



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116458424 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 21

(21) 申请号 202310161493.6

(22) 申请日 2023.02.23

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430000 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 张青林 刘彬 罗正荣 陈文兴
郭大勇 徐莉清

(74) 专利代理机构 武汉智嘉联合知识产权代理
事务所(普通合伙) 42231
专利代理师 张杰

(51) Int. Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

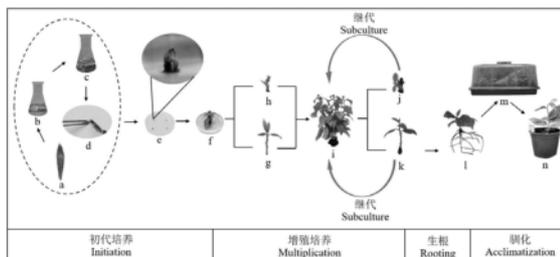
权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54) 发明名称

小果甜柿组培快繁方法

(57) 摘要

本发明涉及小果甜柿组培快繁方法,包括以下步骤:初代培养:取带芽茎段进行灭菌和消毒,剥除饱满休眠芽外部数层鳞片,接种在初代培养基中,培养得到初代组培苗;增殖培养:将初代组培苗剪成茎段,接种在含甜菜碱增殖培养基中培养,获得无根组培苗;生根培养:将无根组培苗采用浸蘸生根法或两步生根法进行生根培养,得到生根组培苗;其中,浸蘸生根法中采用的第一植物生长调节剂为NAA或IBA;两步生根法中采用的第二植物生长调节剂为NAA、IBA和MT的混合物;驯化移栽:取生根组培苗先闭瓶炼苗后开盖炼苗,移栽至育苗穴盘培养至成活,进而移栽至大田。本发明能够有效缩短柿砧木苗木成品时间,且解决了传统柿离体再生过程生根困难的问题。



1. 一种小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 初代培养:取带芽茎段进行灭菌和消毒,剥除饱满休眠芽外部数层鳞片,接种在初代培养基中,培养得到初代组培苗;

(2) 增殖培养:将初代组培苗剪成茎段,接种在含甜菜碱增殖培养基中培养,获得无根组培苗;

(3) 生根培养:将无根组培苗采用浸蘸生根法或两步生根法进行生根培养,得到生根组培苗;其中,浸蘸生根法中采用的第一植物生长调节剂为NAA或IBA;两步生根法中采用的第二植物生长调节剂为NAA、IBA和MT的混合物;

(4) 驯化移栽:取生根组培苗先闭瓶炼苗后开盖炼苗,移栽至育苗穴盘培养至成活,进而移栽至大田。

2. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(1)中,带芽茎段是在冬季采集生长健壮、芽饱满的枝条剪成的;所述灭菌是将带芽茎段用吐温-20浸洗1~2min后用无菌水冲洗干净;所述消毒是将灭菌后的带芽茎段先在75%的酒精溶液中浸泡25~35s,再在0.5~1.2%的次氯酸钠溶液中消毒5~7min后冲洗干净。

3. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(1)中,剥除饱满休眠芽外部2~3层鳞片后接种在初代培养基中;所述初代培养基由MS(1/2N)+1mg/L的ZT+0.1mg/L的IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L的PVP-40组成的;初代培养的培养条件是在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光照强度1000~3000lx和光照时间为16h/d的组培室中培养,培养时间为30~60d。

4. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(2)中,初代组培苗剪成1~1.5cm的茎段。

5. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(2)中,甜菜碱增殖培养基由DKW+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L的PVP-40+100~1000 $\mu\text{mol/L}$ 的甜菜碱组成;增殖培养的培养条件与初代培养的培养条件相同,培养时间为30~60d。

6. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(3)中,浸蘸生根法是用第一植物生长调节剂浸泡无根组培苗的基部,再进行暗处理5~15d后,转入基本培养基A中进行生根培养30~50d;第一植物生长调节剂为NAA时,浓度为50~200mg/L,浸泡时间为5~15min;第一植物生长调节剂为IBA时,浓度为100~200mg/L,浸泡时间为5~10min。

7. 根据权利要求6所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,基本培养基A是由1/2MS+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/LPVP-40组成的。

8. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(3)中,两步生根法是先有无根组培苗接种至基本培养基B中,进行暗处理5~15d后,转入基本培养基A中进行生根培养30~50d;所述基本培养基B是由基本培养基A+0.5~1mg/L的NAA+0.2~1.5mg/L的IBA+0.1~5mg/L的MT组成。

9. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(4)中,闭瓶炼苗时间为3~10d,开盖练苗时间为2~4d。

10. 根据权利要求1所述的小果甜柿组培快繁方法,其特征在于,步骤(4)中,移栽至育苗穴盘的栽培基质采用育苗基质与蛭石的混合土,栽培前用1000倍多菌灵进行拌土;移栽

至育苗穴盘后,用透气保温盖盖上,在托盘中加入水;每7d喷施1000倍多菌灵溶液,放在温度为23~25℃自然光照条件下培养至成活。

小果甜柿组培快繁方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物栽培领域,具体涉及小果甜柿组培快繁方法。

背景技术

[0002] 栽培柿主要通过嫁接繁殖,完全甜柿成熟后即可脆食。目前我国柿砧木主要有君迁子、油柿、野柿、美洲柿、浙江柿(罗正荣和王仁梓,2001)。使用最广泛的砧木君迁子与目前主栽甜柿优质品种“富有”系嫁接出现不亲和,成为限制甜柿发展的重要因素。

[0003] 近年来,研究发现“小果甜柿”与主推“富有”系品种嫁接亲和力强,在甜柿栽培推广中具有重要价值。华中农业大学柿研究团队从湖北省大别山区收集到完全甜柿广亲和砧木小果甜柿和牛眼柿等新基因型,并通过离体嫁接亲和性鉴定、愈伤组织靠接实验及6年生砧穗复合体的田间表现调查发现小果甜柿与“次郎”、“太秋”、“富有”系甜柿嫁接亲和(胡梦珏,陈莉,刘一凤,张青林,罗正荣.2017.“小果甜柿”和“牛眼柿”作为完全甜柿砧木的应用潜力研究.果树学报,34(1):50-58.)。目前小果甜柿作为广亲和砧木,其繁殖方式主要通过种子播种,这种常规方法繁育的柿砧木苗木成品需要的时间长,后代因染色体重组容易发生变异和性状分离,苗木的一致度不高,管理繁琐;柿离体培养可解决这一问题。

[0004] 但柿在组培过程中被普遍认为存在难生根的问题,成为柿种苗商业生产的一大阻碍。造成柿组培苗生根率不同的影响因素有多种,如品种类型,培养基种类,激素种类、处理时间和处理方法,组培苗继代次数等;其中柿的组织培养是存在品种差异性的。TAO等以来源于16个品种的愈伤组织为试材检测了品种基因型对不定芽形成的影响,发现来源于不同品种的愈伤组织,其颜色等外观状况有很大差别,16个品种中只有8个能形成不定芽且不定芽形成百分率从2%到72%不等,推测其原因可能是不同品种的增殖能力不同,也有可能是试验中使用了同一种培养基而不同品种对培养基的需求却不同。此外MURAYAMA等采用相同的方法对5个甜柿品种进行生根培养,所得生根率也有很大差异,从8%~96%不等,再次证明了柿组培过程中品种差异的存在。目前缺乏高效与规模化小果甜柿砧木繁殖技术体系,也没有有关小果甜柿的离体再生完整个体的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述技术不足,提供一种小果甜柿组培快繁方法,解决现有技术中小果甜柿通过种子繁殖带来的柿砧木苗木成品时间长、变异多且采用离体培养时难生根的技术问题。

[0006] 为达到上述技术目的,本发明的技术方案提供一种小果甜柿组培快繁方法:

[0007] 包括以下步骤:

[0008] (1) 初代培养:取带芽茎段进行灭菌和消毒,剥除饱满休眠芽外部数层鳞片,接种在初代培养基中,培养得到初代组培苗;

[0009] (2) 增殖培养:将初代组培苗剪成茎段,接种在含甜菜碱增殖培养基中培养,获得无根组培苗;

[0010] (3)生根培养:将无根组培苗采用浸蘸生根法或两步生根法进行生根培养,得到生根组培苗;其中,浸蘸生根法中采用的第一植物生长调节剂为NAA或IBA;两步生根法中采用的第二植物生长调节剂为NAA、IBA和MT的混合物;

[0011] (4)驯化移栽:取生根组培苗先闭瓶炼苗后开盖炼苗,移栽至育苗穴盘培养至成活,进而移栽至大田。

[0012] 进一步地,步骤(1)中,带芽茎段是在冬季采集生长健壮、芽饱满的枝条剪成的;所述灭菌是将带芽茎段用吐温-20浸洗1~2min后用无菌水冲洗干净;所述消毒是将灭菌后的带芽茎段先在75%的酒精溶液中浸泡25~35s,再在0.5~1.2%的次氯酸钠溶液中消毒5~7min后无菌水冲洗干净。

[0013] 进一步地,步骤(1)中,剥除饱满休眠芽外部2~3层鳞片后接种在初代培养基中;所述初代培养基由MS(1/2N)+1mg/L的ZT+0.1mg/L的IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L的PVP-40组成的;初代培养的培养条件是在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光照强度1000~3000lx和光照时间为16h/d的组培室中培养,培养时间为30~60d。

[0014] 进一步地,步骤(2)中,初代组培苗剪成1~1.5cm的茎段。

[0015] 进一步地,步骤(2)中,含甜菜碱增殖培养基由DKW+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L的PVP-40+100~1000 $\mu\text{mol/L}$ 的甜菜碱组成;增殖培养的培养条件与初代培养的培养条件相同,培养时间为30~60d。

[0016] 进一步地,步骤(3)中,浸蘸生根法是先第一植物生长调节剂浸泡无根组培苗的基部,再进行暗处理5~15d后,转入基本培养基A中进行生根培养30~50d;第一植物生长调节剂为NAA时,浓度为50~200mg/L,浸泡时间为5~15min;第一植物生长调节剂为IBA时,浓度为100~200mg/L,浸泡时间为5~10min。所述基本培养基A是由1/2MS+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40组成的。

[0017] 进一步地,步骤(3)中,两步生根法是先无根组培苗接种至基本培养基B中,进行暗处理5~15d后,转入基本培养基A中进行生根培养30~50d;所述基本培养基B是由基本培养基A+0.5~1mg/L的NAA+0.2~1.5mg/L的IBA+0.1~5mg/L的MT组成。

[0018] 进一步地,步骤(4)中,闭瓶炼苗时间为3~10d,开盖炼苗时间为2~4d。

[0019] 进一步地,步骤(4)中,移栽至育苗穴盘的栽培基质采用育苗基质与蛭石的混合土,栽培前用1000倍多菌灵进行拌土;移栽至育苗穴盘后,用透气保温盖盖上,在托盘中加入水;每7d喷施1000倍多菌灵溶液,放在温度为23~25 $^{\circ}\text{C}$ 自然光照条件下培养至成活。

[0020] 与现有技术相比,本发明的有益效果包括:

[0021] 本发明通过初代培养和增殖培养获得无根组培苗,通过在增殖培养中添加甜菜碱,提高小果甜柿的增殖效率;通过第一植物生长调节剂进行的浸蘸生根法或第二植物生长调节剂进行的两步生根法,能够诱导生根,且促进植株根部粗壮,利于提高存活率;最后通过采用闭瓶炼苗和开盖炼苗配合,成功驯化小果甜柿组培苗,构建了完整的柿离体培养繁殖体系;相对种子播种的繁殖方式,本发明能够有效缩短柿砧木苗木成品时间,且解决了传统柿离体再生难生根的问题,所得后代苗木的一致度高,建立高效的“小果甜柿”离体快速繁殖技术体系,为我国优质甜柿产业的可持续发展提供技术支持。

附图说明

[0022] 图1是本发明实施例1中小果甜柿移栽至大田的示意图。

[0023] 图2是不同浓度次氯酸钠处理小果甜柿外植体后生长状态;其中,A:0.5%次氯酸钠处理小果甜柿外植体;B:1%次氯酸钠处理小果甜柿外植体;C:2%次氯酸钠处理小果甜柿外植体;D:2.5%次氯酸钠处理小果甜柿外植体。

[0024] 图3是不同浓度甜菜碱处理组培苗30d后生长状况;其中,A:0 μ mol/L甜菜碱处理组培苗;B:10 μ mol/L甜菜碱处理组培苗;C:50 μ mol/L甜菜碱处理组培苗;D:100 μ mol/L甜菜碱处理组培苗;E:1000 μ mol/L甜菜碱处理组培苗;F:2000 μ mol/L甜菜碱处理组培苗。

[0025] 图4是不同处理后小果甜柿生根状态(浸蘸法);其中, a_1 - a_9 为浸蘸处理1-9。

[0026] 图5是本发明不同处理后小果甜柿生根状态(两步生根法);其中 b_1 - b_9 为两步生根法处理1-9。

[0027] 图6是本发明小果甜柿快繁体系示意图,其中,a.休眠芽;b.75%酒精消毒;c.1%次氯酸钠消毒;d.手术刀剥除休眠芽外部数层鳞片;e.接种到培养基中;f.不定芽形成及伸长(培养30d);g.初代培养带有4-5片叶的茎段(1-1.5cm);h.初代培养带有芽的茎段;i.初代培养30d后组培苗;j.继代培养30d后带芽茎段;k.继代培养30d后带有4-5片叶的茎段(2-3cm长);l.生根组培苗;m.组培苗驯化;n.移栽2个月后植株。

具体实施方式

[0028] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0029] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规方案,所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。

[0030] 术语及缩写解释

[0031] MS:MS培养基;

[0032] MS(1/2N):MS培养基,氮元素减半。

[0033] 1/2MS:MS培养基中大量元素减半。

[0034] ZT:玉米素;

[0035] IAA:吲哚乙酸,作为生长素;

[0036] PVP:聚乙烯吡咯烷酮;

[0037] DKW:DKW培养基;

[0038] NAA:萘乙酸;

[0039] IBA:吲哚丁酸;

[0040] MT:N-乙酰基-5甲氧基色胺,又称褪黑素。

[0041] 基部愈伤组织诱导率计算方式:愈伤组织诱导率=(形成愈伤组织的外植体数目/总外植体数目) \times 100%。

[0042] 休眠芽再生率计算方式:再生率=(萌发抽梢的外植体数目/总外植体数目) \times 100%。

[0043] 污染率=污染芽个数/总芽数。

[0044] 死亡率=消毒死亡芽个数/总芽数。

[0045] 成活率=成活芽个数/总芽数。

[0046] 本发明试验试材砧木品种为小果甜柿 (*Diospyros kaki* Thunb. 'Xiaoguo Tianshi'), 外植体均为小果甜柿成年树活动芽, 取自湖北武汉华中农业大学种质资源圃。选生长健壮的组培苗, 取2.0-3.0cm幼嫩新梢作生根材料。

[0047] 本发明小果甜柿组培快繁方法, 包括下述步骤:

[0048] (1) 初代培养

[0049] 在冬季芽休眠期采集生长健壮、芽饱满的枝条, 剪成带芽茎段, 装入灭菌后的锥形瓶中, 用吐温-20浸洗1~2min后, 用无菌水冲洗2-3次。接种前, 在75%的酒精溶液中浸泡25~35s, 优选30s, 在0.8~1.2% (优选1%) 浓度的次氯酸钠中消毒5~7min (优选6min) 后, 无菌水冲洗数次至锥形瓶中水为无色, 用手术刀剥除饱满休眠芽外部数层鳞片, 接种在MS (1/2N)+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+PVP-40 (0.6g/L) 培养基中, 在温度(25±2) °C, 光照强度2000lx, 16h/d的组培室中培养。每瓶接1个外植体, 每处理接种20瓶, 重复3次, 培养30d以后, 得到初代组培苗的外植体, 统计污染率和死亡率。

[0050] (2) 增殖培养

[0051] 将初代培养获得的初代组培苗剪成1~1.5cm的茎段, 接种在DKW+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+PVP-40 (0.6g/L) 中添加不同浓度甜菜碱 (优选100~1000μmol/L的甜菜碱) 组合而成的增殖培养基中培养, 培养条件与初代培养相同。每瓶接种1个茎段, 每个处理接种20瓶, 重复3次, 培养30~60d以后得到无根组培苗的外植体, 统计每个无根组培苗的外植体的分蘖数、叶片数、茎节数和株高。

[0052] (3) 生根培养

[0053] 本发明利用两种方法进行生根培养, 具体是:

[0054] 浸蘸生根法: 以1/2MS+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40为基本培养基A, 用不同种类及浓度的植物生长调节剂浸蘸无根组培苗的外植体 (长为1~3cm) 新梢基部, 进行一定天数暗处理而后转入不含植物生长调节剂的基本培养基A中, 促进新梢生根; 优选地, 植物生长调节剂包括NAA或IBA等生长激素; 浓度为50mg/L~200mg/L; 更进一步地, NAA的浓度优选为50~200mg/L, 处理时间优选为5~15min; IBA的浓度优选为100~200mg/L, 处理时间优选为5~10min。

[0055] 两步生根法: 在基本培养基A (同浸蘸生根法的基本培养基) 中附加不同种类不同浓度的植物生长调节剂得到基本培养基B, 将增殖培养中获得的长为1~3cm的无根组培苗切去愈伤组织接于基本培养基B中, 进行不同天数暗处理后转入不含植物生长调节剂的基本培养基诱导生根; 优选地, 植物生长调节剂包括NAA、IBA和MT等生长激素组成的混合物, 浓度分别为0.1mg/L~5mg/L, 基本培养基B优选为基本培养基A+0.5~1mg/L的NAA+0.2~1.5mg/L的IBA+0.1~5mg/L的MT; 暗处理天数为5~15天。

[0056] 上述生根培养中, 暗处理均是遮光, 温度23~25 °C, 组培瓶内湿度恒定为80%~85%。

[0057] 两种诱导生根方法每瓶接种5株茎段, 每个处理接种6瓶, 重复3次, 接种后30d, 统计生根率, 并采用Epson Scan根系扫描仪 (支持软件为WinRHIZO) 测定生根组培苗根系的长度、表面积、体积、分支数和根尖数。

[0058] (4) 移栽试验

[0059] 将已经生根的组培苗驯化移栽,将其放在生长室中闭瓶炼苗7d,再开盖炼苗3d,栽培基质选用商道基质与蛭石的混合土(10:1),栽培前用1000倍多菌灵进行拌土,移栽容器口为6cm,高度为11cm的塑料育苗穴盘,配有深度10cm的塑料盖,移栽后用透气保温盖盖上,在托盘中加入一定量的水(利用蒸发保持一定湿度,优选湿度为80%-85%),每7d喷施1000倍多菌灵溶液,并适当在托盘中补水。放至温度为23~25℃自然光照条件下培养至成活,观察记录幼苗生长状况,60d后统计幼苗成活率及株高。

[0060] (5) 数据处理

[0061] 将获得的数据进行汇总。统计各处理的生根率、生根数和最长根长,数据采用SPSS Statistics 25统计软件进行方差和极差分析。方差分析前对生根率进行反正弦转换,多重比较采用Duncan法。同时,通过隶属函数法对生根效果进行综合评价。隶属函数值计算公式: $R(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$, $i = 1, 2, 3, \dots, n$ 。

[0062] 式中, X_i 为指标测定值; X_{\min} 和 X_{\max} 分别为不同处理中某一指标的最小值和最大值。将测定值 X_i 利用公式换算成相应的隶属函数值 $R(X_i)$,并加和计算不同处理各指标综合隶属函数值。

[0063] 下面通过具体的实施例本发明做进一步详细说明。

[0064] 实施例1:

[0065] 小果甜柿组培快繁方法,包括下述步骤:

[0066] 一种小果甜柿组织培养再生快速繁殖方法,其步骤如下:

[0067] 1) 初代培养:在生长初期采集生长健壮、芽饱满的枝条,剪成带芽茎段,装入灭菌后的锥形瓶中,用吐温-20浸洗1~2min后,用无菌水冲洗2-3次。接种前,在75%的酒精溶液中浸泡30s,在1%的次氯酸钠中消毒6分钟后,无菌水冲洗数次至锥形瓶中水为无色,用手术刀剥除饱满休眠芽外部2-3层鳞片,接种在MS(1/2N)+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40培养基中,pH调至5.8-6.0,在温度(25±2)℃,光照强度2000lx,16h/d的组培室中培养。每瓶接1个外植体,每处理接种20瓶,重复3次,培养30d以后,统计组培苗基部愈伤组织诱导率为100%,污染率为23.6%,死亡率13.84%,成活率62.56%。

[0068] 2) 增殖培养:将初代培养获得的初代组培苗剪成1~1.5cm的茎段,接种在DKW+1mg/L ZT+0.1mg/L IAA+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/LPVP-40+1000μmol/L甜菜碱增殖培养基中培养,pH调至5.8-6.0,在温度(25±2)℃,光照强度2000lx,16h/d的组培室中培养。每瓶接种1个茎段,每个处理接种20瓶,重复3次,培养30d。部分无菌苗以30d为周期进行继代培养扩繁,即将无菌苗切成1~2cm的茎段(含2~3个腋芽)置于继代培养基(与甜菜碱增殖培养基相同)中继代培养,组培苗基部愈伤组织诱导率为100%,丛生芽再生率达100%,平均增殖系数达3.7,株高可达3.29cm,叶片数达9.49片/每株。

[0069] 另一部分无菌苗在继代培养基中培养30d后直接接种至生根培养基。

[0070] 本发明利用DKW培养基进行组培苗的增殖,提高了小果甜柿组培苗的繁殖系数,培育了小果甜柿健壮组培苗。

[0071] 3) 生根培养

[0072] 利用浸蘸生根法(培养30d)进行生根培养:将培养30d的无菌苗,浸蘸生根法处理

后接种至生根培养基中进行生根培养,生根培养中每瓶接种5株茎段,每个处理接种6瓶,重复3次,接种后30d,统计生根率,并采用Epson Scan根系扫描仪(支持软件为WinRHIZO)测定生根组培苗根系的长度、表面积、体积。

[0073] 浸蘸生根法的具体条件:以1/2MS+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40为基本培养基,用200mg/L的NAA浸新梢基部15min,进行10d暗处理而后转入不含植物生长调节剂的基本培养基中,促进新梢生根。

[0074] 经测试,根系最为健壮根系平均总长达18.30cm,根系平均表面积为7.70cm²,根系平均体积为0.20cm³。

[0075] 4) 将浸蘸生根法所得已经生根的组培苗驯化移栽,将其放在生长室中闭瓶炼苗7d,再开盖炼苗3d,栽培基质选用商道基质(来源为山东商道生物科技公司)与蛭石的混合土(质量比10:1),栽培前用1000倍多菌灵进行拌土,移栽容器口为6cm,高度为11cm的塑料育苗穴盘,配有深度10cm的塑料盖,移栽后用透气保温盖盖上,在托盘中加入一定量的水(利用蒸发保持一定湿度),每7d喷施1000倍多菌灵溶液,并适当在托盘中补水。放至温度为25℃自然光照条件下培养至成活,观察记录幼苗生长状况,60d后幼苗成活率,为52.5%,苗木健壮生长良好,移栽至大田均可以正常生长。

[0076] 相对现有技术大多处于实验室环境,未能驯化移栽至大田,本发明从驯化炼苗到移栽至大田炼苗成功率达52.5%,如图1所示,小果甜柿苗木已经完全可以适应大田种植;移栽至大田8个月后小果甜柿平均株高达49.17cm,茎粗达6.01mm,完全可用于嫁接甜柿。

[0077] 实施例2(考察次氯酸钠浓度在外植体消毒与初代培养中的影响)

[0078] 实施例2与实施例1步骤1)的区别仅在于:调整次氯酸钠浓度分别为0.5%、2%和2.5%,其它条件同实施例1步骤1)。对小果甜柿外植体处理效果的测试结果如下表1和图2所示。

[0079] 表1不同浓度次氯酸钠对小果甜柿外植体处理效果的影响

| | 次氯酸钠浓度 (%) | 污染率 (%) | 死亡率 (%) | 成活率 (%) |
|--------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0.5 | 26.11±1.61 ^a | 40.44±1.29 ^{bc} | 33.45±2.86 ^{ab} |
| [0080] | 1 | 23.60±0.71 ^a | 13.84±0.84 ^c | 62.56±0.61 ^a |
| | 2 | 0.00 ^b | 51.97±3.19 ^b | 48.03±3.19 ^a |
| | 2.5 | 0.00 ^b | 100.00 ^a | 0.00 ^b |

[0081] 注:每一个污染率、死亡率、成活率是由三个原始数据的平均值算出。

[0082] 外植体表面灭菌是建立小果甜柿微繁体系的关键,病菌存在会极大的影响柿组培苗后续的生长,也会阻碍小果甜柿无菌材料的获取。实验结果表明,如表1所示,消毒时间相同,随着次氯酸钠浓度的提高污染率从26.11%降低至0,但随着次氯酸钠浓度增加,对外植体的组织损伤加大,外植体在2%的次氯酸钠溶液消毒过程中,大部分污染物都已经去除,但同时对外植体造成了较大的损伤,外植体在7d后分化出一些愈伤组织,如图2C所示;外植体在2.5%的次氯酸钠溶液中浸泡能有效去除污染物,但同时植物组织已经完全受损,诱导后1周以上,外植体变为黑色全部死亡,如图2D所示;0.5%次氯酸钠消毒的外植体污染率较大,在成活后30d后出现非胚性的愈伤组织,成活后容易遭受内生菌污染,如图2A所示;1%的次氯酸钠的成活率最高,外植体在30d后出现胚性愈伤组织并分化出叶片,如图2B所示,同样也存在着少量的内生菌污染,需要通过不断更换培养基消除内生菌的影响。初代培养

时,剥取茎尖在MS (1/2N)+蔗糖 (30.0g/L)+琼脂 (7.0g/L)+ZT (1.0mg/L)+IAA (0.1mg/L)+PVP-40 (0.6g/L)的培养基中进行初代培养,成活后的外植体均能正常生长。

[0083] 实施例3(考察甜菜碱浓度在增殖培养过程中对增殖的影响)

[0084] 实施例3与实施例1步骤2)的区别仅在于:调整甜菜碱的浓度分别为0、10、50、100和2000 $\mu\text{mol/L}$,其它条件和步骤同实施例1。对组培苗增殖的测试结果如表2和图3所示。

[0085] 表2不同浓度甜菜碱处理对小果甜柿组培苗增殖的影响

| 甜菜碱浓度($\mu\text{mol/L}$) | 分蘖数 | 株高(mm) | 叶片数 | 茎节数 |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 1.28 \pm 0.07 ^b | 27.00 \pm 1.28 ^a | 8.05 \pm 0.27 ^b | 6.03 \pm 0.24 ^b |
| 10 | 1.23 \pm 0.07 ^b | 29.17 \pm 1.30 ^a | 7.67 \pm 0.34 ^b | 5.98 \pm 0.27 ^b |
| [0086] 50 | 1.26 \pm 0.07 ^b | 30.93 \pm 1.25 ^a | 7.77 \pm 0.33 ^b | 5.93 \pm 0.22 ^b |
| 100 | 1.41 \pm 0.08 ^{ab} | 31.90 \pm 1.47 ^a | 8.54 \pm 0.22 ^{ab} | 6.85 \pm 0.22 ^{ab} |
| 1000 | 1.59 \pm 0.09 ^a | 32.87 \pm 1.15 ^a | 9.49 \pm 0.25 ^a | 7.40 \pm 0.16 ^a |
| 2000 | 1.23 \pm 0.08 ^b | 29.23 \pm 1.13 ^a | 8.26 \pm 0.24 ^b | 6.26 \pm 0.17 ^b |

[0087] 在100到1000 $\mu\text{mol/L}$ 的甜菜碱浓度范围内,分蘖数、株高、茎节数、叶片数与浓度都呈正相关,由表2可知,10、50、100、2000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的甜菜碱与对照相比分蘖数无显著性差异,说明在较低浓度或超过一定浓度时甜菜碱对组培苗增殖无明显作用,增殖作用在0到2000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内先增加后降低。在1000 $\mu\text{mol/L}$ 甜菜碱浓度处理的增殖效果最佳,平均增殖的分蘖数为1.59个,株高为32.87mm,叶片数达到9.49片/每株,茎节数为7.40/每株(表4)。方差分析结果显示,不同浓度甜菜碱处理下小果甜柿组培苗的株高无显著性差异,1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度甜菜碱与100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理无显著差异,但与其他处理相比分蘖数、叶片数、茎节数均存在显著性差异(表4)。如图3A至图3F所示,不同浓度甜菜碱处理30d后,植株生长状况良好,叶色浓绿,表明基本培养基DKW所含成分能满足小果甜柿生长所需,且图3E组所示1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理,组培苗的增殖状况和生长状况明显优于其他组(图3A-图3D组和图3F组),图3D组其次。

[0088] 实施例4(考察IBA、NAA和MT在浸蘸处理中对生根的影响)

[0089] 实施例4与实施例1步骤3)的区别仅在于:调整植物生长调节剂种类(NAA、IBA或MT)和用量,其它条件和步骤同实施例1。具体种类和用量如表3所示,生根的测试结果如表4-表7以及图4所示。

[0090] 表3浸蘸生根法正交设计试验因素与水平

| 因素 | 水平 | | |
|----------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 |
| [0091] A: 激素种类 | NAA | IBA | MT |
| B: 浓度(mg/L) | 50 | 100 | 200 |
| C: 处理时间(min) | 10 | 30 | 60 |

[0092] 表4不同处理下生根性状及多重比较(浸蘸法)

| 处理 | 因素 | | | | | | |
|----------|-----|-----|----|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | A | B | C | 根长 (cm) | 根系表面积 (cm ²) | 根系体积 (cm ³) | 生根率 (%) |
| 1 | NAA | 50 | 5 | 15.47±0.89 ^{bc} | 6.38±0.56 ^{ab} | 0.16±0.01 ^{ab} | 79.17±5.23 ^a |
| 2 | NAA | 100 | 10 | 23.17±1.11^a | 6.73±0.36 ^{ab} | 0.19±0.01 ^a | 90.00±4.47^a |
| 3 | NAA | 200 | 15 | 18.30±1.00 ^{ab} | 7.70±0.53^a | 0.20±0.01^a | 77.14±5.20 ^a |
| [0093] 4 | IBA | 50 | 15 | 11.03±1.61 ^{cd} | 3.51±0.62 ^c | 0.11±0.02 ^{bc} | 28.00±4.80 ^{bc} |
| 5 | IBA | 100 | 5 | 14.29±1.28 ^{bcd} | 4.09±0.36^c | 0.12±0.01^{bc} | 65.56±5.50^{ab} |
| 6 | IBA | 200 | 10 | 12.01±1.13^{cd} | 4.59±0.41 ^{bc} | 0.17±0.02 ^a | 70.00±3.87 ^a |
| 7 | MT | 50 | 10 | 7.37±0.76 ^d | 2.58±0.29 ^c | 0.09±0.02 ^{bc} | 26.67±3.30 ^c |
| 8 | MT | 100 | 15 | 6.78±0.57 ^d | 2.14±0.47 ^c | 0.05±0.01 ^c | 10.00±1.29 ^c |
| 9 | MT | 200 | 5 | 6.41±1.05 ^d | 2.28±0.28 ^c | 0.07±0.01 ^c | 20.00±1.80 ^c |

[0094] 注:A:激素种类;B:激素浓度(mg/L);C处理时间;同一列中的不同字母表示差异显著($p \leq 0.05$)。

[0095] 表5不同处理对小果甜柿生根各项指标的方差分析(浸蘸法)

| 指标 | 变异来源 | 平方和 | 自由度 df | 均方 | F | P |
|-----------|------|----------|----------|---------|--------|--------|
| [0096] 根长 | 激素种类 | 1664.191 | 2 | 832.096 | 73.555 | 0.000* |

| | | | | | | | |
|--------|-------|---------|-----------|--------|-----------|---------|--------|
| | 处理浓度 | 121.100 | 2 | 60.550 | 5.352 | 0.007* | |
| | 处理时间 | 123.692 | 2 | 61.846 | 5.467 | 0.006* | |
| | 误差 | 757.940 | 67 | 11.313 | | | |
| | 根系表面积 | 激素种类 | 259.025 | 2 | 129.513 | 55.159 | 0.000* |
| | | 处理浓度 | 8.645 | 2 | 4.323 | 1.841 | 0.166 |
| | | 处理时间 | 0.871 | 2 | .435 | .185 | 0.831 |
| | | 误差 | 180.794 | 77 | 2.348 | | |
| [0097] | 根系体积 | 激素种类 | 0.119 | 2 | 0.060 | 40.424 | 0.000* |
| | | 处理浓度 | 0.008 | 2 | 0.004 | 2.816 | 0.069 |
| | | 处理时间 | 0.012 | 2 | 0.006 | 4.174 | 0.021* |
| | | 误差 | 0.080 | 54 | 0.001 | | |
| | 生根率 | 激素种类 | 37272.917 | 2 | 18636.459 | 148.744 | 0.000* |
| | | 处理浓度 | 1303.384 | 2 | 651.692 | 5.201 | 0.009* |
| | | 处理时间 | 5046.520 | 2 | 2523.260 | 20.139 | 0.000* |
| | | 误差 | 5888.732 | 47 | 125.292 | | |

[0098] 注:*表示 $p < 0.05$ 的显著相关

[0099] 表6不同处理后小果甜柿生根各项指标隶属函数值(浸蘸法)

| 处理 | 生根率 | 根长 | 根表面积 | 根体积 | 综合隶属函数值 |
|----|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1 | 0.8646 | 0.5411 | 0.7623 | 0.7112 | 2.8792 |
| 2 | 1.0000 | 1.0000 | 0.8261 | 0.9266 | 3.7527 |
| 3 | 0.8393 | 0.7367 | 1.0000 | 1.0000 | 3.5760 |
| 4 | 0.2250 | 0.2113 | 0.2465 | 0.4056 | 1.0884 |
| 5 | 0.6945 | 0.5060 | 0.3494 | 0.4727 | 2.0226 |
| 6 | 0.7500 | 0.3325 | 0.4393 | 0.8124 | 2.3342 |
| 7 | 0.2084 | 0.0608 | 0.0777 | 0.2352 | 0.5820 |
| 8 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| 9 | 0.1250 | 0.0884 | 0.0251 | 0.0866 | 0.3251 |

[0101] 表7综合隶属函数极差分析(浸蘸法)

| | 因素 | A | B | C |
|--------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | K _{j1} | 10.21 | 4.55 | 5.23 |
| | K _{j2} | 5.45 | 5.78 | 6.67 |
| | K _{j3} | 0.91 | 6.24 | 4.66 |
| [0102] | k _{j1} | 3.40 | 1.52 | 1.74 |
| | k _{j2} | 1.82 | 1.93 | 2.22 |
| | k _{j3} | 0.30 | 2.08 | 1.55 |
| | R _j | 3.10 | 0.56 | 0.67 |
| | 最佳水平 | A ₁ | B ₃ | C ₂ |

[0103] 注:K_j为同一因素不同水平p值之和。k_j为同一因素不同水平p值的平均值,R_j为极差。

[0104] IBA、NAA和MT浸蘸处理对生根的影响结果分析:

[0105] 由表4多重比较分析以及图4表明,根长效果最好为100mg/L NAA处理10min(浸蘸处理2),主根长度达到23.17cm,与200mg/L NAA处理15min(浸蘸处理3)无显著差异,但与其他处理组均存在显著差异。

[0106] 表5方差分析结果表明,不同处理因素对组培苗根长的影响不同,各处理因素F比值由大到小顺序为激素种类、处理时间、调节剂质量浓度,激素种类、处理时间、质量浓度显著影响根系长度($p < 0.05$);且激素种类显著影响根系表面积及根系体积,除激素种类外处理时间也显著影响根系体积($p < 0.05$)。根系表面积及根系体积最优为200mg/L NAA处理15min(浸蘸处理3),根系表面积达到7.70cm²,根系体积为0.20cm³,使用200mg/L NAA处理15min与组内其他处理根系表面积及体积无明显差异,但与其他处理组存在显著差异。

[0107] 单独NAA处理的生根率平均为82.1%,显著高于其他两种激素处理,其中100mg/L NAA浸蘸处理10min生根率效果最高,达到90%,表5方差分析,各处理因素F比值最大为调节剂质量浓度,调节剂质量种类与处理时间F比值相同,激素种类、处理时间、调节剂质量浓度均显著影响生根率。

[0108] 由上述分析可知,本发明浸蘸生根中优选的植物生长调节剂为NAA和IBA,且NAA的浓度优选为50~200mg/L,处理时间优选为5~15min;IBA的浓度优选为100~200mg/L,处理时间优选为5~10min;使得本发明生根率达到65.56~90.00%,根系最为健壮根系平均总长达12.01~23.17cm,根系平均表面积为4.09~7.70cm²,根系平均体积为0.12~0.20cm³。

[0109] 实施例5(采用两步生根法)

[0110] 实施例5与实施例1步骤3)的区别仅在于:采用两步生根法进行生根培养,其它步骤及条件同实施例1。

[0111] 两步生根法的具体条件:将增殖培养中获得的无根苗切去愈伤组织接于1/2MS+0.5mg/L NAA+0.2mg/L IBA+5mg/L MT+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40的生根培养基中,进行10天暗处理后转入1/2MS+1mg/L活性炭+30mg/L蔗糖+7g/L琼脂+0.6g/L PVP-40的基本培养基诱导生根。

[0112] 经测试,生根率达到71.50%,根系最为健壮根系平均总长达24.14cm,根系平均表面积为9.74cm²,根系平均体积为0.27cm³。

[0113] 实施例5相对实施例1,采用两步生根法的生根率略有降低,但根系最为健壮,根系平均总长、根系平均表面积和根系平均体积均有明显提升;与现有技术相比(颐和园古柿树组织培养快繁体系的建立,郑广顺等),本发明制备的不定根无菌苗,根部更加粗壮,根系多,更易存活,耐性好。

[0114] 实施例6(考察暗处理时间以及植物生长调节剂浓度在两步生根法中对生根的影响)

[0115] 实施例6与实施例5步骤3)的区别仅在于:调整暗处理时间以及植物生长调节剂(NAA、IBA和MT)和用量,其它条件和步骤同实施例5。具体种类和用量如表8所示,生根的测试结果如表9-12和图5所示。

[0116] 表8两步生根法正交设计试验因素与水平

| 因素 | 水平 | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 |
| [0117] A: 暗处理天数 | 5 | 10 | 15 |
| B: NAA 浓度 (mg/L) | 0.1 | 0.5 | 1 |
| [0118] C: IBA 浓度 (mg/L) | 0.2 | 1 | 1.5 |
| D: MT 浓度 (mg/L) | 1 | 1.5 | 5 |

[0119] 表9不同处理下生根性状及多重比较(两步生根法)

| 处理 | 因素 | | | | 根长 (cm) | 根系表面积 (cm ²) | 根系体积 (cm ³) | 生根率 (%) |
|----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | A (d) | B (mg/L) | C (mg/L) | D (mg/L) | | | | |
| 1 | 5 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 5.18±0.35 ^d | 2.98±0.57 ^d | 0.13±0.01 ^{bc} | 37.92±9.93 ^a |
| 2 | 5 | 0.5 | 1 | 1 | 15.87±0.61 ^b | 6.47±0.30 ^{bc} | 0.19±0.01 ^{bc} | 53.03±9.38 ^a |
| [0120] 3 | 5 | 1 | 1.5 | 5 | 20.99±0.99 ^a | 9.59±0.75 ^a | 0.29±0.01^a | 60.93±5.69 ^{ab} |
| 4 | 10 | 0.5 | 0.2 | 5 | 24.14±0.83^a | 9.74±0.70^a | 0.27±0.01 ^a | 71.50±9.49 ^{ab} |
| 5 | 10 | 0.1 | 1.5 | 1 | 16.80±0.60 ^b | 5.56±0.41 ^{bcd} | 0.16±0.01 ^{bc} | 46.00±9.45 ^{ab} |
| 6 | 10 | 1 | 1 | 0.1 | 15.62±0.72 ^b | 7.65±0.78 ^{ab} | 0.26±0.01 ^a | 51.85±12.16^{ab} |
| 7 | 15 | 0.5 | 1.5 | 0.1 | 10.79±0.47^c | 4.37±0.38^{cd} | 0.13±0.01^c | 80.00±5.96^{ab} |
| 8 | 15 | 0.1 | 1 | 5 | 13.81±1.16 ^{bc} | 4.29±0.68 ^{cd} | 0.14±0.01 ^{bc} | 62.73±7.64 ^{ab} |
| 9 | 15 | 1 | 0.2 | 1 | 13.65±0.95 ^{bc} | 5.50±0.57 ^{bcd} | 0.20±0.01 ^c | 74.17±5.83 ^b |

[0121] 注:A:暗处理天数;B:NAA浓度;C:IBA浓度;D:MT浓度;同一列中的不同字母表示差

异显著 ($p \leq 0.05$)。

[0122] 表10不同处理对小果甜柿生根各项指标的方差分析(两步生根法)

| | 指标 | 变异来源 | 平方和 | 自由度 <i>df</i> | 均方 | <i>F</i> | <i>P</i> |
|--------|-------|-----------|---------|---------------|------------------------|----------|----------|
| [0123] | 根长 | 暗处理天数 | 518.089 | 2 | 259.045 | 52.194 | 0.000* |
| | | NAA | 343.693 | 2 | 171.847 | 34.624 | 0.000* |
| | | IBA | 44.052 | 2 | 22.026 | 4.438 | 0.015* |
| | | MT | 898.231 | 2 | 449.116 | 90.490 | 0.000* |
| | | 误差 | 342.458 | 69 | 4.963 | | |
| [0124] | 根系表面积 | 暗处理天数 | 113.583 | 2 | 56.792 | 20.055 | 0.000* |
| | | NAA | 124.552 | 2 | 62.276 | 21.991 | 0.000* |
| | | IBA | 2.878 | 2 | 1.439 | 0.508 | 0.604 |
| | | MT | 97.905 | 2 | 48.952 | 17.286 | 0.000* |
| | | 误差 | 201.060 | 71 | 2.832 | | |
| | 根系体积 | 暗处理天数 | 0.082 | 2 | 0.041 | 22.213 | 0.000* |
| | | NAA | 0.135 | 2 | 0.068 | 36.438 | 0.000* |
| | | IBA | 0.000 | 2 | 7.829×10^{-5} | 0.042 | 0.959 |
| | | MT | 0.055 | 2 | 0.028 | 14.880 | 0.000* |
| | | 误差 | 0.143 | 77 | 0.002 | | |
| 生根率 | 暗处理天数 | 8391.958 | 2 | 4195.979 | 5.440 | 0.006* | |
| | NAA | 6284.956 | 2 | 3142.478 | 4.074 | 0.020* | |
| | IBA | 739.724 | 2 | 369.862 | 0.479 | 0.621 | |
| | MT | 1359.823 | 2 | 679.912 | 0.881 | 0.418 | |
| | 误差 | 67881.271 | 88 | 771.378 | | | |

[0125] 注:*表示 $p < 0.05$ 的显著相关。

[0126] 表11不同处理后小果甜柿生根各项指标隶属函数值(两步生根法)

| 处理 | 根长 | 根表面积 | 根体积 | 生根率 | 综合隶属函数值 |
|----|--------|--------|--------|--------|---------|
| 1 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0003 |
| 2 | 0.5642 | 0.5167 | 0.3370 | 0.3099 | 1.7279 |
| 3 | 0.8343 | 0.9786 | 1.0000 | 0.4720 | 3.2849 |
| 4 | 1.0000 | 1.0000 | 0.8403 | 0.6888 | 3.5291 |
| 5 | 0.6130 | 0.3821 | 0.1731 | 0.1657 | 1.3339 |
| 6 | 0.5510 | 0.6903 | 0.7923 | 0.2857 | 2.3193 |
| 7 | 0.2961 | 0.2057 | 0.0000 | 1.0000 | 1.5018 |
| 8 | 0.4552 | 0.1932 | 0.0208 | 0.6581 | 1.3273 |
| 9 | 0.4467 | 0.3723 | 0.3869 | 0.8974 | 2.1033 |

[0127] 表12综合隶属函数极差分析(两步生根法)

| 因素 | A | B | C | D |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Lm1 | 5.01 | 2.66 | 5.63 | 3.82 |
| Lm2 | 7.18 | 6.15 | 3.06 | 4.56 |
| Lm3 | 4.93 | 4.79 | 5.60 | 6.72 |
| lm1 | 1.67 | 0.89 | 1.88 | 1.27 |
| lm2 | 2.39 | 2.05 | 1.02 | 1.52 |
| lm3 | 1.64 | 1.60 | 1.87 | 2.24 |
| Rm | 0.75 | 1.16 | 0.86 | 0.96 |
| 最佳水平 | A ₂ | B ₂ | C ₁ | D ₃ |

[0131] 注:L_m为同一因素不同水平p值之和。lm为同一因素不同水平p值的平均值,R_m为极差。

[0132] 暗处理时间以及植物生长调节剂浓度在浸蘸处理中对生根的影响:

[0133] 表9多重比较分析以及图5表明,根长和根系表面积效果最好为处理组4:0.5mg/L NAA+0.2mg/L IBA+5mg/L MT暗处理10d,根长达到24.14cm,根系表面积达到9.74cm²。根系体积效果最好为处理组3:1mg/L NAA+1.5mg/L IBA+5mg/L MT暗处理5d,根系体积达到0.29cm³。生根率最高处理组7为0.5mg/L NAA+1.5mg/L IBA+0.1mg/L MT暗处理15d,生根率达到80%。

[0134] 表10方差分析结果表明,不同处理因素对组培苗根长、根系表面积、根系体积及生根率的影响不同,根长各处理因素F比值由大到小顺序为MT质量浓度、暗处理天数、NAA质量浓度、IBA质量浓度;根系表面积及根系体积各处理因素F比值由大到小顺序为NAA质量浓度、暗处理天数、MT质量浓度、IBA质量浓度;生根率各处理因素F比值由大到小顺序为暗处理天数、NAA质量浓度、MT质量浓度、IBA质量浓度。NAA、IBA、MT质量浓度及暗处理天数显著

影响根系长度 ($p < 0.05$), 除 IBA 外, 暗处理天数、NAA 质量浓度及 MT 质量浓度显著影响根系表面积及根系体积, 生根率只与暗处理天数及 NAA 质量浓度存在显著差异。

[0135] 由上述分析可知, 本发明两步生根中暗处理天数优选 5~15 天, NAA 浓度优选为 0.5~1mg/L (排除处理组 1、处理组 5 和处理组 8 的方案), IBA 浓度优选为 0.2~1.5mg/L, MT 浓度优选为 0.1~5mg/L; 使得本发明生根率达到 51.85~80.00%, 根系最为健壮根系平均总长达 10.79~24.14cm, 根系平均表面积为 4.37~9.74cm², 根系平均体积为 0.13~0.29cm³。

[0136] 生根效果综合评价

[0137] (1) 通过实施例 4 中的表 6 分析, 浸蘸法各处理的综合隶属函数值处理 2>处理 3>处理 1>处理 6>处理 5>处理 4>处理 7>处理 9>处理 8, 综合隶属函数值最高为处理 2。根据每个处理的平均值 \bar{p} 进行极差分析, 如表 7 所示, 极差 R 值大小为生长调节剂种类 (3.10)>生长调节剂浓度 (0.56)>处理时间 (0.67), 表明生长调节剂种类对小果甜柿生根效果影响最大, 生长调节剂浓度次之, 处理时间影响最小, 最佳方案为 A₁B₃C₂ (浸蘸法处理 2), 即 200mg/L NAA 处理 10min。

[0138] (2) 通过实施例 6 中的表 11 分析, 两步生根法各处理的综合隶属函数值处理 4>处理 3>处理 6>处理 9>处理 2>处理 7>处理 5>处理 8>处理 1, 综合隶属函数值最高为处理 4。根据每个处理的平均值 \bar{p} 进行极差分析, 如表 12 所示, 极差 R 值大小为 NAA 浓度 (1.16)>MT 浓度 (0.96)>IBA 浓度 (0.86)>暗处理天数 (0.75), 表明 NAA 浓度对小果甜柿生根效果影响最大, MT 浓度次之, IBA 浓度第三, 暗处理天数、影响最小, 较佳方案为 A₂B₂C₁D₃, 即 0.5mg/L NAA+0.2mg/L IBA+5mg/L MT 添加至基本培养基暗处理 10 天。

[0139] (3) 结合浸蘸法可知, 单独的 MT 处理对生根效果不明显, 甚至远不如 IBA 单独处理的效果, 但将其与 NAA 和 IBA 复配进行两步法生根使用时, 能够产生协同作用, 在保证生根率的前提下, 有效促进植株根部粗壮, 利于提高存活率。

[0140] 实施例 7 (考察闭瓶炼苗时间对浸蘸法所得组培苗移栽驯化的影响)

[0141] 实施例 7 与实施例 1 步骤 4) 的区别仅在于: 调整闭瓶炼苗时间, 其它条件和步骤同实施例 1。闭瓶炼苗时间以及具体测试结果如下表 13 所示。

[0142] 表 13 闭瓶炼苗对小果甜柿驯化移栽成活率的影响 (浸蘸法)

| | 处理 | 成活率 |
|--------|---------------------|--------|
| [0143] | 闭瓶炼苗 3 d, 开盖炼苗 3 d | 32% |
| | 闭瓶炼苗 7 d, 开盖炼苗 3 d | 52.5% |
| | 闭瓶炼苗 10 d, 开盖炼苗 3 d | 35.25% |

[0144] 实施例 8 (考察闭瓶炼苗时间对两步生根法所得组培苗移栽驯化的影响)

[0145] 实施例 8 与实施例 5 步骤 4) 的区别仅在于: 调整闭瓶炼苗时间, 其它条件和步骤同实施例 5。闭瓶炼苗时间以及具体测试结果如下表 14 所示。

[0146] 表 14 闭瓶炼苗对小果甜柿驯化移栽成活率的影响 (两步生根法)

| | 处理 | 成活率 |
|--------|---------------------|--------|
| [0147] | 闭瓶炼苗 3 d, 开盖炼苗 3 d | 36% |
| | 闭瓶炼苗 7 d, 开盖炼苗 3 d | 57.33% |
| | 闭瓶炼苗 10 d, 开盖炼苗 3 d | 41.33% |

[0148] 木本植物在组织培养中,组培苗长期以培养基中的营养物质作为养分,因此苗木以异养生长为主,光合作用为辅。因此在驯化时,首先要让组培苗从异养状态过渡到主要由光合自养生长。组培苗在培养瓶中处于一个相对封闭的状态,相对湿度高(80%-95%),光照不足(一般容器的光照为1500-3000lx左右,远低于室外的自然光照),移栽驯化时需要从较高湿度及弱光照状态逐步过渡到自然环境状态下,而高温高湿状态下病菌繁殖速度快,组培苗污染率增加。如表13试验结果显示,由浸蘸法所得小果甜柿组培苗通过闭瓶炼苗7天,再开盖炼苗3天,苗木成活率从32%提升到52.5%(相对闭瓶炼苗3d),而两步生根法所得小果甜柿组培苗通过闭瓶炼苗7天,再开盖炼苗3天,苗木成活率从36%提升到57.33%;此外过长的闭瓶炼苗会在强光下,苗木失水会加速,因此炼苗时间不宜过长。

[0149] 与现有技术相比,本发明中,消毒灭菌剂的最佳浓度及使用时间对柿组培快繁体系建立起着重要作用,在本发明体系中,经研究发现,0.5%浓度的次氯酸钠处理小果甜柿后污染程度越高,小果甜柿外植体存活率较低,而2%浓度次氯酸钠处理小果甜柿后污染程度降低了,但消毒时外植体也被破坏,导致成活率也相应下降,在1%的次氯酸钠处理6min时,污染率和消毒致死率都控制在一定范围,成活率也是最高的。不同于常规的甜菜碱经常作为抵抗非生物胁迫的保护剂应用于植物中的作用,本发明在增殖培养基中添加100~1000 μ mol/L的甜菜碱来提高小果甜柿的增殖速率,特别是在培养基中添加1000 μ mol/L甜菜碱,小果甜柿的增殖效果达到了最佳,这一点在柿中此前没有相关的报道。针对难生根的问题,本发明利用两种方法对小果甜柿进行探究,一种是利用植物生长调节剂浸蘸新梢基部,另一种是两步生根法即生根初期在含有生长调节剂的培养基上进行暗培养而后转入不含生长调节剂的培养基上生根,尽管浸蘸法相对于两步生根法具有节约培养基使用的优势且生根率最高达到了90%,但是由于长时间暴露在空气中污染率增加,而两步生根法虽然多进行了一次更换培养基,但是污染率降低了,生根率最高也达到了80%,因此本发明优选两步生根法。

[0150] 研究表明,植物根系的生长发育受植物激素的严格调控,生长素、细胞分裂素、乙烯(ETH)等调控侧根发生、根细胞伸长、根毛形成等过程。许多研究表明,柿不定根属于诱导型根原基,需要经过一定的刺激才能诱导根原基的发生,外源生长素作为一种诱导生根的调节物质,可以改变植物内源激素的水平,通过调节内源激素平衡进而对根系细胞生长发育发挥作用,本发明采用IBA、NAA和褪黑素配合用来诱导柿组培苗生根,在柿组培苗生根中起着重要的作用,产生了正协同效果,并利用正交实验设计,通过两种生根方式,探究以NAA、IBA及MT作为生长调节剂时,浸蘸处理及两步生根法处理生根的最佳条件,其中浸蘸处理最佳方案为A₁B₃C₂,即200mg/L NAA处理10min;而两步生根法处理最佳方案为A₂B₂C₁D₃,即0.5mg/L NAA+0.2mg/L IBA+5mg/L MT添加至基本培养基暗处理10天。最后通过控制闭瓶和开盖的炼苗天数,成功驯化小果甜柿组培苗,构建了完整的柿离体培养繁殖体系。

[0151] 如图6所示,本发明构建的完整的柿离体培养繁殖体系包括以下步骤:

[0152] (1) 初代培养包括:a.休眠芽;b.75%酒精消毒;c.1%次氯酸钠消毒;d.手术刀剥除芽外部数层鳞片;e.接种到培养基中;f.不定芽形成及伸长(培养30d);g.初代培养带有4-5片叶的茎段(1-1.5cm);h.初代培养带有芽的茎段;i.初代培养30d后组培苗;

[0153] (2) 增殖培养包括:j.继代培养30d后带芽茎段;k.继代培养30d后带有4-5片叶的茎段(2-3cm长);

[0154] (3) 生根培养:l.生根组培苗;

[0155] (4) 驯化移栽:m.组培苗驯化;n.移栽2个月后植株。

[0156] 本发明解决了主栽甜柿—“富有”系品种与习用砧木君迁子嫁接不亲和,极大制约了甜柿的推广和甜柿产业的健康发展的问题。本发明利用NAA、IBA与褪黑素的组合激素进行实验,发现三种激素协同作用可显著提高“小果甜柿”组培苗生根率,且根系健壮;目前实生繁殖(种子繁殖)育苗所需周期较长,所获得的苗木一致性差,苗木达到可嫁接状态所需时间在一年以上,本发明移栽至大田6-8个月就可作为砧木嫁接(6个月就可达到粗度在4mm左右),因此本发明从继代培养、生根、移栽驯化整个周期在11月左右,大大缩短了育苗周期。

[0157] 以上所述本发明的具体实施方式,并不构成对本发明保护范围的限定。任何根据本发明的技术构思所做出的各种其他相应的改变与变形,均应包含在本发明权利要求的保护范围内。



图1

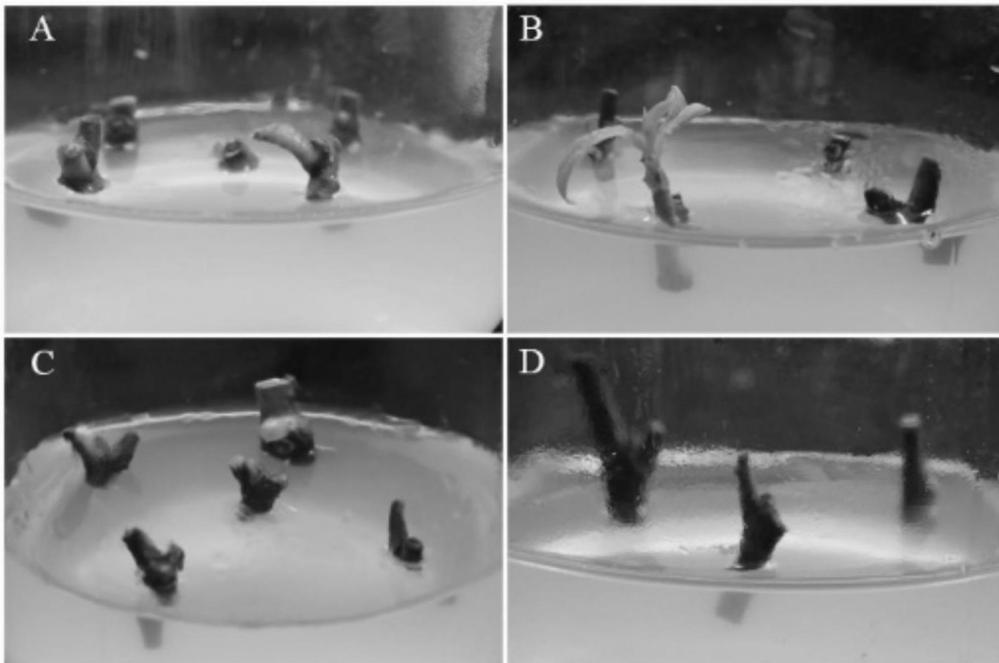


图2

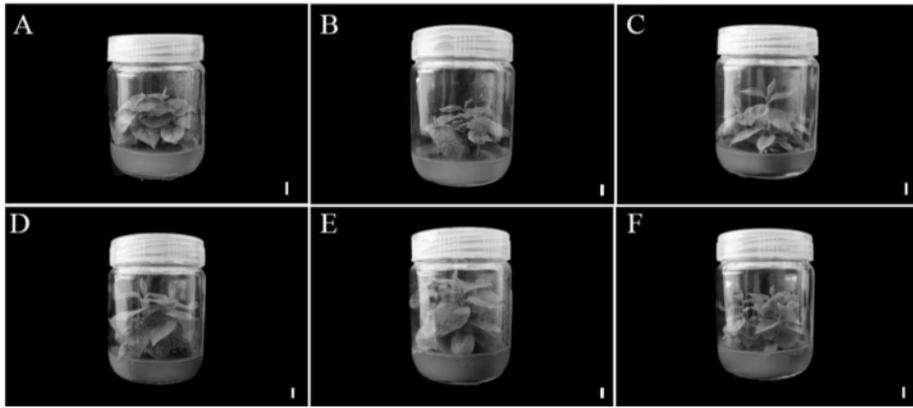


图3

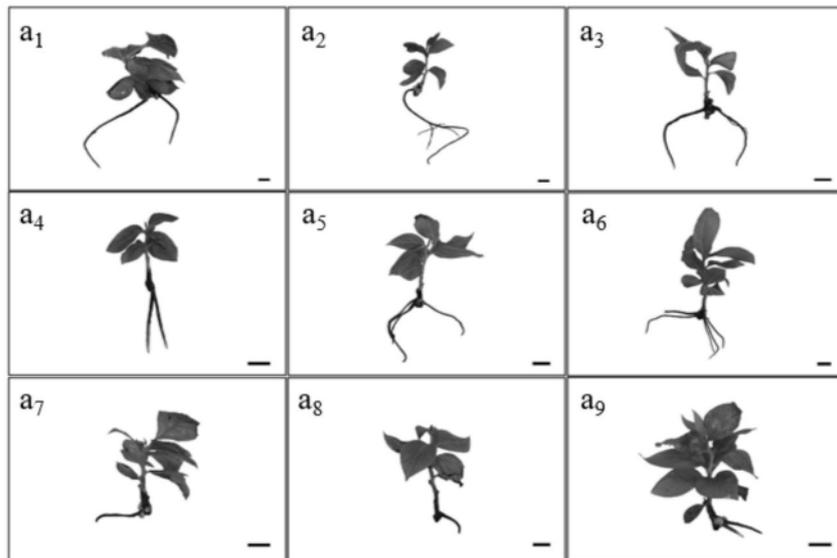


图4

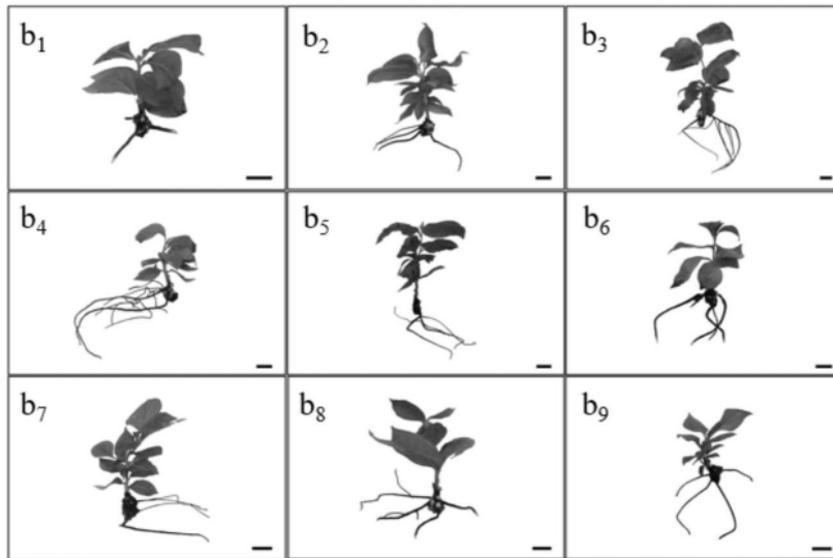


图5

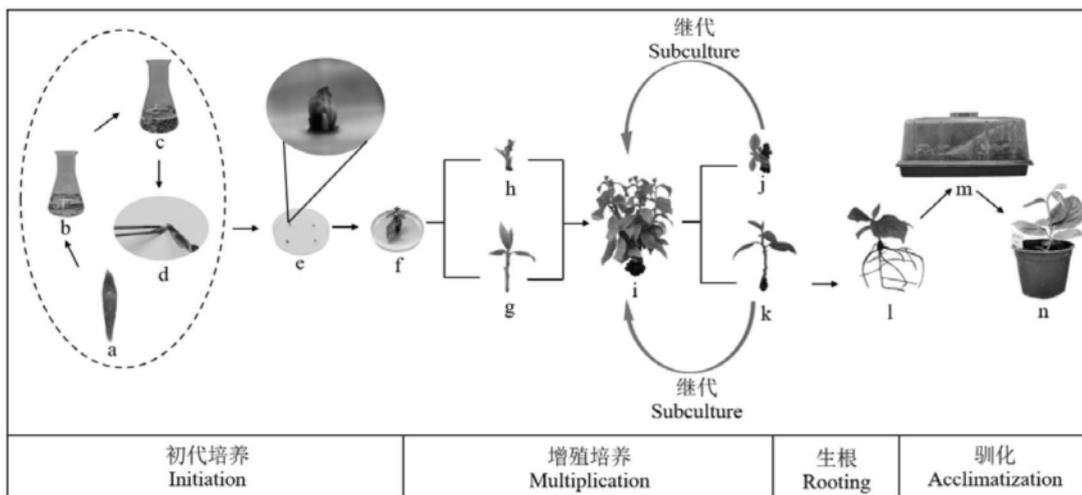


图6