

杂交榛子愈伤组织的诱导

汪青, 丁之恩*, 常慧, 许睿洁, 周天驹, 孙雨薇

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 利用组织培养技术对杂交榛子无性器官进行培养研究, 从而为后续人工控制条件下获得更多的紫杉醇提供基础性研究材料。结果表明, 对于 10 年生杂交榛子的根、茎段和叶片 3 种外植体进行愈伤组织诱导, 其中茎段愈伤组织诱导率最高为 66%, 基础培养基 MS 为最适培养基, 最适生长调节剂组合为 2,4-D 2.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹。

关键词: 杂交榛子; 愈伤组织; 诱导; 诱导率

中图分类号: S723.132.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-1060-04

Callus induction of cross-fibert

WANG Qing, DING Zhien, CHANG Hui, XU Ruijie, ZHOU Tianju, SUN Yuwei

(School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In this study, vegetative tissues of cross-fibert were cultivated using tissue culture technology, which can provide a basic research for subsequently gaining more paclitaxel materials. The results indicated that in three explants (root, stem, and leaf) of a ten-year-old cross-fibert, the stem section had the highest callus induction rate, reaching to 66%. The best basal medium was MS and the optimal plant growth regulators were the combination of 2,4-D 2.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹.

Key words: cross-fibert; callus; induction; induction rate

榛子为四大坚果之一, 全世界约 20 种, 广泛分布在亚洲、欧洲和美洲的温带地区^[1]。中国作为榛子的重要产地, 原产 8 个品种, 2 个变种, 主要分布于东北、华北、西北和西南地区。杂交榛子因为果实大, 耐寒能力强而得到发展^[2]。但是传统的繁殖方法繁殖系数低, 无法满足市场需求。因此通过组织培养的方法培养杂交榛子细胞, 深入探讨不同培养条件对愈伤组织诱导的影响, 找出诱导杂交榛子愈伤组织的最佳条件, 初步建立杂交榛子无菌培养体系, 对杂交榛子工厂化生产距有很大的意义^[3-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料均取自安徽省林业科学院榛子园林中 10 年生杂交榛子树, 分别取样根、茎段和叶片, 为确保实验效果理想, 进行愈伤组织诱导外植体样品

取自春季期间杂交榛子树上的新鲜嫩叶, 茎段和根, 并且保持新鲜活力, 不失水。

1.2 试剂

升汞(贵州省铜仁东方化学试剂厂); 氯仿(上海苏懿化学试剂有限公司); MS 培养基(杭州百思生物技术有限公司); B₅ 培养基(杭州百思生物技术有限公司); DKW 培养基(杭州百思生物技术有限公司); 2,4-D(苏州达麦迪生物医学科技有限公司); NAA(苏州达麦迪生物医学科技有限公司); 6-BA(苏州达麦迪生物医学科技有限公司); KT(苏州达麦迪生物医学科技有限公司); 蔗糖(天津市津北精细化工有限公司); 乳糖(天津市津北精细化工有限公司); 硝酸铵(上海金锦乐实业有限公司); 硫酸铵(上海金锦乐实业有限公司); 蛋白胨(上海金锦乐实业有限公司); 氯化铵(上海金锦乐实业有限公司)。

收稿日期: 2016-08-18

基金项目: 安徽省林业厅世界银行五期项目“经济林混交林高效栽培及资源综合利用”资助。

作者简介: 汪青, 硕士研究生。E-mail: 547463906@qq.com

* 通信作者: 丁之恩, 教授, 博士生导师。E-mail: 448316056@qq.com

表 1 不同植物生长调节剂组合

| 培养基编号 No. of medium | 激素 Hormone | | | | mg·L ⁻¹ |
|------------------------|------------|-----|-----|------|--------------------|
| | 2,4-D | NAA | KT | 6-BA | |
| 1 | 0.5 | 0.5 | 0 | 2.0 | |
| 2 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 0 | |
| 3 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | |
| 4 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 0 | |
| 5 | 1.5 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | |
| 6 | 1.5 | 1.0 | 0 | 1.0 | |
| 7 | 2.0 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | |
| 8 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | |
| 9 | 2.5 | 0 | 0 | 0.5 | |

1.3 仪器

超纯水机(北京赛多利斯科学仪器厂); 电子天平 FR4202CN(奥豪斯仪器(上海)有限公司); ML204/02 电子天平(梅特勒托利多仪器(上海)有限公司); GXZ-9146 MBE 数显鼓风干燥机(上海博讯实业有限公司医疗设备); SW-CJ-2D 超净工作台(苏州净化设备公司); 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); SevenCompactTM 多参数测试仪 S220(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); ZHP-160 数显震荡培养箱(江苏金坛市金城国

胜实验仪器厂); LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); 美的电磁炉(美的集团(合肥)有限公司); 美的电冰箱(美的集团电冰箱制造(合肥)有限公司)。

1.4 方法

分别选取杂交榛子的根、茎和叶等器官为外植体, 消毒灭菌后, 将根、茎剪断成 1 cm 的小段, 叶片剪成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 接种于表 1 加入不同植物生长调节剂组合的 MS 培养基上进行愈伤组织的诱导。各外植体每种培养基上接种 30 块, 重复 3 次^[9]。将接种后的培养基放于 (25±2) °C, 光照强度为 1 200 lx 每天 14 h 条件下培养, 诱导愈伤组织。诱导率=愈伤组织数/接种外植体数×100%。

2 结果与分析

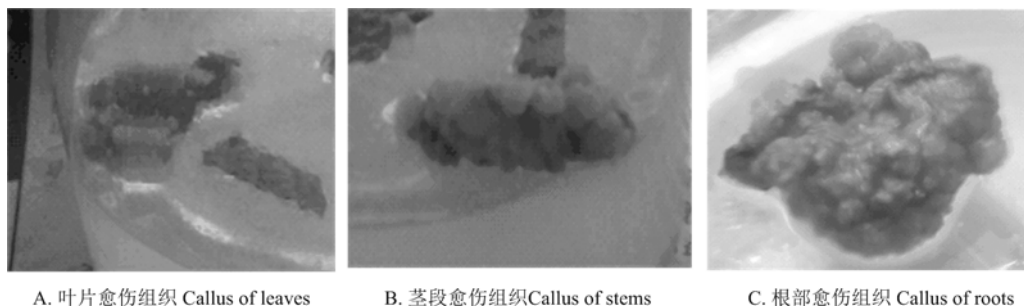
2.1 不同外植体和植物生长激素组合对诱导愈伤组织的影响

实验结果(表 2 和图 1)表明, 不同培养基和植物生长调节剂组合对愈伤组织的诱导率有很大的影响: 以茎为外植体诱导愈伤组织时的诱导率最高; 以加入不同植物生长调节剂组合的培养基培养外植体时, 9 号培养基(2,4-D 2.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹) 中茎段愈伤组织的诱导率最高, 为 (66±2)%; 而

表 2 外植体与植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导率的影响

Table 2 The effects of explants and combinations on the callus induction rate

| 植物生长调节剂组合 Combination of plant hormones | 外植体诱导率/% Induction rates of explants | | |
|--|--------------------------------------|---------|--------|
| | 叶片 Leaf | 茎段 Stem | 根 Root |
| 1 | 46±2 | 52±3 | 36±2 |
| 2 | 25±3 | 28±4 | 23±3 |
| 3 | 8±2 | 12±2 | 17±3 |
| 4 | 12±2 | 8±3 | 19±2 |
| 5 | 24±2 | 13±3 | 21±3 |
| 6 | 16±3 | 25±2 | 9±2 |
| 7 | 9±2 | 7±3 | 11±2 |
| 8 | 26±4 | 13±3 | 25±3 |
| 9 | 32±2 | 66±2 | 51±2 |



A. 叶片愈伤组织 Callus of leaves

B. 茎段愈伤组织 Callus of stems

C. 根部愈伤组织 Callus of roots

图 1 杂交榛子外植体愈伤组织
Figure 1 Cross-fibert explants callus

表 3 不同种类培养基、基质 pH 对榛子茎段愈伤组织诱导的影响

Table 3 The effects of different types of culture mediums and Matrix pH on the callus induction rates

| 不同单因素 Different single factor | 培养基种类 Medium type | | | | | 基质 pH Matrix pH | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------|----------------|------|----------------|------|-----------------|-----|------|------|------|------|-----|
| | DKW | B ₅ | MS | N ₆ | NRM | 4.9 | 5.2 | 5.5 | 5.8 | 6.1 | 6.4 | 6.7 |
| 茎段愈伤组织诱导率/% Induction rate of stem | 16±2 | 9±3 | 66±2 | 23±2 | 45±3 | 3±2 | 5±3 | 27±3 | 57±2 | 43±2 | 22±3 | 8±3 |

表 4 碳源对榛子茎段愈伤组织诱导的影响

Table 4 The effects of different types of carbon sources on the callus induction rates

| 不同单因素 Different single factor | 蔗糖含量/g·L ⁻¹ Sucrose content | | | | | 碳源种类 Carbon source type | | | |
|--|--|------|------|------|------|-------------------------|---------------|----------------|----------------|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 乳糖 Lactose | 蔗糖 Sucrose | 葡萄糖 Glucose | 麦芽糖 Maltose |
| 茎段愈伤组织诱导率/% Induction rates of stem | 33±3 | 40±2 | 66±2 | 48±3 | 29±2 | 34±3 | 66±2 | 42±3 | 28±2 |

表 5 氮源、光周期对愈伤组织诱导的影响

Table 5 The effects of nitrogen source and light cycle on the callus induction rates

| 不同单因素 Different single factor | 氮源种类 Nitrogen source type | | | | 光周期/h·d ⁻¹ Light cycle | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 氯化铵 Ammonium chloride | 硝酸铵 Ammonium nitrate | 硫酸铵 Ammonium sulfate | 蛋白胨 Peptone | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 |
| 茎段愈伤组织诱导率/% Induction rate of stem | 33±2 | 66±2 | 25±2 | 12±2 | 28±3 | 33±2 | 39±2 | 57±3 | 46±2 | 26±3 | 19±2 |

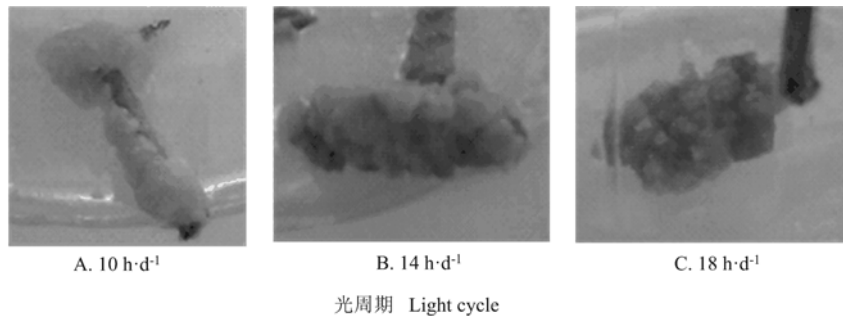


图 2 光周期对诱导愈伤组织的影响

Figure 2 The effects of light cycle on the callus induction rates

7号培养基(2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹)中茎段的诱导率仅为(12±2)%。

2.2 不同培养基种类、基质 pH 对杂交榛子愈伤组织诱导的影响

在 2.1 的基础上,选用不同种类的培养基(MS、DKW、B₅、N₆、NRM)与同一激素组合(2,4-D 2.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹)诱导杂交榛子茎段愈伤组织。实验结果(表 3)表明,当培养基为 B₅时,诱导率最低,为(9±3)%;当培养基为 MS 时,茎段愈伤组织的诱导率最高,为(66±2)%;培养基的 pH 影响外植体对营养元素的吸收,同时也影响着培养基的凝固状态。从表 3 中还可以看出,当培养基的 pH 为 5.8 时,愈伤组织的诱导效果最好,诱导率为(57±2)%;而当培养基的 pH 为 4.9 时,诱导率仅为(3±2)%。

2.3 碳源对杂交榛子愈伤组织诱导的影响

从表 4 中可以看出,不同碳源及其含量对榛子愈伤组织的诱导率有着很大的影响,随着碳源的含量增加呈现递减的趋势,当蔗糖含量为 30 g·L⁻¹时,愈伤组织的诱导率达到最大,为(66±2)%;当蔗糖含量为 40 g·L⁻¹时,诱导率仅为(29±2)%;且以蔗糖为碳源时,愈伤组织的诱导效果最好,为(66±2)%;而当以麦芽糖为碳源时,诱导率仅为(28±2)%。

2.4 氮源、光周期对愈伤组织诱导的影响

氮是植物生长的必需养分之一,它是每个活细胞的组成部分,氮也是植物体内维生素和能量系统的组成部分,氮素对植物生长发育的影响是十分明显的^[10]。由表 5 可知,以硝酸铵为氮源时,愈伤组织的诱导率最高,为(66±2)%;以蛋白胨为氮源时,诱导效果最差,诱导率仅为(12±2)%。

一般情况下植物在黑暗中诱导愈伤效果会好一

些,因为在黑暗中可以有效的防止愈伤组织的褐变,但这个也是根据植物的种类不同而不同的^[11],榛子是喜阳的植物,这样在诱导愈伤组织的过程中,光照的时间就显的尤为重要。由表 5 和图 2 可知,当光照周期为 14 h·d⁻¹ 时,愈伤组织的诱导率最高,为 (57±3)%,诱导效果最好;当光照周期超过 14 h·d⁻¹ 时,愈伤组织会发生褐变,且诱导率也会相应的降低,当光照周期为 18 h·d⁻¹ 时,诱导率为 (26±3)%。

3 讨论

最佳外植体是组织培养成功的关键因素,外植体的年龄、发育阶段、生长环境、选取部位和时间都可能致外植体生理、生化状态的差异,从而影响组织培养形态的发生。周亚琦^[12]在平欧杂交榛微型扦插技术及其愈伤组织诱导的初步研究中发现茎段、叶片在 NRM+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹ 中都能很好的诱导愈伤组织;刘剑锋等^[13]在对平欧杂交榛进行茎段和根蘖苗茎段的外植体选择时,发现根蘖苗茎段比较适合离体培养。可见,在进行愈伤组织诱导时,选用适宜的组织部位是十分必要的,还应尽量选择未分化或分化程度较轻的组织作为外植体使用。本实验以杂交榛子的根部、茎段和叶片为外植体都诱导出了愈伤组织,其中茎段愈伤组织的诱导率最高;对杂交榛子茎段而言,诱导愈伤组织的最佳培养基和激素组合为 MS+2,4-D 2.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹。实验结果表明,对于不同种类的榛子,培养基的种类,植物激素的种类、浓度和组合对愈伤组织的诱导会产生很大的影响,这也是愈伤组织诱导成败的关键。

植物愈伤组织的形成和增殖受到多方面因素的影响,如培养基的成分、光照、温度及外植体等都可以影响植物愈伤组织的形成。盛长忠等^[14]指出红豆杉愈伤组织形成的最适 pH 为 7;许鲲等^[15]研究表明,休眠后的杂交榛基生枝条在室内用营养液培养后萌发的嫩梢作外植体效果最好。本实验从外植体、培养基、激素组合、碳源、氮源、基质 pH 和

光照等方面研究了对杂交榛子愈伤组织诱导的影响,找出诱导愈伤组织最佳的条件,为杂交榛子获得更多的紫杉醇提供基础性研究材料。

参考文献:

- [1] 赵广和. 榛叶中紫杉醇检测方法的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [2] 刘家宁. 平欧杂家茎段与胚培养技术体系的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2006.
- [3] NAS M N, READ P E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts[J]. *Sci Hortic-Amsterdam*, 2004, 101(1): 189-200.
- [4] COETZER C, CORSINI D, LOVE S, et al. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 653-656.
- [5] 杨世增, 魏鑫, 刘毅, 等. 榛属植物资源的研究现状[J]. *北方园艺*, 2010(5): 216-220.
- [6] 陶双勇, 王庆斌, 邹威, 等. 榛子组织培养技术研究[J]. *林业科技*, 2013(4): 1-4.
- [7] 吴莉莉, 白术杰, 李秀玲, 等. 榛属植物药用价值研究进展[J]. *特产研究*, 2010(3): 77-79.
- [8] 于荣敏, 周良彬. 植物细胞培养技术新领域—植物干细胞培养[J]. *食品与药品*, 2012(1): 52-55.
- [9] 邵红, 李秀霞, 肖志坚, 等. 杂交榛愈伤组织诱导和原生质体分离[J]. *东北林业大学学报*, 2010(10): 23-26.
- [10] LI YONG, WANG X D, LUO P F. Inoculation effects of *Dendrobium officinale* Mycorrhizal fungi on their plantlets[J]. *J Agr Sci Tech-Iran*, 2011, 12(11): 1580-1584.
- [11] JENNINGS D W, DEUTSCH H M, ZALKOW L H, et al. Supercritical extraction of taxol from the bark of *Taxus brevifolia*[J]. *J Supercrit Fluid*, 1992, 5(1): 1-6.
- [12] 周亚琦. 平欧杂种榛微型扦插技术及其愈伤组织诱导的初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [13] 刘剑锋, 程云清, 陈智文, 等. 平欧杂交榛组织培养与快速繁殖技术研究[J]. *园艺学报*, 2009, 36(3): 409-414.
- [14] 盛长忠, 王淑芳, 王勇, 等. pH 对红豆杉愈伤组织生长、PAL 活性和紫杉醇含量的影响[J]. *中草药*, 2001, 32(10): 929-931.
- [15] 许鲲, 张秦英, 罗凤霞. 榛子的离体培养研究[J]. *山东林业科技*, 2005(4): 1-3.