

阿月浑子组织培养研究初报

刘 洋¹, 苏淑钗¹, 冷平生², 魏 芳¹

(¹北京林业大学资源与环境学院, 北京 100083, ²北京农学院园林系, 北京 102206)

摘要:阿月浑子是中国西部与华北地区极有发展前景的坚果树种,但其微繁技术至今未有突破,以7年生阿月浑子嫁接树茎段为外植体,进行启动培养试验,对MS、改良MS、Q-L₄、DKW 4类培养基,BA、IBA、NAA、GA 4种激素与用量,7%次氯酸钠和0.1%升汞溶液与灭菌时间、葡萄糖和蔗糖与用量、叶酸、D-泛酸钙与LH(水解乳蛋白)3种添加剂与用量的培养效果进行比较分析,确定阿月浑子外植体0.1%升汞溶液灭菌10min效果最好,最优培养基为1/2DKW+0.5mg/L 6-BA +0.5mg/LIBA + mg/L GA₃+1mg/L 叶酸 + 300mg/L LH +1mg/l D-泛酸钙 +15g/l 葡萄糖 + 6.5g/l 琼脂。

关键词:阿月浑子;启动培养;培养基

Preliminary Studies on Tissue Culture of Pistachio

Liu Yang¹, Su Shuchai¹, Leng Pingsheng², Wei Fang¹

(¹College of nature resource and environment, Beijing Forestry University, Beijing, 100083;

²Beijing University of Agriculture, Beijing, 102206)

Abstract: Pistachio is a potential nut tree in the north and west of China, however, the micropropagation of pistachio is not still successful, this experiment were designed for establishing a tissue culture techniques of pistachio. Shoots collected from grafted tree (7yrs)of pistachio were used as explant in primary culture with different treatments of medium(MS, modified MS, Q-L₄, DKW), plant hormone(BA, IBA, NAA, GA), disinfectant (7%NaClO₃, 0.1%mercuric chloride), addition (folic acid, calcium D-pantothenate and LH), glucose and sucrose, experiment results shown that explant of pistachio were disinfected well with 0.1% mercuric chloride for 10min, the suitable primary medium for pistachio was: 1/2DKW+0.5mg/L 6-BA +0.5mg/L IBA +3.0 mg/L GA₃+1mg/L folic acid+ 300mg/L LH +1mg/L calcium D-pantothenate+ 15g/L glucose+6.5g/L agar.

Key words: Pistachio, Primary culture, Medium

阿月浑子 (*Pistacia vera* L.) 喜光, 耐干旱耐盐碱性强, 结果期可达百年以上, 经济效益十分可观, 是中国西部与华北地区极有发展前景的坚果树种, 目前多通过嫁接繁殖^[1,2], 但常因品种不亲和性和易受环境影响, 嫁接成活率并不高, 而引进的优良砧木UCB的抗病性与亲和性优于中国黄连木, 但从国外引进优良苗木和砧木, 则价格昂贵, 远不能满足中国对种苗的需求, 优良接穗与砧木的缺乏制约着中国阿月浑子的发展, 如果能通过组织培养技术进

行快速繁殖, 进而开展微嫁接, 则不仅可保持其优良品种的遗传特性, 也能有效地提高其繁殖系数, 并为进一步开展品种改良奠定基础。

近20年来, 阿月浑子的组织培养研究报道逐渐增多^[3-6], 所用的外植体包括种胚、休眠芽、茎尖、茎段、子叶、果皮等, 基本培养基有液体或固体的MS培养基、1/2MS或其它改良MS培养基、Heller、WP、EK、SH培养基等, 此外对培养条件、生长调节物质种类、浓度和配比等也开展了一些研究, 但阿月浑子属漆树

基金项目:国家林业局“948”项目“阿月浑子良种与栽培技术引进”(96-4-71-02)与北京市人才基金项目“阿月浑子微繁殖技术研究”(0347823)资助。

第一作者简介:刘洋, 女, 1973年出生, 北京人, 硕士, 主要从事栽培生理研究。E-mail: lengpsh@tom.com。通信地址: 100083北京林业大学资源与环境学院。

通讯作者:苏淑钗, 女, 1967年出生, 河北, 副教授, 博士, 研究方向: 经济林。E-mail: sushuchai@sohu.com。

收稿日期:2006-10-09, 修回日期:2006-10-25。

农业生物技术科学

科,单宁等次生代谢物含量高,组织培养存在很多困难,至今仍未见在生产上应用的报道。阿月浑子组织培养的难点主要表现在愈伤组织褐变、衰老、培养基褐变、污染、新梢生长缓慢、叶片和顶芽枯死、繁殖率和生根率低等方面^[3,5],笔者针对阿月浑子在启动培养阶段存在的污染、褐变、存活率低等问题开展初步研究,为下一步的工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与方法

外植体取自栽种在北京农学院苗圃温室大棚的7年生阿月浑子嫁接树。在晴天 12:00-16:00 时剪取当年萌发的健壮枝条,先用自来水冲洗外植体的表面,洗涤剂溶液浸泡,自来水冲洗,用 70% 的酒精消毒,无菌水冲洗,0.01% 的升汞中浸泡,无菌水洗净 6~7 次,切成约 1~1.5cm 长的小茎段,接种在三角瓶中,培养室温度为(25±1)℃,湿度为(75±5)%,光强 2000 lx。培养基 pH 值为 5.8~6.2,所用试剂均为国产。

1.2 实验处理

1.2.1 灭菌剂及灭菌时间 灭菌剂分别选用 7% 次氯酸钠和 0.1% 升汞溶液,前者灭菌时间分别为 10min、15min、20min,后者灭菌时间分别为 7min、10min、15min,共有 6 个处理,培养基为 DKW+2mg/L 6-BA +0.02mg/L IBA + 5g/L Na₂S₂O₃。接种 15d 后调查非污染率与死亡率,30d 后,调查得率。非污染率 = 未污染茎段数 / 接种总茎段数 × 100%,死亡率 = 失活茎段数 / 接种总茎段数 × 100%,得率 = 褐变程度较轻 + 无褐变的茎段数 / 接种的总茎段数 × 100%。

1.2.2 基本培养基与琼脂量 选用 MS、改良 MS、Q-L₄、DKW 4 种培养基进行阿月浑子启动培养试验,激素为 2mg/L 6-BA 和 0.02mg/L NAA,其它条件一致,茎段接种后,分别在地 7d、14d 与 21d 调查外植体芽萌发率。

对基本培养基 DKW 与琼脂量采用 2 因素完全区组设计进行试验,设定培养基为 1/4DKW、1/2DKW、DKW,琼脂量为 5.5g/L、6.0g/L、6.5g/L、7.0g/L,共 12 个处理。接种 30d 后调查外植体得率。

1.2.3 激素种类与剂量 在 1/2DKW 基本培养基中,添加 BA、IBA、NAA、GA 四种激素,每种激素设置 4 水平,采用 4 因素 4 水平的 L₁₆ (4⁴) 正交设计,接种 30d 后调查外植体得率。

1.2.4 糖类物质与添加剂选择 以 1/2DKW 为基本培养基,分别加入不同种类和浓度的碳源 - 蔗糖(20

g/L、30 g/L、40 g/L)和葡萄糖 (14 g/L、20 g/L、30 g/L),接种 30d 后调查外植体得率。

在培养基中加入叶酸(0.5 g/L、1 g/L、2 mg/L)、D-泛酸钙(1 g/L、2 g/L、3 mg/L)、LH(水解乳蛋白(100 g/L、300 g/L、400 mg/L)三种添加剂,试验采用 3 因素 3 水平 L₉ (3³) 的正交设计,接种 30d 后调查外植体得率。

2 结果与分析

2.1 灭菌剂及灭菌时间对阿月浑子启动培养的影响

7% 次氯酸钠与 0.1% 升汞与不同灭菌时间处理对阿月浑子外植体的非污染率、得率、死亡率的影响极显著,对所得数据进行方差分析,结果见表 1,0.1% 升汞溶液灭菌 15min 处理与 0.1% 升汞溶液灭菌 10min 处理的污染率相对较低,0.1% 升汞溶液灭菌 10min 处理与 0.1% 升汞溶液灭菌 7min 处理的褐变程度较轻,7% 次氯酸钠溶液灭菌 10min 处理、0.1% 升汞溶液灭菌 7min 与灭菌 10min 处理的死亡率相对较低。综合三方面的结果,选用 0.1% 升汞溶液灭菌 10min 为佳。

2.2 基本培养基及琼脂量对阿月浑子启动培养的影响

从图 1 可知,4 种培养基以 DKW 最佳,阿月浑子外植体芽萌发率在第 7 天、14 天和 21 天分别为 24%、28% 和 36%,随时间增长,芽膨大数在增加,

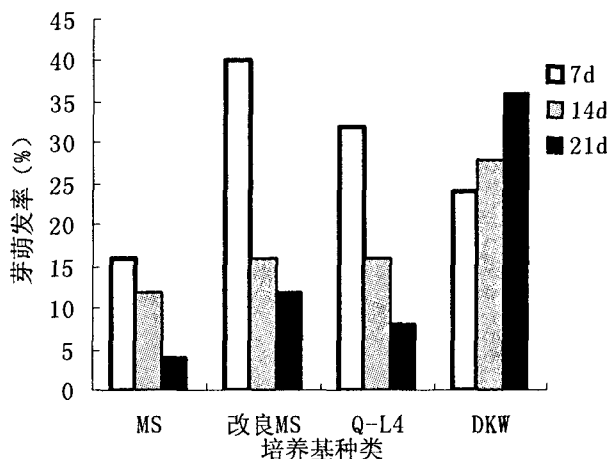


图 1 阿月浑子在 4 种培养基中的芽萌发率

且芽萌发数较多,表明外植体存活率较高,而其它 3 种培养基,随时间延长,外植体死亡数增加,芽萌发数逐渐减少,其中改良 MS 培养基效果相对较好,在第 7 天时芽萌发率为 40%,为最高,但第 21 天后降为 12%。显然,DKW 培养基适宜作阿月浑子启动培养基,保持外植体较高的存活率。

进一步对培养基 DKW 与琼脂用量对阿月浑子

表1 灭菌剂及灭菌时间对阿月浑子启动培养的影响

处理	灭菌剂	灭菌时间(min)	非污染率(%)	死亡率(%)	得率(%)
1	7%次氯酸钠溶液	10min	33.33D	13.33C	26.67BCD
2	7%次氯酸钠溶液	15min	36.67D	23.33ABC	20.00CD
3	7%次氯酸钠溶液	20min	53.33C	36.67A	16.67D
4	0.1%升汞溶液	7min	66.67BC	13.33C	33.33AB
5	0.1%升汞溶液	10min	76.67AB	20.00BC	36.67A
6	0.1%升汞溶液	15min	83.33A	26.67AB	30.00ABC

表2 基本培养基、琼脂对阿月浑子启动培养的影响

处理	基本培养基	琼脂(g/L)	得率(%)
7	1/2DKW	3(6.5)	46.67aA
8	1/2DKW	4(7.0)	43.33aA
6	1/2DKW	2(6.0)	40.00abAB
4	1/4DKW	4(7.0)	36.67bcAB
12	DKW	4(7.0)	36.67bcBC
11	DKW	3(6.5)	30.00cdBCD
10	DKW	2(6.0)	26.67deCDE
5	1/2DKW	1(5.5)	26.67deCDE
3	1/4DKW	3(6.5)	26.67deCDE
2	1/4DKW	2(6.0)	20.00efDE
1	1/4DKW	1(5.5)	16.67efE
9	DKW	1(5.5)	13.33fE

注:不同的大写与小写字母分别表示LCD方差分析0.01水平与0.05水平差异极显著,相同字母表示差异不显著,下同。

外植体得率的影响进行分析,见表2,所得数据经方差分析,基本培养基、琼脂用量及各处理间得率均存在极显著差异,其中1/2DKW基本培养基效果最好;琼脂用量在6.5g/L效果最好。各个处理组合

差异显著性比较显示,处理7、8效果较好,即1/2DKW+6.5g/L琼脂和1/2DKW+7g/L琼脂。将上述结果综合分析,确定基本培养基为1/2DKW+琼脂6.5g/L。

2.3 激素种类及剂量对阿月浑子启动培养的影响

以1/2DKW为基本培养基,配置不同剂量的BA、IBA、NAA、GA4种激素,分析其对阿月浑子外植体的影响,对所得数据进行方差分析,结果表明(表3)各处理间差异极显著,在16种激素组合中最优组合为0.5mg/L 6-BA+0.5mg/L IBA+3.0mg/L GA,阿月浑子外植体得率达66.67%,其次为0.5mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA+3.0mg/L GA,得率为63.33%。其它组合效果明显差,但IBA与NAA选择一种即可。

2.4 糖类物质与添加剂对阿月浑子启动培养的影响

在1/2DKW基本培养基中添加不同剂量的葡萄糖或蔗糖,调查阿月浑子外植体培养情况,经方差分析(见表4)表明,各处理间差异达极显著,葡萄糖作为碳源明显优于蔗糖,在3水平葡萄糖中,

表3 激素种类及剂量对阿月浑子启动培养的影响

处理	6-BA(mg/L)	IBA(mg/L)	NAA(mg/L)	GA(mg/L)	得率(%)
1	0.2	0	0	0	36.67 e DE
2	0.2	0.5	0.02	0.5	36.67 e DE
3	0.2	1.0	0.2	1.5	23.33 ef EF
4	0.2	2.0	0.5	3.0	23.33 g G
5	0.5	0	0.02	1.5	36.67 e DE
6	0.5	0.5	0	3.0	66.67 a A
7	0.5	1.0	0.5	0	33.33 ef EF
8	0.5	2.0	0.2	0.5	23.33 g FG
9	2.0	0	0.2	3.0	63.33 ab AB
10	2.0	0.5	0.5	1.5	53.33 cd BC
11	2.0	1.0	0	0.5	56.67 bc ABC
12	2.0	2.0	0.02	0	23.33 g FG
13	4.0	0	0.5	0.5	46.67 d CD
14	4.0	0.5	0.2	0	23.33 g FG
15	4.0	1.0	0.02	3.0	26.67 fg EFG
16	4.0	2.0	0	1.5	36.67 e DE

表4 葡萄糖与蔗糖及剂量对阿月浑子启动培养的影响

碳源种类	葡萄糖	葡萄糖	葡萄	糖蔗糖	蔗糖	蔗糖
剂量(g/L)	15	20	30	30	20	40
得率(%)	56.67 a A	46.67 b A	43.33 b AB	30.00 c BC	26.67 c C	23.33 c C

表5 添加剂及剂量对阿月浑子启动培养的影响

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9
叶酸(mg/g)	1	1	2	2	0.5	0.5	1	2	0.5
D-泛酸钙(mg/g)	1	2	3	2	3	2	3	1	1
水解乳蛋白(mg/g)	300	400	300	100	400	300	100	400	100
得率(%)	46.67aA	43.33a AB	43.33a AB	30.00b ABC	30.00b ABC	26.67b BC	26.67b BC	26.67b BC	23.33b C

以添加 15g/l 葡萄糖的效果最好, 得率达 56.67%。

在 1/2DKW 基本培养基中比较添加不同水平叶酸、D-泛酸钙、LH(水解乳蛋白)的阿月浑子培养效果, 经方差分析可知(见表5), 处理1、处理2与处理3的外植体得率最高, 分别达 46.47%、43.33%和 43.33%, 叶酸与 LH 各水平间均存在极显著差异, 经多重比较, 叶酸的最优水平是 1 mg/L; LH(水解乳蛋白)的最佳水平是 300mg/l, 因此, 确定添加剂最优组合是处理1, 即叶酸为 1mg/L, D-泛酸钙为 1mg/L, LH(水解乳蛋白)为 300mg/L。

3 讨论

茎段培养可诱导外植体萌发腋芽、不定芽, 通过继代培养实现带芽茎段的增殖, 待幼茎长后再诱导生根从而获得完整植株, 这是阿月浑子微繁的理想途径, 但茎段外植体取自阿月浑子的田间嫁接树, 在离体培养时极易污染^[7], 升汞的灭菌能力在常用灭菌剂中是最强的, 但灭菌时间过长, 对阿月浑子的存活率有不利影响, 从试验结果看, 用 0.1%升汞溶液对外植体灭菌 10min 效果较好。

阿月浑子茎段培养时的启动培养基有不同报道, 本试验比较了 MS、改良 MS、Q-L₄、DKW、1/2DKW、1/4DKW 的几种培养基的培养效果, 得出 1/2DKW 作为启动培养基效果最好, 这与 Ghorbani 等人^[8]关于阿月浑子胚培养基的报导结果是一致的。一些报道使用改良 MS 培养基也获得较好效果, 试验表明改良 MS 培养基有利于阿月浑子芽的迅速萌动, 但褐变严重, 3周后存活率迅速下降, 而使用 DKW 培养基时, 外植体芽萌动比其他培养基晚, 但更多形成愈伤组织, 褐变相对较少, 3周后的存活率较高。文献中外援植物激素有细胞分裂素 6-BA 和 KT, 生长素 NAA 等等, 如 Barghchi 等人^[9]与 Sheibani 等人^[10]在启动培养阶段试验了不同细胞分裂素, 确定 6-BA 最为有效, 也有不附加任何植物激

素的, 如 Mederos-Molina 和 Trujillo^[10]将阿月浑子灭菌后接种到改良的 Heller 培养基(H + 7 mM/l KH₂PO₄ + 10 mM/l AgNO₃)中, 培养 23d 后获得了较高的萌芽率。本实验中笔者采用 DKW 培养基, 比较了 BA、IBA、NAA、GA 4 种激素不同浓度组合, 外援激素对启动培养影响显著, 最优组合为 0.5mg/l 6-BA + 0.5mg/l IBA + 3.0mg/l GA, IBA 与 NAA 选用一种即可。

在阿月浑子组培中有使用不同添加剂的报道, 但效果不一。核桃属于组培困难树种之一, 通过添加叶酸、D-泛酸钙和 LH(水解乳蛋白)到培养基中, 获得良好效果^[11], 将它们试用到阿月浑子组培中, 得出添加 1mg/l 叶酸、1mg/l D-泛酸钙和 300mg/l LH(水解乳蛋白)时有益于阿月浑子启动培养。此外在糖原的选用上, 葡萄糖效果优于蔗糖, 表明小分子量糖更易于被阿月浑子外植体吸收利用。

4 结论

4.1 在几种常规灭菌方法中, 用 0.1%升汞溶液对阿月浑子茎段外植体灭菌 10min 效果最好。

4.2 综合几个影响阿月浑子茎段启动培养的因素, 初步得出较为适合的培养基是: 1/2DKW + 0.5mg/l 6-BA + 0.5mg/l IBA + 3mg/l GA + 1mg/l 叶酸 + 300mg/l LH + 1mg/l D-泛酸钙 + 15g/l 葡萄糖 + 6.5g/l 琼脂。

4.3 阿月浑子是漆树科植物, 组织培养十分困难, 因此, 从外植体的田间采集、灭菌、培养基配制、接种与培养条件的控制等方面必须严格按照程序认真操作。

参考文献

- [1] 路丙社, 董源, 白志英. 我国阿月浑子生产现状与发展对策. 果树科学, 1998, 15(3): 252-255.
- [2] 柳振亮, 李树蓉, 苏淑钗. 北京地区阿月浑子嫁接繁殖的研究. 北京林业大学学报, 2004, 26(5): 27-29.
- [3] 刘洋, 苏淑钗, 冷平生. 阿月浑子组织培养技术研究进展. 北京农学院学报, 2005, 20(2): 65-68.

- [4] Yucel S, Onay A, Colak G, et al. The researches of obtaining from *Pistacia vera* L. apical bud and nodal bud by micropropagation. *Acta Horticulturae*, 1991, 289:167-168.
- [5] Barghchi M, Alderson P G. In vitro propagation of *Pistacia vera* L. from seedling tissues. *J Hort Sci*, 1983,58(3):435-445.
- [6] Abousalim A, Hafdi A, Kaska N, et al. Somatic embryogenesis in pistachio (*P. vera*): effects of subculture, growth regulators and explant type. *First international symposium on pistachio nut, Adana, Turkey, 20-24 Sep. 1994. Acta-Horticulturae, 1995, 419:195-199.*
- [7] Bonja J M, Durzan D J. 树木组织培养. 阙国宁, 郭达出, 李金田译. 北京: 中国林业出版社, 1988:25 ~ 26, 141 ~ 143, 175.
- [8] Ghorbani A M, Azghandi A V, Sheibani A, et al. Effects of altering culture medium on rooting of pistachio micro-shoots (*Pistacia vera* cv 'Badami-Zarand'). *Acta Horticulturae*, 2002, 591:327-331.
- [9] Sheibani A, Villiers T A, Kaska N, et al. Effect of explant type and culture medium on micropropagation of three *Pistacia* species. *First international symposium on pistachio nut, Adana, Turkey, 20-24 Sep. 1994. Acta-Horticulturae. 1995, (419):229-232.*
- [10] Mederos-Molina S, Trujillo M I. Techniques for in vitro seed germination in *Pistacia* species. *South African Journal of Botany*, 1999, 65 (2):149-152.
- [11] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986:11.

(责任编辑: 陈素洁)