品种 Sugar source × Variety	384.889	4	96.222	38.066	**
糖源×品种 Sugar source × Variety	60.000	6	10.000	3.956	*
糖源×浓度×品种 Sugar source × Concentration × Variety	275.778	12	22.981	9.092	**
误差 Error	182.000	72	2.528		
总体 Total	20 160.000	108			

表4　低温（4 ℃）预处理对诱导花药愈伤组织的影响

Table 4　Effect of low temperature (4 ℃) pretreatment on induction of anther callus

处理号 Treatment number	时间 Time/d	冬枣 Dongzao		骏枣 Junzao		七月鲜 Qiyuexian	
		愈伤数 Number of calluses	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤数 Number of calluses	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	愈伤数 Number of calluses	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%
1	0	89	59.33±1.15 b	96	64.00±1.00 a	88	58.67±0.58 b
2	1	91	60.67±1.53 ab	80	53.33±2.08 a	90	60.00±2.65 ab
3	3	100	66.67±0.58 a	71	47.33±1.15 ab	95	63.33±1.15 a
4	5	55	36.67±2.52 c	66	44.00±2.00 b	58	38.67±2.52 c
5	7	36	24.00±1.00 d	60	40.00±1.73 b	42	28.00±1.73 d
6	9	20	13.33±1.15 e	29	19.33±2.08 c	16	10.67±1.53 e

表5　不同增殖培养基对枣愈伤组织增殖的影响

Table 5　Effects of different media on callus proliferation of jujube

培养基编号 Culture medium number	冬枣 Dongzao		骏枣 Junzao		七月鲜 Qiyuexian	
	愈伤增殖系数 Callus induction rate	生活力 Viability	愈伤增殖系数 Callus induction rate	生活力 Viability	愈伤增殖系数 Callus induction rate	生活力 Viability
1	57.78±2.08 c	+	65.56±1.53 b	+	51.11±2.89 c	+
2	75.56±0.58 b	+++	71.11±1.15 ab	++	58.89±2.08 b	++
3	64.44±1.53 bc	++	62.22±0.58 b	+	44.44±2.52 cd	+
4	88.89±1.15 a	+++	68.89±2.08 b	+	56.67±2.00 bc	+
5	51.11±2.52 cd	+	81.11±2.31 a	+++	73.33±1.00 a	+++
6	66.67±1.73 bc	++	76.67±1.73 ab	+++	78.89±0.58 a	+++
7	72.22±2.31 b	++	72.22±1.53 ab	++	50.00±1.73 c	+
8	62.22±1.15 bc	+	68.89±0.58 b	++	51.11±2.31 c	+
9	58.89±2.08 c	+	43.33±2.65 c	+	55.56±2.08 bc	+
10	46.67±1.00 d	+	41.11±2.52 c	+	52.22±2.89 c	+
11	60.00±2.00 c	+	36.67±1.00 cd	+	43.33±2.00 cd	+
12	45.56±0.58 d	+	28.89±1.15 d	+	40.00±2.65 d	+

注：愈伤增殖用+表示，+号越多表示愈伤组织发生量越多。

Note: Callus proliferation is indicated by the “+” symbol, where a greater number of “+” symbols denotes a higher amount of callus tissue formation.

月鲜更易分化，骏枣分化率最低，并且冬枣成苗数多于骏枣和七月鲜（图2）。

2.6　再生植株倍性鉴定

以二倍体酸枣组培苗为对照，对各品种花药再生植株进行倍性鉴定，图3为再生植株倍性的峰值，图4为各品种花药的再生植株。由图3可知，横轴表示荧光的通道值，纵轴表示测定样品的相对细胞数。通过荧光信号的强度和位置，可准确判断样品的倍性特征。在检测不同处理的样品时，如果发现荧光通道值在大约100处呈现峰值，那么这些样品就是单倍体；随着荧光通道值向右移动至约200的位置时，测定的样品中则为二倍体；若样品在100和200这两个位置上都出现了荧光峰，那么这种情况下的样品将被视为混倍体，代表该样品包含两个或多个染色体组的混合倍性。经流式细胞仪检测，36株冬枣再生植株中有33株二倍体，3株单倍体和二倍体的嵌合体，二倍体占比92%，嵌合体占比8%；5株骏枣均为二倍体，二倍体占比100%；8株七月鲜再生植株中有6株二倍体，两株单倍体（图5），二倍体占比75%，单倍体占比25%。

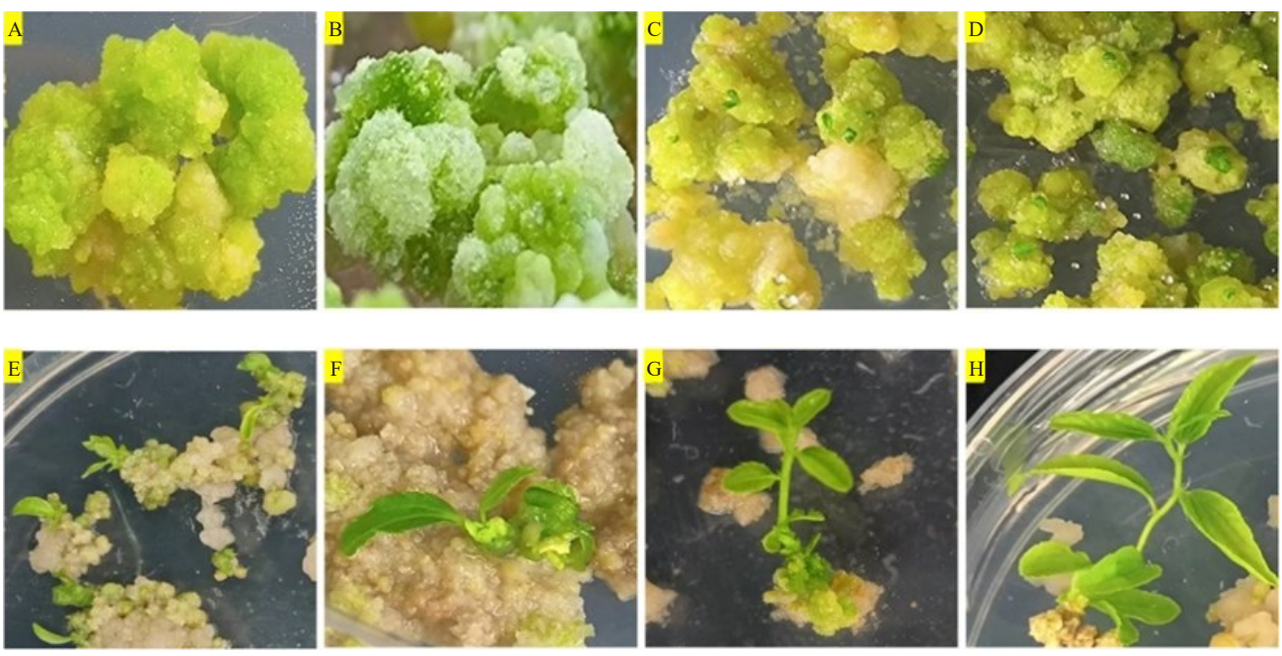
2.7　IBA不同质量浓度对冬枣组培苗生根的影响

为筛选出适宜诱导冬枣组培苗生根的培养基，在1/2MS培养基中添加不同质量浓度的IBA，观察其诱导效果。由观察统计结果（表7）可以看出，当IBA质量浓度为0.4 mg·L^{-1}时，冬枣生根率最高，达到87.5%，诱导生根效果最佳。

表 6 不同分化培养基对枣愈伤组织不定芽分化的影响

Table 6 Effect of medium on adventitious bud differentiation from jujube callus

基本培养基 Medium number	冬枣 Dongzao		骏枣 Junzao		七月鲜 Qiyuexian	
	愈伤分化率 Callus differentiation rate/%	成苗率 Seedling formation rate/%	愈伤分化率 Callus differentiation rate/%	成苗率 Seedling formation rate/%	愈伤分化率 Callus differentiation rate/%	成苗率 Seedling formation rate/%
MS1	20.00±1.73 bc	0	22.67±0.58 a	0	16.67±2.08 b	0
MS2	23.33±1.15 b	0.04	18.67±2.08 a	0	12.00±1.73 c	0
MS3	13.33±1.53 c	0	14.67±2.52 ab	0	10.00±2.00 c	0
MS4	2.67±2.31 cd	0	10.00±1.00 b	0	0.00±0.00 d	0
MS5	6.00±1.00 cd	0	7.33±2.08 bc	0	0.00±0.00 d	0
MS6	0.00±0.00 d	0	2.00±1.73 c	0	0.00±0.00 d	0
MS7	28.00±2.00 b	0	0.00±0.00 d	0	19.33±1.15 ab	0
MS8	34.67±0.58 a	0.03	0.00±0.00 d	0	21.33±2.52 a	0
MS9	29.33±2.52 b	0	0.00±0.00 d	0	23.33±0.58 a	0.04
WPM1	24.67±2.08 c	0.08	29.33±1.15 a	0.10	18.67±2.08 c	0
WPM2	30.00±1.00 c	0.10	25.33±2.52 a	0.04	20.67±1.53 b	0
WPM3	26.67±2.08 c	0.04	22.00±2.00 ab	0.05	19.33±1.15 c	0
WPM4	10.00±2.65 d	0	17.33±0.58 b	0	5.33±2.31 d	0
WPM5	12.67±1.15 d	0	14.67±2.31 c	0	7.33±2.08 d	0
WPM6	7.33±2.31 d	0	12.00±2.00 c	0	3.33±2.89 d	0
WPM7	39.33±1.53 b	0.13	0.00±0.00 d	0	26.00±2.00 b	0.04
WPM8	48.00±1.00 a	0.33	0.00±0.00 d	0	27.33±1.53 ab	0.07
WPM9	40.00±2.00 b	0.18	0.00±0.00 d	0	33.33±1.15 a	0.12

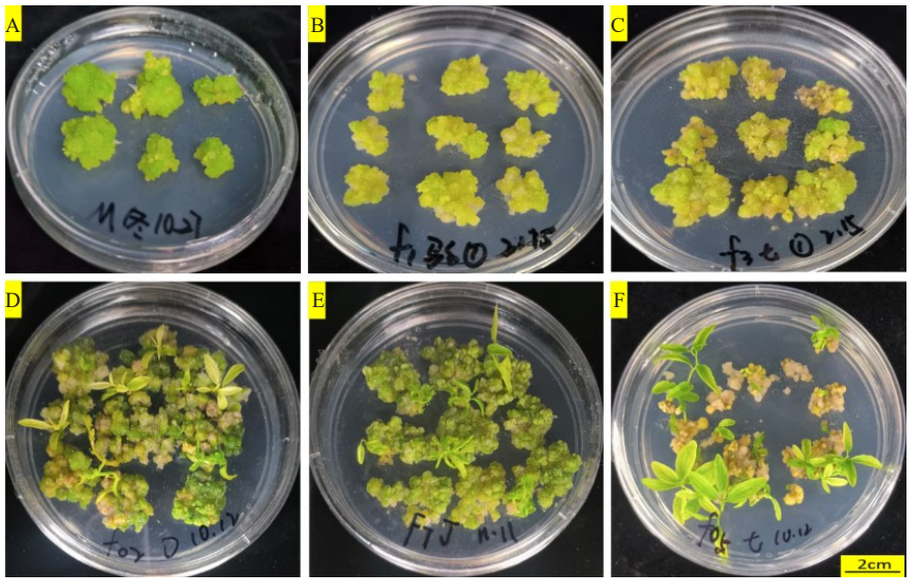


A. 愈伤经光照开始变绿；B. 愈伤转绿开始增殖；C~D. 愈伤出现芽点，开始分化不定芽；E~H. 不定芽伸长与增殖。

A. Callus turned green when exposure to light; B. Callus turned green; C-D. Bud differentiation; E-H. Adventitious buds developments.

图 1 花药愈伤的分化

Fig. 1 Bud differentiation from anther callus

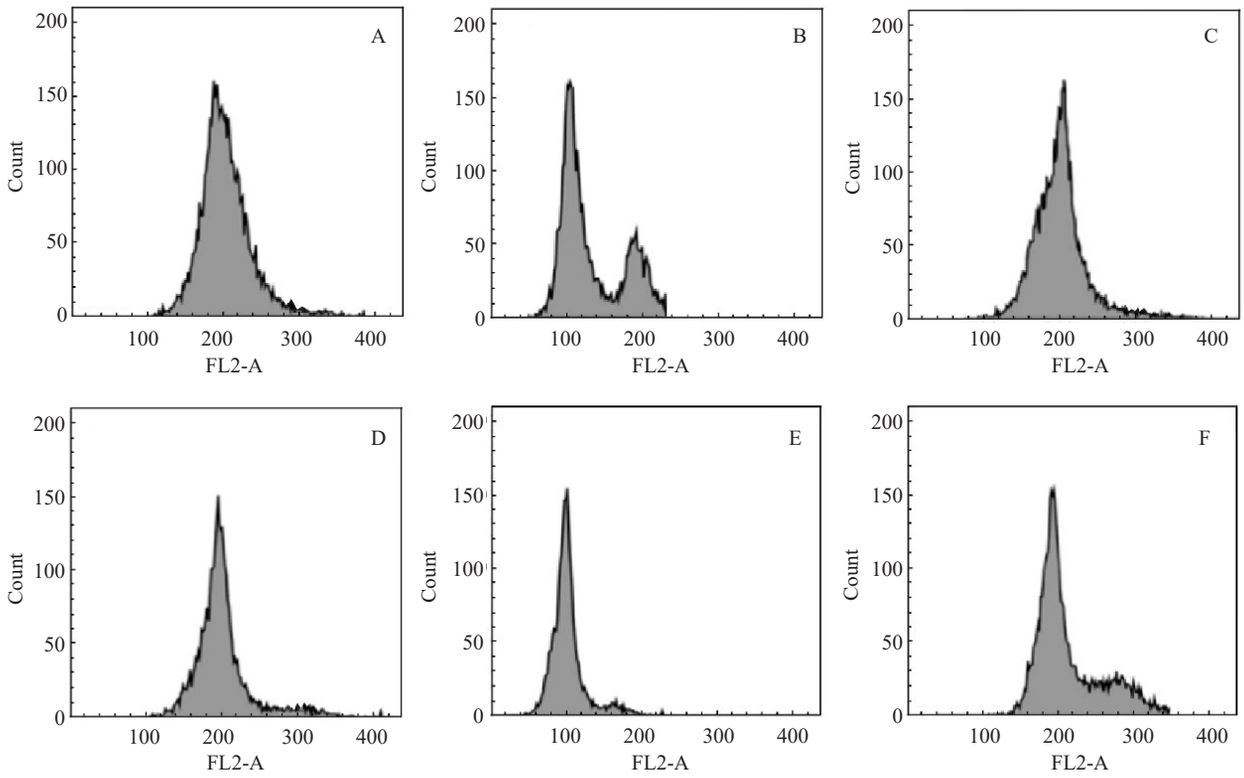


A. 冬枣花药愈伤光照培养；B. 骏枣花药愈伤光照培养；C. 七月鲜花药光照培养；D. 冬枣愈伤不定芽分化；E. 骏枣愈伤不定芽分化；F. 七月鲜不定芽分化。

A. Anther callus of Dongzao; B. Anther callus of Junzao; C. Anther callus of Qiyuexian; D. Adventitious bud differentiation of Dongzao callus; E. Adventitious bud differentiation from callus of Junzao; F. Qiyuexian adventitious bud differentiation.

图 2　不同枣品种花药诱导愈伤不定芽的分化

Fig. 2　Differentiation of adventitious buds from callus generated from jujube anthers

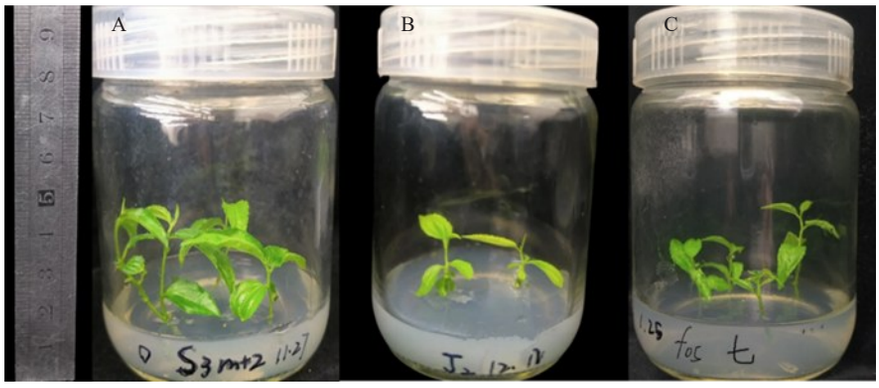


A. 冬枣二倍体；B. 冬枣单倍体、二倍体的嵌合体；C. 骏枣二倍体；D. 七月鲜二倍体；E. 七月鲜单倍体；F. 酸枣二倍体。

A. Dongzao diploid; B. Dongzao haploid and diploid chimera; C. Junzao diploid; D. Qiyuexian diploid; E. Qiyuexian haploid; F. Suanzao diploid.

图 3　流式细胞仪检测再生植株倍性

Fig. 3　Ploidy detection of the regenerated plants from anther callus

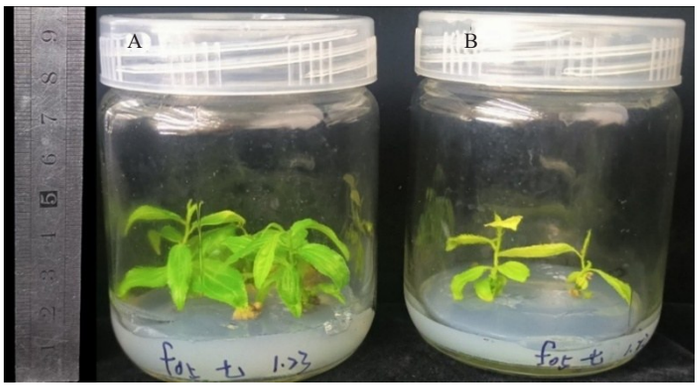


A. 冬枣再生植株；B. 骏枣再生植株；C. 七月鲜再生植株。

A. Dongzao regeneration plant; B. Junzao regeneration plant; C. Qiyuexian regeneration plant.

图4 再生植株增殖培养

Fig. 4 Proliferation culture of regenerated plants



A. 二倍体植株；B. 单倍体植株。

A. Diploid plant; B. Haploid plants.

图5 七月鲜的二倍体和单倍体植株

Fig. 5 Diploid and haploid plants of Qiyuexian

表7 不同质量浓度IBA对冬枣茎段诱导生根的影响

Table 7 Effect of IBA on root induction from Dongzao shoot *in vitro*

处理号 Treatment number	ρ(IBA)/(mg·L^{-1})	接种数 Number of inoculations	生根数 Number of rooted plants	生根率 Rooting rate/%
1	0.2	8	4	50.0
2	0.4	8	7	87.5
3	0.6	8	1	12.5

3 讨 论

研究表明，低温预处理可以阻止纺锤丝的形成，提高花药愈伤组织或胚状体的诱导率[24]。金丝小枣在低温条件下处理5 d后可提高愈伤诱导率[16]，冬枣花药低温预处理3 d时愈伤诱导率最高[21]。在本研究中，低温预处理3 d有利于提高冬枣和七月鲜枣花药愈伤组织诱导率。以不同种类和浓度的糖作为碳源，为枣花药愈伤提供能量，调节渗透压，在组织培养中具有重要作用[19]。长期以来，蔗糖一直被视为植物组织培养的标准碳源而被广泛应用。赞皇大枣和苹果枣花药在添加30 g·L^{-1}蔗糖时愈伤组织诱导率较高[25]。但是近年来发现麦芽糖能够代替蔗糖促进花药培养效率。鲁枣2号和鲁枣6号花药愈伤培养也是以麦芽糖为碳源，得到了黄白色致密型愈伤组织[26]。笔者在本研究中发现麦芽糖是冬枣、骏枣和七月鲜花药愈伤组织培养的最适碳源。添加30 g·L^{-1}麦芽糖时诱导效果最佳，愈伤颜色多数呈黄白色，生长速度快，愈伤组织形态好，诱导率也明显提高。

选用适宜的培养基是组织培养成功的关键[27]，刘晓光等[28]在冬枣花药培养中采用TDZ和NAA达到

16.67%愈伤诱导率；武晓红等[29]只使用2,4-D愈伤诱导率达到57.81%。在本研究中，以MS培养基为基本培养基，选择2,4-D、TDZ、NAA三种激素复配使用，利用正交设计筛选出1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} NAA更适合冬枣、骏枣和七月鲜花药愈伤组织诱导，诱导率分别达到59.33%、64.00%和58.67%，高于单独使用2,4-D和只使用TDZ、NAA的激素组合诱导率，不同生长素组合和低浓度细胞分裂素复配使用更加适合枣花药愈伤诱导培养。笔者在本研究中选用了两种生长素IBA、NAA和细胞分裂素6-BA、TDZ共4种激素，以WPM和MS为基本培养基，共设计9种激素组合，18个不同处理，筛选出了适合各品种花药愈伤分化的最适培养基。研究发现在相同条件下，不同基因型枣花药愈伤组织诱导率、增殖系数和不定芽分化率均有差异，愈伤增殖率和分化率的数据差异较为明显，冬枣、骏枣、七月鲜的愈伤增殖率分别为88.89%、81.11%、78.89%，分化率分别为48.00%、29.33%和33.33%。其中，冬枣的诱导率和分化率均最高，花药愈伤状态良好，与骏枣和七月鲜相比，更容易诱导愈伤和不定芽，且再生植株生长旺盛。因此，在离体花药不定芽诱导中，基因型是重要影响因素之一。

生长素的种类和浓度对组培苗的生根率、根长等具有显著影响。房立媛等[30]的研究结果表明，枣属植物的生根培养通常以1/2MS作为基本培养基，添加单一或复合生长素即可取得较好的生根效果。赵汗青等[31]研究发现，采用改良1/2MS培养基并添加0.8 mg·L^{-1} IBA的组合，能够使京枣39达到最佳生根效果。陈蕊红等[32]在1/2MS培养基中添加0.6 mg·L^{-1} IBA和0.5%活性炭，可使骏枣不定芽的生根率达到86.89%。在本研究中，以继代培养后生长状况良好的冬枣组培苗带芽茎段为材料，选用1/2MS基本培养基，并添加不同质量浓度的IBA和0.3 g·L^{-1}的活性炭进行生根诱导。结果表明，当IBA质量浓度为0.4 mg·L^{-1}时，冬枣的生根率达到87.5%，生根诱导效果最佳。笔者在本研究中使用更低质量浓度的IBA，但生根效率得到有效提高。未来研究可进一步探讨不同生长素组合及活性炭浓度对冬枣生根的影响，以优化其生根培养体系，为枣树组培苗的高效繁殖提供理论依据和技术支持。

目前，国内外在不同植物花药培养技术方面已取得了显著进展，如在水稻、小麦等作物上已经建立了成熟的花药培养体系，但枣树花药培养技术方面仍存在短板和不足。笔者在本研究中通过对不同基因型枣花药进行低温预处理、设计不同碳源，激素组合等对比试验，成功建立了冬枣、骏枣、七月鲜花药培养及植株再生体系，得到了七月鲜单倍体植株和冬枣再生植株，筛选的培养基效果稳定。未来的研究将进一步探索不同基因型枣树花药培养的差异，优化培养条件，提高愈伤诱导率和再生植株数量，为枣树育种提供更多的优良品种资源。

4　结　论

以冬枣、骏枣及七月鲜单核靠边期花药为外植体，低温预处理3 d对冬枣和七月鲜花药诱导有明显促进作用，对骏枣花药影响不显著。花药愈伤诱导的最适激素组合为：1.0 mg·L^{-1} 2,4-D+0.4 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1}NAA。花药增殖的最适激素组合为：冬枣（2.5 mg·L^{-1} TDZ+0.4 mg·L^{-1} IBA+0.1 mg·L^{-1} NAA）；骏枣（1.0 mg·L^{-1} TDZ+0.8 mg·L^{-1} IBA）；七月鲜（1.5 mg·L^{-1} TDZ+0.8 mg·L^{-1} IBA）。花药愈伤分化的最适基本培养基为WPM培养基，适宜的激素组合为：冬枣（0.8 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} IBA+0.2 mg·L^{-1} NAA）；骏枣（1.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.5 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} NAA）；七月鲜（1.0 mg·L^{-1} TDZ+0.5 mg·L^{-1} IBA+0.2 mg·L^{-1}NAA），获得了冬枣、骏枣、七月鲜的花药再生植株，其中七月鲜诱导出单倍体植株。冬枣生根率在IBA质量浓度为0.4 mg·L^{-1}时达最高，获得完整的冬枣再生植株。

参考文献 References：

[1] 刘晓光. 枣愈伤组织诱导和原生质体分离研究[D]. 保定：河北农业大学，2006.
LIU Xiaoguang. Studies on callus induction and protoplast isolation on *Ziziphus jujuba* Mill.[D]. Baoding：Hebei Agricultural University，2006.

[2] CHIANCONE B，GERMANÀ M A. Microspore embryogenesis through anther culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan[J]. Methods in Molecular Biology，2016，1359：475-487.

[3] 王万奇，李文龙，王媛媛，廖栩，穆丹. 植物花药组织培养技术的研究[J]. 黑龙江农业科学，2015(10)：177-179.
WANG Wanqi，LI Wenlong，WANG Yuanyuan，LIAO Xu，MU Dan. Research on tissue culture technology of plant anther[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences，2015(10)：177-179.

[4] GUHA S，MAHESHWARI S C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*[J]. Nature，1964，204(4957)：497.

[5] GREWAL D，MANITO C，BARTOLOME V. Doubled haploids

generated through anther culture from crosses of elite *Indica* and *Japonica* cultivars and/or lines of rice：Large-scale production，agronomic performance，and molecular characterization[J]. Crop Science，2011，51(6)：2544-2553.

[6] RAKHA M T，METWALLY E I，MOUSTAFA S A，ETMAN A A，DEWIR Y H. Evaluation of regenerated strains from six *Cucurbita* interspecific hybrids obtained through anther and ovule *in vitro* cultures[J]. Australian Journal of Crop Science，2012，6(1)：23-30.

[7] SHAHVALI-KOHSHOUR R，MOIENI A，BAGHIZADEH A. Positive effects of cold pretreatment，iron source，and silver nitrate on anther culture of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)[J]. Plant Biotechnology Reports，2013，7(4)：481-488.

[8] CALABUIG-SERNA A，PORCEL R，CORRAL-MARTÍNEZ P，SEGUÍ-SIMARRO J M. Anther and isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Methods in Molecular Biology，2021，2288：235-250.

[9] AROCKIASAMY S，PATIL M，YEPURI V，SHRIVASTAVA V，MADAN N，HADOLE S，SARKAR P. Anther culture in *Jatropha curcas* L.：A tree species[J]. Methods in Molecular Biology，2021，2289：221-233.

[10] 张茂钦，李达孝，董福美 . 滇杨花药培育产生植株[J]. 云南林业科技通讯，1978，7(1)：1-4.
ZHANG Maoqin，LI Daxiao，DONG Fumei. Plants produced by flowering drug cultivation of *Poplar*[J]. Yunnan Forestry Science and Technology，1978，7(1)：1-4.

[11] 吴绛云 . 苹果花药培养获得单倍体植株[J]. 园艺学报，1981，8(4)：36-78.
WU Jiangyun. Obtaining haploid plantlets of crab apple from anther culture *in vitro*[J]. Acta Horticulturae Sinica，1981，8(4)：36-78.

[12] 林寿康，计东风 . 桑树花药培养获得单倍体植株[J]. 蚕桑通报，1985，16(3)：45-46.
LIN Shoukang，JI Dongfeng. Haploid plants from mulberry anther culture[J]. Bulletin of Sericulture，1985，16(3)：45-46.

[13] 武晓红 . 枣花药再生植株及单倍体的获得[D]. 保定：河北农业大学，2008.
WU Xiaohong. Plant regeneration from anther and acquirement of haploid in Chinese jujube[D]. Baoding：Hebei Agricultural University，2008.

[14] 牛瑜菲 . 枣及酸枣原生质体分离与花药培养的研究[D]. 保定：河北农业大学，2010.
NIU Yufei. Isolation of protoplasts and anther culture in Chinese jujube and wild jujube[D]. Baoding：Hebei Agricultural University，2010.

[15] 王震星，张磊 . 枣花药培养再生植株及其染色体倍性研究[J]. 北方果树，1998(2)：5-6.
WANG Zhenxing，ZHANG Lei. Study on regenerated plants and chromosome ploidy of jujube anther culture[J]. Northern Fruits，1998(2)：5-6.

[16] 韩晶，王玖瑞，代丽，刘颖，肖京，刘孟军 .‘长红枣’和‘金丝小枣’离体花药不定芽的诱导[J]. 河北农业大学学报，2014，37(6)：38-42.
HAN Jing，WANG Jiurui，DAI Li，LIU Ying，XIAO Jing，LIU Mengjun. *In vitro* induction of adventitious buds from anther in *Ziziphus jujuba* Mill.‘Changhongzao’and *Z. jujuba* Mill.‘Jinsixiaozao’[J]. Journal of Agricultural University of Hebei，2014，37(6)：38-42.

[17] 王利虎，胡兰，李登科，刘平，刘孟军 . 枣不同基因型在体愈伤芽再生能力评价与同质多倍体新种质创制[J]. 植物遗传资源学报，2017，18(1)：164-170.
WANG Lihu，HU Lan，LI Dengke，LIU Ping，LIU Mengjun. *In vivo* bud regeneration ability and homogeneous polyploid induction *via* callus of different jujube genotypes[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2017，18(1)：164-170.

[18] 段元杰，刘海刚，孟富宣，杨玉皎，周军 . 枣树花药组织培养研究进展[J]. 江西农业学报，2016，28(11)：47-50.
DUAN Yuanjie，LIU Haigang，MENG Fuxuan，YANG Yujiao，ZHOU Jun. Research progress in tissue culture of Chinese jujube anther[J]. Acta Agriculturae Jiangxi，2016，28(11)：47-50.

[19] 马村艺，张黎 . 基于正交设计的露薇花组培苗增殖及瓶内开花[J]. 分子植物育种，2022，20(2)：494-498.
MA Cunyi，ZHANG Li. Proliferation and flowering *in vitro* of tissue culture seedlings of *Lewisia cotyledon* based on orthogonal design[J]. Molecular Plant Breeding，2022，20(2)：494-498.

[20] 陈纪鹏，彭嗣亮，卢禹，刘小林 . 预处理和激素对草莓花药离体培养的影响[J]. 核农学报，2016，30(11)：2144-2150.
CHEN Jipeng，PENG Siliang，LU Yu，LIU Xiaolin. Effect of pretreatment and hormone on anther culture of strawberry *Fragaria ananassa* cv. Hongjia *in vitro*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences，2016，30(11)：2144-2150.

[21] 贾际平，吴丽萍，曹明，孔德仓，李颖岳，庞晓明 . 高效冬枣花药愈伤组织培养体系的建立[J]. 分子植物育种，2018，16(3)：948-953.
JIA Jiping，WU Liping，CAO Ming，KONG Decang，LI Yingyue，PANG Xiaoming. Establishment of a high-efficiency anther callus culture system of Dongzao (*Ziziphus jujuba* Mill.)[J]. Molecular Plant Breeding，2018，16(3)：948-953.

[22] 王利虎，吕晔，罗智，刘平，刘孟军 . 流式细胞术估测枣染色体倍性和基因组大小方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报，2018，26(3)：511-520.
WANG Lihu，LÜ Ye，LUO Zhi，LIU Ping，LIU Mengjun. Establishment and application of a method for chromosome ploidy identification and genome size estimation using flow cytometry in *Ziziphus jujuba*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology，2018，26(3)：511-520.

[23] 田新民，周香艳，弓娜 . 流式细胞术在植物学研究中的应用：检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. 中国农学通报，2011，27(9)：21-27.
TIAN Xinmin，ZHOU Xiangyan，GONG Na. Applications of

flow cytometry in plant research：Analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2011，27(9)：21-27.

[24] 聂园军，冯丽云，张春芬，邓舒，肖蓉，侯丽媛，赵菁，曹秋芬．苹果花药培养不定胚形成的细胞学观察[J]. 果树学报，2020，37(3)：322-329.
NIE Yuanjun，FENG Liyun，ZHANG Chunfen，DENG Shu，XIAO Rong，HOU Liyuan，ZHAO Jing，CAO Qiufen. A cytological observation on the development of embryoid in cultured anther of apple[J]. Journal of Fruit Science，2020，37(3)：322-329.

[25] 王艳．枣、酸枣离体培养研究[D]. 保定：河北农业大学，2011.
WANG Yan. Studies on in vitro culture of Chinese jujube and sour jujube[D]. Baoding：Hebei Agricultural University，2011.

[26] 关秋竹，张琼，孙红雁，周广芳，孙清荣．‘鲁枣2号’和‘鲁枣6号’花药愈伤组织诱导及不定芽分化[J]. 河北科技师范学院学报，2017，31(3)：10-14.
GUAN Qiuzhu，ZHANG Qiong，SUN Hongyan，ZHOU Guangfang，SUN Qingrong. Callus induction of anther and differentiation of adventitious buds in jujube cultivars ‘Luzao 2’ and ‘Luzao 6’[J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology，2017，31(3)：10-14.

[27] 王敬东，陈晓军，张丽，石磊，马洪爱，李苗，甘晓燕，宋玉霞．宁夏枣树花药离体培养再生体系的建立[J]. 中国农学通报，2011，27(31)：174-178.
WANG Jingdong，CHEN Xiaojun，ZHANG Li，SHI Lei，MA Hongai，LI Miao，GAN Xiaoyan，SONG Yuxia. The anther of Ningxia Chinese jujube culturing *in vitro* and establishment of regeneration system[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2011，27(31)：174-178.

[28] 刘晓光，刘孟军，宁强，彭艳芳，苗利军，秦子禹．冬枣花药愈伤组织的诱导及原生质体分离[J]. 中国农学通报，2009，25(2)：100-104.
LIU Xiaoguang，LIU Mengjun，NING Qiang，PENG Yanfang，MIAO Lijun，QIN Ziyu. Studies on callus induction and protoplast isolation on *Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2009，25(2)：100-104.

[29] 武晓红，王玖瑞，刘孟军，代丽．不同预处理对枣花药愈伤组织诱导的影响[J]. 华北农学报，2008，23(增刊1)：43-45.
WU Xiaohong，WANG Jiurui，LIU Mengjun，DAI Li. Effects of different pretreatments on callus induction from anther of Chinese jujube[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica，2008，23(Suppl. 1)：43-45.

[30] 房立媛，林敏娟．枣属植物组织培养研究进展[J/OL]. 分子植物育种，2024：1-21. (2024-06-02). https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240531.1444.012.html.
FANG Liyuan，LIN Minjuan. Research in tissue culture of jujube[J/OL]. Molecular Plant Breeding，2024：1-21. (2024-06-02). https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240531.1444.012.html.

[31] 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.
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.

[32] 陈蕊红，汪海花，郭天然，徐崇崇，解冰芊，李云飞，黄建．骏枣组培快繁体系及菌根化育苗技术研究[J]. 西北林学院学报，2025，40(1)：111-118.
CHEN Ruihong，WANG Haihua，GUO Tianran，XU Chongchong，XIE Bingqian，LI Yunfei，HUANG Jian. Establishment of rapid propagation *in vitro* and mycorrhizal seedling system of *Ziziphus jujuba* ‘Junzao’[J]. Journal of Northwest Forestry University，2025，40(1)：111-118.