

DOI: 10: 3969/j. issn. 1000-2006. 201609034

壳斗科植物组织培养研究进展

邓小梅^{1,2}, 吴乔娜¹, 李蕊萍¹, 赵梦秋¹, 林洁莹¹, 奚如春^{1,2*}

(1.广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642; 2.华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 壳斗科植物是北半球热带、亚热带及温带森林植被的主要建群树种, 其中在我国分布广泛, 具有重大的社会经济与生态价值, 如保持水土、生产优质材、园林应用等。植物组织培养技术是其优良种质繁殖及无性化推广的主要途径之一。从组培苗再生途径、外植体选择、基本培养基及植物生长调节剂应用等方面总结了壳斗科植物组织培养研究的进展, 在外植体选择中应考虑到选择的诱导途径, 培养基和植物生长调节剂的选择应根据不同树种在基本培养基上做相应调整。并探讨了其组培过程中存在的污染率高、褐化严重、增殖芽伸长、生根困难等问题及解决方法, 旨在进一步推动壳斗科 (Fagaceae) 植物组织培养的发展。

关键词: 壳斗科; 组织培养; 基本培养基; 植物生长调节剂

Research Progress on in vitro Micropropagation of Fagaceae Plants

DENG Xiaomei, WU Qiaona, LI Ruiping, ZHAO Mengqiu, LIN Jieying, XI Ruchun**

(College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Germplasm, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: Fagaceae is the major tree species in the Northern Hemisphere tropical, subtropical and temperate forest vegetation, which is widely distributed in China. And Fagaceae plants are of importance to socio-economic and ecological value, such as maintaining water and soil, producing high quality materials, gardening applications and so on. Plant tissue culture technology is one of the main ways for its excellent germplasm reproduction and asexualization promotion. This paper reviews the studying progress on micropropagation technique of Fagaceae plants, which is in terms of selections of explants, basic medium, and types and concentrations of plant-growth regulator. The induction pathways should be considered in the selection of explants. The selection of media and plant growth regulators should be adjusted according to different species. Furthermore, several problems such as contamination, browning in recent research and the difficulty in rooting and elongation of proliferation buds and their solutions were discussed, all of which above aims at promoting tissue culture of Fagaceae plants.

Keys: Fagaceae; tissue culture; basic medium; plant growth regulator

壳斗科 (Fagaceae) 植物起源古老, 其化石记录可追溯到白垩纪^[1], 是北半球热带、亚

收稿日期: 2017-09-10 修回日期: 2018-05-15

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2016B020233001); 广东省林业科技创新项目 (2014KJCX002)

第一作者: 邓小梅 (dxmei2006@scau.edu.cn), 教授。吴乔娜 (1009375829@qq.com)。*通信作者: 奚如春 (xirc2006@scau.edu.cn), 教授。

热带及温带森林植被的主要建群树种，是最重要的木本植物之一，全球约有 8 属 1047 种^[2]。我国共有 7 个属 300 多种^[3]。壳斗科植物是针阔叶混交林和常绿阔叶林的重要成分，具有较强的保持水土、涵养水源、防灾减灾等生态功能^[4]。我国的壳斗科植物分布广泛，资源丰富，是生产优质材、坚果、栲胶等的重要资源植物，具有重大的经济价值与生态价值^[3,5]。壳斗科植物树形优美，冠大荫浓，叶形奇特，花果美丽，可吸收有害物质等众多优良的园林特性，在欧美国家常被作为观赏植物种植^[6]。

在世界范围内，通过组织培养成功再生植株的植物种类已达 130 个科，1500 个种以上^[7]，其中木本植物达 400 多种（包含果树在内），并且在不断增加^[8]。壳斗科植物组织培养的研究起步较早，主要集中在栎属与栗属。栎属植物组织培养研究始于 1952 年，Jaquiot^[9]报道了 3 类栎类的组织发生现象（韧皮部形成后出现了愈伤组织）。20 世纪 80 年代栎类的组织培养研究盛行起来，研究较多的有德国、荷兰、西班牙、美国、日本、韩国等国家，涉及的树种多为对本国经济和生态作用巨大的栎类，如欧洲栓皮栎、北美红栎、麻栎、欧洲白栎等^[10]。植株再生方式主要以丛芽发生途径为主，少数种以体胚发生途径或器官发生途径获得成功。栗属植物组织培养始于 1947—1953 年，Jacquiot 用成龄（树龄 100a 以上）板栗的形成层作外植体，在无植物激素添加、成分明确的培养基上培养得到了愈伤组织，但未见明显的器官分化^[11]。随着植物组织培养技术的不断完善和研究的深入，迄今，国内外已开展组织培养研究的壳斗科植物有栎属的欧洲栓皮栎、麻栎^[12,13]、栓皮栎^[14]、冬青栎^[15]、北美红栎^[16,17]、辽东栎^[18]、夏栎^[19-20]、沈氏栎^[21]、蒙古栎^[22-24]、苏玛栎^[25]等，栲属的大叶栎^[26-27]和红锥，栗属的美洲板栗^[28]、板栗^[29-31]和锥栗^[32-33]等，石栎属的石栎^[34]，三棱栎属的三棱栎^[35]、青岗属的赤皮青冈^[36-37]等，不同树种组织培养效果不一。笔者主要从外植体、组培苗再生途径、基本培养基、植物生长调节剂种类及水平等方面探讨在壳斗科植物的组织培养研究现状，并对培养过程中常出现的污染率高、褐化严重、增殖芽伸长困难等问题及解决方法进行探讨。

1 外植体的选择

选择具有最大分化潜能的外植体是确保植物组织培养成功的前提^[38]。外植体基因型、外植体母本材料的年龄、所处发育阶段及生长环境、取材部位、取材季节及取材时天气状况、均可造成其生理状态的不同，从而影响组培体系的形态建成^[39]。壳斗科植物主要采用成熟或未成熟合子胚、子叶节、茎段、茎尖、叶片等为外植体。

外植体的基因型影响组培效果。杨志坚等^[33]以锥栗 14 个品种的成熟胚为外植体进行植物组织培养研究发现，芽分化率为 12%~72%，差异明显，其中‘油榛’芽诱导率最高。陈建华等在‘檀桥’、‘新田’、‘韶十八’、‘华光’、‘红栗’、‘铁粒头’、‘安1’、‘新田’、‘焦扎’、‘石丰’、‘九家种’等 11 个板栗品种试验中，愈伤组织诱导成功的品种只有‘檀桥’、‘新田’、‘韶十八’、‘华光’、‘红栗’；外植体中胚的愈伤组织诱导率最高，野外材料以茎段的诱导率最高，达 65%；不定芽的诱导中，檀桥生长最好；诱导生根中，华光可直接诱导出根^[40]。

不同取材部位, 诱导效果有明显不同。唐罗忠等^[41]以麻栎去皮种子、种子苗幼嫩茎段、大树嫩枝和大树1年生木质化枝条等5种材料为外植体建立无菌系, 结果表明, 种子苗幼嫩茎段和大树嫩枝的进瓶效果相对较好, 污染少、芽萌发率高、生长快。任鹏^[42]研究发现用燕山板栗3个月种子苗枝条中部茎段为外植体以直插或斜插方式或用下胚轴以平卧方式接种于适合培养基可快速获得无菌体系, 而腋芽与子叶由于褐化、污染、不能正常萌发等原因未能建立起无菌系。胚的愈伤组织诱导率最高, 为79%, 主要是由于胚为无菌的外植体, 且不发生褐变。来自营养器官的外植体以茎段的诱导率最大, 为65%; 叶柄次之, 为25%; 叶片的诱导情况最差, 这是由于叶片的褐变情况极为严重, 较难诱导出愈伤组织。1-2年生生长旺盛的赤皮青冈幼苗的顶芽、茎段及其幼嫩的叶片作为外植体, 通过实验对比, 腋芽更适合作为愈伤组织的诱导材料, 而从芽诱导时选取的是子叶节和顶芽^[37]。利用栓皮栎未成熟合子胚与叶片和茎段进行体胚诱导, 两者的诱导率间有显著差异, 其中未成熟合子胚体胚诱导率可达到57.8%, 叶片在35%左右, 而茎段的诱导率约有25%^[43]。

外植体的不同取材时期对组织培养能否成功有着较大的影响。3月上旬到4月上旬是成龄栓皮栎外植体采集的最适时期, 污染率均小于10%, 芽萌发率均大于90%^[44]。麻栎大树嫩枝采集的最适时期是4月和5月, 污染率为23.3%和29.7%, 萌发率为66.3%和55.9%; 幼苗茎段采集的最适时期是4月和6月, 污染率为14.3%和13.1%, 萌发率为72.1%和74.7%^[41]。

表1 部分壳斗科植物组织培养外植体选用情况

Table 1 Selection of Tissue Culture Explants of Some Fagaceae Plants

| 植物名称 species | 外植体 explant | 分化途径 differentiation pathway | 诱导率 induction rate | 组培效果 results |
|--|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 大叶栎 <i>Quercus griffithii</i> [27] | 嫩茎 | 丛芽诱导 | 无 | 完整植株 |
| 麻栎 <i>Quercus acutissima</i> [41] | 种子苗幼嫩茎段、大树嫩枝、木质化枝条、胚、种子 | 丛芽诱导 | 种子苗幼嫩茎段(74.7%)>大树嫩枝(66.3%) | 小芽 |
| 夏栎 <i>Quercus robur</i> [45] | 2~12个月的小苗带芽茎段 | 丛芽诱导 | 无 | 完整植株 |
| 板栗 <i>Castanea mollissima</i> 韶栗十八 ^[46] | 成熟胚 | 愈伤组织 | 成熟胚(79%)>茎段(65%)>叶柄(25%)>叶片(5%) | 愈伤组织 |
| 板栗 <i>Castanea mollissima</i> 燕山板栗 ^[42] | 下胚轴>种子苗枝条中部茎段>叶片 | 愈伤组织 | 下胚轴(79%)>种子苗枝条中部茎段(65%)>叶片(25%) | 直接生根发茎尖坏死, 间接生根发少量生根苗 |
| 栓皮栎 | 胚, 胚根≥叶片≥茎段 | 愈伤组织 | 胚, 胚根≥叶片≥茎段 | 未从愈伤组织诱导 |

| | | | | |
|--|-------------|-------|-------------------------------|--------------------|
| <i>Quercus variabilis</i> [44] | | | | 出芽、不定根 |
| 赤皮青冈 | 腋芽 | 愈伤组织 | 腋芽(83%)>顶芽(80%)>叶片(26%) | 分化出芽, 但有凋萎趋势 |
| <i>Cyclobalanopsis gilva</i> [37] | | | | |
| 栓皮栎 | 未成熟合子胚>叶片>茎 | 体细胞胚胎 | 未成熟合子胚(57.8%)>叶片(35%)>茎段(25%) | 转化植株中大多数植株在培养过程中枯死 |
| <i>Quercus variabilis</i> [43] | 段 | | | |
| 辽东栎 | 未成熟合子胚 | 体细胞胚胎 | 无 | 小植株脆弱易断 |
| <i>Quercus liaotungensis</i> ^[47] | | | | |

2 基本培养基

壳斗科植物组培中所用基本培养基主要有 MS、1/2MS、1/4MS、WPM、GD、BTM、SH 等。

其中中等含量无机盐的 WPM、BMT 以及 1/2MS 是锥属、栗属和栎属等较常使用的基本培养基。覃子海^[48]等在用优株萌芽条的带芽茎段进行丛芽诱导时使用的基本培养基是 BMT。王以红等^[27]选取 MS、BMT、ER 和 B5 为基本培养基对外植体进行腋芽诱导, 发现 BTM 培养基诱导率、生长状况显著优于其他 3 种培养基, 为大叶栎较适宜的基本培养基。Chalupa^[19]对夏栎的基本培养基进行了筛选, 结果表明, BTM、WPM 培养基有利于芽的诱导和生长, 1 个月芽长可达 3~5 cm; 在 MS 培养基中, 芽诱导仅为 10%~25%, 在 GD 培养基中, 虽芽诱导率较高, 但芽较短且芽数量少, 诱导出的芽很快会枯死。而谷栎的适用基本培养基是 BTM、GD, 在 WPM 中诱导的芽容易萎黄^[49]。张存旭等^[50]研究表明, 栓皮栎初代培养选用低盐培养基 WPM、BTM 和 GD, 附加 0.2 mg/L 6-BA, 产生的丛生芽较多, 茎粗壮, 均优于高盐培养基 MS。李文文^[22]等在基本培养基对蒙古栎腋芽启动和生长的影响试验中发现 1/2MS 最适合, 腋芽启动时间最早, 有效芽数量最多, 而且芽生长最为健壮, 其次是 WPM 培养基, BTM 和 MS 培养基效果明显较差。徐晨等^[30]选用 WPM、MS、DKW 为 3 种基本培养基, 筛选最适宜板栗种子萌发的基础培养基。试验表明, 在 WPM 培养基上萌发形成的幼苗苗高最高, 长势最好。DKW 次之, MS 最差。苏冬梅等^[46]将韶栗 18 号成年树当年萌发幼嫩枝条经消毒后, 分别接于附加 0.5 mg/L 6-BA、0.2 mg/L NAA 的 WPM、MS、Heller (大量元素)+Nitsch (微量元素)、White 4 种基本培养基上培养, 发现 WPM 和 MS 对韶栗 18 号茎段的愈伤组织诱导较好, 且 WPM 培养基中所诱导的愈伤组织为绿色, 体积大, 生长量大, 表明 WPM 最适合韶栗 18 号茎段愈伤组织的诱导; 而 Heller (大量元素)+Nitsch (微量元素) 培养基中愈伤组织长势最差, 褐化很严重; White 培养基虽然褐化很轻, 但诱导率很小, 未形成愈伤组织的外植体最终死亡。

但是不同的树种或者同一树种采用不同的诱导途径, 选用的基本培养基仍然有所差异, 甚至需要在常用基本培养基上调整某些元素含量。不同板栗品种的愈伤组织诱导中最适基本培养基也不同, 在‘檀桥’、‘韶十八’、‘华光’、‘红栗’等 11 个板栗品种中, MS 比 WPM 更利

于红栗的愈伤组织诱导，而有些品种在上述两种培养基上的愈伤组织诱导效果都不好^[40]。李玲莉在红锥带芽茎段的丛芽诱导试验，发现 SH 培养基、1/2MS 培养基、MS 培养基和 GD 培养基中，SH 培养基对幼嫩茎段的腋芽诱导效果显著优于 MS 和 GD 培养基，在 SH 培养基中，幼嫩茎段的成活率为 29.05%^[51]，这与覃子海^[48]的丛芽诱导中所用的 BMT 中盐培养基有所不同，可能是材料品种的不同。王艳娟等在赤皮青冈顶芽和子叶节的丛芽诱导中使用的基本培养基是 1/2MS；而腋芽的愈伤组织的诱导培养基是高盐的 MS^[37]。以‘油榛’胚为材料，选用 6 种培养基进行不定芽诱导培养，一个月后发现，M 培养基分化出的不定芽粗壮仅伴有少量愈伤，而材料在其他几种培养基中皆表现较差：MS 培养基中不定芽粗壮，但伴有大量愈伤，White、1/2MS 培养基中芽长势弱，WPM、改良 MS 中芽褐化严重。说明总盐量中等且 NH₄⁺与 NO₃⁻的比值为 1 的培养基适合锥栗不定芽诱导^[33]。于艳等^[52]以 5 年生麻栎茎段为外植体，研究不定芽诱导最适基本培养基，发现 1/4MS（2 倍铁盐）相较于 MS、WPM 最佳，诱导率达 86.7%，且褐化率仅为 5.0%。

同种材料在不同阶段所用培养基也有所不同。生根过程中的大量元素含量可以再诱导和继代培养基的基础上减半，通常认为低无机盐浓度的培养基更有利于组培苗不定根的生成^[53]。大叶栎在 BMT 基本培养基上继代，单芽在 1/2 BMT 培养基上进行生根诱导培养^[27]。红锥带芽茎段最适诱导培养基为 BMT，最适增殖培养基为 BMT，单芽在 1/2 BMT 培养基上生根效果好，炼苗成功后移栽成活率达 90%以上^[54]。板栗不定芽诱导最佳基本培养基为 MS，最佳增殖培养基为 GD^[55]。美洲栗的带芽茎段诱导，诱导培养基为改良 MS（增加钙镁），增值和芽伸长为改良 WPM，生根培养基为改良 1/2MS^[56]。蒙古栎促萌枝条的幼嫩茎段可通过器官发生途径获得再生植株，最佳初代培养基为 WPM，最佳不定芽增殖培养基 WPM，最佳生根培养基为 1/2MS^[23]。

表 2 部分壳斗科植物组织培养培养基选用情况

Table 2 Selection of tissue culture medium for some Fagaceae plants

| 植物名称 species | 外植体 explant | 分化途径 differentiation pathway | 诱导培养基 induction culture medium | 增殖培养 基 proliferati on medium | 生根培养 基 rooting medium |
|--|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------|
| 中盐诱导培养基 | | | | | |
| 板栗 <i>Castanea mollissima</i> ^[57] | 胚珠 | 体细胞胚胎 | WPM | 无 | 无 |
| 红锥 <i>Castanopsis hystrix</i> ^[48] | 优株的萌芽条,带芽茎段 | 丛芽诱导 | BMT | BMT | 1/2 BMT |
| 大叶栎 <i>Quercus griffithii</i> ^[27] | 腋芽 | 丛芽诱导 | BMT>MS、 B5>ER | BTM | 1/2 BMT |

| | | | | | |
|---|------------------------------------|--------|--|------------------|-----------------------------------|
| 夏栎 <i>Quercus robur</i> ^[45] | 2个月~1年的小苗的茎尖和短节间 | 丛芽诱导 | BTM、WPM>MS、GD | BTM、WPM | GD, BTM 和 WPM (盐含量减半, 不添加吡哆醇和氨基酸) |
| 谷栎 <i>Quercus lobata</i> ^[49] | 1年生小苗的带芽茎段 | 丛芽诱导 | BTM、GD >WPM | 无 | 无 |
| 蒙古栎 <i>Quercus mongolica</i> ^[22] | 水培催芽的枝条取其萌发的茎段 | 丛芽诱导 | 1/2MS > WPM > BTM 和 MS | 1/2MS > WPM | MS>1/4MS、1/2MS、WPM |
| 蒙古栎 <i>Quercus mongolica</i> ^[23] | 幼嫩茎段 | 器官发生 | WPM | WPM | 1/2MS |
| 栓皮栎 <i>Quercus variabilis</i> ^[50] | 4~6个月的实生苗茎段 | 丛芽诱导 | WPM、BTM 和 GD>MS | WPM、BTM 和 GD 无差异 | WPM (未做对比试验) |
| 板栗 <i>Castanea mollissima</i> 韶栗 18 号 ^[46] | 当年萌发幼嫩枝条 | 器官发生途径 | WPM>MS、Heller (大量元素)+Nitsch (微量元素)、White | 无 | 无 |
| 板栗 <i>Castanea mollissima</i> “燕山红栗” ^[30] | 种子萌芽的无菌苗, 取带腋芽茎段 | 丛芽诱导 | WPM>DKW>MS | WPM | WPM |
| 赤皮青冈 <i>Cyclobalanopsis gilva</i> ^[37] | 顶芽 | 丛芽诱导 | 1/2MS | 无 | 无 |
| 赤皮青冈 <i>Cyclobalanopsis gilva</i> ^[37] | 子叶节 | 丛芽诱导 | 1/2MS | 无 | 无 |
| 高盐诱导培养基 | | | | | |
| 夏栎 <i>Quercus robur</i> ^[58] | 继代组培苗和外植体茎段和叶片 | 体细胞胚胎 | MS | MS | MS |
| 辽东栎 <i>Quercus liaotungensis</i> ^[47] | 未成熟合子胚 | 体细胞胚胎 | MS | MS (增殖和成熟) | 1/2MS (萌发) |
| 赤皮青冈 <i>Cyclobalanopsis</i> | 腋芽 (出愈率 83%) > 顶芽 (80%) > 叶片 (26%) | 器官发生途径 | MS | MS (增值和分化) | 无 |

| | | | | | | |
|---|--------------|------|--------------|----------|------------|--|
| <i>gilva</i> ^[57] | | | | | | |
| 红锥 | 树桩萌生的幼嫩枝条，带芽 | 丛芽诱导 | SH | SH (未作 | 无 | |
| <i>Castanopsis</i> | 茎段 | | > MS 和 GD | 对比) | | |
| <i>hystrix</i> ^[51] | | | > 1/2MS | | | |
| 板栗 | 优树茎段 | 丛芽诱导 | MS | GD | 无 | |
| <i>Castanea mollissima</i> | | | | | | |
| “燕山早丰” ^[55] | | | | | | |
| 美洲板栗 | 带芽茎段 | 丛芽诱导 | MS | 改 良 | 改良 1/2MS | |
| <i>Castanea dentata</i> ^[56] | | | | WPM | | |
| 低盐诱导培养基 | | | | | | |
| 麻栎 | 5年生茎段 | 丛芽诱导 | 1/4MS (2倍铁 | 1/4MS (2 | 1/4MS (2倍铁 | |
| <i>Quercus acutissima</i> | | | 盐) | 倍铁盐) | 盐) | |
| ^[52] | | | (86.7%) >MS、 | | | |
| | | | WPM | | | |
| 调配培养基 | | | | | | |
| 锥栗 | 胚 | 丛芽诱导 | M>White、 | M | M | |
| <i>Castanea henryi</i> | | | 1/2MS、WPM、 | | | |
| “油榛” ^[33] | | | 改良 MS | | | |

3 植物生长调节剂种类及浓度对初代和继代培养的影响

在壳斗科植物的组织培养研究中，常用到植物生长调节剂中，生长素有IAA、NAA、2, 4-D, IBA, 细胞分裂素主要有6-BA、KT、TDZ、ZT。

同种植物采用不同的诱导途径，其植物生长调节剂的种类可能不同，用量也有所差异。如在锥栗的组织培养中，冯金玲^[32]研究发现，锥栗的胚在分裂素与生长素的比例为8:1时，锥栗能诱导出正常的不定芽。但并不是相对含量越高或者越低越好，而是有一定的适应范围。最佳的锥栗不定芽诱导激素配比为1.5 mg/L 6-BA +0.2mg/L IBA。而在诱导锥栗愈伤组织时只需要生长素而不需要分裂素的参与，且生长素2, 4-D优于NAA和IBA。愈伤组织增殖时生长素优于分裂素，在生长素中以2, 4-D最好。又如在板栗的组织培养过程中，在WPM培养基上培养3 d的板栗下胚轴为外植体，只添加3.0 mg/L 6-BA时，愈伤组织诱导率较高，且愈伤组织色泽较好；同时添加5.0 mg/L 6-BA和0.1 mg/L IBA，愈伤组织诱导率相对较高，高于添加6-BA和2, 4-D、6-BA和NAA激素组合，但诱导率低于只添加6-BA的处理，IBA诱导愈伤组织作用不明显；2, 4-D和ZT激素组合的诱导效果同样不及6-BA^[59]。刘玉芬等^[29]以板栗短雄花序芽变的嫩叶、茎段为外植体诱导愈伤组织，发现在MS培养基中，适当浓度的6-BA和NAA搭配使用能明显提高愈伤组织诱导率并促进增殖，茎段诱导最佳激素配比为0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。在板栗胚珠离体培养中，胚性愈伤组织的诱导与2, 4-D浓度、细胞分裂素种类及浓度显著相关，单独使用0.5或1.0 mg/L的2, 4-D、6-BA、TDZ不能诱导板栗胚珠的体胚发生，6-BA与2, 4-D配合使用的出胚率明显高于KT、TDZ、ZT分别与2, 4-D的配合，6.0 mg/L 2, 4-D +0.5 mg/L 6-BA组合、4.0 mg/L 2, 4-D+1.0 mg/L TDZ组合，利于胚性

愈伤组织的形成^[57]。杨国臣等^[28]研究发现, 植物生长调节剂的种类及浓度对美洲板栗愈伤组织的诱导和植株再生有很大影响。添加1.5 mg/L TDZ的芽诱导率最高, 达88%, 其次为CPPU, KT和ZT; 添加0.5 mg/L 2, 4, 5-T的愈伤组织诱导率最高, 达84%, 其次为2, 4-D, IBA和NAA。

组织培养过程中, 植物生长调节剂的种类和用量在不同的培养阶段并不是一成不变的, 夏栎叶片体细胞胚胎诱导在含有4.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA和500 mg/L酪蛋白水解物的MS培养基中育6周, 然后将外植体转移到相同组成的新鲜培养基上, 只是NAA和6-BA分别降低到0.1和0.01 mg/L^[60]。赤皮青冈最佳诱导培养基为MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L IBA, 最佳增殖培养基MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA;最佳分化培养基为1.5 mg/L 6-BA和0.1 mg/L IBA^[37]。辽东栎体胚诱导的最佳培养基和激素组合为MS+0.1 mg/L 2, 4-D+1.0 mg/L 6-BA, 诱导率最高达86.7%; 在体胚增殖试验中, 最佳培养基和激素组合为MS+0.01 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA, 最高增殖率达93.3%^[47]。

除了细胞分裂素和生长素, 还有可能会加入赤霉素GA₃。而以北美红栎的子叶节为外植体, WPM附加1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L GA₃的芽诱导率和诱导的丛芽数明显高与MS附加6-BA和TDZ^[16]。Purohit等^[61]也提出, 1.0 mg/L GA₃可以协同6-BA进一步提高芽诱导数量与芽高度, 但会使芽细弱。

4 生根培养

目前, 许多植物的组织培养研究尚停留在不定芽的诱导增殖阶段, 不定根诱导成为植物组织培养的一大难题。木本植物较草本植物而言, 生根难度更大。因而, 生根培养的研究对于木本植物组织培养的成功与否至关重要^[62]。

覃子海等^[48]研究发现, 红锥继代芽的质量对单芽生根有较大的影响, 生长健壮、叶片舒展鲜绿的芽生根率较高, 且根系发达。生根前, 对随着继代次数增多, 长势变差的芽进行壮苗培养很有必要, 板栗组培小苗生根前在以WPM为基本培养基, 附加0.3 mg/L 6-BA的培养基中过渡20 d, 可有效的达到壮苗目的^[42]。不同植物进行组织培养, 存在不同的继代复幼临界期, 因而, 继代次数会影响继代芽生根。王桂云^[63]在研究燕山红栎不定根发生时发现, 继代4次后, 生根率随着继代次数的增加逐渐提高, 第8代的芽最有利于生根。

在壳斗科植物生根阶段, 培养基大多数需要大量元素减半, 适度降低糖浓度, 激素多只用生长素^[53]。魏爽^[47]研究发现, 在糖浓度为30 g/L时, 1/2MS比MS培养基更有利于辽东栎的生根, 生根率由36.7%上升到76.7%, 且根的长势好。糖浓度为20 g/L时, 虽根系健壮, 但苗的长势弱, 叶片发黄。张存旭等^[50]指出单独使用NAA, 栓皮栎的生根率随其浓度的提高而上升, 但芽基部愈伤越来越大, 根系质量差。而单独使用IBA时, 采用先在0.5 g/L IBA溶液中浸泡1 min后转入空白培养基的处理, 虽出根时间快, 根系粗壮, 但生根率低且芽基部伴有较多愈伤; 采用培养基中直接加入1.0 mg/L IBA的处理, 虽芽基部愈伤小, 但出根时间慢, 根系细弱, 苗整体长势差。激素组合0.1 mg/L NAA + 0.25 mg/L IBA最有利于栓皮栎生根, 生根率高, 根系质量好。于艳等^[52]对以多年生的麻栎茎段为外植体的组培体系进

行了优化,指出 IBA 比 NAA 更有利于麻栎小苗生根, NAA 处理生出的根多为愈伤根,移栽不易成活。Chalupa^[45]研究发现,材料幼嫩有助于生根,基因型对生根的影响大于基本培养基与激素,12 个不同无性系的生根率 14%~86%之间。

生根程序包括一步生根与两步生根。徐晨等^[30]对板栗两步生根的方式进行了探索发现,幼苗基部浸泡 2.0 mg/L IBA 溶液中 4 min 后转移至 WPM 空白培养基,最有助于板栗生根,生根率达 55.33%。两步生根的方法同样适用于北美红栎的三个变种,具体方案为将 1.5~2.0 cm 的继代芽先接入到含 25 mg/L IBA 的 1/2WPM 培养基中,48 h 后移入到不含激素的 1/2WPM+4 g/L AC 培养基中,转接后,不需要进行暗处理^[17]。

5 存在的问题与解决方法

5.1 污染问题

在壳斗科植物组织培养污染问题的研究上,对外植体类型、灭菌时间及采集季节的探索较多。Hernández^[64]在栓皮栎体细胞胚胎发生研究中发现,在春季(5月底)和冬季(1月底)采集同一母株茎段作为外植体,外植体污染率及体胚诱导率存在明显差异,污染率分别为 2.5%、11.3%,体胚诱导率分别为 23%、8%。可见,春季(5月底)采集的外植体污染率较低且体胚诱导率较高。采用 6%NaClO(加入 2 滴吐温 80)消毒 6 min,对麻栎幼苗茎、叶的消毒效果最好^[12]。而用锥栗半木质化嫩茎作外植体时,先用 70%酒精浸润 30 s,然后用 0.2%HgCl₂+吐温 80 消毒 7 min 效果最好,污染率仅为 16%^[65]。壳斗科植物种子的外种皮坚硬且渗透性强,灭菌剂的时间与浓度难以把握,无菌条件下剥壳难度大,要求高,耗时耗力。采用无菌水浸泡适宜的时间软化种皮^[66]结合剥壳后再灭菌的方式,可以提高壳斗科植物种子的进瓶效率。必要时,可进行二次灭菌以减少对良种的浪费。郭素娟等^[31]对板栗种子进行二次灭菌处理后,污染率由 85%以上降到 16.67%,且成活率较高,达 77.78%。壳斗科种子属顽拗型种子,宜随采随播。同样,用于组培体系建立的壳斗科植物的种子应在收获后尽快安排实验,以保证种子的活力且避免微生物的滋生。

5.2 褐化问题

褐化现象在壳斗科植物继代培养过程中较难解决,转接不及时就会因褐化物质的毒害使瓶苗枯顶吐水死亡。目前,褐化的解决方法主要有:母本在采集之前进行遮光处理、在合适季节取材、选取幼龄材料、材料进行适当的低温或抗氧化剂预处理、选用最佳的培养基及培养条件、培养基中加抗褐化剂、转接后前一周内进行弱光或暗培养、及时转接等。

在培养基中直接加抗褐化剂是植物组织培养当中较为简便且有效的措施。常用的抗褐化剂有活性炭(AC)、抗坏血酸(V_C)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、柠檬酸(CA)、盐酸半胱氨酸(Cys)等^[67]。刘光金等^[68]在培养基中加 1.0~3.0 g/L AC 或 0.3 g/L V_C 有效降低了大叶栎的褐化率。周冰彬等^[69]发现培养基中加 3.0 g/L PVP 结合初期暗培养、低温至 19℃可有效抑制黧蒴栲的褐变现象。而丁彤^[70]研究结果表明,在培养基中添加 200 mg/L Na₂S₂O₃ 可将北美红栎的褐化死亡率降至 20%。壳斗科栲属植物红锥增殖培养过程中抑制褐化较适宜的方式为培养基中加 V_C 80 mg/L,可有效缓解褐化,同时促进芽

的生长。对板栗愈伤组织诱导中,在培养基中添加不同浓度的抗坏血酸(VC)及聚乙烯吡啶酮(PVP)后,外植体褐变率均显著低于对照,其中当加入Vc 100 mg/L后,外植体褐化率最低(53.8%)^[71]。另外,于艳^[72]等通过系统研究,得出:采集枝条前,对母株遮光处理5 d,选用春枝不带生长点(茎尖)的幼嫩茎段为外植体,0.1% HgCl₂溶液表面灭菌7 min后接入诱导培养基,并在培养前期暗培养5~7 d可有效降低多年生麻栎茎段的褐化率。

6 研究展望

壳斗科植物组织培养经历了60余年的研究,但除欧洲栓皮栎、夏栎、北美红栎、栓皮栎、麻栎、美洲栗等少数种组培技术相对成熟外,许多种植物仍处于探索阶段。取得成功的树种也多以种胚及生理幼态茎段为外植体,而以成年优树为母本材料则困难很多,关键技术瓶颈主要有以下几点:①组培无菌系难以建立,外植体诱导培养过程中污染及褐化严重;②继代培养时,玻璃化及褐化现象普遍存在,幼化培养材料时长,进入正常增殖培养所需代数多,增殖芽伸长慢、芽弱甚至死亡;③生根困难等问题。

壳斗科植物具有很高的社会经济与生态价值,植物组培快繁技术是林木优良种质无性化推广的最有效途径之一,具有广阔的市场前景。目前壳斗科许多种如红锥等选育出一批优良单株,要实现无性化快速推广,下一步研究关键包括以下几个方面。①优良单株的高效幼化技术。无性繁殖可以最大程度地保持母本的优良性状,但是无性繁殖过程不能如同实生有性繁殖过程一样,通过减数分裂和受精作用解除老化作用,因此对成年性优树材料进行幼化,使其达到速生、生根易的性状是很有必要的。组织培养技术是幼化的其中有效方法之一,通常认为外植体取材年龄的降低,外植体在母树上取材部位的下降以及继代次数的增加,其组培幼化效果愈佳^[73,74]。但某些母本树龄较大,幼化周期较长,因此还可采取微型嫁接的方法,例如大叶山杨^[75]和白花泡桐^[76],在壳斗科大部分树种中尚未见报道。②基本培养基矿质元素、有机物质等的优化调控,提高增殖效果及芽的质量。目前使用的培养基多为WPM、BMT、MS等固定元素含量的基本培养基,受经验和技术水平的限制,大部分试验中都没有对其中元素进行调配。因此,还需要进一步了解矿质元素、植物生长调节剂、各种有机添加物等的相互作用对离体植物培养过程的影响以及对离体植物的生理调控,找到普遍可遵循的规律。③以成年优树为母本材料的体细胞胚胎发生技术等。目前体细胞胚胎诱导常用的为幼年胚胎组织,例如未成熟合子胚,但是所选用的外植体是遗传上不确定的材料,所以这些体胚的诱导和观察,仅具科学意义,在林木遗传改良上价值不高^[12]。成熟材料的体细胞胚胎诱导也已经有很大进展,例如夏栎的成年大树的叶片^[58]。但是合子胚等幼年组织诱导率可达100%,但成年材料诱导率一般仅有20%左右^[43]。另外,在红锥等大部分壳斗科植物中对成年优树材料的体细胞胚胎发生的进展相对落后。

参考文献 (reference) :

- [1] 周浙昆. 壳斗科的地质历史及其系统学和植物地理学意义[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 369-385.
ZHOU Z K . Fossils of the Fagaceae and their implications in systematics and biogeography[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1999, 37(4): 369-385.
- [2] GOVAERTS R, FRODIN D G. World checklist and bibliography of Fagales[M]. London: the Royal Botanic Gardens, Kew, 1998: 201-204.
- [3] 刘茂松, 洪必恭. 中国壳斗科的地理分布及其与气候条件的关系[J]. 植物生态学报, 1998(1): 42-43.
LIU M S, HONG B G. The distribution of Fagaceae in China and its relationship with climatic and geographic characters[J]. Acta Phytocologica Sinica, 1998, (01): 42-43.
- [4] 罗坤水, 杨春霞, 林小凡, 等. 壳斗科树种育苗技术研究[J]. 江西林业科技, 2008 (6): 6-9.
LUO K S, YANG C X, LIN X F, et al. Research on nursery technology of Fagaceae[J]. Jiangxi Forestry Science and Technology, 2008 (6): 6-9.
- [5] 金振洲, 区普定. 我国的硬叶常绿阔叶林[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1981 (2): 13-20.
JIN Z Z, OU P D. Hard-leaved evergreen broad-leaved forest in China[J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 1981 (2): 13-20.
- [6] 许瑾. 壳斗科植物在我国城市园林绿化中的应用现状及前景[J]. 现代园艺, 2013(17): 37-38.DOI: [10.3969/j.issn.1006-4958.2013.17.025](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4958.2013.17.025).
XU J . Application status and prospect of Fagaceae Plants in urban landscaping in China[J]. Modern Gardening, 2013, (17): 37-38.
- [7] 吴丽君. 木本植物组织培养技术在林业科研与生产中的应用与局限[J]. 福建林业科技, 2003 (1): 67-69.DOI: [10.3969/j.issn.1002-7351.2003.01.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-7351.2003.01.017).
WU L J. Application and limitations of the woody plant tissue culture technique in the forestry scientific research and production[J]. Jour of Fujian Forestry Sci and Tech, 2003 (1): 67-69.
- [8] 邓小梅. 乐东拟单性木兰、华木莲、红叶石楠‘红罗宾’的组织培养及快繁技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
DENG X M. A study on tissue culture and rapid propagation of *Parakmeria lotungensis* (Chun et C.Tsoong) Law, *Sinomanglietia glauca* Z.X.Yu et Q.Y.Zhang and *Photinia fraseri* ‘red Robin’[D]. Nanjing : Nanjing Forestry University, 2004.
- [9] JAQUIOT C. Sur les phénomènes d’histogenèse observés dans les cultures *in vitro* de tissu cambial de chênes (*Quercus sessiflora* Sm., *Q. pedunculata*, Ehr., *Q. suber* L.)[J]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1952, 234: 1468-1470.
- [10] 宋敏. 栓皮栎离体培养再生植株的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
SONG M.Regeneration plantlet for *Quercus variabilis* in vitro[D]. Yangling: Southwest Sei-Tech University of Agriculture and Forestry, 2003.
- [11] 任鹏, 郭素娟. 栗属树种离体培养研究进展[J]. 经济林研究, 2004(2): 65-68.
DOI:[10.3969/j.issn.1003-8981.2004.02.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-8981.2004.02.023).
REN P, GUO S J. Advances of research on propagation of chestnut *in vitro*[J]. Nonwood Forest Research, 2004 (2): 65-68.
- [12] 廖婧. 麻栎体细胞胚胎发生与快速繁殖技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
LIAO J. Somatic embryogenesis and rapid propagation technology of *Quercus acutissima* Carr[D]. Nanjing : Nanjing Forestry University, 2012.
- [13] 赵丹. 麻栎组培和扦插繁殖技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.

- Zhao D. The research of propagation technique of tissue culture and cutting of *Quercus acutissima*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [14] PINTO G, VALENTIM H, COSTA A, et al. Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2002, 38(6): 569-572. DOI: 10.1079/IVP20023521054-5476/02.
- [15] MARTÍNEZ M, SAN JOSÉ M, VIEITEZ A, et al. Propagation of mature *Quercus ilex* L. (holm oak) trees by somatic embryogenesis[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 131(2): 321-333.
- [16] VENGADESAN G, PIJUT P M. In vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45(4): 474-482. DOI: 10.1007/s11627-008-9182-6.
- [17] VIEITEZ A, CORREDOIRA E, BALLESTER A, et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 98(2): 135-145.
- [18] 魏爽, 崔建国, 温伟, 等. 辽东栎的组织培养和植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 2010, (12): 1277-1278. WEI S, CUI J G, WEN W, et al. Tissue culture and plantlet regeneration of *Quercus liaotungensis* Klidz[J]. *Plant Physiology Newsletter*, 2010, (12): 1277-1278.
- [19] CHALUPA V. *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.)[J]. *Biologia plantarum*, 1984, 26(5): 374-377. DOI: 10.1007/bf02898577.
- [20] JUNCKER B, FAVRE J. Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 19(3): 267-276. DOI: 10.1007/bf00043353.
- [21] 丁世民, 李晓娟, 于颖, 等. 沈氏栎组培快繁技术的初步研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, (23): 11606-11608. DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2012.23.028. DING S M, LI X J, DING Y, et al. Preliminary study on the tissue culture and rapid propagation of *Quercus shumardi* 'Shumard Oak'[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2012, (23): 11606-11608.
- [22] 李文文, 刘希华, 黄秦军, 等. 蒙古栎茎段的离体培养[J]. *东北林业大学学报*, 2012, 40(8): 1-6. DOI: 10.3969/j.issn.1000-5382.2012.08.001. LI W W, LIU X H, HUANG Q J, et al. *In vitro* cultivation of nodal segments in *Quercus mongolica*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2012, 40(8): 1-6.
- [23] 高珊, 林梅, 崔建国, 等. 蒙古栎促萌茎段的离体培养研究[J]. *北方园艺*, 2013, (19): 102-105. GAO S, LIN M, CUI J G, et al. Study on the *in vitro* culture of budding stem segments of *Quercus mongolica*[J]. *Northern Horticulture*, 2013, (19): 102-105.
- [24] 赵吉胜, 杨晶. 蒙古栎组织培养的初步研究[J]. *吉林林业科技*, 2014 (1): 17-19. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7129.2014.01.004. ZHAO J S, YANG J. Study on tissue culture of *Quercus mongolica*[J]. *Journal of Jilin Forestry Science and Technology*, 2014 (1): 17-19.
- [25] 吕秀立, 沈烈英, 施季森, 等. 苏玛栎离体培养和植株再生研究[J]. *植物研究*, 2015, (2): 185-190. LV X L, SHEN L Y, SHI J S, et al. *In vitro* culture and plantlet regeneration of *Quercus shumardii*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2015 (2): 185-190.
- [26] 吴幼媚, 陈晓明, 王以红, 等. 大叶栎的组织培养和快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 2008 (1): 114. WU Y M, WANG X M, WANG Y H, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Castanopsis fissa* (Champ. Ex Benth.) Rehd. et Wils[J]. *Plant Physiology Newsletter*, 2008 (1): 114.
- [27] 王以红, 陈晓明, 蔡玲, 等. 大叶栎组织培养再生植株的研究[J]. *广西林业科学*, 2009(2): 71-74. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1126.2009.02.001. WANG Y H, CHEN X M, CAI L, et al. Study on tissue culture and regeneration of *Castanopsis fissa* [J]. *Guangxi Forestry Science*, 2009, (02): 71-74.

- [28] 杨国臣, 鲁重格, THEOPHILUS M A, 等. 美洲板栗愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 466-471.
YANG G C, LU Z G, THEOPHILUS M A, et al. *In vitro* callus induction and shoot initiation of American chestnut (*Castanea dentata*)[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 30(4): 466-471.
- [29] 刘玉芬, 赵国强, 曹庆芹, 等. 板栗短雄花序芽变的离体培养研究[J]. 中国农学通报, 2008 (10): 99-102.
LIU Y F, ZHAO G Q, CAO Q Q, et al. Propagation *in vitro* of chestnut short Catkin Mutant (*Castanea mollissima* Bl.)[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008 (10): 99-102.
- [30] 徐晨, 陈双双, 王金金, 等. 板栗高效组培体系的建立和优化[J]. 北京农学院学报, 2013, 28(3): 6-9.
XU C, CHEN S S, WANG J J, et al. Establishment and optimization of efficient micropropagation system in *Castanea mollissima*[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2013, 28(3): 6-9.
- [31] 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. DOI: [10.3969/j.issn.1001-7461.2015.03.16](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-7461.2015.03.16).
- 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.
- [32] 冯金玲. 锥栗组织培养及其再生体系建立的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
FENG J L. Study on tissue culture and regeneration system of *Castanea henryi*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2004.
- [33] 杨志坚, 冯金玲, 陈辉. 锥栗植株再生体系的建立[J]. 果树学报, 2013, (1): 105-109.
YANG Z J, FENG J L, CHEN H. Establishment of tissue culture regeneration system for *Castanea henryi*[J]. Journal of Fruit Science, 2013 (1): 105-109.
- [34] 黄光文, 张平, 张志光. 柯的组织培养[J]. 零陵学院学报, 2002 (6): 81-83.
HUANG G W, ZHANG P, ZHANG Z G. The organizational culture of *Lithocarpus glaber*(Thunb.) Nakai [J]. Journal of Linling University, 2002 (6): 81-83.
- [35] 孙卫邦, 周元, 向其柏, 等. 三棱栎的组培方法: CN1899028[P]. 2007-01-24.
SUN W B, ZHOU Y, XIANG Q B, et al. Tissue culture method of *Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman): CN1899028[P]. 2007-01-24.
- [36] 汪丽. 赤皮青冈快繁技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.
WANG L. *Cyclobalanopsis gilva* rapid propagation technology research[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2014.
- [37] 王艳娟. 赤皮青冈组织培养技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015.
WANG Y J. The technology research for tissue culture of *Cyclobalanopsis gilva* (Blume) Oerst[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2015.
- [38] BONGA J, KLIMASZEWSKA K, VON ADERKAS P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 100(3): 241-254. DOI 10.1007/s11240-009-9647-2.
- [39] 胡莹, 杨柳青. 山茶科植物组织培养研究进展[J]. 江苏农业科学, 2008 (2): 6-9. DOI: [10.3969/j.issn.1002-1302.2008.02.002](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1302.2008.02.002).
- HU Y, YANG L Q. Research progress on tissue culture of *Camellia* Plants[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008, (2): 6-9.
- [40] 陈建华, 罗丽华, 苏冬梅, 等. 不同板栗品种的组培技术[J]. 中南林业科技大学学报, 2007, (6): 83-87. DOI: [10.3969/j.issn.1673-923X.2007.06.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-923X.2007.06.013).
- CHEN J H, LUO L H, SU D M, et al. The technique of tissue culture for different varieties of chestnut[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2007(6): 83-87.
- [41] 唐罗忠, 赵丹, 诸葛强, 等. 麻栎组织培养外植体选择与灭菌方法[J]. 江苏林业科技, 2010, (5): 22-25. [10.3969/j.issn.1001-7380.2010.05.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-7380.2010.05.006)

TANG L Z, ZHAO D, ZHU G Q, et al. Explants selection and sterilization method of tissue culture for *Quercus acutissima*[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2010, (5): 22-25

[42] 任鹏. 板栗 (*Castanea mollissima* BL.) 组织培养技术研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2005.

REN P. Study on Micropropagation of Chinese chestnut *in vitro*[D]. Beijing :Beijing Forestry University, 2005.

[43] 张存旭. 栓皮栎体细胞胚胎发生及生化特性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.

ZHANG C X. Somatic embryogenesis and biochemical characteristics in *Quercus variabilis* Bl[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007.

[45] 杨锋利. 成龄栓皮栎组培繁殖技术的研究[D]. 西北农林科技大学, 2005.

YANG F L. *In vitro* propagation of mature trees of *Quercus variabilis* Bl[D]. Yangling:Northwest A & F University, 2005.

[46] CHALUPA V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation[J]. *Biologia Plantarum*, 1988, 30 (6) : 414-421. DOI: 10.1007/bf02890509.

[47] 苏冬梅,罗丽华,杨定海. 板栗愈伤组织的诱导[J]. 经济林研究, 2004, (3) : 17-19.

SU D M, LUO L H, YANG D H. Research on callus induction of Chinese chestnut[J]. Nonwood Forest Research, 2004, (3): 17-19.

[48] 魏爽. 辽东栎合子胚的离体培养[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2011.

Wei Shuang. In vitro culture of zygotic embryo in *Quercus liaotungensis* Koidz[D]. Shenyang : Shenyang Agricultural University , 2011.

[49] 覃子海,刘海龙,蒋华,等. 红锥组织培养与快速繁殖的研究[J]. 热带农业科学, 2014, 34 (2) : 50-53.

QIN Z H, LIU H L, JIANG H, et al. Tissue culture and rapid multiplication of *Castanopsis hystrix*[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2014, 34 (2) : 50-53.

[50] JOHNSON K R, WALKER R F. Micropropagation of valley oak shoots from seedling explants[J]. New Forests, 1991, 4 (4) : 271-279. DOI: 10.1007/bf00119206.

[51] 张存旭,宋敏,赵忠. 栓皮栎茎段离体培养的研究[J]. 西北植物学报, 2004, (7) : 1260-1265.

ZHANG C X, SONG M, ZHAO Z. *In vitro* cultivation of nodal segments of the cork tree (*Quercus variabilis*)[J]. Acta Bot.Boreal.-Occident.Sin., 2004, (7): 1260-1265.

[52] 李玲莉. 柔枝松和红锥的组织培养研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.

LI L L. Study on tissue culture of *Pinus flexilis* and *Castanopsis hystrix* A. DC[D]. Beijing : Beijing Forestry University, 2010.

[53] 于艳,郎庆龙,夏兴宏,等. 以多年生麻栎茎段为外植体的组织培养条件优化[J]. 蚕业科学, 2014, 40(2): 202-209.

YU Y , LANG Q L, XIA X H, et al. Optimization of tissue culture condition using perennial *Quercus acutissima* stem segments as explant[J]. Science of Sericulture, 2014, 40 (2) : 202-209.

[54] 卫梅. 闽西青冈组织培养体系的建立及其机理研究[D].福州: 福建农林大学, 2016.

WEI M. Study on tissue culture technology and mechanism of *Cyclobalanopsis minxiensis*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016.

[55] 覃子海,覃鹏飞,吴幼媚,等. 红锥不同外植体消毒技术初探[J]. 生物技术世界, 2013, (8) : 15-16.

QIN Z H, QIN P F, WU Y M, et al. Study on disinfection techniques of *Castanopsis hystrix* from different explants[J]. Biotechnology World, 2013, (8): 15-16.

[55] 孙小兵, 郭素娟. 成龄板栗组培快繁体系的建立及影响因素的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2015, 35 (4) : 51-55.

SUN X B, GUO S J. Establishment and influencing factors of micropropagation system in mature *Castanea mollissima*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2015, 35 (4) : 51-55.

[56] XING Z, SATCHWELL M F, POWELL W A, et al. Micropropagation of American chestnut: increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, 1997, 33(1): 43-48.

[57] 张玲,尹伟伦,王华芳. 板栗胚珠培养研究初报[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29 (5) : 99-105.
ZHANG L, YIN W L, WANG H F. Ovule culture in vitro of *Castanea mollissima* Bl[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007,29 (5): 99-105.

[58] San-José M C, Corredoira E, Martínez M T, et al. Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* L. trees[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(6): 661-671.

[59] 陈双双, 曹庆芹, 邢宇,等. 板栗愈伤组织诱导[C]// 中国园艺学会 2013 年学术年会. 2013: 2603.

[60] CORREDOIRA E, VALLADARES S, VIEITEZ A M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2006, 42 (6) : 525-533. DOI: 10.1079/ivp2006827.

[61] PUROHIT V K, TAMTA S, CHANDRA S, et al. In vitro multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: important Himalayan oaks[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 69(2): 121-133.

[62] 金建邦,祝遵凌. 桦木科植物组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2013 (23) : 202-206.

Jin J B, Zhu Z L. Review of birch families tissue culture[J]. Northern Horticulture, 2013, (23): 202-206.

[63] 王桂云. 燕山红栗茎尖组织培养及不定根发生机理研究[D]. 北京:北京林业大学, 2007.

WANG G Y. Studies on tissue culture using shoot tips and adventitious root mechanism[D]. Beijing :Beijing Forestry University 2007

[64] HERNÁNDEZ I, CELESTINO C, ALEGRE J, et al. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic

embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees[J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21 (8) : 765-770.
DOI: 10.1007/s00299-003-0604-y.

[65] 冯金玲,陈辉,杨志坚,等. 锥栗组织培养外植体消毒和选择[J]. 福建林学院学报, 2006, (1) : 22-25.
FENG J L, CHEN H, YANG Z J, et al. The selection and sterilization of explant of *Castanea henryiin* tissue culture[J]. *Journal of Fujian College of Forestry*, 2006, (1): 22-25.

[66] 朱登云,李浚明. 植物组织培养教程 [M].3 版. 中国农大出版社, 2006.
ZHU D Y, LI J M. *Plant tissue culture tutorial* [M]. 3rd Ed. China Agricultural University Press, 2006.

[67] 谢志亮,吴振旺. 木本植物组培褐化研究进展[J]. 中国南方果树, 2013, (5) : 42-46.
XIE Z L, WU Z W. The review on browning in woody plant tissue culture[J]. *South China Fruits*, 2013, (5): 42-46.

[68] 刘光金,黄寿先,刘芳,等. 大叶栎组织培养中外植体褐变的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16) : 7343-7344.
LIU G J, HUANG S X, LIU F, et al. Preliminary study on browning of explant in *Castanopsis fissa* tissue culture[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2009, 37(16): 7343-7344.

[69] 周冰彬,陈晓阳,李慧. 不同培养条件对鬲蒴栲组培苗褐变的抑制作用[J]. 河北林果研究, 2007, 22(4) : 348-350,354.
ZHOU B B, CHEN X Y, LI H. Effect of different conditions on browning of *Castanopsis fissa* in tissue culture[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2007, 22 (4): 348-350, 354.

[70] 丁彤. 北美红栎无性繁殖体系的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
DING T. *Study on the asexual reproduction system of northern red oak*[D]. Hefei: Anhui Agriculture University, 2012.

[71] 刘杜玲,吕平会,彭少兵,等. 板栗愈伤组织诱导及外植体褐化研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2016, 36(12) : 26-30.
LIU D L, LV P H, PENG S B, et al. Research on callus induction and explant browning of chestnut (*Castanea mollissima* Bl.)[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2016, 36(12): 26-30.

[72] 于艳,夏兴宏,石淑萍,等. 减少多年生麻栎茎段外植体褐化的材料采集与组织培养条件优化[J]. 蚕业科学, 2015, 41(5) : 793-800.
YU Y, XIA X H, SHI S P, et al. Material collection of stem segment explants from perennial *Quercus acutissima* and optimization of tissue culture condition to reduce Browning[J]. *Science of Sericulture*, 2015, (05): 793-800.

[73] 董胜君,刘明国,郑可,等. 基于幼化效果的山杏组培繁殖技术研究[J]. 西北植物学报, 2017, 37(3) : 595-601.
DONG S J, LIU M G, ZHENG K, et al. Tissue culture propagation technique of *Armeniaca sibirica* based on rejuvenation effect[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2017, 37(03): 595-601.

[74] 张世红,李坤霞,朱淑新,等. 毛白杨成熟效应与组培幼化[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(4) : 83-86.

ZHANG S H, LI K X, ZHU S X, et al. Cyclophysis and rejuvenation of *Populus tomentosa* by tissue culture[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(4): 83-86.

[75] 孙立平,章林,赵珊珊,等. 大叶山杨幼化处理技术的研究[J]. 吉林林业科技, 2009, 38(5): 18-20.
SUN L P, ZHANG L, ZHAO S S, et al. Research on the rejuvenation technology of *Populus davidiana* var. *macrophylla*[J]. Jilin Forestry Science and Technology, 2009, 38(5): 18-20.

[76] 邓建军,李芳东,乔杰,等. 白花泡桐优树试管嫁接幼化及组培快繁技术研究[J]. 林业科学研究, 2011, 24(5): 646-650.

DENG J J, LI F D, QIAO J, et al. Study on grafted tissue rejuvenation technology and rapid propagation of *Paulownia fortunei* superior trees[J]. Forest Research, 2011, (05): 646-650.

(责任编辑 吴祝华)

