

小果甜柿组织培养快繁技术

覃换玲¹,高莹莹^{1*},黄丽辉¹,陈淑媛¹,黄天琨¹,
李贤高¹,周晓璇¹,关长飞²,杨勇²

(¹广西植物组培苗有限公司,南宁 530007; ²西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】建立小果甜柿组培快繁技术体系,实现小果甜柿组培苗的工厂化生产。【方法】以小果甜柿带芽嫩枝茎段为外植体,研究了外植体取材时间、灭菌方法、植物生长调节剂配比对其组织培养过程中外植体消毒、启动培养、继代培养、生根培养的影响。【结果】适宜小果甜柿外植体取材的时间为4月、6月;选择75%酒精10 s + 0.1%氯化汞8 min的组合进行消毒,外植体成活率达76.67%;以(1/2N)MS + 2.5 mg·L⁻¹ ZT + 0.1 mg·L⁻¹ NAA为启动培养基,外植体萌芽率达78.33%;以(1/2N)MS + 2.0 mg·L⁻¹ ZT + 0.1 mg·L⁻¹ NAA为继代培养基,平均增殖系数在1.77以上;以1/2 MS + 1.0 mg·L⁻¹ IBA为生根培养基,生根率达74.73%,平均根数3.33条,平均根长2.60 cm。【结论】构建了小果甜柿组培快繁技术体系,为小果甜柿组培苗的工厂化生产提供参考依据。

关键词:小果甜柿;组织培养;快繁;茎段;培养基

中图分类号:S665.2

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2023)09-1992-09

Study on tissue culture and rapid propagation of Xiaoguo Tianshi as a sweet persimmon rootstock

QIN Huanling¹, GAO Yingying^{1*}, HUANG Lihui¹, CHEN Shuyuan¹, HUANG Tiankun¹, LI Xiangao¹, ZHOU Xiaoxuan¹, GUAN Changfei², YANG Yong²

(¹Guangxi Plant Tissue Culture Seedling Co. LTD, Nanning 530007, Guangxi, China; ²College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: 【Objective】Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) belongs to the genus (*Diospyros* Linn.) of the family Ebenaceae. China is rich in persimmon germplasm resources and one of the persimmon-producing countries with the longest cultivation history, the largest cultivated area and the largest yield in the world. Persimmon fruit tastes delicious, with unique flavor and high nutritional, and medicinal value, and is favored by consumers. At present, persimmon is often divided into sweet and astringent persimmon types according to whether the fruit can be deastringent naturally on the tree after maturity. Sweet persimmon can be crisp after ripening without any artificial treatment, sweet and refreshing, and the fresh experience of goods is excellent. The convenient transportation results in a higher economic value and persimmon industry at home and abroad focus on the development of varieties. At present, the lack of suitable rootstock in the sweet persimmon growing is the main reason that restricts its large scale development. Many domestic scholars have concluded that Xiaoguo Tianshi is a widely compatible and preferred rootstock for sweet persimmon. If the conventional seed and seedling breeding method is applied, the offspring traits will separate, and in this way, seedling breeding cycle is limited, and the yield is insufficient, so that it is difficult to meet the continuous growing market demand. Therefore, it is very important to use plant tissue culture technology for rapid propagation of Xiaoguo Tianshi as high-quality rootstock seedlings. Therefore, tissue culture has made great progress in persimmon crops

收稿日期:2022-12-26

接受日期:2023-06-01

作者简介:覃换玲,女,本科,主要从事农业生物技术方面的研究。Tel:0771-3243086,E-mail:312940679@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0771-3243086,E-mail:595249583@qq.com

and has been widely used in persimmon varieties and rootstock seedling breeding. However, there are few reports on tissue culture of Xiaoguo Tianshi, and because of the differences in physiological characteristics, explants, culture methods and other aspects among different persimmon crop varieties, the tissue culture and rapid propagation technology system of other persimmon varieties cannot be effectively applied. Therefore, the establishment of Xiaoguo Tianshi tissue culture and rapid propagation technology system is of great significance to realize the factory production of Xiaoguo Tianshi tissue culture seedlings.【Methods】First of all, the materials were collected in different months and different disinfection methods were used to disinfect the surface of the stem segments of the current year's young shoots, which were inoculated on the different start-up medium, and the contamination rate, browning rate and survival rate of explants were calculated. Secondly, the sterile bud obtained from the start-up medium was inoculated on different subculture media, and the subculture multiplication coefficient and the growth of the plantlets were counted. Finally, the sterile single bud with strong growth vigor, stem and leaf spreading and height of 3–4 cm was selected to inoculate on different rooting media, and the rooting rate, root number and root length were calculated. Through these methods, the best explants were selected, such as the time of material collection, sterilization method, start-up medium, subculture medium and rooting medium. The effects of time, sterilization method and proportion of plant growth regulators on explants disinfection, start-up culture, subculture and rooting culture were studied.【Results】In different months of the year, the suitable time for Xiaoguo Tianshi explant sampling was in April and June. The explants were sterilized in 75% alcohol and 0.1% HgCl₂ for 10 s and 8 min, the explants of Xiaoguo Tianshi had the lowest contamination rate and browning rate, and the survival rate reached to 76.67%. The medium for the initial culture was (1/2N) MS+2.5 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ sucrose and 4.5 g·L⁻¹ agar, the new buds grew well, the buds were robust and vigorous, and the percentage of axillary buds was up to 78.33%. The medium for the subculture was (1/2N) MS+2.0 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ sucrose and 4.5 g·L⁻¹ agar, the subgeneration seedlings grew well, the leaves stretched fully, the plants were strong and vigorous, and the multiplication coefficient reached to 1.77. The rooting medium was 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ sucrose and 4.5 g·L⁻¹ agar, with a rooting rate of 74.73%, the average root number was 3.33, and the average root length was 2.60 cm.【Conclusion】The production efficiency of Xiaoguo Tianshi seedlings could be effectively improved by plant tissue culture. Therefore, in this study, the key technological processes were confirmed, including explant disinfection, start-up culture, subculture and rooting culture in tissue culture by using the stem segment of Xiaoguo Tianshi with buds as explants, and the results can provide a reference for the industrial production of tissue culture plantlets of Xiaoguo Tianshi.

Key words: Xiaoguo Tianshi; Tissues culture; Rapid propagation; Stem segment; Culture medium

柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 属于柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros* Linn.) 植物, 起源于我国, 是柿属植物果树栽培的重要作物, 我国柿资源丰富, 至今已有 2000 多年的栽培历史^[1]。柿果味道鲜美、风味独特、颜色艳丽, 含有丰富的果糖、葡萄糖、维生素 C 等营养物质, 有润肺、生津等功效, 具有很高的营养价值和药用价值, 近年来深受消费者喜爱^[2]。

目前常根据柿果实成熟后能否在树上自然脱涩, 将其分为甜柿和涩柿, 涩柿需进行脱涩处理后才

能食用, 而甜柿则不需要任何人工脱涩处理即可脆食, 因此甜柿有着更高的经济价值^[3]。我国的柿资源大部分是涩柿, 自 20 世纪 20 年代就开始从日本引进甜柿品种, 由于缺乏嫁接亲和性强的砧木, 制约了我国甜柿产业的规模化发展, 是我国现代甜柿产业可持续发展的“瓶颈”问题之一^[4-6]。因此, 解决甜柿嫁接不亲和问题, 着力选育、发展优良砧木种苗, 已成为了行业研究的首要问题。

近年来, 以小果甜柿作为甜柿品种砧木的应用

潜力研究已取得一定进展。李曼^[4]对甜柿不同砧穗组合嫁接亲和性的研究,初步得出甘秋与小果甜柿亲和性较好,早秋与山东君迁子和小果甜柿亲和性相当;胡梦珏等^[5]以小果甜柿作为富有、次郎甜柿砧木的研究得出,两个组合嫁接亲和性均表现良好,嫁接后田间表现正常,表明小果甜柿有望成为完全甜柿的优选砧木;陈莉^[7]对柿广亲和砧木的筛选研究得出:日本甜柿太秋、富有、松本早生均与小果甜柿表现为嫁接亲和的结果。尽管多位学者均研究得出小果甜柿是甜柿的广亲和优选砧木,但当前仍主要通过传统的种子播种繁殖方式获得砧木实生苗,又因其不具有无融合生殖能力,且不同授粉源对其遗传稳定性影响较明显,因此,获得大批量性状表现一致的砧木苗较为困难^[7-8]。

随着柿树栽培和甜柿引种工作的深入开展,优良砧木的需求量急剧增加。由于常规育苗方法周期长,成活率低,种苗性状不均一,故组织培养研究在柿科作物上已取得了较大进展,开始广泛应用于柿品种和砧木的种苗繁育。马俊莲等^[9]以叶片为外植体进行愈伤组织诱导和不定芽再生的研究,建立了富有和次郎两个甜柿品种组织培养再生体系;李晶等^[10]以君迁子休眠芽和叶片为外植体,研究基本培养基种类和外植体基因型对初代培养的影响,建立了君迁子组织培养再生体系;蒋振莹等^[11]以当年生枝条上休眠芽为外植体材料,通过不同处理间对比研究,建立了山红柿再生技术体系;刘一凤^[8]通过组织培养、直立压条、硬枝扦插等技术途径,获得了小果甜柿自根苗生产技术。多位学者已对柿属作物进行了一系列的组培研究,总结出不同柿属作物的再生技术体系,取得了一定成果。但目前小果甜柿组培方面的研究报道较少,又因不同柿属作物品种间生理特性、外植体取材部位、培养方式等方面存在差异,无法有效套用其他柿属品种的组培快繁技术体系。鉴于此,笔者在本研究中通过组织培养技术,旨在建立一个快速高效的小果甜柿组培快繁技术体系,为小果甜柿组培苗的工厂化生产提供一定的技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料取自国家柿种质资源圃甜柿品种及优良砧木试种示范选育推广基地—广西植物组培苗有

限公司科研育苗棚柿圃(22°51' N, 108°14' E)。选取生长旺盛、无病虫害、长势健壮的小果甜柿实生苗母株,于2021年4—10月,取该植株上当年生带芽嫩枝茎段为外植体。

1.2 方法

1.2.1 不同取材时间对当年生嫩枝茎段灭菌效果的影响 为确定外植体适宜的采集时间,分别于不同时期(4月10日、6月12日、8月10日、10月9日)选取当年生带芽嫩枝茎段作为供试材料外植体,共4个处理(表1)。在超净工作台上,采用75%乙醇10 s和0.1%氯化汞8 min组合的方式进行表面消毒,期间不断晃动,最后用无菌水冲洗3~4次。将消毒后的外植体用无菌滤纸吸去表面水分后,切割成单芽茎段接种于不含激素的(1/2N)MS初代培养基中。每个处理接种60个外植体、设置3次重复。培养14 d后统计外植体污染率及成活率。

1.2.2 不同灭菌方法对当年生嫩枝茎段灭菌效果的影响 于连续晴朗的午后,选取当年生带芽嫩枝茎段作为供试材料外植体。采用75%乙醇(10、30 s)和0.1%氯化汞(6、8、10 min)组合的方式进行消毒,共6种消毒处理组合(表2,消毒流程同1.2.1)。每个处理接种60个外植体、设置3个重复。组织培养条件:温度(25±2) °C,暗培养5 d后转入光照培养,光照度2500~3000 lx,光照时长12 h·d⁻¹(下同)。培养14 d后统计外植体污染率及成活率。

1.2.3 启动培养 为确定不同细胞分裂素种类及浓度对外植体萌芽的影响。以(1/2N)MS为供试基本培养基,分别添加1.5、2.0、2.5、3.0 mg·L⁻¹ 6-BA或ZT,共8种培养基组合(表3)。每种培养基均添加0.1 mg·L⁻¹ NAA、30 g·L⁻¹蔗糖和4.5 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8。

将经最佳消毒方式处理后获得的外植体分别接种于8种培养基中,每瓶1个,每配方接种外植体60个、设置3个重复。培养25 d后观察外植体腋芽萌动情况,并计算诱导率。

1.2.4 继代培养 为确定不同激素组合和转接代数对组培苗继代增殖的影响。选择(1/2N)MS为供试基本培养基,分别添加1.5、2.0、2.5、3.0 mg·L⁻¹ 6-BA或ZT,共8种培养基组合(表4)。每种培养基均添加0.1 mg·L⁻¹ NAA、30 g·L⁻¹蔗糖和4.5 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8。

将启动培养基中获得的长势较好、生长健壮的

无菌单芽分别接种于8种培养基中,每配方接种无菌单芽10个,每隔30 d转接1次,共转接15次。从培养的第1代起至第15代,统计每一代的增殖系数及丛芽生长情况。

1.2.5 生根培养 为确定不同激素种类及浓度对组培苗生根的影响。选择1/2 MS为供试基本培养基,分别添加不同浓度的IAA、IBA、NAA,共9种培养基组合(表5)。每种培养基均添加30 g·L⁻¹蔗糖、4.5 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8。

选取最佳继代配方中培养的长势健壮、茎叶舒展、高度3~4 cm的无菌单芽,分别接种于9种培养基中,每瓶接种4株,每生根配方接种60株、设置3个重复。暗培养7 d后转入光照培养,培养35 d后观察并统计各单株的生根条数、根长、根粗及生长情况。

将组培室内培养30 d左右的组培生根苗移入

温室进行炼苗14 d,炼苗完成后取出生根苗,洗净根部培养基,用200 mg·L⁻¹高锰酸钾水溶液对植株进行短时消毒,然后移栽至含进口泥炭土70%+珍珠岩30%的育苗杯中,淋定根水,同时喷施1000倍多菌灵溶液进行消毒,盖小拱棚保湿,遮阳网遮阴。

1.2.6 数据分析 采用Excel 2013进行数据处理及制图,用SPSS 19.0软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同取材时间对当年生嫩枝茎段灭菌效果的影响

不同取材时间对外植体灭菌的效果影响不同。由表1可以看出,不同取材时间的小果甜柿嫩枝茎段在灭菌接种后,污染率、褐化率和存活率均存在显著差异。从污染率、褐化率来看,8月、10月显著高

表1 不同取材时间对小果甜柿外植体灭菌的影响

Table 1 Effect of different time on sterilization of Xiaoguo Tianshi explants

处理编号 Process number	取材时间 Sampling time	75%乙醇消毒时间 75% alcohol disinfection time/s	0.1%氯化汞消毒时间 0.1% mercury chloride disinfection time/min	污染率 Pollution rate/%	褐化率 Browning rate/%	成活率 Survival rate/%
1	4月 April	10	6	11.67 c	15.00 bc	73.33 a
2	6月 June	10	6	13.33 c	8.33 c	78.34 a
3	8月 August	10	6	21.67 b	26.67 a	51.66 b
4	10月 October	10	6	41.67 a	18.33 b	40.00 c

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同。

Note: Different small letters in the table indicated that the difference between different treatments was significant ($p < 0.05$). The same below.

于4月、6月,当取材时间为4月、6月时,外植体污染率分别为11.67%、13.33%,褐化率分别为15.00%、8.33%;就存活率而言,4月、6月成活率显著高于8月、10月,分别为73.33%、78.34%。因此,小果甜柿当年生嫩枝茎段外植体最佳的取材时间是4月、6月。

2.2 不同灭菌方法对当年生嫩枝茎段灭菌效果的影响

将经不同灭菌方法消毒后的外植体接种至相同的初代培养基中,14 d后观察发现,不同灭菌方法对小果甜柿外植体灭菌效果的影响显著(表2)。当使用0.1%氯化汞消毒时间相同时,随着75%乙醇的处理时间增加,外植体污染率和褐化率均随之升高,成活率随之降低,但各组合整体差异不显著,其中以使用75%乙醇消毒10 s较好。当使用75%乙醇消毒时间相同时,随着0.1%氯化汞

消毒时间的延长,外植体污染率差异不显著,但褐化率显著升高,导致成活率有所降低。因此,适合小果甜柿嫩枝茎段外植体消毒的最佳方式为:

表2 不同灭菌方法对小果甜柿外植体灭菌的影响

Table 2 Effect of different sterilization methods on the sterilization of Xiaoguo Tianshi explants

处理编号 Process number	75%乙醇消毒时间 75% alcohol disinfection time/s	0.1%氯化汞消毒时间 0.1% mercury chloride disinfection time/min	污染率 Pollution rate/%	褐化率 Browning rate/%	成活率 Survival rate/%
1	10	6	15.00 ab	11.67 b	73.33 ab
2	10	8	10.00 b	13.33 b	76.67 a
3	10	10	13.33 ab	26.67 a	60.00 bc
4	30	6	21.67 a	15.00 b	63.33 abc
5	30	8	18.33 ab	26.67 a	55.00 c
6	30	10	20.00 a	26.67 a	53.33 c

75%乙醇 10 s + 0.1%氯化汞 8 min, 外植体成活率 76.67%。

2.3 不同培养基对小果甜柿外植体萌芽率的影响

将经同种灭菌方法消毒后的外植体接种至不

同的初代培养基中, 14 d 左右外植体腋芽开始萌发, 芽体逐渐生长, 叶片变大, 30 d 后新芽高度最高可达 3 cm, 叶片舒展。当 NAA 浓度一定时, 启动培养基中添加不同浓度的 6-BA 或 ZT, 对小果甜柿外植

表 3 不同培养基对小果甜柿外植体萌芽率的影响

Table 3 Effect of different media on germination rate of Xiaoguo Tianshi explants

处理编号 Process number	基本培养基类型 Basic medium	ρ (植物生长调节剂) Plant growth regulators/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			萌芽率 Germination rate/%	生长情况 Growth condition
		6-BA	ZT	NAA		
1	(1/2N) MS	1.5		0.1	33.33 b	长势一般, 愈伤组织较黑 It's not growing well. The Callus was black
2	(1/2N) MS	2.0		0.1	40.00 b	长势一般, 愈伤组织较黑 It's not growing well. The Callus was black
3	(1/2N) MS	2.5		0.1	65.00 a	长势较好, 芽健壮 It grows well and has strong buds
4	(1/2N) MS	3.0		0.1	63.33 a	长势较好, 芽健壮, 部分芽玻璃化严重 It grows well and has strong buds. Some bud vitrification was serious
5	(1/2N) MS		1.5	0.1	63.33 a	长势较好, 芽健壮 It grows well and has strong buds
6	(1/2N) MS		2.0	0.1	71.67 a	长势较好, 芽健壮 It grows well and has strong buds
7	(1/2N) MS		2.5	0.1	78.33 a	长势好, 萌芽较快, 芽健壮, 新芽腋芽处有不定芽萌发 It grows well, sprouts quickly, sprouts are strong, and there are adventitious sprouts in the axillary buds of new sprouts
8	(1/2N) MS		3.0	0.1	76.67 a	长势好, 芽健壮, 长势较快, 部分芽玻璃化严重 It grows well, bud strong, fast growth, some bud vitrification serious

体萌芽率的影响显著(表3)。随着 6-BA、ZT 的浓度增加, 外植体萌芽率先升高后降低, 均以 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度时萌芽率最高, 分别为 65.00%、78.33%; 当 6-BA 和 ZT 质量浓度相同时, ZT 对小果甜柿萌芽的效果显著优于 6-BA。因此, 适宜小果甜柿外植体腋芽萌发的启动培养基为: (1/2N)MS + $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA(图 1-A、B)。

2.4 不同培养基对小果甜柿组培苗继代增殖的影响

将诱导出的新芽进行继代增殖培养, 经 15 次继代增殖, 发现不同浓度植物生长调节剂配比对小果甜柿继代增殖影响显著(表 4)。当 NAA 浓度一定时, 随着 6-BA 或 ZT 浓度增加, 增殖系数增大; 当 6-BA 和 ZT 浓度相同时, ZT 对小果甜柿继代增殖的效果显著优于 6-BA。试验表明: 6-BA 对小果甜柿组培苗继代增殖效果较差, 芽体长势差, 增殖系数小, 随着继代次数增加, 后期芽体逐渐褐化死亡; ZT 对其继代增殖效果较好, 芽体长势好, 增殖系数随浓度升高而增大, 但随着继代次数增加到 8 代以上, 当 ZT 质量浓度为 2.5 或 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 芽体会出现明显

的玻璃化现象而导致增殖系数变小, 而 ZT 质量浓度为 2.0 或 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时玻璃化程度较轻, 对其增殖影响较小。因此, 适宜小果甜柿组培苗继代增殖的培养基为: (1/2N)MS + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA(图 1-C)。

2.5 不同培养基对小果甜柿组培苗生根的影响

由表 5 可见, 不同生长素种类及浓度对小果甜柿组培苗生根影响显著。单独使用 3 种生长素, 对组培苗生根率的影响由大到小依次为: IBA > IAA > NAA; 对组培苗根长的影响由大到小依次为: IAA > IBA > NAA; 对组培苗根数的影响总体上看 IBA、IAA 优于 NAA。3 种生长素均以添加质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时较好, 其中当 IBA 质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时组培苗长势最好, 生根率高达 74.73%, 根数 3.33 条, 根长 2.60 cm。另外, 将组培室内培养 30 d 左右小果甜柿组培生根苗进行移栽, 60 d 待其生长稳定后统计其移栽成活率约为 80%。因此, 适宜小果甜柿组培苗生根的培养基为: 1/2 MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA(图 1-D、E)。

表4 不同培养基对小果甜柿组培苗继代增殖的影响

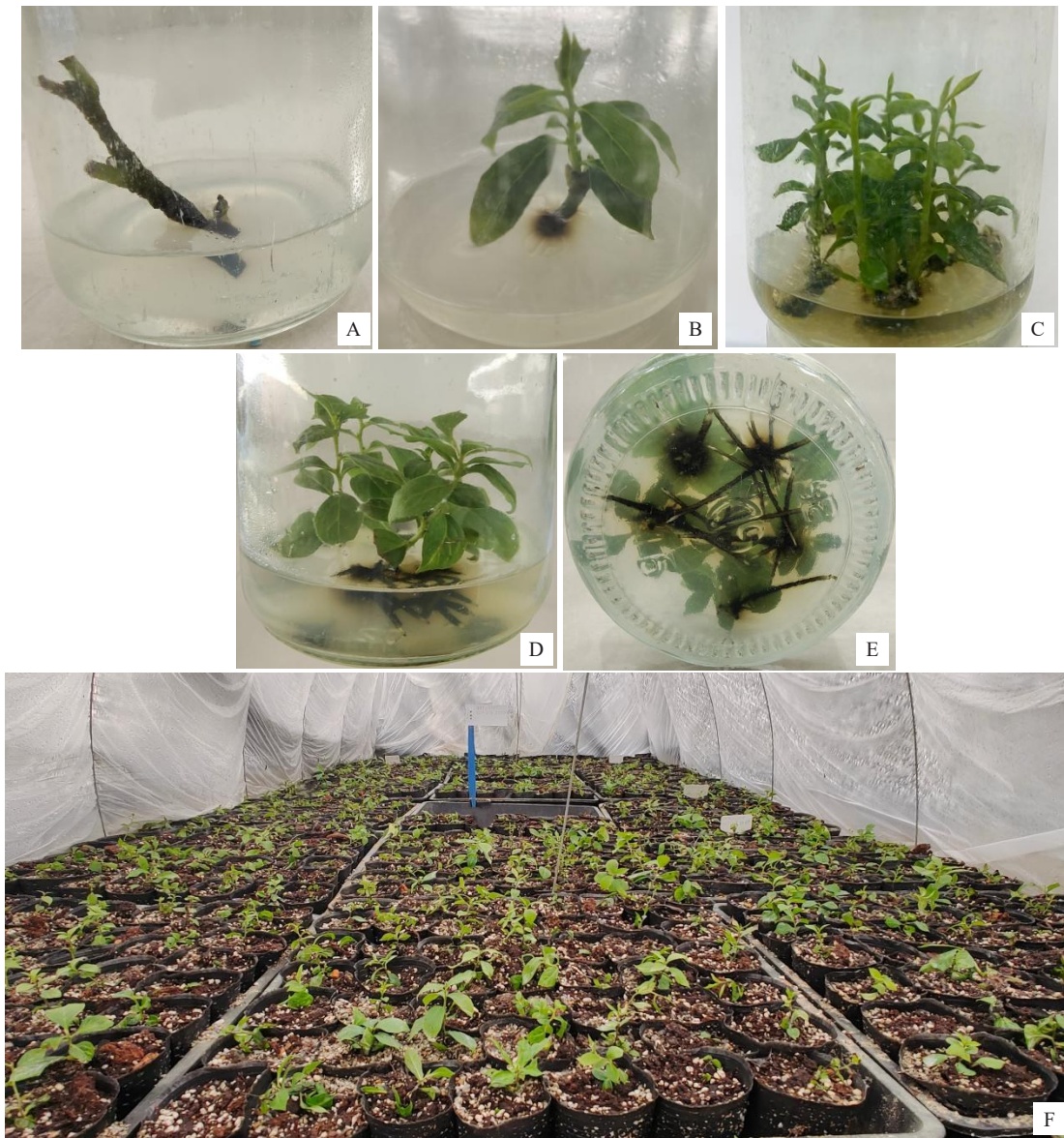
Table 4 Effects of different media on subculture proliferation of Xiaoguo Tianshi tissue culture seedlings

处理 编号 Process number	基本培养 基类型 Basic medium	ρ (植物生长调节剂) Plant growth regulators/(mg·L ⁻¹)			1~7代增殖系数	8~15代增殖系数	生长情况 Growth condition
		6-BA	ZT	NAA	1-7 algebra multiplication coefficient	8-15 algebra multiplication coefficient	
1	(1/2N) MS	1.5		0.1	0.91 e	0.00 d	长势逐渐变差,叶片易脱落 The growth tendency gradually becomes worse, the leaf is easy to fall off
2	(1/2N) MS	2.0		0.1	1.07 de	0.00 d	长势逐渐变差,叶片易脱落 The growth tendency gradually becomes worse, the leaf is easy to fall off
3	(1/2N) MS	2.5		0.1	1.15 d	0.00 d	长势逐渐变差,芽细弱,基部易褐变 The growth of poor gradually, thin bud, base easy to brown
4	(1/2N) MS	3.0		0.1	1.18 d	0.00 d	长势逐渐变差,芽细弱,基部易褐变 The growth of poor gradually, thin bud, base easy to brown
5	(1/2N) MS		1.5	0.1	1.46 c	1.29 c	长势好,植株粗壮,叶片大 Grow well, plant stout, leaves are big
6	(1/2N) MS		2.0	0.1	1.86 b	1.77 a	长势好,植株粗壮,叶片舒展 Grow well, plant stout, leaves stretch
7	(1/2N) MS		2.5	0.1	1.68 b	1.51 b	长势较好,叶片易玻璃化 Good growth, easy to vitrification of the leaves
8	(1/2N) MS		3.0	0.1	2.25 a	1.48 b	长势较好,叶片易玻璃化,部分叶卷曲 Good growth, easy to vitrification of the leaves, part of the leaf crimp

表5 不同培养基对小果甜柿组培苗生根的影响

Table 5 Effects of different media on rooting of Xiaoguo Tianshi tissue culture seedlings

处理 编号 Process number	基本培养 基类型 Basic medium	激素 Hormones	ρ (mg·L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	平均根数 Average number of root	平均根长 Average root length/cm	生长情况 Growth condition
2	1/2MS		1.0	63.30 b	3.30 b	2.97 a	根系细长,较黑,后期容易断根 The root system is slender and blacker. The later stage is easy to cut off the root
3	1/2MS		1.5	51.53 c	1.50 d	2.67 a	根系细长,较黑,基部有少量愈伤组织,后期容易断根 The root system is slender and darker. The base has the few cal- lus. The later period is easy to cut off the root
4	1/2MS	IBA	0.5	63.67 b	0.97 e	2.10 b	根系活力好,部分根系后期不生长 The root system vigor is good, partial root system later stage does not grow
5	1/2MS		1.0	74.73 a	3.33 b	2.60 a	根系活力好,根系较粗 The root system vigor is good, the root system is thick
6	1/2MS		1.5	60.03 b	3.57 ab	1.87 bc	根系活力好,基部有少量愈伤 The root system vigor is good, the base has the few callus
7	1/2MS	NAA	0.5	25.03 e	3.70 a	1.60 cd	根系弱,基部愈伤较大,根系易脱离,叶片卷曲 The root system is weak, the base callus is big, the root system is easy to detach, the leaf blade curls
8	1/2MS		1.0	18.50 g	1.03 e	1.53 cd	根系弱,基部愈伤较大,根系易脱离,叶片卷曲 The root system is weak, the base callus is big, the root system is easy to detach, the leaf blade curls
9	1/2MS		1.5	9.10 f	1.13 e	1.27 d	根系弱,基部愈伤较大,较黑,根系易脱离,叶片卷曲 The root system is weak, the base callus is bigger, darker, the root system is easy to detach, the leaf blade curls



A. 外植体; B. 茎段腋芽萌发; C. 继代培养; D, E. 生根培养; F. 组培苗移栽。

A. Explant; B. Axillary buds of stem segment germinate; C. Subculture; D, E. Rooting culture; F. Transplantation of tissue culture seedlings.

图 1 小果甜柿组织培养流程

Fig. 1 Tissue culture process of Xiaoguo Tianshi

3 讨 论

笔者在本研究中以小果甜柿带芽嫩枝茎段为外植体,通过外植体取材时间、灭菌时间、植物生长调节剂配比对其组织培养过程中外植体消毒、启动培养、继代培养、生根培养的影响进行了研究。初步建立了小果甜柿组织培养快繁技术体系。

外植体的消毒处理是组培过程中的关键环节,在对外植体进行彻底灭菌的同时还要尽可能地减少对外植体组织的伤害,保证植物细胞仍具有旺盛的生长分化能力^[12]。小果甜柿的腋芽长期暴露在空气

中,容易积累多种微生物造成消毒困难,因此,在每年的4月、6月选取含菌较少且生长分化能力较强的植物组织作为外植体较适宜,同时要严格控制灭菌时间,以求达到最佳的灭菌效果。

在植物组织培养过程中,植物生长调节剂对外植体的诱导分化起重要作用,可以调节并决定着外植体的生长发育进程、分化方向和器官发生^[13]。李畅等^[14]采用阳丰甜柿带芽茎段为外植体接种在 $1/2 MS + 1.0 mg \cdot L^{-1} ZT + 0.1 mg \cdot L^{-1} IAA$ 培养基中,腋芽诱导率为77.8%;蒋振莹等^[11]采用山红柿休眠芽为外植体接种在 $(1/2N)MS + 1.0 mg \cdot L^{-1} ZT + 0.1 mg \cdot L^{-1} NAA$ 培养基

中,诱导新芽长势较好。笔者在本试验中以(1/2N)MS + 2.5 mg·L⁻¹ ZT + 0.1 mg·L⁻¹ NAA为小果甜柿嫩枝茎段外植体最佳启动培养基,ZT使用浓度与前人所使用的浓度不同,这可能与品种间生理特性不同有关。

褐变现象普遍存在于多种植物体的组织培养过程中,木本植物表现尤为严重,导致木本作物较难建立组培快繁体系,其中选择适宜的植物生长调节剂种类对试验的成功至关重要^[15]。前人研究发现,部分柿品种在含有6-BA的培养基中长势较差甚至无法生长,而ZT在柿组织培养中则普遍使用。例如,刘恺等^[16]研究得出,在柿的组培快繁过程中,富有甜柿的组培苗只能在含有ZT的培养基中生长;朱陈宇^[17]研究6-BA和ZT两种细胞分裂素对柿继代增殖的影响发现,与6-BA相比,ZT更适宜君迁子优系L938的继代培养;孔祥生等^[18]的研究表明,富有和次郎的继代培养基中单独使用ZT或6-BA,在增殖倍数和新梢生长方面,ZT都显著优于6-BA。本试验研究得出,ZT比6-BA更适宜用于小果甜柿组培苗继代培养,与多位学者研究结果一致。另外,本试验结果还表明,小果甜柿继代培养基中不适宜长期添加较高浓度的ZT,否则8代以后芽体会出现玻璃化现象而导致组培苗继代增殖系数降低,这可能与外源激素的累积效应相关。而就笔者在本试验中目前进展而言,虽经15次继代后的组培生根苗已进行试种,现移栽存活率稳定,植株长势正常,未发现明显变异情况,但对其大田种植多年后的遗传稳定性等方面的研究仍在继续重点进行中。

很多学者的研究均表明,柿存在生根难的问题。目前,解决生根困难的问题多采用生根前期暗培养、增加继代培养代数、调节基本培养基成分及植物生长调节剂种类等方法。李畅等^[1]、刘一凤^[8]、朱陈宇^[17]、刘聪娟等^[19]通过减少生根培养基中的营养成分、生根前期暗培养等方式,对多个柿品种组培苗生根的作用效果进行研究,试验结果均表现较好。笔者在本试验中借鉴前人的研究成果,采用1/2 MS为基本培养基,在生根前期暗培养7 d后转入光照培养,研究了IAA、IBA、NAA 3种生长素单独使用对小果甜柿组培苗生根的影响。试验结果表明IBA优于IAA和NAA,但它们三者对小果甜柿组培苗生根的相互作用效果还需进一步深入研究。

目前,香蕉^[20]、桃树^[21]、苹果^[22]、葡萄^[23]、柿^[1-2]等许多木本植物都已成功建立了植物组织培养快繁技术体系,但不同植物的体系快速繁殖效果不同。本试

验虽比部分柿科植物的组培扩繁效率和生根率较高,继代增殖系数约1.77以上,生根率达74.73%,但与香蕉、桃树、苹果、葡萄等成熟的快繁技术体系相比,这些品种继代增殖系数高达2.0以上,生根率达95%以上,本文中研究的体系快速繁殖效率还略低。笔者在试验过程中已采用多种方法来防止褐变的发生,在一定程度上可降低褐变程度,但在培养过程中仍不能完全抑制褐变,这可能也是影响小果甜柿体系快速繁殖效果的原因之一。但是,本试验与该品种的常规育苗方法相比,可有效缩短育苗周期,提高种苗成活率,种苗性状也较均一,为小果甜柿组培苗的工厂化生产提供了一定的技术支撑。

4 结 论

本试验结果表明,以小果甜柿带芽嫩枝茎段为外植体,适宜小果甜柿外植体取材的最佳时间为4月、6月;选择75%乙醇10 s+0.1%氯化汞8 min的组合进行消毒,外植体成活率达76.67%;以(1/2N)MS + 2.5 mg·L⁻¹ ZT+0.1 mg·L⁻¹ NAA为启动培养基,萌发的新芽有活力,外植体萌芽率达78.33%;以(1/2N)MS + 2.0 mg·L⁻¹ ZT + 0.1 mg·L⁻¹ NAA为继代培养基,小果甜柿组培继代苗长势好,增殖系数在1.77以上;以1/2 MS + 1.0 mg·L⁻¹ IBA为生根培养基,小果甜柿组培苗生根率达74.73%,平均根数3.33条,平均根长2.60 cm。

参考文献 References:

- [1] 李畅,傅建敏,王森,文亚峰,晏巢,孙鹏,刁松峰,韩卫娟. 阳丰甜柿组织培养再生体系的建立[J]. 西北林学院学报,2016,31(3):159-164.
LI Chang, FU Jianmin, WANG Sen, WEN Yafeng, YAN Chao, SUN Peng, DIAO Songfeng, HAN Weijuan. Establishment of tissue culture regeneration system of *Diospyros kaki* cv. Youhou[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(3): 159-164.
- [2] 李畅. 阳丰甜柿组织培养及微型嫁接技术研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2016.
LI Chang. Research on in vitro regeneration system and micrografting of *Diospyros kaki* cv. Youhou[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2016.
- [3] 罗正荣,蔡礼鸿,胡春根. 柿属植物种质资源及其利用研究现状[J]. 华中农业大学学报,1996,15(4):381-388.
LUO Zhengrong, CAI Lihong, HU Chungen. Research development of germplasm resources of *Diospyros* and their utilization[J]. Journal Huazhong Agricultural University, 1996, 15(4): 381-388.
- [4] 李曼. 甜柿不同砧穗组合嫁接亲和性的初步研究[D]. 南京:南

- 京农业大学,2016.
- LI Man. The preliminary research of persimmon grafting affinity[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2016.
- [5] 胡梦珏,陈莉,刘一凤,张青林,罗正荣. 小果甜柿和牛眼柿作为完全甜柿砧木的应用潜力研究[J]. 果树学报,2017,34(1):50-58.
- HU Mengjue, CHEN Li, LIU Yifeng, ZHANG Qinglin, LUO Zhengrong. Potential of Xiaoguo Tianshi and niuyanshi (*Diospyros kaki* Thunb.) as novel rootstocks for PCNA persimmon[J]. Journal of Fruit Science,2017,34(1):50-58.
- [6] 龚榜初,王劲风,吴开云. 日本科柿砧木类型选择的研究[J]. 林业科学研究,1992,5(6):706-711.
- GONG Bangchu, WANG Jinfeng, WU Kaiyun. Studies on the selection of combination of root stocks with scions of non-astringent persimmon (*Diospyros*) varieties[J]. Forest Research,1992,5(6):706-711.
- [7] 陈莉. 柿广亲和砧木筛选及其生殖特性探究[D]. 武汉:华中农业大学,2016.
- CHEN Li. Screening of wide compatible rootstocks in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and its reproductive characteristics research[D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,2016.
- [8] 刘一凤. 完全甜柿砧木小果甜柿繁殖技术研究[D]. 武汉:华中农业大学,2017.
- LIU Yifeng. Establishment of propagation technology for PCNA rootstock Xiaoguo Tianshi[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University,2017.
- [9] 马俊莲,刘恺,张子德. ‘富有’和‘次郎’甜柿叶片再生植株的研究[J]. 园艺学报,2006,33(5):1048-1050.
- MA Junlian, LIU Kai, ZHANG Zide. Shoot regeneration from leaves of ‘Fuyu’ and ‘Jiro’ persimmon[J]. Acta Horticulturae Sinica,2006,33(5):1048-1050.
- [10] 李晶,罗玉洁,张青林,罗正荣,刘继红. 君迁子休眠芽及叶片离体培养体系优化及植株再生[J]. 华中农业大学学报,2016,35(4):14-19.
- LI Jing, LUO Yujie, ZHANG Qinglin, LUO Zhengrong, LIU Jihong. *In vitro* culture system optimization and regeneration of date plum (*Diospyros lotus* Linn.) dormant buds and leaves[J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2016,35(4):14-19.
- [11] 蒋振莹,闫艳秋,林志伟,冯佳,渠慎春. 山红柿组培快繁技术体系的建立[J]. 江西农业大学学报,2016,38(1):74-82.
- JIANG Zhenying, YAN Yanqiu, LIN Zhiwei, FENG Jia, QU Shenchun. Establishment of rapid *in vitro* propagation system for *Diospyros morrisiana* Hance[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2016,38(1):74-82.
- [12] 马琳,何丽娜,姜岩,潘会堂. 锯叶班克木 *Banksia serrata* 外植体的选择及消毒方法的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(12):133-137.
- MA Lin, HE Lina, JIANG Yan, PAN Huitang. Study on selection and sterilization of explants of *Banksia serrata* in tissue culture[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2011,31(12):133-137.
- [13] 吴秀燕,张鸽香. 美国流苏离体胚的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报,2017,53(2):227-233.
- WU Xiuyan, ZHANG Gexiang. Study on embryo culture and rapid propagation *in vitro* of *Chionanthus virginicus*[J]. Plant Physiology Journal,2017,53(2):227-233.
- [14] 李畅,傅建敏,王森,文亚峰. 阳丰甜柿组织培养外植体的选择与灭菌[J]. 经济林研究,2016,34(1):158-163.
- LI Chang, FU Jianmin, WANG Sen, WEN Yafeng. Explants selection and sterilization in tissue culture for *Diospyros kaki* cv. Youhou[J]. Nonwood Forest Research,2016,34(1):158-163.
- [15] 高洁,张萍,薛璟祺,薛玉前,王顺利,张秀新. 酚类物质及其对木本植物组织培养褐变影响的研究进展[J]. 园艺学报,2019,46(9):1645-1654.
- GAO Jie, ZHANG Ping, XUE Jingqi, XUE Yuqian, WANG Shunli, ZHANG Xiuxin. Advances in phenolic substances and their effects on browning in woody plant tissue culture[J]. Acta Horticulturae Sinica,2019,46(9):1645-1654.
- [16] 刘恺,贾春风. 甜柿品种‘富有’组织培养技术研究[J]. 保定师范专科学校学报,2007,20(2):51-52.
- LIU Kai, JIA Chunfeng. Study on tissue culture ‘Fuyu’ persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) [J]. Journal of Baoding Teachers College,2007,20(2):51-52.
- [17] 朱陈宇. 柿砧木 L938 组培技术研究[D]. 保定:河北农业大学,2021.
- ZHU Chenyu. Study on tissue culture technology of persimmon rootstock L938[D]. Baoding: Hebei Agricultural University,2021.
- [18] 孔祥生,张妙霞,杜爱玲,张益民. 甜柿离体快繁技术研究[J]. 华中农业大学学报,1998,17(2):178-186.
- KONG Xiangsheng, ZHANG Miaoxia, DU Ailing, ZHANG Yimin. Studied on rapid propagation technology of *Diospyros kaki*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University,1998,17(2):178-186.
- [19] 刘聪娟,唐霞,刘恺,马俊莲. 甜柿组培苗生根条件的研究[J]. 河北林果研究,2006,21(2):185-188.
- LIU Congjuan, TANG Xia, LIU Kai, MA Junlian. Studies on rooting conditions of nonastringent persimmon *in vitro*[J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research,2006,21(2):185-188.
- [20] 杨丽. 福建地方特色香蕉品种(系)的工厂化育苗关键技术研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- YANG Li. Studies on the key techniques of industrial-scale micropropagation in 2 local characteristic cultivars in Fujian[D]. Fuzhou:Fujian Agriculture and Forestry University,2013.
- [21] 吴延军,徐昌杰,张上隆. 桃组织培养和遗传转化研究现状及展望[J]. 果树学报,2002,19(2):123-127.
- WU Yanjun, XU Changjie, ZHANG Shanglong. Status and prospect of research in peach tissue culture and genetic transformation[J]. Journal of Fruit Science,2002,19(2):123-127.
- [22] 赵亮明,王飞,韩明玉,卢艳. 苹果砧木组织培养与快繁技术研究[J]. 西北农业学报,2011,20(7):118-122.
- ZHAO Liangming, WANG Fei, HAN Mingyu, LU Yan. Studies on tissue culture and rapid propagation of apple stocks[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2011,20(7):118-122.
- [23] 林茜,高营营,覃换玲,黄天琨,赵宇,王钟霞,陈淑媛. ‘阳光玫瑰’葡萄组培脱毒快繁技术研究[J]. 果树学报,2021,38(3):435-443.
- LIN Qian, GAO Yingying, QIN Huanling, HUANG Tiankun, ZHAO Yu, WANG Zhongxia, CHEN Shuyuan. Study on rapid propagation technology of virus-free seedlings by tissue culture in ‘Shine Muscat’ grape[J]. Journal of Fruit Science,2021,38(3):435-443.