

山核桃幼胚不定芽的诱导

万俊丽, 黄坚钦, 夏国华, 张启香, 黄丽春

(浙江林学院 浙江省现代森林培育重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 以山核桃 *Carya cathayensis* 花后 60, 75 和 100 d 的幼胚为外植体, 金属硫蛋白(MT)复合维生素+ 20 g·L⁻¹ 葡萄糖+10 mg·L⁻¹ 腺嘌呤+500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白作为基本培养条件, 研究山核桃幼胚的不同发育时期, 不同植物生长调节物质及基本培养基对山核桃不定芽诱导的影响。结果表明, 山核桃花后 60 d 的幼胚培养 56 d 后未形成不定芽, 花后 100 d 的幼胚比花后 75 d 的幼胚诱导产生的不定芽多而且长; 植物生长调节物质对山核桃不定芽诱导以 0.010 0 mg·L⁻¹ 4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶羧酸(Picloram) + 3.0 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)为启动培养基较佳; 当 6-BA 质量浓度一定时, 随 Picloram 质量浓度增加不定芽数量差异不显著; 当 Picloram 质量浓度一定时, 随 6-BA 质量浓度增加, 产生不定芽数逐渐上升, 但当 6-BA 达 10 mg·L⁻¹ 时, 不定芽出现明显玻璃化现象; 2, 4-D 的添加不利于外植体不定芽产生; MS(Murashige and Skoog)是最佳基本培养基。图 1 表 2 参 16

关键词: 植物学; 山核桃; 幼胚; 组织培养; 不定芽

中图分类号: Q943.1; S664.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)05-0762-05

Adventitious bud induction with immature embryo of *Carya cathayensis*

WAN Jun-li, HUANG Jian-qin, XIA Guo-hua, ZHANG Qi-xiang, HUANG Li-chun

(The Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Developmental stages for explants of immature embryos of *Carya cathayensis* at 60, 75, and 100-day after full bloom, different plant growth regulators, such as potassium, 6-BA, and 2, 4-D and basic media were studied. All media were supplemented with MT vitamin + 20 g·L⁻¹ D-glucose + 10 mg·L⁻¹ Ad + 500 mg·L⁻¹ CH to induce adventitious-buds. Results of a starting-culture plant growth regulator for adventitious bud induction and regeneration showed that 100-day after full bloom there were better developed stages of immature embryos from induced adventitious buds with 0.01 mg·L⁻¹ potassium + 3 mg·L⁻¹ 6-BA considered the most effective. When the concentration of potassium was constant, with an increasing concentration of 6-BA, adventitious buds gradually increased. However in a concentration of 10 mg·L⁻¹ the buds were vitrified. Additionally, 2, 4-D was detrimental to adventitious buds development, and MS (Murashige and Skoog) was the best basal medium. [Ch, 1 fig, 2 tab. 16 ref.]

Key words: botany; *Carya cathayensis*; immature embryo; tissue culture; adventitious buds

山核桃 *Carya cathayensis* 隶属于胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya*, 主要分布在浙皖交界的天目山区, 是中国特有, 浙江省重要的经济树种。长期以来, 山核桃主要采用实生苗繁殖、嫁接繁殖和扦插繁殖。生产上大量使用的实生苗基本上是自然授粉形成的, 种质不纯, 优劣并存, 而且童期长, 严重阻碍了生产的发展。山核桃嫁接虽然取得突破^[1-2], 但由于受嫁接时期、嫁接技术等因素的制约,

收稿日期: 2008-12-02; 修回日期: 2009-02-18

基金项目: 浙江省自然科学基金重大项目(Z307534); 浙江林学院 B 类创新团队资助项目(2007); 浙江省杭州市科技局资助项目(2008)

作者简介: 万俊丽, 从事经济林培育与利用研究。E-mail: wanjunli301@yahoo.com.cn。通信作者: 黄坚钦, 教授, 博士, 从事植物发育生物学研究。E-mail: huangjq@zjfc.edu.cn

繁殖效率低，繁殖速度远达不到生产的需要。而扦插繁殖目前仅解决了幼树的根插繁殖技术^[3-4]。为了加速山核桃的品种改良和优良品种苗木的繁育，用现代生物技术的方法来培育山核桃新品种并繁育苗木已势在必行。目前，虽然核桃 *Juglans regia*^[5-9]，美国山核桃 *Carya illinoensis*^[10-12]，黑核桃 *J. nigris*^[13] 等体细胞胚诱导已有成功的报道，但山核桃组织培养仍停留在愈合组织诱导阶段^[14]。本实验以不同发育时期的山核桃幼胚为外植体，用不同质量浓度 4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶羧酸(Picloram)、2, 4-二氯苯氧基乙酸(2, 4-D)和 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)组合，来探讨适合不定芽诱导的幼胚发育时期、植物生长调节物质质量浓度和配比及基本培养基对山核桃不定芽诱导的影响，为山核桃组培快繁和遗传转化体系的建立奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及预处理

采样地点为浙江省临安市板桥乡罗塘村，采山核桃开花后 60, 75 和 100 d 的幼果，带回实验室备用。选果型正常，大小均一，无伤无虫的幼果，剪去花柱及柱头，用体积分数为 75% 的乙醇浸泡 30 s，自来水冲洗干净，用 5 g·L⁻¹ 次氯酸钠溶液加少许吐温-20 抽真空 20 min，无菌水冲洗 5~6 次，在超净工作台上去除果皮和种皮后将完整的幼胚接入培养基中培养。

1.2 不同植物生长调节物质组合的筛选

以 MS (Murashige and Skoog) 为基本培养基，研究不同质量浓度的 6-BA (0, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 mg·L⁻¹)、2, 4-D (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹)、Picloram (0, 0.000 1, 0.001 0, 0.010 0 mg·L⁻¹) 单独添加和组合对山核桃幼胚不定芽诱导的影响，以不添加任何植物生长调节物质处理作为对照。均附加金属硫蛋白(MT)复合维生素，20 g·L⁻¹ 葡萄糖，10 mg·L⁻¹ 腺嘌呤(AD)，500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白(CH)，8 g·L⁻¹ 琼脂，pH 5.7，20 管·处理⁻¹，接 1 个外植体·管⁻¹，重复 3 次。

1.3 基本培养基的筛选

以花后 100 d 幼胚为材料进行基本培养基的筛选，根据 NO₃⁻ + NH₄⁺ 总含量不同，选用了 1/2MS, WPM (wood plant medium), DKW (Driver and Kuniyuki walnut), B5 和 White 等 5 种基本培养基，以 MS 为对照。各培养基中均添加 MT 复合维生素，20 g·L⁻¹ 葡萄糖，10 mg·L⁻¹ AD, 0.01 mg·L⁻¹ Picloram 以及 3 mg·L⁻¹ 6-BA, 500 mg·L⁻¹ CH, 8 g·L⁻¹ 琼脂，pH 5.7。20 管·处理⁻¹，接外植体 1 个·管⁻¹，重复 3 次。

1.4 培养条件

先暗培养 2 d 后，再放入光下，每日光暗周期为 16 h/8 h，光强为 2 400 ~ 2 600 lx，培养温度为 (25 ± 2) °C。

1.5 统计指标

28 d 继代 1 次，观察不定芽发育情况，56 d 统计每管产生的再生不定芽数、芽长和玻璃化程度。再生的不定芽平均芽数 = 每个处理产生再生的不定芽总数/接幼胚的总数；芽数是对 0.1 cm 以上的芽进行统计；芽长为达到 3 个芽数及以上的，随机取 3 个芽的平均值，少于 3 个芽的以实际芽长来统计；采用 DPS 3.0 Duncan，新复极差检验法进行数据分析处理。

2 结果与分析

2.1 幼胚发育时期对不定芽诱导的影响

花后 60 d 幼果横径为 1.71 cm，纵径 2.15 cm，幼胚长约 0.2 cm。接种 2 d 后生长点开始发育，7 d 后生长点发育成白色颗粒状结实结构，子叶增厚，14 d 后在幼胚子叶上发育形成块状和颗粒状淡黄色的致密愈合组织和白色透明松散的愈合组织(图 1-1)，28 d 后从幼胚上脱分化产生白色至黄色致密的子叶状结构(图 1-2)，松散愈合组织开始褐化。花后 75 d (幼果横径 2.27 cm，纵径 2.31 cm) 和花后 100 d (幼果横径 2.45 cm，纵径 2.41 cm)，幼胚长约 1.5 cm，接种 4 d 幼胚部分转绿，胚轴两端开始膨大伸长，7 d 后胚分化胚芽和胚根，子叶完全变绿且增厚，14 d 后胚芽端变为绿色扁平体，不定芽相继从胚芽幼叶原基处不断发育形成，呈丛生状(图 1-3)，胚根长至 8 mm 左右，28 d 后根变粗而且肉

表1 幼胚发育时期和植物生长调节物质质量浓度对山核桃幼胚不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of developmental stage and plant growth regulators on adventitious-buds induction of immature embryo *Carya cathayensis*

植物生长调节物质/(mg·L ⁻¹)			平均芽数/个			平均芽长/cm			不定芽的玻璃化程度		
Picloram	6-BA/	2,4-D	60	75	100 d	60	75	100 d	60	75	100 d
0	0	0	0	0.80 b	1.00 b	0	0.05 bc	1.44 a	-	+	+
0	1	0	0	0.71 b	0.43 e	0	0.11 bc	1.19 a	-	+	+
0	3	0	0	0.50 b	6.70 cde	0	0.10 bc	0.78 a	-	++	++
0	10	0	0	6.36 ab	14.45 abc	0	0.10 bc	0.66 a	-	+++	+++
0.000 1	0	0	0	0.33 b	2.2 de	0	0.12 bc	1.10 a	-	+	+
0.000 1	1	0	0	1.44 b	1.82 de	0	0.11 bc	0.71 a	-	+	+
0.000 1	3	0	0	5.86 ab	6.55 cde	0	0.35 ab	0.45 a	-	++	++
0.000 1	10	0	0	15.29 a	12.83 abc	0	0.26 abc	0.51 a	-	+++	+++
0.001 0	0	0	0	0.11 b	0.60 de	0	0.29 abc	0.63 a	-	+	+
0.001 0	1	0	0	1.00 b	3.50 de	0	0.09 bc	0.73 a	-	+	+
0.001 0	3	0	0	7.92 b	7.75 cde	0	0.41 a	1.29 a	-	++	++
0.001 0	10	0	0	9.17 ab	16.83 ab	0	0.28 abc	0.71 a	-	+++	+++
0.010 0	0	0	0	1.33 b	0.89 de	0	0.20 abc	1.27 a	-	+	+
0.010 0	1	0	0	2.08 b	2.60 de	0	0.14 abc	0.98 a	-	+	+
0.010 0	3	0	0	7.43 ab	9.38 bcd	0	0.28 abc	0.76 a	-	++	++
0.010 0	10	0	0	13.00 a	19.92 a	0	0.15 abc	0.94 a	-	+++	+++
0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	0.3	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	1.0	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	3.0	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	0.3	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	1.0	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	3.0	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	0	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	0.3	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	1.0	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-
0	3.0	2	0	0	0	0	0	0	-	-	-

说明：“-”没有不定芽；“+”产生不定芽且未玻璃化；“++”产生大量不定芽且轻微玻璃化；“+++”产生的不定芽大量玻璃化且程度较重。不同字母表示在0.05水平上差异显著。

质化，膨大的根外部变褐色，部分表皮破裂，56 d后根尖停止生长，胚轴上的侧芽都能健壮生长，主芽的顶端优势不明显，顶端新长出幼叶有子叶状结构和玻璃化现象出现。

实验结果表明，3个幼胚发育时期产生的不定芽数差异显著 ($P < 0.05$)。花后75 d幼胚诱导的不定芽数为1.73个，花后100 d诱导不定芽的数量最多，为2.79个。接种56 d后，花后100 d的不定芽大量产生，进一步分割培养后形成健壮的不定芽(图1-4)。且花后100 d诱导出的不定芽比75 d诱导出的平均芽长要长，所以花后100 d幼胚是不定芽诱导的较佳时期。

2.2 不同植物生长调节物质对不定芽诱导的影响

本研究在基本培养条件的基础上选用2, 4-D和6-BA 2因素4水平以及Picloram和6-BA 2因素

4 水平分别进行正交设计。实验结果表明，不同组合对不定芽数量和芽长有明显影响。在 2, 4-D 与 6-BA 组合的 16 个处理中，胚芽及胚根均未萌发，也未形成不定芽，而产生瘤状结构。Picloram 与 6-BA 组合对不定芽诱导效果较好，在 Picloram 与 6-BA 组合的 16 个处理中，当 6-BA 质量浓度一定时，随 Picloram 质量浓度增加不定芽数量差异不显著；而当 Picloram 质量浓度一定时，产生的不定芽数量随 6-BA 质量浓度升高而增多，当 6-BA 为 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，产生的不定芽数量较多且芽较健壮，无玻璃化现象或极少数出现玻璃化现象，为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，产生的不定芽数量最多，花后 100 d 产生的平均不定芽数量高达 19.92 个，但此条件下产生的不定芽多出现玻璃化，叶片发脆和畸形。方差分析结果表明，各处理间存在极显著差异，最佳植物生长调节物质组合为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Picloram + $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。

2.3 基本培养基的筛选

基本培养基对山核桃幼胚诱导不定芽影响较大。由表 2 可见，6 种供试的基本培养基对产生不定芽数差异显著，但对芽长差异不显著。MS 培养基平均不定芽数最多，为 8.58 个，不定芽生长良好，芽相对较长，玻璃化较轻，产生子叶状的致密愈合组织较少，是诱导不定芽最佳基本培养基；其次是 DKW 和 B5，两者平均芽数与 MS 差异不显著，芽长也相对较长，玻璃化轻，能形成较多淡黄色或黄色的子叶状的致密愈合组织；1/2MS 分化不定芽相对少且短，多呈淡绿色，玻璃化最严重，产生致密愈合组织多为黄绿色或白色子叶状，主根还产生不定芽；WPM 和 White 培养基产生不定芽数少，WPM 产生的不定芽多黄化，White 培养基产生不定芽最少且多呈红色，褐化比较严重。

3 结论

山核桃的幼胚在接种时污染率很高，对幼胚直接灭菌不能有效地控制污染，需将山核桃的幼果先灭菌后再取出幼胚接种，可将污染率控制在到 5% 以下，提高幼胚的成活率。采用次氯酸钠浸泡的同时真空泵抽虑灭菌，用次氯酸钠溶液替代升汞等灭菌剂，在降低成本的同时也减少了对环境的污染。

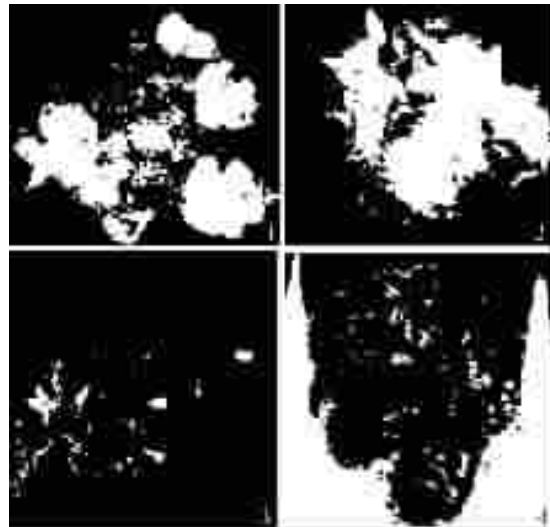
一般而言，离体胚逐步复杂的外部形态发育和发育中的内部生化变化，能够广泛地反映在其营养要求的变化上，胚越小培养越困难，特别是发育早期异养的幼胚，离体培养不易成功。多数植物的幼胚必需在长到叶原基已开始形成，器官已分化时，离体培养才能成功，胚龄大小(胚的发育指数)与胚培养成苗存在正相关关系^[15]。本实验中，在同样培养条件下花后 60, 75 和 100 d 的幼胚根原基和芽原基已开始形成，花后 100 d 的幼胚比 75 d 不定芽长，芽生长更好，低于花后 75 d 幼胚其组成成分有较高的胚性感受水平，不能诱导产生不定芽，易脱分化产生愈合组织，这可能与不同发育时期胚内生长物质含量及其比例不同有关^[16]。本研究最佳基本培养基为

表 2 基本培养基对山核桃幼胚不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of basic mediums on adventitious buds induction of immature embryo of *Carya cathayensis*

基本培养基	平均芽数/个	平均芽长/cm	玻璃化程度
MS	8.58 a	0.18 a	++
B5	4.30 ab	0.16 a	++
1/2MS	2.86 b	0.13 a	+++
DKW	5.44 ab	0.18 a	++
WPM	2.64 b	0.13 a	++
White	0.80 b	0.15 a	++

说明：不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。



1. 花后 60 d 幼胚生长点处和分子叶上发育形成块状、颗粒状淡黄色的致密愈合组织；2. 花后 60 d 幼胚的子叶外围脱分化产生白色至黄色致密的子叶状结构；3. 不定芽；4. 生长健壮的不定芽。

图 1 不同幼胚发育时期和培养条件下产生的不定芽

Figure 1 Adventitious buds under different developed stages of immature embryo and culture conditons

MS, 植物生长调节物质对不定芽诱导以 $0.010\ 0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Picloram + $3.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 为启动培养基较佳。

参考文献:

- [1] 黄坚钦, 章滨森, 陆建伟, 等. 山核桃嫁接愈合过程的解剖学观察[J]. 浙江林学院学报, 2001, **18** (2): 111 - 114.
HUANG Jianqin, ZHANG Bingsen, LU Jianwei, et al. Anatomical observation in graft union of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2001, **18** (2): 111 - 114.
- [2] 余琳, 余忠敏, 余家中, 等. 山核桃嫁接育苗技术与造林试验[J]. 浙江林业科技, 2006, **26** (5): 20 - 23.
YU Lin, YU Zhongmin, YU Jiazhong, et al. Preliminary study on seeding cultivation of *Carya cathayensis* by different grafting techniques[J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2006, **26** (5): 20 - 23.
- [3] 黄有军, 王正加, 郑炳松, 等. 植物生长调节剂对薄壳山核桃硬枝扦插生根的影响[J]. 西南林学院学报, 2006, **26** (5): 42 - 44.
HUANG Youjun, WANG Zhengjia, ZHENG Bingsong, et al. Effect of plant growth regulators on rooting capacity by lignified cuttings of *Carya illinoensis*[J]. *J Southwest For Coll*, 2006, **26** (5): 42 - 44.
- [4] 黄有军, 王正加, 郑炳松, 等. 山核桃根插试验[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23** (2): 228 - 231.
HUNG Youjun, WANG Zhengjia, ZHENG Bingsong, et al. Experiment on root cutting of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23** (2): 228 - 231.
- [5] 吕守芳, 闫爱玲, 吴燕民, 等. 核桃离体繁殖技术[J]. 经济林研究, 2004, **22** (1): 12 - 14.
LV Shoufang, YAN Ailing, WU Yanmin, et al. Micropropagation techniques for three walnut cultivars [J]. *Nonwood For Res*, 2004, **22** (1): 12 - 14.
- [6] 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 核桃体细胞胚发生与转基因研究进展[J]. 林业科学, 2000, **36** (3): 102 - 110.
TANG Haoru, WANG Yongqing, REN Zhenglong. An overview of progress on somatic embryogenesis and transformation in walnut[J]. *Sci Silv Sin*, 2000, **36** (3): 102 - 110.
- [7] 冀爱青, 原树伟, 张红梅, 等. 核桃体细胞胚胎发生研究进展[J]. 河北林果研究, 2003, **18** (3): 288 - 292.
JI Aiqing, YUAN Shuwei, ZHANG Hongmei, et al. Advance in research on somatic embryogenesis of walnut [J]. *Hebei J For Orchard Res*, 2003, **18** (3): 288 - 292.
- [8] LONG L M, PREECE J E, VANSAMBEEK J W. Adventitious regeneration of *Juglans regia* [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, **14** (12): 799 - 803.
- [9] DANDEKAR A M, MCGRANAHAN G H, VAIL P V, et al. High levels of expression of full-length cry IA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic walnut somatic embryos[J]. *Plant Sci*, 1998, **131** (2): 181 - 193.
- [10] OBEIDY A A., SMITH M.A.L. Establishing axenic cultures from mature pecan embryo explants on media with low water availability[J]. *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 463 - 465.
- [11] MCGRANAHAN G H, LESLIE C L, ABHAYA M. Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, 1993, **12**: 597 - 660.
- [12] BURNS J A, WETZSTEIN H Y. Development and germination of pecan somatic embryos derived from liquid culture [J]. *In Vitro Cell & Dev Biol*, 1995, **31**: 72 - 78.
- [13] 方宏均, 王关林. 黑核桃体细胞胚状体发生及基因转化系统的建立[J]. 园艺学报, 2000, **27** (6): 406 - 411.
FANG Hongjun, WANG Guanlin. Somatic embryogenesis of *Juglans nigris* L. and establishment of gene transformation system of walnut[J]. *Acta Horti Sin*, 2000, **27** (6): 406 - 411.
- [14] 朱玉球, 廖望仪, 黄坚钦, 等. 山核桃愈伤组织诱导的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2001, **18** (2): 115 - 118.
ZHU Yuqiu, LIAO Wangyi, HUANG Jianqin, et al. A preliminary study on induction of callus in *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2001, **18** (2): 115 - 118.
- [15] 董晓颖. 超红短枝桃幼胚培养技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
DONG Xiaoying. *Studies on the Culture Immature Embryo in 'Superred Spur' Peach* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.
- [16] 刘淑兰, 韩碧文. 核桃离体胚的植株再生[J]. 植物生理学报, 1989, **15** (1): 98 - 100.
LIU Shulan, HAN Biwen. Plant regeneration from excised embryos of *Juglans regia* [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 1989, **15** (1): 98 - 100.