

不同板栗品种的组培技术

陈建华¹, 罗丽华², 苏冬梅¹, 杨定海², 朱 凡¹

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2. 海南大学 农学院, 海南 海口 570000)

摘 要: 对檀桥、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 个板栗品种的组织培养技术进行了研究。结果表明: 最适培养基为 WPM, MS; 愈伤组织诱导成功的品种是檀桥、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, 为 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。

关键词: 板栗; 愈伤组织; 外植体; 培养基; 不定芽; 诱导生根

中图分类号: S664.2; Q813.1

文献标志码: A

The Technique of Tissue Culture for Different Chestnut Varieties

CHEN Jian-hua¹, LUO Li-hua², SU Dong-mei¹, YANG Ding-hai², ZHU fan¹

(1. School of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China;

2. School of Agricultural, Hainan University, Haikou 570000, Hainan, China)

Abstract: 11 kinds of different chestnut varieties were chosen for callus induction by the technique of tissue culture. The result shows that the optimal medium for callus induction was WPM, MS among WPM, MS, Heller+Nitsch and White medium; that the calluses of 5 kinds of different chestnut varieties, Tanqiao, Xintian, Shao Shiba, Huaguan and Hongli, were successfully induced; that the inducement rate of embryos in the explants was higher than that in other tissues and the inducement rate of stalks was the highest, being 65%, among all the materials from the field; and that Tanqiao grew the best through inducing adventitious buds and Huaguan's root could be directly induced.

Key words: chestnut; callus; explants; medium; adventitious bud; induced rooting

栗树是应用离体培养技术较早的木本植物, 但有关这方面的报道为数不多, 开展研究的领域也较少。现存的栗属植物有 7 个种, 其中进行经济栽培的主要有中国栗、欧洲栗、日本栗和美洲栗 4 种。欧洲栗和美洲栗的组培比我国板栗稍有进展, 主要集中在愈伤组织的诱导、微体繁殖、体细胞胚状体发生方面的研究^[1,2]。我国许多科研工作者也曾进行过该项实验, 但由于褐变相当严重, 至今为止尚未见到成功的报道。为此, 笔者查阅相关资料^[3~23], 研究了不同板栗品种、不同外植体、不同培养基、激素对愈伤组织诱导的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料为湖南省林科院板栗试验园的中国栗, 品种有 11 个(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), 于 5 月初和 8 月初 2 次采样, 取成年树当年生嫩枝的无病虫害的茎段、叶柄和嫩叶为外植体; 10 月初采取不同品种成年树上的果实为实验材料, 进行胚培养。

1.2 试验方法

采用单因子试验法, 每组实验重复 2 次。

收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 湖南省自然科学基金课题“板栗丰产机理研究”(编号: 99JJY20027); 中南林学院引进人才项目; 湖南省教育厅项目。

作者简介: 陈建华(1955—), 男, 湖南桃江人, 教授, 博士, 主要从事经济林育种与栽培的研究工作。

1.2.1 材料的消毒

采用常规消毒方法.

1.2.2 培养基的制备

以 WPM、MS、Heller+Nitsch 和 White 4 种为基本培养基,各培养基均添加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、PVP 2 g/L,pH 值为 6.0,在 0.1 Pa、121℃ 恒温条件下灭菌 15 min.

1.2.3 培养条件

接种初期置于暗处培养,2 周后转于温度 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光强 1 500 lx 的人工气候箱中培养,每天光照时间为 12 h.

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基对板栗茎段愈伤组织诱导的影响

根据初期培养结果,把韶十八茎段接种于 WPM、MS、Heller(大量元素)+Nitsch(微量元素)、White 4 种基本培养基上,在同一激素水平 6-BA 为 0.5 mg/L、NAA 为 0.2 mg/L 的条件下培养,以探明不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响,结果见表 1.

表 1 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different medium on the callus induction

基本培养基	接种瓶数	污染瓶数	褐变程度	愈伤数量	诱导率/%	诱导情况	色泽	体积
WPM	20	9	严重	13	65	细胞颗粒明显	绿	大
MS	20	4	严重	11	55	细胞颗粒明显	黄	一般
Heller+Nitsch	20	7	严重	2	10	外植体不变	黄	小
White	20	3	轻	3	15	茎段膨大	黄绿	小

从表 1 可知,不同基本培养基对同一品种的茎段愈伤组织诱导情况不同,其诱导率、生长速度和褐变程度都有很大的差异.其中 WPM 和 MS 对韶十八茎段的愈伤组织诱导较好,特别是 WPM 所诱导的愈伤组织色绿、生长量大,说明 WPM 最适合韶十八茎段愈伤组织的诱导;而 Heller+Nitsch 培养基最差,褐变也很严重;White 培养基虽然褐变很轻,但诱导率却很小,未形成愈伤组织的外植体最后死亡,说明此培养基不适宜板栗茎段愈伤组织的诱导.

2.2 基本培养基对不同板栗品种的诱导

把板栗 11 个品种(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)的茎段接种于 WPM 和 MS 培养基中,在同一激素水平 6-BA 为 0.5 mg/L、NAA 为 0.2 mg/L 的条件下进行培养,比较外植体在这 2 种基本培养基中的诱导情况,结果见图 1.

由图 1 可知,不同板栗品种的最适基本培养基有差异,有些品种较适宜在 WPM 基本培养基中诱导,如韶十八、檀桥、华光、新田,但这些品种在 MS 培养基中也能诱导,只是诱导率稍差.红栗与它们稍有不同,最适培养基为 MS,其次为 WPM.另外,有些品种如焦扎、铁粒头、安 1、华丰、石丰、九家种,则在这 2 种基本培养基中诱导效果都不好,诱导率极低(小于 10%,有些甚至为 0).由此可知,选择适宜的基本培养基是愈伤组织诱导能否成功的重要因素.

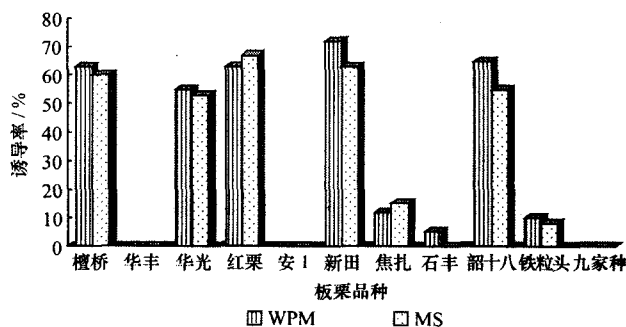


图 1 基本培养基对不同品种板栗愈伤组织的诱导情况

Fig. 1 The effect of basic medium on the callus induction of different chestnut varieties

2.3 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

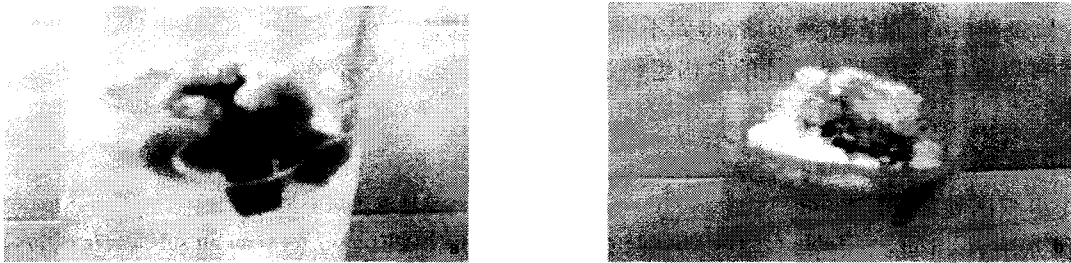
外植体的来源不同,其愈伤组织诱导率也存在一定差异. 本实验采用韶十八茎段、叶柄、叶片、胚培养于 WPM + 6-BA0. 5 mg/L + NAA0. 2 mg/L 培养基中,考察这 4 种外植体的诱导效果,结果见表 2.

表 2 外植体来源对愈伤组织诱导的影响[†]

Table 2 The effect of explants fromed by different parts on callus induction					
外植体来源	接种数/块	愈伤数量/块	褐变程度	诱导率/%	愈伤组织产生量
茎段	20	13	++	65.0	多
叶柄	20	5	+++	25.0	少
叶片	20	1	++++	5.0	少
胚	19	15	—	79.0	多

[†] 褐变程度(褐色深浅以“+”多少表示,“—”表示无褐色,即愈伤组织为新鲜的淡黄绿色,下同).

表 2 表明,胚的愈伤组织诱导率最高(见图 2),主要是由于其污染率最小,且不发生褐变. 野外材料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.



a 为茎段诱导的愈伤组织;b 为胚轴诱导的愈伤组织

图 2 不同外植体诱导的愈伤组织

Fig. 2 The calli of different explants

2.4 植物生长物质对愈伤组织诱导的影响

2.4.1 细胞分裂素对愈伤组织的诱导

将韶十八的茎段接种于添加 NAA、6-BA 2 种激素的培养基中,固定 NAA 质量浓度为 0. 1 mg/L 不变,改变 6-BA 的质量浓度,观察其诱导情况,筛选出韶十八茎端愈伤组织诱导较适宜的 6-BA 质量浓度,结果见表 3.

表 3 不同质量浓度的细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

Table 3 The effect of different cytotimin on the callus induction						
6-BA 质量浓度 (mg · L ⁻¹)	接种 瓶数	褐变数	褐变程度	诱导 瓶数	诱导率 /%	诱导情况
0. 2	24	7	+	13	54. 2	黄绿,体积大
0. 5	24	6	+	17	71. 0	黄绿,体积大
1. 0	24	5	++	9	37. 5	黄绿,体积大
1. 5	24	6	++	16	66. 7	黄绿带褐,体积小

由表 3 可知,6-BA 质量浓度为 0. 5 mg/L 时,诱导率较高,褐变程度较小,愈伤组织体积大,效果好;当 6-BA 质量浓度为 1. 5 mg/L 时,诱导率虽然也较高,但褐变程度较大,且愈伤组织的色泽较差,体积较小,不适宜板栗愈伤组织的诱导.

2.4.2 类似生长素对愈伤组织的诱导

将韶十八的茎段接种于添加 6-BA 和 NAA 2 种激素的培养基中,固定 6-BA 质量浓度为 0. 5 mg/L 不变,改变 NAA 的质量浓度,观察其诱导情况,筛选韶十八茎端愈伤组织诱导较适宜的 NAA 质量浓度,结果见表 4.

表 4 不同质量浓度类似生长素对愈伤组织的诱导

Table 4 The effect of different concentration of auxin on the callus induction						
NAA 质量浓度 (mg · L ⁻¹)	接种 瓶数	褐变数	褐变程度	诱导 瓶数	诱导率 /%	诱导情况
0	24	15	+++	6	25.0	黄褐,细胞小,体积小
0. 1	24	4	+	14	58. 3	黄,体积稍大
0. 2	24	6	+	17	71. 0	黄绿,体积大
0. 5	24	6	++	10	41. 7	黄绿,体积稍大
1. 0	24	4	+++	13	54. 2	黄褐,体积稍大

由表 4 可以看出,培养基中 NAA 的质量浓度不同,其诱导的效果也不同,当 NAA 的质量浓度为 0. 2

mg/L时诱导率最高,且褐变程度较小,愈伤组织为黄绿色,体积也较大.

因此,韶十八茎段愈伤组织诱导的激素配比以 6-BA0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L 为好.

2.5 不同板栗品种与愈伤组织诱导的关系

同样,采用单因子试验,先将不同板栗品种的茎段接种于 NAA 质量浓度相同而 6-BA 质量浓度不同的培养基中,观察其诱导情况,得到不同板栗品种愈伤组织诱导较适宜的 6-BA 质量浓度,然后在此质量浓度下筛选较适宜的 NAA 质量浓度,经过多次筛选后,得到不同品种愈伤组织诱导的适宜培养基,结果见表 5.

由表 5 可以看出,不同板栗品种的愈伤组织诱导的激素配比不同,故在组织培养过程中选择适当的激素配比尤为重要.

2.6 继代培养

与愈伤组织诱导最佳激素配比筛选方法相同,采用单因子试验,将不同板栗品种的愈伤组织进行继代培养,先筛选最佳质量浓度的 6-BA,再筛选 NAA 的质量浓度,筛选出激素配比,经过多次试验,得到结果如表 6.

经过一系列的试验可知,不同板栗品种的继代培养的培养基稍有差异,如韶十八在一定质量浓度范围内(如6-BA为 0.5~1.0 mg · L⁻¹,NAA 为 0.2 mg · L⁻¹),其愈伤组织生长良好,超出这个范围,激素配比不同,其愈伤组织的生长情况各有差异.

2.7 不定芽的诱导

采用单因子试验,将不同板栗品种的愈伤组织进行继代培养,筛选其激素配比,经过多次筛选,结果见表 7.

把生长情况较好的不同板栗品种愈伤组织接种

于不同激素配比的培养基中,观察其分化情况,结果表明:激素配比不同,所产生的不定芽的状态不同,如 NAA 质量浓度较小时,所诱导的不定芽细弱,NAA 质量浓度太大则粗短;6-BA 质量浓度太小时,所诱导的不定芽往往不是丛生芽,6-BA 质量浓度太大则不能产生不定芽,而是继续产生愈伤组织;激素配比不当还会产生畸形芽.故由不定芽的各种不同状态,可知最佳激素配比的大体范围.

2.8 根的诱导

在培养过程中,从华光愈伤组织中直接诱导出根(见图 4),培养基配比为:WPM+NAA1.0 mg · L⁻¹.但其它的品种(韶十八、檀桥、新田、红栗)却未曾诱导出不定根.

表 5 不同品种愈伤组织的诱导

Table 5 The suitable ratio of hormone in different medium on callus induction

板栗品种	基本培养基	6-BA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	NAA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	PVP 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	蔗糖 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	琼脂 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	pH
檀桥	WPM	0.2~0.5	0.2	2	30	8	6.0
新田	WPM	0.5	0.1~0.2	2	30	8	6.0
华光	WPM	0.5~1.0	0.2	2	30	8	6.0
红栗	WPM	0.5~1.0	0.2	2	30	8	6.0
韶十八	WPM	0.5	0.2	2	30	8	6.0

表 6 不同品种继代培养激素配比

Table 6 The suitable ratio of hormone in different medium on subculture callus induction

品种	基本培养基	6-BA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	NAA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	PVP 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	蔗糖 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	琼脂 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	pH
韶十八	WPM	0.5~1.0	0.2	2	30	8	6.0
檀桥	WPM	1.0~1.5	0.1~0.2	2	30	8	6.0
新田	WPM	0.5~1.0	0~0.1	2	30	8	6.0
华光	WPM	0.5~1.0	0~0.2	2	30	8	6.0
红栗	WPM	0.2~0.5	0.2	2	30	8	6.0

表 7 不同品种不定芽诱导激素配比

Table 7 The suitable ratio of hormone in different medium on adventitious buds of different chestnut varieties

品种	基本培养基	6-BA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	NAA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	PVP 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	蔗糖 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	琼脂 质量浓度 /(g · L ⁻¹)	pH
檀桥	WPM	1.0~1.5	0.1~0.2	2	30	8	6.0
华光	WPM	1.0~1.5	0~0.2	2	30	8	6.0
新田	WPM	0.1~1.0	0.1	2	30	8	6.0
红栗	WPM	1.0~1.5	0.1~0.2	2	30	8	6.0

3 结论与讨论

在韶十八茎段愈伤组织诱导所采用的4种基本培养基中,以WPM的效果最好,MS的效果次之。比较这4种培养基的营养元素含量,可以发现:MS培养基总N量最高,是WPM培养基的3.5倍、Heller+Nitsch培养基的8倍左右、White培养基的19倍;Heller+Nitsch和White都不含铵态氮;MS和WPM的 Ca^{2+} 质量浓度相近,而其它2种培养基的 Ca^{2+} 质量浓度低得多;MS培养基的有机物含量是White培养基10倍。由此可见,板栗愈伤组织的诱导和细胞生长要求培养基中总N量、 Ca^{2+} 质量浓度、有机物含量不能太低,同时N的种类对板栗愈伤组织的诱导也有较大的影响。

外植体来源不同,其诱导率也不一样,试验采用的茎段、叶片、叶柄、胚这4种不同的外植体中,以胚最好,其诱导率最大,茎段次之。

在基本培养基中添加适当质量浓度的细胞分裂素或生长素能显著促进板栗愈伤组织的形成和增殖,两者同时添加时效果更佳。细胞分裂素和生长素的质量浓度不同,其影响大小也不一样。以韶十八茎段为材料,最佳诱导质量浓度配比为6-BA0.5 mg/L+NAA0.2 mg/L。

不同板栗品种的愈伤组织的诱导、不定芽的诱导、根的诱导等激素配比各不相同,故在组织培养过程中选择适当的激素配比尤为重要。

参考文献:

- [1] Kwys R N. Requirements for the uniform growth of callus cultures of four species of castanea[J]. West-Virginia-forestry notes, 1987,13: 19-24.
- [2] Shreve L W. Propagation of Walnut, Chestnut and Pecan by rooted cuttings[C]//In Proceedings, Eighth central states Forest tree improvement Conference. Columbia: University of Missouri, 1974:20-23.
- [3] 何业华,熊细满,谢碧霞,等. 枣树组织培养愈伤组织诱导的研究[J]. 中南林学院学报,1997,17(1):13-18.
- [4] 冉隆贤,林雪坚,文仕知,等. 芦竹组织培养技术研究[J]. 中南林学院学报,1998,18(1):49-52.
- [5] 何业华,伍成厚,胡中沂,等. 枣树愈伤组织培养不定芽的分析[J]. 中南林学院学报,1998,18(3):44-50.
- [6] 徐刚标,何方,陈良昌,等. 银杏愈伤诱导与继代培养的研究[J]. 中南林学院学报,1999,19(3):32-36.
- [7] 谢碧霞,何业华,易志军,等. 盾叶薯蓣愈伤组织培养及其高产系的筛选[J]. 中南林学院学报,1999,19(4):17-21.
- [8] 周国英,刘君昂,周德明. 山茱萸组织培养研究[J]. 中南林学院学报,2000,20(1):65-67.
- [9] 唐效蓉,李午平,郭照光. 芦荟组培苗移栽与叶面施肥配套技术[J]. 中南林学院学报,2002,22(3):32-36.
- [10] 金晓玲,何平. 大叶举愈伤组织诱导与继代培养的影响因素[J]. 中南林学院学报,2003,23(1):32-36.
- [11] 郑子成,何淑勤. 大果沙棘组织培养技术[J]. 中南林学院学报,2003,23(4):42-45.
- [12] 王晓红,谭晓风,石明旺. 非洲菊F1的组织培养[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):45-48.
- [13] 易自力,陈智勇,蒋建雄,等. 三种冷季型草坪愈伤组织再生体系的建立[J]. 中南林学院学报,2005,25(6):25-28.
- [14] 曾艳玲,谭晓风,乌云塔娜,等. 梨不同杂交和自交组合幼胚组织培养的研究[J]. 中南林学院学报,2005,25(1):29-32.
- [15] 何志祥,曾艳玲,谭晓风. 翠冠梨茎段组织培养的研究[J]. 中南林学院学报,2006,26(1):66-68.
- [16] 李际红,周庆和,谢会成. 驱蚊香草的组织培养技术[J]. 中南林学院学报,2005,25(5):92-96.
- [17] 喻晓雁,刘克旺,梁文斌. 穗花杉组织培养初探[J]. 中南林学院学报,2005,25(2):55-58.
- [18] 金晓玲,何平,张日清. 榉树茎尖的培养[J]. 中南林学院学报,2005,25(1):38-41.
- [19] 李小川,张华通,周丽华,等. 迷迭香带芽茎段的组织培养技术[J]. 经济林研究,2006,24(3):15-20.
- [20] 张进,张燕,吴国良,等. 核桃茎段组织培养[J]. 经济林研究,2005,23(2):36-38.
- [21] 张立磊,李保印,郭巧玲,等. 彩叶植物金叶绣线菊组织培养研究[J]. 经济林研究,2005,23(1):47-49.
- [22] 曾艳玲,谭晓风,乌云塔娜. 自交新高梨叶片的培养繁殖技术[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):50-52.
- [23] 仇键,谭晓风. 蒙花1、2号金银花的组织培养与快速繁殖[J]. 中南林学院学报,2005,25(4):53-56.



图3 檀桥愈伤组织诱导不定芽

Fig. 3 The adventitious buds induced from callus



图4 生长的不定根

Fig. 4 The growing root