

## 柿属新种德阳柿组培快繁技术研究

王洋<sup>1,2,3</sup>, 邱晓<sup>1,2</sup>, 孙海莲<sup>1,2</sup>, 常虹<sup>1,2</sup>, 徐莉清<sup>3\*</sup>

(1. 内蒙古自治区农牧业科学院, 内蒙古呼和浩特 010031; 2. 中国科学院内蒙古草业研究中心, 内蒙古呼和浩特 010031; 3. 华中农业大学, 湖北武汉 430070)

**摘要** 为了使德阳柿能够通过组织培养的方式在短期内快速繁殖, 探究德阳柿培养基的最适培养条件。取一年生德阳柿枝条上的休眠芽茎段无菌处理后作为外植体, 选择不同的基本培养基, 对德阳柿组培快繁技术进行研究。结果表明, 以 MS 为基本培养基的德阳柿休眠芽组培苗萌发率达 81.13%, 以 MS(1/2N) 为基本培养基的德阳柿休眠芽萌发率为 78.05%; 德阳柿诱导休眠芽以 MS(1/2N) 为基本培养基的长势要优于以 MS 为基本培养基。由此可知, MS(1/2N) 培养基是德阳柿幼芽初代培养的最适培养基。该研究提供了德阳柿初代培养的最适培养基, 为其短期内大量繁殖提供了技术指导和理论支持。

**关键词** 德阳柿; 组培快繁; 初代培养; 继代培养; 无菌操作; 接种; 育苗

**中图分类号** S665.2 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2020)22-0051-05

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.22.015



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Persimmon from Deyang, a New Species of Persimmon

WANG Yang<sup>1,2,3</sup>, QIU Xiao<sup>1,2</sup>, SUN Hai-lian<sup>1,2</sup> et al (1. Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010031; 2. Inner Mongolia Prataculture Research Center, Chinese Academy of Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010031; 3. Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract** In order to make Deyang persimmon multiply rapidly in a short time by tissue culture, the optimum culture conditions of Deyang persimmon were studied. The stem segment of dormant buds on the branches of deyang persimmon was treated aseptically and used as explants. The germination rate of the dormant buds in Deyang persimmon using MS as the basic medium was 81.13%, while the germination rate of the dormant buds in Deyang persimmon using MS(1/2 n) as the basic medium was 78.05%. The growth rate of the dormant buds in Deyang persimmon with MS(1/2 n) as the basic medium was better than that with MS as the basic medium. Finally, it can be concluded that MS(1/2 n) medium was the optimal medium for the primary bud culture of deyang persimmon. This study provided the optimum medium for the primary culture of Deyang persimmon and provided technical guidance and theoretical support for its short-term mass reproduction.

**Key words** Deyang persimmon; Tissue culture and rapid propagation; Primary culture; Subculture; Aseptic operation; Vaccination; Seedling

德阳柿 (*Diospyros* sp. Deyangshi;  $2n = 4x = 60$ ), 又称红花草野毛柿, 为雌雄异株的落叶果树, 主要产自四川省德阳市, 是 2007 年国家柿种质资源圃从四川德阳采集的野生资源。且利用德阳柿的种子播种后长出的实生苗, 第二年就能开花<sup>[1]</sup>。因其具有早花等特性, 成为学术界关注的热点问题<sup>[2]</sup>。

张永芳<sup>[3]</sup>利用扫描电镜对其进行孢粉学观察和 SRAP 分子标记分析, 将其确定为柿属的一个新品种, 并证实为四倍体基因型。发现该品种柿属植物的早花特性在研究果树植物遗传转化方面具有巨大的应用潜力。但开展植物基因工程技术是德阳柿得以更广泛应用的前提, 其关键应用前提是建立德阳柿较好的再生体系<sup>[4]</sup>。转基因技术研究的前提是建立高效稳定的遗传转化受体系统。

关于柿的初代组织培养技术, 国内外已有学者进行了相关方面的研究<sup>[5]</sup>。研究发现甜柿上西早生叶片适合在低矿物质元素, 尤其是较低氮素含量的培养基中增殖与生长<sup>[6]</sup>。君迁子休眠芽初代培养中, DKW 培养基最适合其生长发育<sup>[7]</sup>。以磨盘柿 4 月中旬生长中的幼芽和 8 月下旬休眠芽为外植体研究发现, 高浓度 ZT 不利于柿的初代培养<sup>[8]</sup>。研究发现基本培养基 DKW 对磨盘柿的继代增殖效果最好<sup>[9]</sup>, 且在 ZT(1.0~2.0 mg/L) 和 IAA(0.1 mg/L) 的激素配比条件下, 磨盘柿继代苗的分化和长势最好<sup>[10]</sup>。研究表明柿组培

苗根尖的有无与不定芽的再生效果无关, 而根段长度与不定芽再生效率呈极显著正相关<sup>[11]</sup>。

德阳柿是一个四倍体柿属新种<sup>[12]</sup>, 具有早花特性, 是柿基因工程研究的理想材料<sup>[13]</sup>。但目前国内外尚未见关于德阳柿高效、稳定的植株再生体系的研究, 在一定程度上限制了对德阳柿使用基因工程技术研究<sup>[14]</sup>。因柿组织培养方法品种间差异较大, 且含酚类物质较多, 建立完整的组培快繁体系较困难<sup>[15]</sup>, 不同品种之间最适培养基的成分配比不完全相同, 该试验设计原理将参照现有的柿属植物组织培养研究成果, 进一步探究德阳柿这一特定品种的培养基成分最佳配比。笔者以德阳柿休眠芽为外植体, 比较组培过程中的各种因素, 筛选出最适的生长发育与再生培养条件, 建立德阳柿组织培养体系, 为后续遗传转化研究提供试验材料, 为德阳柿基因转化奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 供试材料为德阳柿 (*Diospyros* sp. Deyangshi), 为华中农业大学柿基因库 2015 年长势良好的成年树。

### 1.2 3 种不同培养基的筛选

**1.2.1 外植体接种前处理。** 取一年生德阳柿枝条上的休眠芽, 剥去芽外侧的 2~3 个鳞片, 用清水淋洗 45 min, 去除表面灰尘和细菌, 再将生长状况良好的芽用刀片切下, 用 75% 乙醇表面消毒 30 s, 再用 2% 的次氯酸钠浸泡消毒 4 min, 在浸泡过程中要不断摇动, 最后用无菌水冲洗 5 次, 每次 5 min。

**1.2.2 不同基本培养基配制。** 基本培养基有 3 种: MS(1/2N) 培养基、MS 培养基、DKW 培养基。所有的基本培养

基中均含有蔗糖 30.0 mg/L, 琼脂 6.0 mg/L, PVP - K40 0.6 mg/L, ZT 0.5 mg/L, IAA 0.01 mg/L, pH 为 5.8。基本培养基配制好后, 于 121 °C 高温灭菌 15 min, 然后置于超净工作台冷却至 55 °C 左右, 摇匀后分装至培养瓶中。

**1.2.3 接种。**将休眠芽用 75% 乙醇进行表面灭菌 30 s, 再用 2% 的 NaClO 浸泡 10~15 min。将清洗后的休眠芽剥去外鳞片, 留茎尖约 1.5 mm, 保留 2~3 片叶原, 接种到相应的初代培养基上, 每个组合接种 20 个, 重复 3 次, 置于 25 °C、3 000 lx 光强、16 h/d 光照的人工培养室培养。

**1.3 初代培养最适氮含量的探究** 根据上述试验可得, MS 培养基和 (1/2N) MS 培养基对于德阳柿休眠芽的初代培养

较为适宜, 且成活率相差不大, 但氮元素的含量对于植株的形态构成有一定的影响。氮元素是构成蛋白质的主要成分, 通过影响基因的转录和表达改变植株的形态, 氮元素缺乏时, 植株矮小, 叶片黄化, 成熟后果实品质差, 坐果率低, 严重影响果实的产量, 而氮元素过多时, 植株徒长, 抗逆性差, 后期果实含糖量较低, 发育缓慢。因此, 植株培育初期要严格控制培养基中的氮元素含量, 并以此为依据进行德阳柿休眠芽初代培养最适氮含量的探究(表 1)。根据前述试验可得, 最适氮元素含量在 MS 培养基氮元素含量与 (1/2N) MS 培养基氮元素含量之间。

表 1 MS 培养基母液配制成分

Table 1 Composition of mother liquor in MS medium

母液 Mother liquor	成分 Composition	规定量 Specified amount mL	浓缩倍数 Enrichment ratio 倍	称取量 Weighing quantity mg	母液体积 Mother liquid volume mL	配制 1 L 培养基吸取量 Absorbed quantity mL
大量元素 Macroelement	KNO <sub>3</sub>	1 900	10	19 000	1 000	100
	NH <sub>4</sub> NOD3	1 650	10	16 500		
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	10	3 700		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	10	1 700		
微量元素 Trace element	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	10	4 400		100
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3	100	2 230		
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	100	860		
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	100	620		
	KI	0.83	100	830		10
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.25	100	25		
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025	100	2.5		
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025	100	2.5		
铁盐 Iron salt	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	100	3 730		10
	FeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	27.8	100	2 780		
有机成分 Organic ingredient	甘氨酸	2.0	100	100	500	10
	盐酸吡哆醇	0.5	100	25		
	盐酸硫胺素	0.1	100	5		
	烟酸	0.5	100	25		
	肌醇	100	100	5 000		

注: MS(1/2N)培养基是 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 成分减半, 其他成分不变

Note: MS(1/2N) medium is half of KNO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> components, other components remain unchanged

根据 MS 培养基配方可以看出, MS 培养基与 (1/2N) MS 培养基中氮元素的差别在于 (1/2N) MS 培养基中 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的成分是否减半, 因此, 将通过设计 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的浓度梯度来探究德阳柿休眠芽初代培养基中最适氮元素的含量(表 2)。

#### 1.4 叶片愈伤组织培养最适激素含量的探究

**1.4.1 外植体接种前处理。**采摘德阳柿当年新梢, 留顶端 3~4 片叶片, 取下面所有叶片, 用流水冲洗 30~60 min, 然后放入已经灭菌好的锥形瓶中, 用 75% 乙醇进行表面灭菌 30 s, 再用 2% NaClO 浸泡 3~4 min, 浸泡过程要不断摇动, 最后用无菌水冲洗 4~5 次。在无菌条件下, 留顶端 3~4 片叶片, 取下面所有叶片, 将叶片横切成 4 mm×4 mm 大小, 接种到配制好的 10 种培养基上, 培养基以 MS(1/2N) 为基本培养基, 添加的激素浓度按表 3 设计。每个处理接种 50 片, 先暗处理 20 d, 统计叶片愈伤组织形成率(利用伦理数值), 将诱导出的愈伤

表 2 氮元素组合设计

Table 2 Combination design of nitrogen elements

组合 Combination	KNO <sub>3</sub> 称取量 Weighing quantity of KNO <sub>3</sub> //g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 称取量 Weighing quantity of NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> //g
1	19.00	16.500
2	18.05	15.675
3	17.10	14.850
4	16.15	14.025
5	15.20	13.200
6	14.25	12.375
7	13.30	11.550
8	12.35	10.725
9	11.40	9.900
10	10.45	9.075

组织接种到 MS(1/2N)+PVP 0.6 mg/L+ZT 1 mg/L+IAA 0.1 mg/L 培养基中, 转至正常光照下培养。30 d 后分别统计

分化率、平均不定芽数。

叶片接种培养基: MS (1/2N) + PVP 0.6 mg/L + IAA 0.1 mg/L + 蔗糖 20 g/L + 琼脂 7.5 g/L, pH=5.8。

**1.4.2 不同激素含量的配制。** 试验设计见表 3, 柿属植物叶片愈伤组织诱导的最适 TDZ 浓度为 0.01~0.10 mg/L, 最适 NAA 浓度为 0~0.2 mg/L<sup>[7]</sup>, 因此, 以华中农业大学柿属植物资源库树龄 2 年的德阳柿春季叶片为外植体, 以 (1/2N) MS 培养基为基本培养基, 每组激素组合接种叶片切块 50 片, 探究德阳柿叶片愈伤组织培养的最适 TDZ 和 NAA 浓度。外植体叶片在培养基中培养 10 d 后开始生长, 20 d 后出现嫩绿色的愈伤组织。

**1.5 数据分析** 试验数据均采用 SPSS 20.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

**2.1 3 种不同培养基的筛选** 德阳柿休眠芽的无菌茎段接入初代培养基 15 d 后开始萌发, 30 d 左右, 休眠芽发育为 2~3 cm (30 d 为一个观察周期)。MS 培养基的萌发率为 81.13%, 长势状况一般, 休眠芽在培养基中萌发速度较快, 叶片较 MS(1/2N) 培养基黄化严重、稀疏, 叶片偏黄且卷曲严重, 植株细弱; MS(1/2N) 培养基的萌发率为 78.05%, 长势状

况良好, 休眠芽在培养基中萌发快, 叶展开幅度大, 且浓绿茂盛(图 1), 由此可知, 在休眠芽生长过程中, 氮含量显著影响叶片和植株的发育状况和萌发率; DKW 培养基的萌发率为 52.94%, 长势状况一般, 休眠芽 15 d 时叶片和茎段发育较为缓慢, 株高在 0.5~1.0 cm, 叶片较少且卷曲严重, 茎秆细弱, 植株多为芽体变大, 未展叶(表 4)。

表 3 不同激素配比组合设计

Table 3 Combination design of different hormone ratios

组合 Combination	TDZ mg/L	NAA mg/L
1	0.01	0
2	0.02	0.1
3	0.03	0.2
4	0.04	0
5	0.05	0.1
6	0.06	0.2
7	0.07	0
8	0.08	0.1
9	0.09	0.2
10	0.10	0

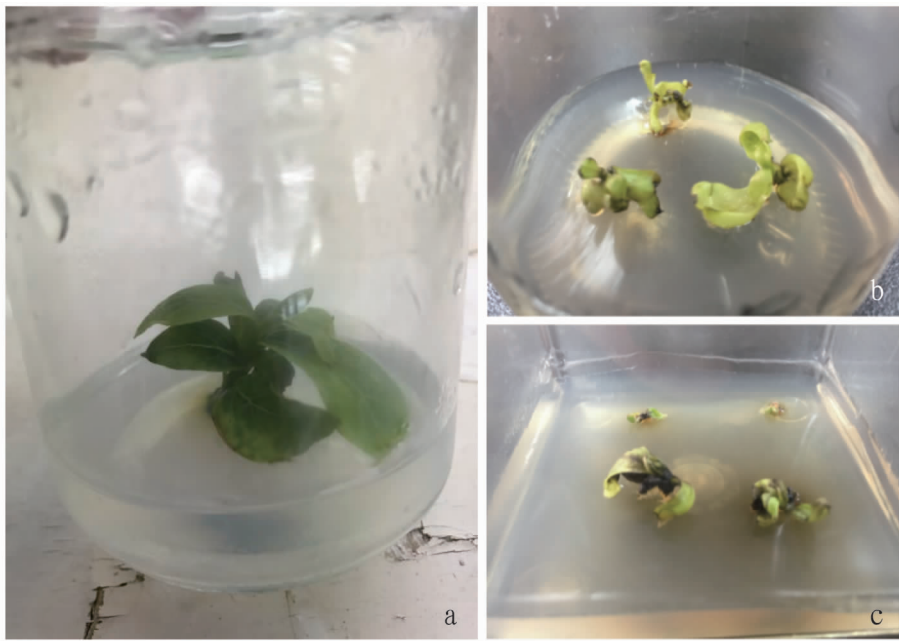


图 1 初代培养 MS(1/2N) 植株(a)、MS 培养基植株(b)和 DKW 培养基植株(c)

Fig.1 Initial culture MS(1/2N) plants (a), MS medium plants (b) and DKW medium plants (c)

表 4 初代培养结果

Table 4 Results of primary culture

培养基类型 Medium type	接种数量 Inoculation quantity//个	萌发数量 Germination number//个	萌发率 Germination rate//%	长势状况 Growth condition
MS	63	53	81.13	良
MS(1/2N)	50	41	78.05	优
DKW	75	51	52.94	差

对比 MS 培养基、MS(1/2N) 培养基和 DKW 培养基对德阳柿幼芽初代培养的影响, 虽然在 MS 培养基中接种的幼芽成活率最高, 但对比实生苗的长势情况来看, MS(1/2N) 培养

基中的实生苗长势最佳, 且 MS(1/2N) 培养基中实生苗的成活率与 MS 培养基中的成活率差异不显著, 因此, MS(1/2N) 培养基是德阳柿幼芽初代培养的最适培养基。

**2.2 初代培养最适氮含量** 由表 5 可知, 不同浓度的氮元素中最适宜德阳柿休眠芽初代培养的是第 3 组, 而其中长势最佳的是第 7 组, 且叶片展叶幅度大, 叶片较绿, 长势良好。综合比较第 3 组和第 7 组的试验结果, 2 组萌发率相差 3.75%, 差异不显著, 50 株幼苗的鲜重相差 58.56%, 差异极显著。氮元素浓度对德阳柿休眠芽初代培养的幼苗萌发率影响不大, 但对幼苗萌发之后的叶长势影响较为明显, 随着氮元素浓度

的增加,每50株幼苗的鲜重呈增加趋势,说明氮元素有利于幼苗的发育。由此可知,第7组培养基氮元素量的配比是德阳柿休眠芽初代培养的最适宜浓度(图2)。

**2.3 叶片愈伤组织培养最适激素含量** 从表6可以看出,在仅添加TDZ的培养基中,20d后,叶片愈伤组织形成率在80%左右,在同时添加TDZ和NAA的培养基中,叶片愈伤组织形成率大于95%,但组织疏松多孔,呈海绵状。培养30d左右,愈伤组织中开始萌发出不定芽,在不含NAA的培养基中,不定芽的萌发率较高,随着NAA浓度的增加,在浓度为0.2 mg/L的培养基中,愈伤组织分化出不定芽的概率降低,且茎段短小,生长质量较差,说明NAA浓度的增加能促进德阳柿叶片愈伤组织的诱导率,但不利于愈伤组织进一步分化出不定芽(图3)。



图2 氮元素初代培养第7组植株(a)、第3组植株(b)和第4组植株(c)

Fig.2 Plants from group 7(a), group 3(b) and group 4(c) in primary culture of nitrogen

表6 激素对比对叶片愈伤组织及芽分化的影响

Table 6 Effects of hormone ratio on callus and bud differentiation of leaves %

组合 Combination	愈伤组织率 Callus rate	分化率 Differentiation rate
1	84	74
2	100	52
3	96	26
4	92	76
5	100	48
6	98	22
7	82	68
8	100	42
9	100	24
10	78	58

### 3 讨论

在四川省德阳市发现了一种新的柿子品种,称德阳柿,其具有早花的特性<sup>[16]</sup>,可以极大程度上缩短培育周期,为柿属新种提供更加优质的野生资源<sup>[17]</sup>,该试验探究德阳柿组织培养中初代培养、继代培养和叶片培养的最适培养基的原料和激素组合<sup>[6]</sup>,提高其幼芽的成活率和生长速度。

在进行培养基的选择时,需根据特定植物的不同生理学性状选择适宜其生长发育的培养基,在选择时,需要综合考虑培养基的营养物质、激素种类和成分配比,据此,通过查阅文献和相关资料<sup>[18]</sup>,结果表明,MS培养基、MS(1/2N)培养基和DKW培养基更加适合柿属植物休眠芽的生长,因此,该

表5 不同氮元素对幼苗成活状况的影响

Table 5 Effects of different nitrogen elements on seedling survival

组合 Combination	接种数 Inoculation number//株	萌发数 Germination number//株	萌发率 Germination rate//%	50株幼苗鲜重 Seedling fresh weight//g
1	80	66	82.50	2.72
2	80	65	81.25	2.77
3	80	69	86.25	2.92
4	80	62	77.50	2.33
5	80	60	75.00	2.86
6	80	63	78.75	3.15
7	80	66	82.50	4.63
8	80	57	71.25	3.76
9	80	59	73.75	3.28
10	80	61	76.25	4.26

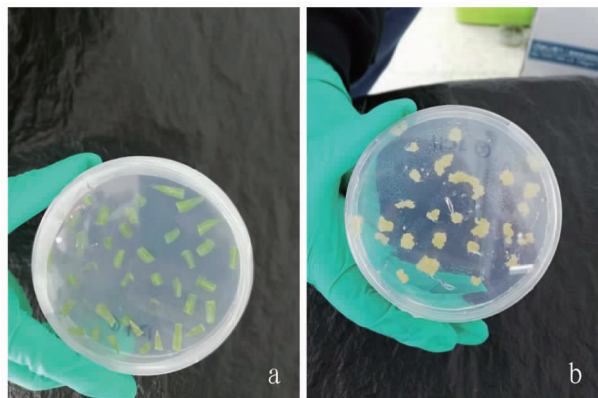


图3 叶片接种(a)和愈伤组织形成(b)

Fig.3 Leaf inoculation(a) and callus formation(b)

试验即筛选这3种不同成分的培养基为德阳柿休眠芽初代培养的最佳培育环境<sup>[19]</sup>。该研究发现,休眠芽诱导过程中MS(1/2N)培养基培养效果优于MS培养基和DKW培养基。初代培养中以MS(1/2N)为基本培养基休眠芽萌发率为78.05%,且植株生长状态最佳。与马俊莲等<sup>[20]</sup>的研究结果一致,主要原因可能是德阳柿休眠芽生长对氮元素的耐受限度与MS(1/2N)培养基中氮元素含量较吻合<sup>[21]</sup>,而氮元素在植株生长阶段影响植株的形态建成、蛋白质的产生和叶绿素的形成。这与张永芳等<sup>[22]</sup>的研究结果一致。

以德阳柿休眠芽为外植体,研究3种培养基种类,即MS、MS(1/2N)、DKW培养基(PVP 0.6 g/L+蔗糖 20 g/L+ZT 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L,琼脂 7.5 g/L,pH为5.8)对休眠芽



初代培养的影响。休眠芽在培养基中培养30 d后发现,MS培养基的萌发率是81.13%,休眠芽在培养基中萌发快,叶展开幅度大,但叶片偏黄;MS(1/2N)培养基的萌发率是78.05%,休眠芽在培养基中萌发快,长势较好,叶片较绿;DKW培养基的萌发率是52.94%,休眠芽生长慢,多为芽体变大,未展叶。由此可知,3种基础培养基中,MS(1/2N)培养基是德阳柿休眠芽初代培养的最适培养基。

以德阳柿休眠芽为外植体,探究不同氮元素浓度对其生长发育的影响,筛选出最适氮元素浓度的培养基。根据试验结果可知,氮元素浓度的增加对休眠芽的发育影响不大,在氮元素呈梯度变化的过程中,德阳柿休眠芽的萌发率稳定在70%~90%。但氮元素对德阳柿休眠芽的形态建成影响较大,共分为2个阶段,第一阶段随着氮元素含量呈梯度减少,休眠芽萌发后每50株幼苗的鲜重呈增加趋势,第7组培养条件下50株休眠芽鲜重最大,第二阶段随着氮元素浓度的减少,鲜重也减少,说明在一定程度上氮元素含量的减少有利于休眠芽的生长,但继续降低,则氮元素的含量将成为休眠芽生长的限制因素。第一阶段氮元素含量过多,过多的氮元素与植物细胞中的碳水化合物结合形成蛋白质,造成用于构建细胞壁的碳水化合物缺失,植物细胞壁薄,组织柔软,叶片脆而薄,易卷曲。第二阶段氮元素含量则为休眠芽生长的限制因素,氮元素是核酸、蛋白质和磷脂的组成成分,影响原生质、细胞核和生物膜的形成,缺氮时,蛋白质、核酸和磷脂的合成受阻,植株矮小,叶片小而薄,分枝、分蘖很少,因氮元素同时还影响叶绿素的合成,所以在缺氮条件下,叶片早衰发黄甚至干枯,且症状从下部叶片逐渐向上显现。

以德阳柿叶片为外植体,(1/2N)MS培养基为基本培养基,探究TDZ和NAA对叶片愈伤组织形成和不定芽分化产生的影响,从而探究培养基的最适激素浓度。由此可知,TDZ对叶片愈伤组织的形成影响不大,但1、4、7、10这4组数据显示,随着TDZ浓度的增加,不定芽的形成率下降。NAA对愈伤组织的形成率影响较大,NAA含量的增加有利于其形成,但组织疏松多孔,呈海绵状。随着NAA浓度的增加,愈伤组织分化为不定芽的概率降低,在不含NAA的4组中,不定芽的分化率较高,说明NAA浓度的增加能促进德阳柿叶片愈伤组织诱导率,但不利于愈伤组织进一步分化出不定芽。TDZ是一种新型的植物生长调节剂,具有细胞分裂素的活性,能有效地促进植物愈伤组织的发育,延缓植株衰老。NAA为类生长素物质,具有高度的植物细胞生长素活性,因此在叶片愈伤组织和不定芽的培育过程中,更有利于植物细胞的生长,不利于细胞分化。

该研究采用高温灭菌法处理德阳柿休眠芽和叶片,从而获得大量试验所需的无菌外植体,为组织培养的研究提供良

好材料<sup>[23]</sup>。同时开展德阳柿休眠芽组培快繁技术研究,为德阳柿组培快繁初代培养寻找合适的基本培养基配比和植物生长调节剂用量,提高了德阳柿初代培养过程中的植株成活率,改善了植株的生长状况,为德阳柿的大规模批量生产和工厂化育苗提供了技术支撑。

## 参考文献

- [1] 李宁宁.‘南通小方柿’组培快繁及叶片再生体系的建立[D].南京:南京农业大学,2014.
- [2] 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.
- [3] 张永芳.四川特异性资源德阳柿的观测与鉴定[D].杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [4] ABOUZID S.Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture;Silymarin from *Silybum marianum* tissue culture[J].Natural product research,2014,28(23):2102-2110.
- [5] DIAS M I,SOUSA M J,ALVES R C,et al.Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review[J].Industrial crops & products,2016,82:9-22.
- [6] SUGIYAMA M.Historical review of research on plant cell dedifferentiation[J].Journal of plant research,2015,128(3):349-359.
- [7] 李畅,傅建敏,王森,等.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):160-164.
- [8] 艾鹏飞,罗正荣.柿和君迁子试管苗茎尖玻璃化超低温保存及再生植株遗传稳定性研究[J].中国农业科学,2004,37(12):2023-2027.
- [9] WITTE C P,TILLER S A,TAYLOR M A,et al.Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress[J].Plant cell, tissue & organ culture,2002,68(1):103-104.
- [10] 张鸿龄.柿属植物资源及其利用[J].植物杂志,1994(4):19.
- [11] 胡彦,赵艳.植物组织培养技术的应用以及在培养过程中存在的问题[J].陕西师范大学学报(自然科学版),2004,32(S1):130-134.
- [12] THORPE T A.History of plant tissue culture[M]//LOYOLA-VARGAS V M,VÁZQUEZ-FLOTA F.Plant cell culture protocols.Totowa,NJ:Humana Press,2006:9-32.
- [13] MEDJEMEM N,HARABI A,BOUZERARA F,et al.Elaboration and characterization of low cost ceramics microfiltration membranes applied to the sterilization of plant tissue culture media[J].Journal of the Taiwan institute of chemical engineers,2016,59:79-85.
- [14] 李素红,宫庆涛,蒋恩顺,等.组织培养在果树中的应用[J].山西农业科学,2013,41(11):1270-1273.
- [15] 蔡剑华.我国柿树资源及开发利用前景[J].经济林研究,1992(S1):100-103.
- [16] 罗正荣.国内外柿产业现状与发展趋势[J].落叶果树,2018,50(5):1-4.
- [17] WANG J,LI J L,LI J,et al.Production of active compounds in medicinal plants:From plant tissue culture to biosynthesis[J].Chinese herbal medicines,2017,9(2):115-125.
- [18] 王栋,买合木提·克衣木,王永雄,等.植物组织培养中的褐化现象及其防止措施[J].黑龙江农业科学,2008(1):7-10.
- [19] 徐莉清.部分中国原产柿属雄性种质的生物学特性及其新种质创制的研究[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [20] 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.
- [21] DEB C R,IMCHEN T.An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants[J].Biotechnology,2010,9(1):79-83.
- [22] 张永芳,胡超琼,杨勇,等.柿属8种植物花粉形态观察[J].园艺学报,2016,43(6):1167-1174.
- [23] KUMAR P P,LOH C S.Plant tissue culture for biotechnology[M]//ALTMAN A,HASEGAWA P M.Plant biotechnology and agriculture.San Diego,CA:Academic Press,2012:131-138.