

阳丰甜柿组织培养再生体系的建立

李 畅<sup>1</sup>,傅建敏<sup>2\*</sup>,王 森<sup>1</sup>,文亚峰<sup>1</sup>,晏 巢<sup>3</sup>,孙 鹏<sup>2</sup>,刁松峰<sup>2</sup>,韩卫娟<sup>2</sup>

(1.中南林业科技大学 林学院,湖南 长沙 410004;2.国家林业局 泡桐研究开发中心,河南 郑州 450003;  
3.中国林科院 亚热带林业实验中心,江西 分宜 336600)

**摘 要:**以阳丰甜柿(*Diospyros kaki* cv. Youhou)的带腋芽茎段为外植体,研究了植物生长调节剂及其浓度配比对其腋芽的诱导、增殖及生根的影响。结果表明,带芽茎段接种在 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>ZT+0.1 mg·L<sup>-1</sup>IAA 培养基培养 4 周后,腋芽诱导率为 77.8%。将萌发的腋芽切成带芽茎段或单株转到 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>ZT+2.0 mg·L<sup>-1</sup>2ip+0.1 mg·L<sup>-1</sup>IAA 培养基继代培养,最高增殖系数可达 4.1。在增殖培养中长至 3 cm 以上的芽转入 1/2MS+0.75 mg·L<sup>-1</sup>IBA 的生根培养基中暗培养 7 d 后,转入光下培养 30 d,生根率可达 73.3%,平均生根数为 3.6。该研究建立了阳丰甜柿离体再生体系,为其规模化生产提供了技术平台。

**关键词:**阳丰甜柿;组织培养;腋芽诱导;再生体系

**中图分类号:**S723.1      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)03-0159-06

Establishment of Tissue Culture Regeneration System of *Diospyros kaki* cv. Youhou

LI Chang<sup>1</sup>,FU Jian-min<sup>2\*</sup>,WANG Sen<sup>1</sup>,WEN Ya-feng<sup>1</sup>,YAN Chao<sup>3</sup>,SUN Peng<sup>2</sup>,  
DIAO Song-feng<sup>2</sup>,HAN Wei-juan<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China;  
2. Paulownia Research & Development Center, State Forestry Administration, Zhengzhou, Henan 450003, China;  
3. The Experimental Centre of Subtropical Forestry, Fenyi, Jiangxi 336600, China)

**Abstract:** Taking the stem segments with auxiliary buds of *Diospyros kaki* cv. Youhou as explants, influences of plant regulators and their concentrations on the induction, proliferation and rooting were examined. The induction rate of auxiliary bud was 77.8% after the explants were cultured 4 weeks in the medium of 1/2MS+1.0Mg·L<sup>-1</sup> Zeatin+0.1 mg·L<sup>-1</sup>IAA. The regenerated buds were then subcultured in the medium of 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>ZT+2.0 mg·L<sup>-1</sup>2ip+0.1 mg·L<sup>-1</sup>IAA, the highest proliferation coefficient was 4.1. The shoots with 3 cm in length were transferred into the medium 1/2 MS+0.75 mg·L<sup>-1</sup>IBA, and cultured for 7 d in dark and 30 d in light, the rooting rate was 73.3%, and the average number of root was 3.6. This results established the *in vitro* propagation system for *Diospyros kaki*, and provided the technical basis for scale production.

**Key words:** *Diospyros kaki* cv. Youhou; tissue culture; axillary bud induction; regeneration system

柿(*Diospyros kaki*)属于柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros*)植物,原产于中国<sup>[1]</sup>,迄今为止有 2 000 a 多栽培历史<sup>[2]</sup>,是我国重要的六大木本粮食树种之一。柿种质资源丰富,现今全世界约有柿品

种 1 000 余种<sup>[3]</sup>。柿分类方法很多,其中根据种子的有无、果实脱涩难易程度以及果肉褐斑深浅,日本学者将柿品种分为 4 类:完全甜柿(PCNA, pollination-constant and non-astringent)、不完全甜柿

收稿日期:2015-11-08 修回日期:2015-12-28

基金项目:国家“十二五”农村领域科技计划课题(2013BAD14D0502)。

作者简介:李 畅,女,在读硕士,研究方向:经济林栽培与育种。E-mail:846770189@qq.com

\* 通信作者:傅建敏,女,副研究员,研究方向:经济林栽培与育种。E-mail:fjm371@163.com

(PVNA, pollination-variant and non-astringent)、不完全涩柿(PVA, pollination-variant and astringent)、完全涩柿(PCA, pollination-constant and astringent)<sup>[4]</sup>。我国柿品种资源大部分为涩柿,其鲜果需脱涩才能食用,而甜柿能在树体上自然脱涩。阳丰甜柿(*Diospyros kaki* cv. Youhou)是我国引自日本的完全甜柿品种,引种适应性良好、抗性强、丰产性强,果实具有果大、肉质硬脆、风味佳等特点<sup>[5]</sup>,深受广大消费者的喜爱。

目前,阳丰甜柿多以君迁子(*Diospyros lotus*)为砧木进行嫁接繁育。但传统的嫁接方法培育时间较长,占地面积大,成本高。组织培养既可实现植物的离体快速繁殖<sup>[6]</sup>,又能保持其优良性状<sup>[7]</sup>,因此,利用植物组织培养实现阳丰甜柿的规模化生产有着重要意义。早在20世纪末就有相关柿离体再生的研究报道<sup>[8-9]</sup>。近年来,刘月英<sup>[10]</sup>等以磨盘柿(*Diospyros kaki* cv. Mopan)叶片外植体,成功的诱导出不定芽,分化率达76.76%。谢启鑫<sup>[11]</sup>等利用油柿(*Diospyros oleifera*)的下胚轴为外植体,建立了再生体系。刘恺<sup>[12]</sup>利用甜柿‘富有’(*Diospyros kaki* cv. Fuyu)和‘次郎’(*Diospyros kaki* cv. Jiro)的组培苗叶片为外植体,成功的诱导出不定芽并诱导生根。但有关阳丰甜柿的离体再生鲜有报道,本试验以阳丰甜柿的带芽茎段为外植体,通过对其腋芽的诱导、增殖和生根,拟建立离体再生体系,为阳丰甜柿以后的工厂化育苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料阳丰采自中国林业科学研究院经济林研究开发中心原阳试验基地柿属资源圃。于2014年和2015年5月21日,晴天,剪下当年生半木质化且腋芽饱满的阳丰甜柿茎段,喷水后带回实验室备用。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的处理 将采集的穗条去掉叶片,用洗洁精浸泡10 min,然后去表面灰尘和杂物等,再用自来水冲洗1.5 h后,用刀片切成4~5 cm长的带芽茎段,置于灭菌好的广口瓶中。在超净工作台上用75%乙醇浸泡消毒处理30 s,无菌水冲洗4~5次,然后用含有0.1%氯化汞处理8 min进行表面灭菌,浸泡过程中不时摇动,最后用无菌水冲洗5次,用无菌滤纸吸干茎段表面水分,用无菌刀片将其切成带单芽茎段,接种至初代培养基中进行腋芽萌发诱导<sup>[13-14]</sup>。

1.2.2 初代培养 采用双因素试验,共9组植物生

长调节剂及其浓度,筛选适宜诱导阳丰甜柿腋芽的IAA(indole-3-acetic acid)和ZT(Zeatin)浓度(表1)。接种35 d后,统计腋芽诱导情况,观察芽的长势,以确定适宜诱导腋芽萌发的培养基。每处理接种15瓶,每瓶接种2~3个外植体,重复3次。

腋芽诱导率=(萌芽的腋芽数/接种的外植体总数)×100% (1)

1.2.3 继代增殖培养 ZT是柿组织培养时常用的植物生长调节剂<sup>[15]</sup>,对促进细胞分裂和芽的诱导具有重要作用。将初代培养诱导的腋芽切下接种在添加不同质量浓度的ZT、IAA、2ip的1/2MS(Murshige and Skoog)培养基中,13组处理(表2),进行继代增殖培养,30 d后记录增殖情况、有效芽粗壮度、有效芽高度和总体生长情况,以筛选适宜继代增殖和壮苗培养基配方。每种激素浓度组合接种15瓶,每瓶接种2~4个外植体,重复3次。

增殖系数=增殖后的芽苗数/接种的外植体总数 (2)

有效芽粗壮度用数字0~5.0表示,其中1.0、2.0、3.0、4.0与5.0分别表示每种处理中粗壮植株(直径>1.5 mm)占整体植株比例的20%、40%、60%、80%与100%;有效芽高度指植株基部到植株茎尖的距离。

1.2.4 生根培养 切取生长健壮且长势一致、苗高3.0~4.0 cm的无根苗接种在2组含一定浓度IBA(indole-3-butyric acid)的1/2 MS(1/2N;NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>与KNO<sub>3</sub>含量减半)培养基中,一组于正常光照下培养,另一组先暗培养7 d,然后转移至光下进行生根诱导(表3)。培养35 d后,统计单苗生根数和生根率,并记录试管苗的生长情况。生根培养基共设置10个处理,每处理30瓶,每瓶接种1个单株,重复3次。

生根率=(生根的组培苗数/接种的组培苗数)×100% (3)

1.2.5 炼苗移栽 生根培养35 d后,将生长状态良好、根系发达且株高3 cm以上的试管苗进行炼苗,7 d后将其从培养瓶中取出,洗净根部的琼脂,移栽至经消毒的混合基质(草炭土、蛭石、珍珠岩按体积比2:1:1)中,覆盖塑料薄膜保温保湿,湿度60%~70%,20~30℃的大棚中培养。30 d后统计成活情况。

1.2.6 培养基灭菌及培养条件 腋芽诱导及继代增殖的培养基中均添加30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,6 g·L<sup>-1</sup>琼脂和0.5 g·L<sup>-1</sup> PVP(polyvinyl pyrrolidone),生根培养基中添加15 g·L<sup>-1</sup>蔗糖、6 g·L<sup>-1</sup>琼脂和0.5 g·L<sup>-1</sup> PVP。高压灭菌前调整pH至5.8,保持121℃高温灭菌20 min。培养室温度(25±1)

℃,光照强度 2 500~3 000 lx,每天光照 14 h。

1.2.7 数据分析 数据采用 Excel 2007, Spss 20.0 统计分析软件进行处理和方差分析,用 Duncan's法进行多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物生长调节剂对阳丰甜柿初代腋芽诱导的影响

将阳丰甜柿的带腋芽茎段接种至添加不同植物激素的培养基中(图 1A),10 d 左右腋芽与木质部连接处的形成层细胞开始分裂,组织不断膨大,形成大量白色与浅绿色的愈伤组织(图 1B);15 d 左右腋芽始萌发(图 1C);之后愈伤组织开始慢慢变黑,新

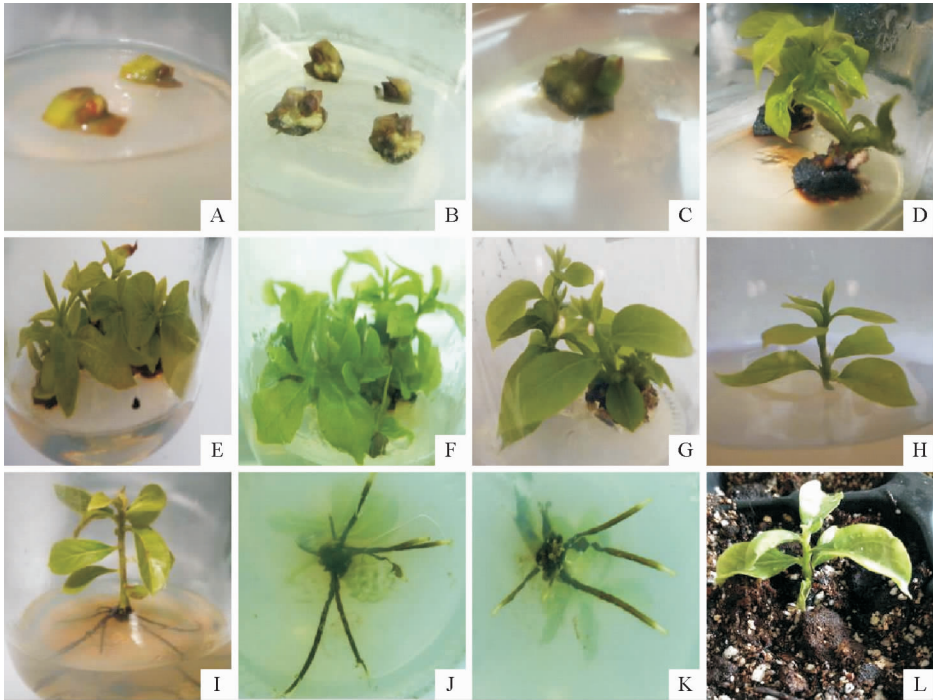
芽继续迅速生长,25 d 后新芽高度可达 2.5 cm (图 1D)。不同植物生长调节剂浓度对比对阳丰甜柿茎间初代培养影响显著(表 1),其腋芽的诱导率最高达 77.8%,最低仅 31.3%,且其长势也相差甚大。当 IAA 浓度为 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 时,1.0 mg · L<sup>-1</sup> ZT 芽诱导率最高,为 77.8%,且长势较好;当 ZT 浓度增加时,其诱导率稍有下降,同时平均芽高呈下降趋势,但能发现主芽旁 2 个隐芽同时开始萌动。不同浓度的 IAA 也影响腋芽的诱导,浓度过高或者过低,都不适宜腋芽的诱导,就生长情况而言,IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 最适宜。因此,适合阳丰甜柿茎段腋芽萌发的最佳培养基为:1/2MS+1.0 mg · L<sup>-1</sup> ZT +0.1 mg · L<sup>-1</sup> IAA。

表 1 不同植物生长调节剂对阳丰甜柿茎段初代培养的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulators on primary culture from stem of *D. kaki* cv. Youhou

处理号	植物生长调节剂/(mg · L <sup>-1</sup> )		诱导率/%	平均芽数/%	生长情况
	IAA	ZT			
A1	0.05	0.5	46.6±0.13bc	1.33±0.15b	长势较弱,植株矮小,叶片发黄
A2	0.05	1.0	53.3±0.13b	1.24±0.17b	长势一般,叶嫩绿,芽基部愈伤组织较黑
A3	0.05	3.0	48.9±0.08bc	1.37±0.12ab	长势较弱,叶嫩绿,生长缓慢
A4	0.10	0.5	66.2±0.08ab	1.23±0.12b	长势较好,叶嫩绿、微卷,芽较健壮
A5	0.10	1.0	77.8±0.10a	1.50±0.02ab	长势好,芽健壮、主芽两侧有不定芽冒出,片较大
A6	0.10	3.0	60.0±0.07b	1.87±0.23ab	长势较好,芽节间短,叶片较小
A7	0.50	0.5	35.6±0.10bc	1.47±0.50ab	长势一般,叶片较绿,后期生长缓慢
A8	0.50	1.0	44.4±0.07c	1.52±0.42ab	叶片较大,芽短小,芽基部愈伤组织较大
A9	0.50	3.0	31.3±0.10c	1.97±0.90a	长势差,叶片小,芽短小

注:同列不同字母表示  $p=0.05$  水平差异显著;下同。



注:A.外植体;B.茎段形成层愈伤组织形成;C、D.茎段腋芽萌发;E、F、G.继代培养;H、I、J、K.生根培养;L.试管苗的移栽。

图 1 阳丰甜柿组织培养再生体系的建立

Fig. 1 Establishment of tissue culture regeneration system of *D. kaki* cv. Youhou

2.2 不同植物生长调节剂对阳丰甜柿增殖的影响

当 IAA 浓度一定时,随着添加 ZT 浓度的增加,阳丰甜柿的增殖系数增加,当 ZT 质量浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup>时,其增殖系数为 2.97,质量浓度超过 2.0 mg · L<sup>-1</sup>时,有效芽数反而减少;单独加入 2ip,其增殖效果不佳,芽苗长势弱;而当同时加入一定浓

度 ZT 和 2ip 之后,其增殖系数明显增加,其中最大增殖系数达 4.1,且苗生长健壮(图 1E、F、G);随着继代次数的增加,其增殖系数有所提高(表 2)。适宜阳丰甜柿芽的继代增殖的培养基配方为 1/2MS +0.1 mg · L<sup>-1</sup>IAA+1.0 mg · L<sup>-1</sup>ZT+1.0 mg · L<sup>-1</sup>2ip。

表 2 不同植物生长调节剂对阳丰甜柿继代增殖培养的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulators on secondary proliferation culture of *D. kaki* cv. Youhou

处理号	植物生长调节剂浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> )			增殖系数	有效芽粗壮度 *	有效芽高度/cm	芽的生长情况
	IAA	ZT	2ip				
B1	0.1	1.0	—	2.82±0.23bc	4.0±0.20bcd	2.8±0.26abc	长势较好,植株较粗壮,叶片嫩绿
B2	0.1	1.5	—	2.88±0.33bc	3.8±0.09dc	1.5±0.26ef	长势一般,植株较粗壮,叶片正常
B3	0.1	2.0	—	2.97±0.33b	4.5±0.30ab	3.1±0.55ab	长势较好,植株粗壮,叶片深绿
B4	0.1	2.5	—	2.48±0.15bc	3.9±0.20dc	2.3±0.26cd	1/2 的芽中等粗壮,部分叶片发黄
B5	0.2	—	1.0	1.67±0.41d	1.9±0.46f	1.5±0.70ef	植株细弱,叶片淡黄,生长较慢
B6	0.2	—	2.5	1.50±0.18d	1.6±0.2f	1.2±0.10f	长势较差,植株细弱,叶色淡黄,节间短
B7	0.2	—	5.0	1.86±0.17d	1.8±0.17f	1.4±0.10ef	植株较细弱,叶色微黄,新芽细小
B8	0.1	1.0	0.5	2.89±0.29bc	4.8±0.34a	3.2±0.51a	长势良好,植株粗壮,叶片绿色
B9	0.1	1.0	1.0	3.73±0.24a	4.5±0.26ab	3.0±0.50ab	长势较好,植株粗壮,叶片深绿
B10	0.1	1.0	2.0	4.10±0.12a	3.6±0.36d	2.0±0.26ed	长势良好,植株较粗壮,生长较快
B11	0.1	2.5	0.5	2.06±0.53c	3.9±0.51dc	2.5±0.17bcd	植株较粗壮,叶片略发黄
B12	0.1	2.5	1.0	2.56±0.09bc	4.2±0.26abc	3.0±0.36ab	长势一般,叶片较大
B13	0.1	2.5	2.0	2.59±0.22bc	3.0±0.26e	2.3±0.10cd	长势较弱,叶片发黄,部分植株畸形

注: \*: 数字 1、2、3、4、5 分别表示群体中粗壮植株的比例为 20%、40%、60%、80%与 100%。

2.3 阳丰甜柿的生根培养

将继代培养的健壮组培苗接种至生根培养基(图 1H),15 d 后芽开始形成不定根,之后根生长迅速,35 d 形成良好根系(图 1I)。

暗培养对阳丰甜柿芽的生根有明显的促进作用,未经暗培养的组培苗出根时间长且其生根率、平均生根数均较低,生根率最高仅为 22.2%,在培养过程中少数植株出现叶片枯黄脱落的现象,而暗培养 7 d 的组培苗其生根率能达到 73.3%,生根率提高 51.1%。

生长素 IBA 能有效促进阳丰甜柿生根,当 IBA

浓度为 0.75 mg · L<sup>-1</sup>时,培养 14 d 后开始有不定根形成,其生根率高于其他浓度处理,平均生根数也最多,根系较发达(图 1J、K),随着 IBA 浓度的增加,不定芽基部容易形成大量黑色愈伤组织,不利于其生根及移栽成活率(表 3)。因此,适宜阳丰甜柿生根培养的培养基为 1/2MS+0.75 mg · L<sup>-1</sup>IBA。

将完成生根的试管苗在室内炼苗后移出组培室,取出并洗净组培苗,移栽至营养钵中,定期浇水,培养 30 d 后,统计平均成活率达 85.0%,植物生长状态良好。

表 3 不同质量浓度 IBA 对阳丰甜柿组培苗生根的影响

Table 3 Effects of IBA on rooting culture of *D. kaki* cv. Youhou

处理号	暗培养天数/d	IBA 浓度/(mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/%	平均根条数/条	根系生长情况
C1	0	0.50	15.6±0.04d	1.7±0.25b	根系细弱,根量小
C2	0	0.75	24.4±0.04d	2.0±0.29b	根系较弱,基部愈伤组织较小
C3	0	1.00	22.2±0.04d	1.9±0.91b	根系较弱,少数根系中途停止生长
C4	0	1.25	15.6±0.10d	2.1±0.28b	根系生长较好,根量较小
C5	0	1.50	22.2±0.10d	2.2±1.05b	根较细,基部愈伤组织大
C6	7	0.50	55.5±0.03b	2.4±0.64b	根系较发达,根较长而粗
C7	7	0.75	73.3±0.07a	3.6±0.41b	根系发达,根粗而长
C8	7	1.00	60.0±0.07b	2.8±0.79a	根系较发达
C9	7	1.25	40.0±0.07c	2.2±0.35ab	根系较弱,基部愈伤组织较大
C10	7	1.50	53.3±0.13b	2.5±0.60b	根系较发达,基部愈伤组织大,根较短

### 3 结论与讨论

植物组织培养是一种较理想的快速繁殖方法<sup>[16]</sup>。本试验以阳丰甜柿带腋芽茎段为外植体,对植物生长调节剂的种类和配比、培养条件等因素对其腋芽的诱导、增殖及生根的影响进行了探讨,成功建立了阳丰甜柿组织培养再生体系。

在阳丰甜柿组织培养中,外植体的处理和腋芽的诱导是其组培繁殖过程中的关键环节。叶片、茎段、休眠芽均可作为外植体,但阳丰甜柿的叶片在培养过程中形成的愈伤组织容易褐化,较难诱导出不定芽,休眠芽暴露在空气中的时间长,容易累积大量微生物造成消毒困难的现象,因此,选择5—6月初形成芽不久且受污染程度小的茎段作为外植体较为适宜。在腋芽的诱导时,不同浓度ZT对阳丰甜柿腋芽的诱导起着关键作用,与上西早春甜柿离体快繁技术研究<sup>[17]</sup>的结论一致,质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最适宜,诱导率达77.8%。

生长素和细胞分裂素及其浓度直接影响外植体生长和分化的方向<sup>[18]</sup>,且不同植物生长调节物质互作比单一某种生长调节物质更能促进丛芽或不定芽的形成与增殖<sup>[19]</sup>。在阳丰甜柿的继代培养中发现,ZT和2ip同时作为细胞分裂素添加使用时,其增殖效果明显优于单独加入其中一种分裂素,将诱导的腋芽移至 $1/2\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZT}++2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}2\text{ip}$ 的增殖培养基中培养,芽的增殖率最大,增殖系数能达到4.1,大部分芽增殖是从主芽的基部萌发出新的芽,少数主芽的腋芽直接萌发,且叶片嫩绿,生长情况良好。而单独使用分裂素ZT或者2ip直接诱导丛生芽时,增值效果均低于两者配合使用。随着激素浓度升高,诱导出芽数目增多,但芽小、长势弱,不利于芽苗后期的生长。

在柿的组织培养中,生根一直是个较难突破的点<sup>[15]</sup>,暗培养对柿的生根有一定的促进作用,本试验在加入一定浓度的IBA时,未经暗培养的组培苗叶片容易发生枯黄脱落,生根率低,而经暗培养7 d的组培苗生长情况良好,而且生根率较高,可能是因为光可以促进生长素的降解,影响植株正常的生长,不利于生根<sup>[20]</sup>。另外,减少培养基中的营养成分和糖含量能有效促进甜柿阳丰的生根,可能贫瘠的生长环境能减少试管苗对培养基的依赖性,促进根的形成从而顺利的吸收营养物质<sup>[21]</sup>。本试验以 $1/2\text{MS}$ 为基本培养基,添加不同浓度的IBA, $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}$ 能有效诱导阳丰甜柿组培苗生根且生根效果最好。本试验建立了阳丰甜柿的组织培养与快繁体系,为该品种的推广及工厂化育苗奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] LUO Z R, WANG R Z. Persimmon in China: domestication and traditional utilization of genetic resources [J]. *Advances in Horticultural Science*, 2008, 22(4): 239-243.
- [2] 袁录霞, 张青林, 郭大勇, 等. 中国甜柿及其在世界甜柿基因库中的地位[J]. *园艺学报*, 2011, 38(2): 361-370.  
YUAN L X, ZHANG Q L, GUO D Y, *et al.* Characteristics of Chinese PCNA types and their roles in science and industry of oriental persimmon [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(2): 361-370. (in Chinese)
- [3] 赵献明. 浙江省农家柿品种资源多样性与分类研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012.
- [4] SUGIURA A. The origin of persimmon and its cultivar differentiation[J]. *Recent Advances in Plant Breeding*, 1984, 25: 30-37.
- [5] 夏宏义, 杨勇, 张永芳等. 甜柿‘阳丰’果实营养成分和氨基酸组分分析[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(1): 116-120.
- [6] 赵静, 帅明蓉, 赵玉飞, 等. 南川百合组织培养与快繁技术体系研究[J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 37(6): 109-115.  
ZHAO J, SHUAI M R, ZHAO Y F, *et al.* Tissue culture of *Lilium rosthornii* Diel and a rapid propagation system for it [J]. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition*, 2012, 37(6): 109-115. (in Chinese)
- [7] 杨永青, 陈扬祥, 魏文雄. 枇杷茎尖组培苗的遗传稳定性及生产性能[J]. *园艺学报*, 1991, 18(2): 107-114.  
YANG Y Q, CHEN Y X, WEI W X. Genetic stability and productivity in clonal plant derived from shoot tip culture of loquat [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1991, 18(2): 107-114. (in Chinese)
- [8] TAO R, MURAYAMA H, MORIGUCHI K, *et al.* Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon [J]. *Hortscience*, 1988, 23(6): 1055-1056.
- [9] TETSUMURA T. Effect of types of cytokinin used for *in vitro* shoot proliferation of Japanese persimmon on the subsequent rooting of shoots[J]. *Acta Horticulturae*, 1997, 436: 143-148.
- [10] 刘月英, 马俊莲, 唐霞, 等. 柿叶片不定芽再生的研究[J]. *湖北农业科技*, 2006, 45(5): 619-621.
- [11] 谢启鑫, 庄东红, 吴奕恒. 油柿下胚轴再生植株的培养[J]. *果树学报*, 2007, 24(2): 157-161.  
XIE Q X, ZHUANG D H, WU Y H. Regeneration from hypocotyl explants of persimmon (*Diospyros oleifera* Cheng) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 24(2): 157-161. (in Chinese)
- [12] 刘恺. 富有柿与次郎柿组织培养技术的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [13] 任继文, 雷颖. 金丝桃组织培养再生体系的建立[J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(3): 90-92.  
REN J W, LEI Y. Establishment of tissue culture regeneration system of *Hypericum monogynum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(3): 90-92. (in Chinese)
- [14] 雷亚灵, 李周歧. 八仙花茎段组织培养技术研究[J]. *西北林学院学报*, 2008, 23(4): 101-103.

LEI Y L,LI Z Q. Tissue culture of stem segment of *Hydrangea macrophylla*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(4):101-103. (in Chinese)

[15] 王海光,张国良,张淑云,等. 柿组织培养技术研究进展[J]. 河北农业大学学报,2001,24(4):93-97.

WANG H G,ZHANG G L,ZHANG S Y,*et al.* Advances of *in vitro* regeneration in persimmon[J]. Journal of Agricultural University of Hebei,2001,24(4):93-97. (in Chinese)

[16] 吴秀华,张艳玲,周月,等. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. 植物生理学报,2013,49(8):759-763.

WU X H,ZHANG Y L,ZHOU Y,*et al.* Establishment of high frequency and direct regeneration system from leaf of ‘Hayward’ Kiwifruit [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson][J]. Plant Physiology Journal,2013,49(8):759-763. (in Chinese)

[17] 刘晓娜,马俊莲,张子德等. 上西早生甜柿离体快繁技术研究[J]. 河北农业大学学报,2004,27(1):62-63.

LIU X M,MA J L,ZHANG Z D,*et al.* Study on micropropagation in vitro of Uenishiwise persimmon[J]. Journal of Agricultural University of Hebei,2004,27(1):62-63. (in Chinese)

[18] 郭素娟,孙小兵,秦天天,等. 板栗成熟胚再生体系的建立与优化[J]. 西北林学院学报,2015,30(3):89-93.

GUO S J,SUN X B,QIN T T,*et al.* Establishment and optimization of *in vitro* regeneration system of mature embryo of *Castanea mollissima*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(3):89-93. (in Chinese)

[19] 陈继富. 无籽罗汉果的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学报,2013,49(9):968-972.

CHEN J F. Tissue culture and rapid propagation of seedless *Siraitia grosvenorii* [J]. Plant Physiology Journal,2013,49(9):968-972. (in Chinese)

[20] 谢寅峰,王莹,尚旭岚,等. 青钱柳组培快繁体系的初步研究[J]. 西北植物学报,2009,29(11):2331-2338.

XIE Y F,WANG Y,SHANG X L,*et al.* Preliminary study on the tissue culture and rapid propagation system of *Cyclocarya paliurus*[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica,2009,29(11):2331-2338. (in Chinese)

[21] 梁钻姬,潘超美,赖珍珍,等. 药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学报,2012,48(1):85-89.

LIANG Z J,PAN C M,LAI Z Z,*et al.* Tissue culture and rapid propagation of medicinal plant *Eupatorium chinense* L. [J]. Plant Physiology Journal,2012,48(1):85-89. (in Chinese)

(上接第 147 页)

[15] 代惠萍,赵桦,吴三桥,等. 秦巴山区油茶品种遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北林学院学报,2014,29(2):107-111.

DAI H P,ZHAO H,WU S Q,*et al.* ISSR analysis of genetic diversity of camellia oleifera in Qinba Mountains[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(2):107-111. (in Chinese)

[16] LI G,QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP),a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. Theor. Appl. Genet.,2001,103(2):455-461.

[17] 彭方仁,吴莺莺,郝明灼,等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析油茶遗传多样性[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2012,36(5):19-25.

PENG F R,WU Y Y,HAO M Z,*et al.* Genetic diversity of *Camellia oleifera* using ISSR and SRAP markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition,2012,36(5):19-25. (in Chinese)

[18] 张羽,李英,许伟,等. 利用 SRAP 和 SSR 标记对汉中地区主要油菜品种的遗传多样性分析[J]. 四川农业大学学报,2013,31(4):370-376.

ZHANG Y,LI Y,XU W,*et al.* Analysis of genetic diversity of *Brassica napus* mainly popularized in hanzhong based on SRAP and SSR markers[J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2013,31(4):370-376. (in Chinese)

[19] 姚宇飞,王英,庄南生,等. 利用 SRAP 标记分析海南旱稻地方品种的遗传多样性及其分子身份证的构建[J]. 生物技术通报,2014(11):97-106.

[20] 刘志恒,胡积祥,侯悦,等. 水稻茄丝核菌 SRAP 引物筛选与体系优化[J]. 植物保护学报,2013,40(5):407-412.

LIU Z H,HU J X,HOU Y,*et al.* Optimization of SRAP system and primer screening of *Rhizoctonia solani* in rice[J]. Acta Phytophylacica Sinica,2013,40(5):407-412. (in Chinese)

[21] 张采波,张艳花. 刘和洋,等. 利用 SRAP 和 SSR 标记构建空间诱变新选玉米自交系指纹图谱[J]. 中国生物工程杂志,2013,33(10):103-110.

[22] SMITH J S C,CHINE C L,SHU H,*et al.* An evaluation of the utility of SSR loci as molecular marker in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. Theor. Appl. Genet.,1997,95:163-173.

[23] BOTSTEIN D,WHITE R L,SKOLNICK M,*et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am. J. Hum. Genet.,1980,32:314-331.