

平欧杂交榛的组织培养

刘家宁^{1,2}, 高遐虹¹, 秦岭^{1*}

(¹北京农学院植物科学技术系, 北京 102206; ²新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 为了探索我国平欧杂交榛离体培养和快繁技术, 以 5 个平欧杂交榛品种(系)的幼嫩茎段为外植体, 研究其组织培养及快速繁殖技术, 结果表明, (1)5 月中旬为茎尖培养取材的较好时期, 污染率低、萌芽率高。(2)适宜的基本培养基为 DKW 培养基。(3)不同基因型间的萌芽率及芽苗生长状态存在极显著差异。(4)增殖阶段较好的培养基为: DKW+TDZ 1.5 mg/L+IBA 0.01 mg/L。(5)生根培养较佳培养基为: 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L, 生根率达 90%。

关键词: 杂交榛子; 外植株; 组织培养

中图分类号: S664.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9980(2006)03-471-04

Tissue culture of hybrid hazelnut

LIU Jia-ning^{1,2}, GAO Xia-hong¹, QIN Ling^{1*}

(¹Department of Plant Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206 China; ²College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052 China)

Abstract: The young shoots with axillary buds were chosen as explants for initiation culture and rapid propagation of 5 genotypes from *Corylus heterophylla* × *C. avellana* hybrids. The results showed that: (1) Mid May was the best sampling period for collecting materials, in such time explants had the lowest contamination rate and the highest rate of bud germination. (2) The proper basic medium was DKW. (3) The germinating rate and growth vigor were significantly different among genotypes. (4) The medium DKW+TDZ 1.5 mg/L+IBA 0.01 mg/L was the optimal one for differentiation. (5) The effective medium for rooting was 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L, the rooting rate was up to 90%. (6) The survival rate was 90% 2 to 3 weeks after the plants were transplanted into a mixture of vermiculite and peat (1:1).

Key Words: Hybrid hazelnut; Explant; Tissue culture

榛为桦木科(Betulaceae)榛属(*Corylus* L.)植物, 多年生落叶乔木或灌木。栽培榛是世界上重要的干果。榛属植物在世界上约有 20 个种。我国原产 8 个种 2 个变种, 其中有平榛、毛榛等。我国目前推广的榛为欧洲榛 (*C. avellana* L) 与平榛 (*C. heterophylla* Fisch.) 的杂交品种(品系)^[1], 具有坚果大、抗寒性强的特点, 在北方已开始发展, 育苗主要采用分株和压条繁殖, 但繁殖系数低, 繁殖速度慢。所以良种苗木的快繁是榛发展中亟待解决的问题。

组织培养是苗木快速繁育的重要途径, 国内外对欧洲榛子组织培养已有相关报道^[2-5], 但对平榛和欧洲榛杂交后的抗寒大果榛的组织培养与快繁技术尚未见报导。本文从初代培养、增殖培养、生根培养等方面就杂交榛子的组织培养与快速繁殖进行了研究, 为我国平欧杂交榛品种(系)的离体培养和快速繁殖提供参考与借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

杂交榛品种 2 个: 魁香、达维, 品系 3 个: 平欧 88 号、平欧 73 号、84-402, 均为平榛与欧榛的杂交品种(系), 材料种植于北京农学院榛苗圃, 种源由大连经济林研究所梁维坚研究员提供。取材时期: 3 月下旬芽未萌发枝条; 4 月中旬芽萌动枝条; 5 月中旬新梢旺盛生长; 5 月下旬新梢半木质化。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 将榛嫩枝剪成 2 cm 左右带叶柄茎段, 用无菌水、75%酒精、升汞+吐温-80(数滴)等处理后接种。

1.2.2 培养基 初代培养基: 以 DKW 为基本培养基(基本培养基筛选为 DKW 和 MS 2 种), 附加激素 6-BA 5.0 mg/L、IAA 0.01 mg/L。

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2006-03-03

基金项目: 北京市农委资助项目(20040212)。

作者简介: 刘家宁, 男, 在读硕士生, 主要从事组织培养与生物技术研究。Tel: 010-80794426, E-mail: liujianing1215@126.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 010-80799136, E-mail: qinlingbac@126.com

增殖培养基:以 DKW 为基本培养基,分设 6-BA、ZT、TDZ(1.0 mg/L)3 种细胞分裂素处理;TDZ 设 4 个浓度梯度(1.0、1.5、2.0、3.0 mg/L)。

生根培养基:1/2 MS;1/2 MS+NAA 0.1 mg/L;MS;MS+NAA 0.05 mg/L。

1.2.3 移栽基质 将生根的试管苗移植于蛭石:草炭(1:1)基质中。

2 结果与分析

2.1 外植体采集时期对魁香初代培养的影响

表 1 外植体采集时期对魁香初代培养的影响
Table 1 Effect of different sampling time on initiation culture of Kuixiang

采集时期 Sampling time	接种数 Inoculating number	污染率 Contamination rate(%)	萌芽率 Germination rate (%)	生长状况 Growth situation
3 月下旬 Late Mar.	100	89.29 aA	0.00 dD	无萌芽发生 No germination
4 月中旬 Mid Apr.	100	41.96 bB	10.71 cC	叶淡绿,生长缓慢 Growth slowly, leaves light green
5 月中旬 Mid May	100	8.43 cC	68.67 aA	叶浓绿、健壮、生长良好 Growth strong, leaves heavy green
5 月下旬 Late May	100	10.12 cC	38.71 bB	叶浓绿、健壮、生长良好 Growth strong, leaves heavy green

注:表中大、小写字母分别表示 $P=0.01$ 、 $P=0.05$ 显著差异水平。下同。

Note: Followed by the different capital and letters are significantly different at $P=0.01$ and $P=0.05$ level(test Duncan, LSR method). The same as below.

DKW 培养基上的萌芽率均高于 MS 培养基,且新芽叶片舒展,叶色浓绿(图版-2)。随着培养时间的延长,MS 培养基上的芽苗出现不同程度的叶色变黄现象(图版-3)。3 个品种(系)的芽苗在 DKW 和 MS

结果表明,不同取材时期的外植体萌芽率差异极显著,3 月下旬和 4 月中旬外植体污染率极显著高于 5 月中旬和 5 月下旬。5 月中旬为魁香新梢旺盛生长时期,是茎尖培养取材的较好时期,取材接种污染率较低,为 8.43%,萌芽率较高为 68.67%(图版-1),极显著优于其它采集时期(表 1)。3 月下旬和 4 月中旬易造成污染率高的原因可能是芽鳞片上茸毛多,尚未完全展开,不易使消毒剂渗入。

2.2 基本培养基的选择

3 个杂交榛品种(系)达维、魁香、平欧 73 号在

培养基上伸长生长差异不明显(表 2)。综合考虑各因素,认为 DKW 作为达维、魁香、平欧 73 号的基本培养基较为适宜。

2.3 杂交榛不同品种(系)初代培养的差异

表 2 基本培养基对不同基因型杂交榛初代培养的影响
Table 2 Effect of basic media on initiation culture of different genotypes of hybrid hazelnut

基本培养基 Basic medium	品种 Cultivars	接种数 Inoculating number	萌芽率 Germination rate (%)	生长状况 Growth situation
DKW	达维 Dawei	50	20.69	正常、叶片淡绿 Growth healthy, leaves light green
	魁香 Kuixiang	50	58.33	叶片平展、绿色、新生叶较多 New leaves more, unfold and green
	平欧 73 号 Hybrid 73	50	43.75	正常、叶片绿色 Growth healthy, green
MS	达维 Dawei	50	6.45	正常、叶片黄绿 Growth healthy, leaves chlorotic
	魁香 Kuixiang	50	57.69	叶片皱缩、黄绿、新生叶较少 New leaves less, leaves crimple and chlorotic
	平欧 73 号 Hybrid 73	50	12.12	几乎全部死亡 Mostly dead

杂交榛 4 个品种(系)间萌芽率存在极显著差异,魁香萌芽率最高,为 68.67%,极显著的高于其它 3 个品种(系),腋芽萌发较快,生长健壮、浓绿(图版-4)。84-402 萌发的幼苗较其它品种粗壮、叶宽大,但腋芽萌发晚,萌发率较低。达维品种萌芽率最低,但腋芽萌发最早(表 3)。

2.4 植物激素对魁香芽苗增殖的影响

2.4.1 不同细胞分裂素对魁香芽苗增殖的影响 以 DKW 为基本培养基,在 0.02 mg/L IAA 的基础上分别添加 1.0 mg/L 的 TDZ、BA 和 ZT。结果表明:细胞分裂素 TDZ 在促进组培苗增殖方面极显著好于 BA 和 ZT(表 4,图版-5,6)。含 TDZ 的芽苗基部普遍分

化出愈伤,愈伤组织上分化新芽,茎节短而健壮,叶色翠绿,而在 BA 和 ZT 的培养基上植株增殖系数不明显,茎一般较长且茎节间距相对较大,叶色深,个别芽苗株高增长明显,高达 3 cm。因此认为,TDZ 对榛芽苗的增殖效果较好。

2.4.2 不同 TDZ 浓度对魁香芽苗增殖的影响 从表 5 看出,TDZ 浓度以 1.5 mg/L 增殖效果最好,增殖系数为 3.7,茎段粗,长势强。当 TDZ 浓度小于或高于 1.5 mg/L,增殖系数都呈下降趋势。高浓度的 TDZ 诱导出的新芽茎叶普遍愈化,个别芽苗畸形,密集成球状,说明高浓度 TDZ 的使用,对新芽的分化和生长具抑制作用(图版-7)。

表 3 不同基因型杂交榛茎段培养
Table 3 The stem culture of different genotypes of hybrid hazelnuts

品种 Cultivars	接种数 Inoculating number	萌芽率 Germination rate(%)	生长状况 Growth situation
魁香 Kuixiang	100	68.67 aA	腋芽萌发早、生长快、叶细 Auxillary buds germinating early, growing quickly, leaves thin
平欧 88 号 Hybrid 88	100	22.11 bB	腋芽萌发较早、生长快、叶细 Auxillary buds germinating early, growing quickly, leaves thin
84-402Hybrid 84-402	100	11.96 cC	腋芽萌发晚、粗壮、叶宽大 Auxillary buds germinating late, thickset, leaves bountty
达维 Dawei	100	7.55 dD	腋芽萌发最早、健壮、生长快、叶浓绿、细小 Auxillary buds germinating early, growing quickly; Leaves thin and heavy green

表 4 不同细胞分裂素对魁香芽苗增殖的影响
Table 4 Effect of different cytokinin on shoot multiplication of Kuixiang

细胞分裂素 Cytokinin (mg/L)	接种数 Inoculating number	增殖系数 Multiple	平均苗高 Average shoot height (cm)	生长状况 Growth situation
TDZ1.0	50	3.5 aA	1.81 aA	苗健壮,叶浓绿,基部分化新芽 Shoot growth strong, leaves heavy green, differentiate new buds on bottom
BA1.0	50	2.1 bA	2.50 aA	苗弱,叶淡绿,极个别高度生长明显 Shoot growth feebleness, leaves light green, and growth significant high individual
ZT1.0	50	2.1 bA	2.32 aA	苗生长中庸,叶黄绿 Shoot growth mean and leaves chlorotic

表 5 不同 TDZ 浓度对魁香芽苗增殖的影响
Table 5 Effect of different TDZ concentration on shoot multiplication of Kuixiang

TDZ 浓度 TDZ concentration (mg/L)	接种数 Inoculating number	增殖系数 Multiple	生长状况 Growth situation
1.0	50	2.5 bAB	茎粗中等,叶绿、舒展 Stem diameter middle, leaves green and unfolded
1.5	50	3.7 aA	茎粗,叶浓绿、舒展 Stem thick, leaves heavy green and unfolded
2.0	50	2.5 bAB	茎粗,叶绿、皱缩 Stem thick, leaves green and crimple
3.0	50	1.0 cB	苗密集成球状,叶皱缩 Shoot densified into globosity, leaves crimple

2.5 不同生根培养基对魁香试管苗生根的影响

将魁香 1 cm 以上的壮苗接入生根培养基中, 5~7 d 后基部膨大, 9~12 d 可见白色根尖长出, 20~25 d 后根可长至 8 cm, 有侧根, 苗健壮。表 6 所示生根培养基以 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L 为最好, 生根率达 90%, 且生根数量较多、根系也较粗壮(图版-8); 其次, MS+NAA 0.05 mg/L 生根效果较好, 生根率达 75%; 1/2 MS 培养基中的根长和苗高虽然显著高于其他培养基, 但生根率较低, 为 40%。

2.6 移栽

选取生长势良好、植株健壮根系发达的组培苗, 打开瓶盖, 炼苗 1~2 d 后, 从瓶中取出, 洗净根部的培养基, 浸入 600 倍的多菌灵溶液中消毒 20 min, 然后栽植在装有灭菌基质的营养钵中, 浇足水后覆盖聚乙烯膜小拱棚, 放入培养室内, 注意保持湿度。移栽后 10 d 调查, 成活率超过 90%(图版-9)。20 d 后将长势壮的组培苗移入温室内带基质栽植。

表 6 不同生根培养基对魁香试管苗生根的影响
Table 6 Effect of different media on rooting of Kuixiang

生根培养基 Rooting medium (mg/L)	接种苗数 Inoculating number	生根率 Rooting rate (%)	根数 Average root number	平均根长 Root length (cm)	平均苗高 Shoot height (cm)	根系状况 Root growth situation
MS	15	38.46 cC	3.00 aA	2.27 bB	2.00 bAB	根较多、细长, 苗健壮 Root more and slightly, shoot strong
MS+NAA 0.05	15	75.00 bB	3.67 aA	2.14 bB	1.67 bB	根多、细长, 苗健壮 Root most and slightly, shoot strong
1/2 MS	15	40.00 cC	3.25 aA	4.60 aA	2.75 aA	根较多、细长, 苗健壮 Root more and slightly, shoot strong
1/2 MS+NAA 0.1	15	90.00 aA	5.45 aA	2.16 bB	1.86 bB	根多、粗壮, 苗健壮 Root most and thickset, shoot strong

3 讨 论

本实验首次研究了 TDZ 在榛组培中的应用。结果表明, 与 BA 相比, TDZ 是一种更适于促进腋芽增

殖,具有更高细胞分裂素活性的物质,而且 TDZ 能促进榛愈伤组织分化,具有比 ZT 更强的作用,这与周俊彦等^[6]的报道类似。但是,随着继代培养次数增加,TDZ 浓度应逐渐下降甚至去除。因为 TDZ 在植物体内积累,会抑制芽的生长和分化。张小红等^[7]认为可能是由于外植体内部的内源激素与 TDZ 的协同作用,低浓度下 2 者维持着一定的平衡状态,高浓度则打破了 2 者之间的平衡,从而抑制其生长。

试验同时发现,随着继代培养时间的延长,榛芽苗出现不同程度的叶色变黄现象,可能与榛组培苗吸收、利用螯合铁的效率有关。国外欧榛及杂交榛组培多用 Sequestrene 138 Fe^[8-9],国内没有此药的生产,从国外购买较困难,笔者采用适当加大铁盐量(每 L 加 200 倍铁盐母液 15 mL 左右)或者缩短继代时间(20 d 左右)来解决此问题。(本文图版见插一)

参考文献 References:

- [1] LIANG W J, DONG D F(梁维坚,董德芬). Breeding and cultivation of hybrid hazelnut(*Corylus heterophylla* × *C. avellana*)(大果榛子育种与栽培)[M]. Beijing: China Forest Press, 2002: 17-20. (in Chinese)
- [2] NAS M N, REED P E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts[J]. Scientia Horticulture, 2004, 101:189-200.
- [3] NAS M N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut(*Corylus avellana* L.) micropropagation[J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2004, 28(3):189-194.
- [4] YIN C T, SUN M Z, HAN A P(尹成涛,孙满芝,韩爱平). Studies on Tissue culture and Rapid Propagation of *Corylus avellana* L. (欧洲榛子的组培快繁技术研究)[J]. Shandong Forest Science and Technology(山东林业科技), 2002(5):14-15. (in Chinese)
- [5] YU X, REED B M. A micropropagation system for hazelnut (*Corylus species*)[J]. Hortscience, 1995, 30:120-123.
- [6] ZHOU J Y, GUO F X(周俊彦,郭扶兴). Cytokinin activities of benzyl derivatives[J]. Plant Physiology Communication(植物生理学通讯), 1990(4):7-13. (in Chinese)
- [7] ZHANG X H, ZHANG H Y, WU J(张小红,张红燕,武军). Effect of TDZ on callus inducement and shoot growth in tissue culture of *Toona sinensis*[J]. Journal of Northwest Sci Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed)(西北农林科技大学学报:自然科学版)2002, 30(5):35-39. (in Chinese)
- [8] NAS M N, READ P E. Micropropagation of hybrid hazelnut: medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality. In: Proceedings of the Fifth International Congress on Hazelnut[J]. Acta Hort, 2000, 556:251-258.
- [9] AL-KAI H, SALESES G, MOURAS A. Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus Avellana* L.)[J]. Ahronomie, 1984(4):399-402.



图版说明

1. 5月中旬的田间材料, 2. 芽苗在DKW培养基上生长30 d后生长状况, 3. 芽苗在MS培养基上生长30 d后生长状况, 4. 穗香品种初代培养20 d后生长状况, 5. 芽苗在附加TDZ培养基上30 d后分化的丛生芽, 6. 芽苗在附加6-BA培养基上30 d后生长状况, 7. 高浓度TDZ诱导产生的愈伤团, 8. 培养30 d后的生根苗, 9. 移栽10 d后有活的试管苗

Explanation of plates

1. The field-grown tree in mid May, 2. Shoot cultured on DKW medium after 30 d culture, 3. Shoot cultured on MS medium after 30 d culture, 4. Kuixiang shoot after 20 d initiation culture, 5. The cluster shoots on DKW medium supplemented with TDZ after 30 d culture, 6. The shoot on DKW medium supplemented with TDZ after 30 d culture, 7. Callus on DKW medium supplemented with high TDZ concentration, 8. The rooting shoot after 30 d culture, 9. Survival plantlet after 10 d