

影响红枣幼茎组培增殖因子的研究

杨 伟¹, 杨 宇², 徐崇志², 高疆生^{1,2}

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团
塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以灰枣、骏枣的幼嫩茎段为外植体,研究了不同有机添加物对红枣组培继代增殖的影响。结果表明:外植体灭菌采用酒精处理 20 s、升汞处理 10 min,茎段污染率低,平均出芽数比较高;灰枣初代培养基:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,骏枣初代培养基:MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;灰枣继代培养基:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,骏枣继代培养基:MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L;最适有机添加物为水解酪蛋白,在灰枣和骏枣的继代培养中的添加浓度分别为 400 mg/L 和 500 mg/L。

关键词:灰枣;骏枣;组织培养;有机添加物;继代培养

中图分类号:S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0116-04

枣树的组织培养研究始于 20 世纪 70 年代末,1978 年山东农学院首次利用枣胚乳培养获得三倍体植株^[1]。

第一作者简介:杨伟(1986-),男,在读硕士,研究方向为果树种质资源。E-mail:yangweitaru@sina.cn。

责任作者:高疆生(1959-),男,本科,教授,硕士生导师,研究方向为果树种质资源。

基金项目:“973”计划前期研究专项资助项目(2010CB134406)。

收稿日期:2012-03-09

之后,中国科学院植物所利用组织培养方法诱导酸枣产生胚状体^[2]。张福泉等^[3]以坛坛枣当年生幼嫩茎段为试材获得枣树组培苗。目前为止,利用枣树的营养器官进行组织培养是最简单且有效的方法。对于茎尖、茎段培养,一般来说,材料体积小培养较困难,成苗所需时间长,而培养材料体积大的容易培养成功。但体积大,消毒困难,所以在枣树快繁中接种的茎尖或带腋芽的茎段一般为 1.0 cm 左右。

[3] 王玉,李政,郝利民,等.培养基优化提高灰树花菌丝体的研究[J].北方园艺,2011(4):190-191.

[4] Mau J L, Chang C N, Huang S J, et al. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia [J]. Food Chemistry, 2004, 87(1): 111-118.

[5] Chan J, Chan E, Chan S W, et al. Enhancement of *in vitro* and *in vivo* anticancer activities of polysaccharide peptide from *Grifola frondosa* by chemical modifications [J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(11): 1114-1120.

[6] Lin E S. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of *Grifola frondosa* TFR1073 and their antioxidant and antiprolifer-

ative activities [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(3): 555-561.

[7] Illana-Esteban C. The fungus maitake (*Grifola frondosa*) and its therapeutic potential [J]. Revista Iberoamericana de Micología, 2008, 25(3): 141-144.

[8] Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, et al. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1- \rightarrow 3)- β -D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa* [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 1994, 7(12): 1554-1560.

Optimization of Medium for Improving Exo-polysaccharide of *Grifola frondosa* by Response Surface Methodology

LI Zheng¹, WANG Yu², HAO Li-min³

(1. College of Textiles, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387; 2. Department of Agronomy, Tianjin Agriculture University, Tianjin 300384; 3. The Quartermaster Equipment Institute of the General Logistics Department of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100010)

Abstract: In order to increase the production of exo-polysaccharide of *Grifola frondosa*, the optimization of medium by response surface methodology (RSM) was studied. The results showed the optimal medium was (g/L): KH_2PO_4 2, MgSO_4 1, VB_1 0.02, wheat bran 50, glucose 20, corn steep liquor 23.8, corn powder 19.7, soybean cake powder 5.2. Under the medium, the exo-polysaccharide of *Grifola frondosa* was 2.44 g/L, which was increased 75.22% than that of initial medium.

Key words: *Grifola frondosa*; exo-polysaccharide; response surface methodology (RSM); medium

该试验以灰枣和骏枣的茎段为外植体进行组织培养,研究了不同有机添加物对红枣组培继代增殖的影响,通过不同种类有机添加物及适宜浓度的筛选为建立红枣组培苗高效的扩繁体系,扩大繁殖量提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:以塔里木大学园艺试验站提供的灰枣、骏枣的幼嫩茎段为试材。试剂:6-苄基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、蔗糖、琼脂以及MS培养基所需的大量元素、微量元素、有机物和铁盐等。仪器:BS224S 电子天平(德国赛多利斯公司)、GTOP-310B 智能光照培养箱(浙江托普仪器有限公司)、LO2Z-40SII数显立式高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂)、JC20T3-W 正夫人电磁炉(中山市电器有限公司)、超净工作台、冰箱以及常规组织培养器材及容器。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体准备 从生长健壮的枣树取1 a生幼嫩茎段放在自来水下冲洗24 h,去叶。用毛刷将腋芽处刷洗干净,将茎段剪成1~2 cm带腋芽的小段。在无菌条件下,用75%酒精和0.1%的升汞配合处理,接种30 d后统计材料的污染率和成活率。

1.2.2 初代培养 消毒完毕后,在无菌条件下将消过毒的带腋芽茎段放在铺有滤纸的无菌培养皿中,吸干水分后,剪去茎段底端接触消毒药物的切口部分,竖直插入培养基中。诱导培养基以MS固体培养基(蔗糖30 g/L,琼脂7 g/L)为基本培养基,灰枣、骏枣启动激素均为6-BA,2,4-D,NAA,pH 6.0,培养30 d后统计茎段萌动情况。培养条件:培养温度24~26℃,光照>2 000 lx(10 h/d),下同。

1.2.3 继代培养 选择经初代培养成功的含有多个芽的芽丛切割成单芽,并将芽中高于2 cm以上的单芽切割成带有1个腋芽的茎段,诱导培养基以MS固体培养基(蔗糖30 g/L,琼脂7 g/L)为基本培养基,灰枣、骏枣试验因子均为6-BA,NAA,pH 6.0,培养30 d后统计株高和增殖率。

1.2.4 不同有机添加物的处理 基本培养基使用MS(继代)+蔗糖30 g/L+琼脂7 g/L,pH 6.0。分别添加椰子汁、马铃薯汁、水解酪蛋白和香蕉汁作为不同处理。添加量为:水解酪蛋白600 mg/L,椰子汁100 g/L,马铃薯100 g/L,香蕉100 g/L。其中马铃薯剥皮后,切成小碎块,打磨成匀浆后用纱布过滤再称量使用,成熟香蕉剥皮打磨成香蕉泥,用纱布过滤再称量。pH 6.0,培养30 d后统计株高和增殖率。

1.2.5 筛选出的最适有机添加物分4个浓度梯度进行继代培养试验 筛选出的最适有机添加物分4个浓度梯度进行最适浓度筛选试验。pH 6.0,培养30 d后统计

株高和增殖率。增殖率=分化芽数/接种芽数。

1.3 数据分析

依试验目的和要求不同对外植体的生长进行观察,用数码相机照像。试验数据均采用DPS数据处理软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对红枣外植体灭菌效果的影响

由表1可知,酒精和升汞消毒的时间越长污染率越低,但是成活率也低。处理1中酒精和升汞的时间都很短,成活率较高,但是污染率也很高,不是最理想的组合。处理16酒精和升汞消毒的时间最长,污染率最低,但是成活率也很低,也不是最理想的组合。处理6酒精处理20 s,升汞处理10 min时,污染率为15%,成活率为80%,为最佳组合。

表1 不同灭菌方式对外植体灭菌效果的影响

| 处理 | 75%酒精 /s | 0.1% HgCl ₂ /min | 接种个数 /个 | 污染数 /个 | 污染率 /% | 成活数 /个 | 成活率 /% |
|----|-------------|--------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 15 | 8 | 20 | 17 | 85 | 18 | 90 |
| 2 | 15 | 10 | 20 | 13 | 65 | 19 | 95 |
| 3 | 15 | 12 | 20 | 7 | 32 | 18 | 90 |
| 4 | 15 | 14 | 20 | 6 | 30 | 8 | 40 |
| 5 | 20 | 8 | 20 | 17 | 85 | 19 | 95 |
| 6 | 20 | 10 | 20 | 3 | 15 | 16 | 80 |
| 7 | 20 | 12 | 20 | 11 | 55 | 19 | 95 |
| 8 | 20 | 14 | 20 | 2 | 10 | 6 | 30 |
| 9 | 25 | 8 | 20 | 13 | 65 | 17 | 85 |
| 10 | 25 | 10 | 20 | 10 | 50 | 15 | 75 |
| 11 | 25 | 12 | 20 | 7 | 35 | 13 | 65 |
| 12 | 25 | 14 | 20 | 1 | 5 | 7 | 35 |
| 13 | 30 | 8 | 20 | 12 | 60 | 13 | 65 |
| 14 | 30 | 10 | 20 | 4 | 20 | 8 | 40 |
| 15 | 30 | 12 | 20 | 3 | 45 | 4 | 20 |
| 16 | 30 | 14 | 20 | 1 | 5 | 3 | 15 |

2.2 红枣不定芽诱导培养基的筛选

2.2.1 不同激素处理对腋芽生长的影响 茎段接入1周后,茎段基部开始膨大,腋芽逐渐肿胀,茎梢有所伸长,2~3周后,可伸长1.0~1.3 cm。由表2可知,红枣外植体的出芽率随6-BA浓度的增加先增加后降低,当6-BA浓度较低时,出芽率普遍较低,说明6-BA对腋芽的萌发起显著作用。当2,4-D浓度为0.0 mg/L时,灰枣和骏枣的出芽率分别为0.37%、82%和4%、57%、35%,说明2,4-D对腋芽萌发的作用效果不明显,NAA作为一种具有生长素类活性的植物生长调节剂,出芽率随NAA浓度先增加后降低,0.2 mg/L NAA对灰枣和0.5 mg/L NAA对骏枣的腋芽萌发效果较显著,分别是82%和76%,说明初代培养基中不宜单独使用6-BA,而应附加低浓度的NAA。灰枣和骏枣分别在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L和MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L的培养基上平均出芽率较高。

表 2

不同激素处理对红枣腋芽生长的影响

| 灰枣初代培养基的筛选 | | | | 骏枣初代培养基的筛选 | | | |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------|
| 6-BA/mg · L ⁻¹ | 2,4-D/mg · L ⁻¹ | NAA/mg · L ⁻¹ | 出芽率/% | 6-BA/mg · L ⁻¹ | 2,4-D/mg · L ⁻¹ | NAA/mg · L ⁻¹ | 出芽率/% |
| 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0±0g | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 4±0.4h |
| 0.0 | 0.2 | 0.2 | 14±0.2g | 2.0 | 0.2 | 0.5 | 15±0.4g |
| 0.0 | 0.5 | 0.5 | 23±1.4f | 2.0 | 0.5 | 1.0 | 28±1.5f |
| 0.5 | 0.0 | 0.2 | 37±1.8e | 4.0 | 0.0 | 0.5 | 76±1.7a |
| 0.5 | 0.2 | 0.5 | 47±1.1d | 4.0 | 0.2 | 0.0 | 57±1.1b |
| 0.5 | 0.5 | 0.0 | 54±2.4c | 4.0 | 0.5 | 1.0 | 45±2.0d |
| 1.0 | 0.0 | 0.2 | 82±1.8a | 6.0 | 0.0 | 0.0 | 35±0.7e |
| 1.0 | 0.2 | 0.0 | 42±2.1d | 6.0 | 0.2 | 1.0 | 50±2.1c |
| 1.0 | 0.5 | 0.5 | 58±1.1b | 6.0 | 0.5 | 0.5 | 46±2.3d |

注:表中的数据为3次重复的平均值,表内平均数经新复极差检测,下同。

2.2.2 继代增殖培养基的选择 由表3可知,在灰枣的继代培养中,对苗均高的分析,6-BA对继代增殖的影响最大,株高随着6-BA浓度逐渐增加先增加后降低,株高最高达3.1cm,这说明6-BA对生长起显著作用。从增殖系数分析,增殖率随NAA浓度增加呈正向增长,对增殖起显著作用,在骏枣的继代培养中株高随6-BA浓度的

增加先增加后降低,株高最高达3.2cm,对生长起显著作用,NAA对增殖率的作用呈先增加后降低的趋势,高浓度和低浓度的NAA都不利继代增殖。由此得出,MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.4mg/L的培养基适合灰枣继代,MS+6-BA 4.0mg/L+NAA 0.1mg/L的培养基适合骏枣继代。

表 3

不同激素处理对红枣组培继代增殖的影响

| 灰枣继代培养基的筛选 | | | | 骏枣继代培养基的筛选 | | | |
|---------------------------|--------------------------|-----------|-----------|---------------------------|--------------------------|-----------|------------|
| 6-BA/mg · L ⁻¹ | NAA/mg · L ⁻¹ | 株高/cm | 增殖率 | 6-BA/mg · L ⁻¹ | NAA/mg · L ⁻¹ | 株高/cm | 增殖率 |
| 1.0 | 0.1 | 1.8±0.2e | 2.5±0.2c | 2.0 | 0.1 | 1.4±0.1e | 1.6±0.1def |
| 1.0 | 0.2 | 2.1±0.3c | 1.7±0.1e | 2.0 | 0.2 | 1.5±0.0e | 1.9±0.0cd |
| 1.0 | 0.4 | 2.5±0.3c | 2.7±0.1ab | 2.0 | 0.5 | 2.3±0.3c | 1.2±0.2g |
| 2.0 | 0.1 | 2.1±0.3de | 2.3±0.1bc | 4.0 | 0.1 | 2.7±0.2b | 2.8±0.2a |
| 2.0 | 0.2 | 3.1±0.3a | 2.5±0.2c | 4.0 | 0.2 | 3.2±0.2a | 2.1±0.3bc |
| 2.0 | 0.4 | 2.9±0.1ab | 3.2±0.3a | 4.0 | 0.5 | 2.1±0.1cd | 1.8±0.1de |
| 3.0 | 0.1 | 2.2±0.3e | 2.0±0.0d | 6.0 | 0.1 | 1.8±0.0d | 2.3±0.3b |
| 3.0 | 0.2 | 2.4±0.0cd | 2.3±0.4bc | 6.0 | 0.2 | 2.2±0.1c | 1.9±0.0cd |
| 3.0 | 0.4 | 2.6±0.2bc | 2.6±0.3bc | 6.0 | 0.5 | 1.9±0.1 | 1.4±0.1fg |

2.3 有机添加物对红枣组培继代增殖的影响

2.3.1 相同浓度的不同有机添加物的影响 由表4可知,4种有机添加物的作用效果差异很大,在灰枣的继代培养中,香蕉对株高的作用最显著,株高达到了2.2cm,增殖率也较高,达到了2.1,但是综合考虑株高和增殖率,水解酪蛋白的作用效果较显著,株高达2.1cm,增殖率达2.7;在骏枣的继代培养中水解酪蛋白的作用效果最显著,株高达到了1.9cm,增殖率达到了2.1。同时观察到香蕉中的植株在前期生长良好,后期有褐化的现象,椰汁中形成的组培苗颜色浅且有部分白化,马铃薯中有部分枯死的现象,水解酪蛋白中植株一直保持旺盛的增殖且植株较粗壮。

表 4 相同浓度不同有机添加物对红枣组培继代增殖的影响

| 有机添加物 | 对灰枣继代的影响 | | 对骏枣继代的影响 | |
|-------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | 株高/cm | 增殖率 | 株高/cm | 增殖率 |
| 香蕉 | 2.2±0.1a | 2.1±0.2c | 1.4±0.2b | 1.9±0.2ab |
| 椰汁 | 1.3±0.2b | 2.3±0.1b | 1.6±0.3ab | 1.3±0.3c |
| 马铃薯 | 1.7±0.3ab | 1.4±0.0c | 1.4±0.2b | 1.5±0.1bc |
| 水解酪蛋白 | 2.1±0.1a | 2.7±0.1a | 1.9±0.1a | 2.1±0.2a |

2.3.2 同种有机物不同浓度的影响 添加的4种有机

物对灰枣、骏枣继代增殖都有一定程度的影响。其中,水解酪蛋白对灰枣和骏枣的继代增殖效果最为显著,因此对水解酪蛋白进行最适浓度浓度梯度试验以确定最适添加浓度。这与王静^[4]的研究结果相似。由表5可知,高浓度的水解酪蛋白可以抑制灰枣和骏枣的继代增殖。通过比较水解酪蛋白对灰枣株高和增殖率的影响,其最适添加浓度为400mg/L。500mg/L的水解酪蛋白对骏枣的长势相比其它3组最理想。

表 5 不同浓度水解酪蛋白对红枣组培继代增殖的影响

| 有机物浓度 /mg · L ⁻¹ | 灰枣 | | 骏枣 | |
|--------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | 株高/cm | 增殖率 | 株高/cm | 增殖率 |
| 400 | 1.9±0.2ab | 2.9±0.3a | 1.9±0.2a | 2.1±0.2bc |
| 500 | 1.7±0.1ab | 2.6±0.2ab | 2.1±0.2a | 2.7±0.3a |
| 600 | 2.1±0.3a | 2.1±0.3bc | 2.0±0.1a | 2.2±0.2c |
| 700 | 1.4±0.2b | 1.8±0.4c | 1.7±0.3a | 1.8±0.2c |

3 结论与讨论

3.1 酒精和升汞最佳消毒配比时间筛选

试验结果表明,消毒时间越长,污染率越低但是成活率也很低,消毒时间越短,成活率越高但是污染率也很高,综合考虑到污染率和成活率,用75%的酒精

20 s+0.1%的升汞 10 min 的消毒方法最为理想。

3.2 红枣茎段萌发和继代培养基激素的筛选

该试验结果表明,灰枣初代培养的最佳配比是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,出芽率为 82%。骏枣初代培养的最佳配比是 MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,出芽率为 76%。这与赵薇等^[5]研究结果不同。植物组织培养中大多需要几种激素互相配合,才能达到快繁的目的^[6]。试验结果发现,6-BA 和 NAA 结合使用时,在灰枣的继代培养中,株高随 6-BA 浓度的增加先增加后降低,6-BA 浓度为 1.0、2.0、3.0 mg/L 时丛生苗平均伸长 2.1、2.7、2.4 cm。增殖系数与 NAA 浓度呈正向增加,最高达 3.2,0.4 mg/L 的 NAA 是否是灰枣继代培养最适添加浓度有待试验进一步确定;在骏枣的继代培养中株高随 6-BA 浓度的增加而先增加后降低,6-BA 浓度为 2.0、4.0、6.0 mg/L 时丛生苗平均伸长 1.7、2.6、1.9 cm,株高最高达 3.2 cm,但增殖系数随 NAA 浓度的增加呈负向增加,增殖率最大为 2.8,这说明高浓度为 NAA 可以抑制灰枣和骏枣的继代增殖。

3.3 最适有机添加物及其浓度的筛选

3.3.1 最适有机添加物筛选 在灰枣和骏枣的继代培养基中添加的 4 种有机物都对继代增殖都有一定影响。香蕉富含糖类物质,椰汁的蛋白质含量丰富,马铃薯含有丰富的蛋白质、维生素、碳水化合物及微量元素,水解酪蛋白的蛋白质含量非常高。因此对红枣组培继代增殖率都有很大的影响,香蕉、椰汁、马铃薯的添加量为 100 g/L,其中香蕉的作用效果较显著,在灰枣的继代培养中,株高达 2.2 cm,增殖率达 2.1 香蕉中富含碳水化合物、蛋白质、脂肪及钙、磷、铁、烟酸等微量物质,这些物质都是组织培养中植株生长需要的。但香蕉与水解酪

蛋白相比,水解酪蛋白的增殖效果更为显著,株高达到了 2.1 cm,增殖率达到了 2.7;在骏枣的继代培养中,香蕉的作用效果较椰汁和马铃薯明显,而水解酪蛋白的作用效果相比其它 3 种添加物都较显著,株高达到了 1.7 cm,增殖率达到了 1.8。这 4 种有机物是一些含有氨基酸、激素和酶等有机物且成分较为复杂的复合物,它们对细胞和组织的增殖和分化有一定的促进作用。

3.3.2 最适有机添加物浓度筛选 红枣继代培养基中的 4 种有机添加物中,水解酪蛋白的作用效果最为显著。因此对水解酪蛋白进行最适添加浓度试验,分别为 400、500、600、700 mg/L。其中灰枣的最适添加浓度为 400 mg/L,株高和增殖率分别为 1.9 cm 和 2.9;骏枣的最适添加浓度为 500 mg/L,株高和增殖率为 2.1 cm 和 2.7。Chawllal H S^[7]认为 0.10~1.00 g/L 的浓度比较适合,与该试验结果基本一致。但是品种间的结果差异较大。造成这一结果可能是由于品种间的差异或外植体本身的差异,原因还有待于继续研究。

参考文献

- [1] 林伯年. 果树组织培养综述[J]. 中国果树,1978(3-4):19-27.
- [2] 陈维伦,郭东红. 酸枣组织培养中胚状体的形成[J]. 植物生理学报,1981,7(1):83-84.
- [3] 张福泉,王嘉长,李峰,等. 枣茎段离体培养初报[J]. 中国果树,1983(3):46-47.
- [4] 王静. 大量元素、有机添加物、激素对蝴蝶兰原球茎增殖的影响[J]. 上海农业科技,2004(3):22-24.
- [5] 赵薇,彭建营. 枣组织培养技术体系的建立[J]. 保定:河北农业大学,2007.
- [6] 伍成厚,何业华,谢碧霞. 枣树愈伤组织继代培养研究[J]. 临沂师范学院学报,2004,26(3):64-66.
- [7] Chawllal H S. 植物生物技术导论[M]. 1 版. 北京:化学工业出版社,2005.

Study on the Factor Influencing the Propagation to the Soft-Stem Tissue Culture of the Jujube

YANG Wei¹, YANG Yu², XU Chong-zhi², GAO Jiang-sheng^{1,2}

(1. College of Plant Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Key Laboratory of Biological Resource Protection and Utilization of Tarim Basin, Xinjiang Production and Construction Group, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Using soft stems of 'Huizao' jujube and 'Junzao' jujube as explants, the effects of tissue culture multiplication on jujube with different organic additive were studied. The results showed that the treating by alcohol mercuric chloride for 20 s and 10 min, the effect of explant sterilization was better, the pollution percent of jujuba stem segments was low and the average budding rate was higher. The primary media for 'Huizao' jujube were MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L and the primany media for 'Junzao' jujube were MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; The subculture media for 'Huizao jujube' were MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L and for 'Junzao' jujube were MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L. The proper organic additives was hydrolytic castein, which additive concentration in 'Junzao' and 'Huiza' jujube were 400 mg/L and 500 mg/L.

Key words: 'Huizao' jujube; 'Junzao' jujube; tissue culture; organic material; subculture