

文章编号: 1000-5692(2001)02-0115-04

山核桃愈伤组织诱导的初步研究

朱玉球¹, 廖望仪², 黄坚钦¹, 孙晓萍³

(1. 浙江林学院 资源与环境系, 浙江 临安 311300; 2. 浙江森禾种业有限公司金华分公司, 浙江 金华 321022)

(3. 浙江省杭州市园林文物局 苗圃, 浙江 杭州 310023)

摘要: 采用正交设计研究了不同植物激素配比、蔗糖质量浓度、外植体取材部位以及单宁含量等因素对山核桃组织培养中愈伤组织形成的影响。结果表明: WPM+BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最适培养基; 顶芽和第 4 芽段为较适宜的山核桃愈伤组织诱导的取材部位; 不同芽段愈伤组织的形成率与其单宁含量不相关, 而与芽段愈伤组织形成的部位有关, 且随着单宁含量的减少, 愈伤组织形成的部位向切口上移。选取 1 年生实生苗茎尖和茎段, 配比合理的植物激素加以诱导, 可提高山核桃嫁接成活率。表 5 参 11

关键词: 山核桃; 组织培养; 愈伤组织; 单宁; 嫁接

中图分类号: S794.9; S664.1; Q943.1 **文献标识码:** A

山核桃 (*Carya cathayensis*) 属胡桃科 (Juglandaceae) 山核桃属植物, 集中产于天目山区浙江临安和安徽宁国等县 (市)。山核桃为著名的木本油料树种和食用干果, 具有较高的营养价值和经济价值^[1,2]。长期以来, 它主要通过种子繁殖。许多学者相继从不同角度对山核桃丰产栽培技术, 保花保果技术, 低产林改造等方面进行了一系的试验研究, 取得了一定的成果^[2-8]。山核桃是嫁接难成活的树种之一, 虽然进行了多种有益的实践和探讨, 但未能有效应用生产^[9,10]。本研究从选取外植体部位和培养成分等环节探讨山核桃愈伤组织的诱导技术, 旨在为提高其嫁接成活率, 在接穗选材和附加外源激素种类与配比等方面提供理论依据。这对山核桃提前开花结实、扩大人工栽培以及保持品种优良特性均具有重要的意义。

1 试验材料与方 法

1.1 组织培养条件的筛选

1.1.1 材料 山核桃 1 年生实生苗茎尖和茎段。

1.1.2 方法 选取生长健壮的无病虫害的实生苗枝段为外植体。将外植体用自来水洗净后, 在洗洁精溶液中浸泡 15 min, 冲洗后在流动的清水中浸泡 24 h, 再用洗洁精刷一遍, 用滤纸吸干外植体表面的水分, 用 70% 的乙醇浸泡 10 s, 然后用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次。在无菌条件下切取 1~2 cm 茎尖 (含 2 个芽)、茎段接种在不同激素配比的培养基上进行愈伤组织的诱导。

1.1.3 培养条件 培养温度为 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 每日光照 12 h, 光强度为 1 500~2 000 lx。

收稿日期: 2000-12-21; 修回日期: 2001-02-20

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (300011)

作者简介: 朱玉球 (1963-), 女, 浙江永康人, 实验师, 从事植物遗传育种研究。

1.2 试验方法

1.2.1 方法1 基本培养基为WPM (McCown 和 Lloyd, 1981), 附加3种植物激素, 即6-苄基氨基嘌呤 (BA)、吲哚丁酸 (IBA) 和赤霉素 (GA)。每种选用3种质量浓度 (表1)。利用正交表来设计试验方案, 进行山核桃茎尖和茎段愈伤组织形成的对比试验。

1.2.2 方法2 用不同质量浓度的蔗糖 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验对山核桃茎尖愈伤组织形成的影响。

1.2.3 方法3 利用1.2.1, 1.2.2试验方法选择最适合山核桃茎尖和茎段愈伤组织形成的蔗糖质量浓度和植物激素配比, 进行外植体取样部位对愈伤组织形成影响的试验。

1.2.4 方法4 用外植体取样部位测定单宁含量的变化对山核桃愈伤组织形成的影响。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导情况

山核桃的茎尖和茎段接种后7d左右就在叶柄、叶痕处、皮层和上切口形成愈伤组织。愈伤组织多为松散型, 乳白色或淡绿色, 少具光泽。愈伤组织寿命为20~40 d。

2.2 植物激素配比对山核桃茎尖和茎段愈伤组织形成的影响

基本培养基能保证培养物的生存与最低的生理活动, 但只有配合使用适当的植物激素含量才能诱导细胞分裂、愈伤组织增殖、生长以及根、芽分化或胚状体发育等合乎理想的变化。诱导和保持愈伤组织生长所需植物激素的种类和质量浓度, 又与供体植物的种类和外植体本身的生理状态或对植物激素的敏感性密切相关^[11]。为此, 本次试验选用了3种植物激素, 每种选用3种质

表1 植物激素种类和质量浓度

Table 1 Plant hormones and their mass concentrations

植物激素	植物激素质量浓度 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		
	1	2	3
IBA	0.5	2.0	4.0
BA	2.0	4.0	8.0
GA	0.5	1.0	3.0

表2 正交设计方差分析结果

Table 2 Variance analysis of the orthogonal design

变因	自由度 <i>d</i>	茎 尖		茎 段		F_{α}
		均方	<i>F</i> 值	均方	<i>F</i> 值	
IBA	2	3 317.58	2.47	2 339.86	7.91 **	$F_{0.05(2,20)} = 3.49$
BA	2	789.80	0.59	500.93	1.69	$F_{0.01(2,20)} = 5.85$
GA	2	1 095.36	0.82	12.03		
误差	20	1 341.48		295.78		

表3 植物激素配比对山核桃茎尖和茎段愈伤组织形成的影响

Table 3 Effects of proportions of plant hormones on the callus formation of both stem apices and other stem lengths

培养基序号	植物调节剂的配比	茎尖愈伤组织	茎段愈伤组织
		形成率/ %	形成率/ %
1	IBA _{0.5} +BA _{2.0} +GA _{0.5}	0	0
2	IBA _{0.5} +BA _{4.0} +GA _{1.0}	0	0
3	IBA _{0.5} +BA _{8.0} +GA _{3.0}	0	0
4	IBA _{2.0} +BA _{2.0} +GA _{1.0}	0	30
5	IBA _{2.0} +BA _{4.0} +GA _{3.0}	0	30
6	IBA _{2.0} +BA _{8.0} +GA _{0.5}	65	10
7	IBA _{4.0} +BA _{2.0} +GA _{3.0}	0	0
8	IBA _{4.0} +BA _{4.0} +GA _{0.5}	60	15
9	IBA _{4.0} +BA _{8.0} +GA _{1.0}	50	0
10	IBA _{0.5} +BA _{2.0} +GA _{1.0}	100	50
11	IBA _{0.5} +BA _{4.0} +GA _{3.0}	0	30
12	IBA _{0.5} +BA _{8.0} +GA _{0.5}	35	15
13	IBA _{2.0} +BA _{2.0} +GA _{3.0}	0	30
14	IBA _{2.0} +BA _{4.0} +GA _{0.5}	55	60
15	IBA _{2.0} +BA _{8.0} +GA _{1.0}	100	70
16	IBA _{4.0} +BA _{2.0} +GA _{0.5}	35	35
17	IBA _{4.0} +BA _{4.0} +GA _{1.0}	25	0
18	IBA _{4.0} +BA _{8.0} +GA _{3.0}	15	0
19	IBA _{0.5} +BA _{2.0} +GA _{3.0}	80	0
20	IBA _{0.5} +BA _{4.0} +GA _{0.5}	0	0
21	IBA _{0.5} +BA _{8.0} +GA _{1.0}	100	0
22	IBA _{2.0} +BA _{2.0} +GA _{0.5}	100	0
23	IBA _{2.0} +BA _{4.0} +GA _{1.0}	70	0
24	IBA _{2.0} +BA _{8.0} +GA _{3.0}	60	0
25	IBA _{4.0} +BA _{2.0} +GA _{1.0}	80	0
26	IBA _{4.0} +BA _{4.0} +GA _{3.0}	30	0
27	IBA _{4.0} +BA _{8.0} +GA _{0.5}	0	25

说明: 基本培养基为WPM, 培养时间20 d, 蔗糖质量浓度 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

量浓度, 利用正交表设计了 27 种组合的培养基。结果见表 2 和表 3。

由表 2 方差分析结果和表 3 数据表明, 茎尖愈伤组织的形成较茎段容易, 组合间差异不显著, 茎尖愈伤组织的形成率高的可达 100%, 如 10 号、15 号、21 号和 22 号培养基。相反, 茎段愈伤组织的形成率在组合间差异极显著, 其中生长素 (IBA) 是主导因子。愈伤组织形成率高的可达 70%。其中 10 号、14 号和 15 号培养基显著高于其他组合。相比之下, 15 号培养基是诱导山核桃茎尖和茎段愈伤组织形成的适合培养基。

2.3 蔗糖质量浓度对山核桃茎尖愈伤组织形成的影响

蔗糖既是培养基中的能源物质也是渗透调节剂, 其浓度对愈伤组织的诱导、增殖、分化及质地有明显的影 响。因此, 为了寻求山核桃茎尖愈伤组织形成中碳源的最适质量浓度, 进行了蔗糖质量浓度的对比试验, 结果见表 4。

从表 4 可知, 蔗糖质量浓度在 $0 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 随蔗糖质量浓度增加, 茎尖愈伤组织的形成率增高, 以致达到 100%。当蔗糖质量浓度达到或超过 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的增殖极慢, 易干枯, 一般寿命为 7~10 d, 这可能是由培养基的渗透势增大所致。当蔗糖质量浓度为

表 4 蔗糖质量浓度对茎尖愈伤组织形成的影响

Table 4 Effects of sucrose mass concentrations on the callus formation of stem apices

蔗糖质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	愈伤组织形成率/%	愈伤组织生长状况
0	0	
20	50	乳白色, 增殖快
30	77.5	乳白色, 增殖快
40	100	白色粉状, 增殖慢, 易干枯
80	100	白色粉状, 增殖极慢, 易干枯

说明: 基本培养基 WPM, 培养基中加 BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

0, 山核桃茎尖愈伤组织未能形成。这说明碳源是愈伤组织诱导所必需的。可以认为, 中等质量浓度蔗糖 ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对山核桃愈伤组织的诱导、增殖和生长最为有利。

2.4 外植体取样部位对山核桃愈伤组织形成的影响

利用上述试验结果, 选出最适合山核桃茎尖和芽段愈伤组织诱导和生长的 15 号培养基, 即 WPM + BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 进行外植体取样部位对愈伤组织形成的对比试验, 结果见表 5。

由表 5 可知, 在同等条件下, 芽段在枝条上所处的位置不同, 其愈伤组织的形成率和愈伤组织形成部位不同。愈伤组织的形成率以顶芽最高, 第 4 芽段次之, 这可能与外植体自身生理生化状态有关。由此可以认为, 顶芽和第 4 芽段为较适宜的山核桃愈伤组织诱导的取材部位。

表 5 不同芽段及单宁含量对愈伤组织形成的影响

Table 5 Effects of different bud loci and tannin contents on the callus formation

外植体 部 位	单宁含量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	接种数/ 个	愈伤组织 形成率/%	愈伤组织形成部位
顶芽	11.30	20	100	叶痕处, 皮层
第 3 芽段	81.1	20	30	上切口下 2~5 mm 皮层
第 4 芽段	66.8	20	80	上切口
第 5 芽段	58.3	20	40	上切口

说明: 培养时间 20 d

2.5 不同芽段单宁含量的变化对山核桃愈伤组织形成的影响

2.5.1 单宁含量测定 单宁是多酚类化合物的总称。其测定原理为单宁在碱性条件下与醋酸锌中的锌离子络合, 产生少量沉淀, 多余的醋酸锌用 EDTA 滴定, 从而求出单宁的含量。测定结果见表 5。

2.5.2 单宁含量的变化与芽段愈伤组织形成的关系 从表 5 可知, 不同芽段愈伤组织的形成率与其单宁含量没有相关性, 但对芽段愈伤组织形成的部位有影响, 随着单宁含量的减少, 愈伤组织形成的部位向切口上移。这说明在外植体切口上流出的单宁形成一种愈合物, 对切口进行保护, 单宁含量越高越是要阻碍切口处愈伤组织的形成。

3 结论与讨论

山核桃是经济价值较高的树种, 但它属于无性繁殖难的树种。本研究对山核桃茎尖和茎段在各种

条件下愈伤组织诱导进行了初步的研究。可以看出, WPM+BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最适培养基。在外植体选取上以顶芽和第4芽段为较适宜的山核桃愈伤组织诱导的取材部位, 而且第4芽段和第5芽段上切口愈伤组织诱导成功, 为提高嫁接成活率在接穗的取芽部位提供了科学依据。不同芽段愈伤组织的形成率与其单宁含量不相关, 而与芽段愈伤组织形成的部位有关, 随着单宁含量的减少, 愈伤组织形成的部位向切口上移。该试验结果为山核桃嫁接的接穗选取和合理激素配比的使用提供了科学依据。但从试验结果看出, 山核桃愈伤组织的寿命较短, 一般维持在20~40 d, 这也许是影响山核桃嫁接成活的另一关键因素。因此, 如何保持愈伤组织较长时间的分裂能力, 愈伤组织细胞的分化以及成苗的内外条件等方面, 还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王景祥. 浙江植物志: 第2卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986. 24-26.
- [2] 黎章矩, 高林, 王白坡, 等. 浙江省名特优经济树种栽培技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1995. 159-172.
- [3] 朱永军. 浙江山核桃丰产栽培技术[J]. 林业科技开发, 1992, (4): 37.
- [4] 黎章矩, 钱莲芳. 山核桃科研成就和增产措施[J]. 浙江林业科技, 1992, 12(6): 49-53.
- [5] 黎章矩, 钱莲芳, 钱尧林. 山核桃保花保果技术研究[J]. 林业科学, 1993, 29(4): 360-365.
- [6] 王白坡, 徐林娟, 林霞, 等. 多效唑对8种经济树种生长和结果的调控作用[J]. 浙江林学院学报, 1996, 13(3): 255-262.
- [7] 何社发. 山核桃结实大小年产生的原因及对策[J]. 安徽林业科技, 1998, (4): 30-31.
- [8] 张玉林. 山核桃培育技术[J]. 安徽林业, 1999, (2): 23.
- [9] 钱林, 程益鹏, 程渭山. 山核桃嫁接新技术[J]. 浙江林业, 1995, (2): 17.
- [10] 汪祥顺, 蔡传山, 徐德传. 山核桃嫁接技术研究[J]. 林业科技通讯, 1997, (2): 30-32.
- [11] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 30-45.

A preliminary study on induction of callus in *Carya cathayensis*

ZHU Yu-qiu¹, LIAO Wang-yi², HUANG Jian-qin¹, SUN Xiao-ping³

(1. Department of Resources and Environment, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Jinhua Branch of Zhejiang Senhe Seed Industry, Jinhua 321022, Zhejiang, China; 3. Nursery of Hangzhou Garden and Cultural Relic Bureau, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

Abstract: Effects of such factors as ratios of different plant hormones, mass concentrations of sucrose, the part from which explants were obtained and the content of tannins on the formation of callus in the tissue culture of *Carya cathayensis* were studied by means of an orthogonal design. It's showed that WPM+BA $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +sucrose $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was an optimal medium; the portion between apical buds and the 4th bud was suitable to induce callus in *Carya cathayensis*; and the formation rate of callus for loci of the buds was not correlated with the content of tannins, but in correlation with the loci where callus was formed. In addition, the smaller the content of tannins, the farther the locus where callus formed was from the cut. The key of raising survival rate of grafting was the selection of scions and the proportions of hormones to be used in grafting.

Key words: *Carya cathayensis*; tissue culture; callus; tannin; grafting