

榛属植物组织培养研究进展

刘家宁^{1,2}, 秦岭^{1*}, 高遐虹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: 笔者从茎尖培养和胚培养两方面阐述了国内外有关榛子组织培养的研究进展, 总结了榛子组织培养的关键技术, 提出了存在的问题和展望。

关键词: 榛属; 茎尖和茎段培养; 胚培养; 培养条件

中图分类号: S664.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-3186 (2006) 01-0062-05

A Review on Study of Tissue Culture of Hazelnut (*Corylus* Species)LIU Jia-ning^{1,2}, QIN Ling^{1*}, GAO Xia-hong¹

(1. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2. Institute of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: The advances of tissue culture of hazelnut were reviewed in this paper, including the culture of shoot tips and embryo. The techniques of in vitro propagation of hazelnut were summarized. Meanwhile, the problems and prospects for tissue culture of hazelnut were also mentioned.

Key words: hazelnut (*Corylus* species); shoot tips and stem segments culture; embryo culture; cultural condition

榛子为桦木科 (Betulaceae)、榛属 (*Corylus*) 植物, 多年生落叶乔木或灌木。栽培榛子是世界上四大干果 (扁桃、核桃、榛子、腰果) 之一, 素有“坚果之王”之美誉^[1]。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, 平榛 (*Corylus heterophylla* Fisch.) 是野生商品榛子的主要生产种。引入种 1 种, 即欧榛, 为世界上主要栽培种^[2]。我国 22 个省 (区) 有榛属植物分布, 95% 是平榛。我国目前推广的榛子为欧榛与平榛的杂交种 (品种)^[3]。良种苗木的快繁是榛子栽培亟待解决的问题。榛子育苗主要采用分株和压条繁殖, 但繁殖系数低, 繁殖速度慢, 满足不了生产的需求, 组织培养是苗木快速繁育的重要途径。国外有一些对欧榛的相关报道, 但国内对欧榛与平榛的杂交种组织培养鲜有成功的报道。笔者主要就欧洲榛子的茎尖培养和胚培养进行综述, 总结其成功的技术, 为我国

大果杂交榛的组织培养提供参考与借鉴。

1 茎尖和腋芽培养

1.1 外植体的选择 榛子组织培养由于材料来源不同, 取材部位不一和时期不同, 培养结果也不一样。在榛子组织培养研究中, 使用最多的外植体是嫩梢, 带菌较少, 消毒容易, 且易于增殖和生根^[4]。研究表明, 榛子不同取材时间和取材部位诱导的效果不同, Yu 和 Reed 对欧洲榛不同外植体来源进行研究显示, 3 月份采集的温室嫁接苗是最好的外植体材料, 7 月份的根蘖可作为用于培养的最好的田间材料^[5]。

1.2 外植体消毒 外植体消毒一般用 70%~95% 乙醇和 0.5%~5.25% 次氯酸钠。采自室内培养植株的欧榛材料, 常按以下程序进行处理: 嫩茎去除叶片, 肥皂水、流水冲洗干净 → 茎按每节剪成短段 →

收稿日期: 2005-09-10; 修订日期: 2005-11-20

基金项目: 北京市农委资助项目

作者简介: 刘家宁, 男, 1978 年出生, 北京农学院和新疆农业大学联合培养 2003 级硕士研究生, 研究方向为果树生物技术; * 通讯作者

15%漂白粉(含5.25%次氯酸钠)+几滴(每80 mL滴1滴)吐温-20灭菌10 min→无菌水冲洗5~6次→接种在培养基上^[5]。

采自田间培养植株的欧榛材料,常按以下程序进行处理:取欧榛1年生苗的嫩茎→水龙头下流水冲洗干净→去除叶片,茎按每节剪成1~2 cm短段,紫外灯下照射20 min→70%酒精处理10 s,无菌水冲洗1次→0.1% HgCl₂浸泡和振荡5~8 min→无菌水冲洗4~5次→接种在培养基上^[6]。为防止欧榛茎段消毒过程中切口处氧化,接种前可在DIECA 2 g/L溶液中浸泡1 h^[7]。

1.3 基本培养基的选择 Yu和Reed^[8]研究了DKW、MWPMC和Anderson三种培养基对欧榛组培的影响,发现DKW培养基的增殖最好。尹成涛等^[9]研究了欧榛附加BA 2.0 mg/L+NAA 1.4 mg/L的WH、WPM、MS和N6 4种基本培养基,认为MS培养基比较好^[10]。而Nas和Read^[11]研究了附加BA 5 mg/L+IBA 0.01 mg/L+维生素B5 (0.2 μmol/L)的DKW、MS、NN69、WPM 4种培养基,表明WPM培养基对杂交榛子组织培养比较好。Anderson^[12]采用欧榛实生苗组培研究表明,MS、WPM、Anderson三种培养基中芽苗最佳增殖培养基为Anderson培养基。而Rodriguez等^[10]得出了K(h)是杂交榛组织培养的最佳基本培养基的结论。另一方面,Diaz-Sala等^[7]报道欧榛芽苗在MS培养基上会引起黄化,Al-Kai等^[4]也有类似报道。Perez等^[6,13]认为来自欧榛成年树上的胚和单个侧芽在1/2 K(h)培养基上的增殖最好,全量K(h)培养基易导致坏死病。

Nas和Read等^[14]提出榛子组培中矿物和有机物质两者的配比和种子中配比相似的假设,用以建立组培的最佳培养基。试验将一种新的NM培养基和WPM、NN69、DKW、MS培养基做比较,所有的培养基附加22.2 μmol/L BA+0.049 μmol/L IBA。结果表明,NM和NN69培养基上的芽苗叶绿、愈伤相对较多,WPM叶色略差,DKW轻微黄化、愈伤较少,MS黄化最重、几乎无愈伤。NN69培养基上的芽长是其他培养基上的3倍,NM和WPM培养基上的增殖率分别是107%和85%,高于其他培养基。根据Mehmet等研究者的假设,NM培养基的化学成分进一步提高后,芽长提高3倍,增殖率还可提高93%。提出了一种理论上可以用于组织培养和快繁的培养基,一个单芽的外植体经1年9次的继代培养,每次继代按20%的芽死亡

来计算,可生产出2.3~8.7百万个新芽。

Nas和Read^[11]试验表明,欧榛芽苗黄化的形成至少部分是和很高的盐浓度和螯合铁的来源相关联的。MS培养基上芽苗的黄化最严重,黄化植株在后期的继代培养中,成活率显著下降。WPM、NN69培养基上芽苗的芽长、芽数、叶色和愈伤数均高于MS、DKW培养基。试验者认为,MS培养基不适用于榛子组织培养,建议采用WPM和NN69培养基,这与Diaz-Sala等^[7]和Al-Kai等^[4]的研究结果一致,与Yu和Reed^[8]采用改良的DKW培养基矛盾。这些观点的不一致性归因于研究者在培养条件、基因型、外植体类型上的差异。

1.4 增殖培养

1.4.1 植物激素 以MS为基本培养基时,多用BAP、BA、NAA、IAA等的激素组合,尹成涛等^[9]利用欧榛埃内斯1年生苗的嫩茎作为外植体,认为最佳分化培养基为MS+BA 2.0 mg/L+NAA 1.4 mg/L,分化率达95%。Diaz-Sala等^[7]建立了一个组织培养体系:改良MS+BAP 5 mg/L+IAA 0.01 mg/L+GA 0.1 mg/L。结果表明,固液双层培养体系对榛子芽苗的生长、增殖有很好的促进作用。Al-Kai等^[4]试验表明,腋芽最佳增殖培养基为:MS+NAA 0.01 mg/L+GA 0.1 mg/L+BAP 5 mg/L。Bassil^[15]等对cv. Ruby、cv. Ennis、Cor145、Cor156 4个品种进行试验,认为芽苗的增殖在不同基因型、不同BAP浓度、培养基上的不同放置方式上存在差异。将芽平放在含5 μmol/L BAP的改良MS培养基上的增殖率最高。

以DKW为基本培养基时,多采用BA和IBA的激素组合。Yu和Reed^[8]研究表明,BA、ZT(1.5 mg/L)和BA 2 mg/L+2 iP 1 mg/L处理的培养基对榛子芽苗的增殖好于KT、2 iP(1.5 mg/L)处理的培养基,其中不同BA浓度间芽的增殖具显著差异,不同2 iP浓度间芽的增殖差异不显著,并且附加2 iP不能改变BA的激素效应,BA适宜浓度为1.5~3 mg/L。在另一研究中,Yu和Reed^[5]认为6.7 μmol/L 6-BA+0.04 μmol/L IBA的激素组合对芽苗增殖有很好的促进作用,在DKW培养基上培养28 d后,就可陆续进行增殖培养。

一般认为,幼年枝的增殖和生根效果好于成熟枝条。但经一些激素和方法处理,也有例外。Diaz-Sala等^[16]研究表明,成熟枝条在附加5 mg/L BAP的MS培养基上连续继代培养,可促进芽苗的增殖和生长,提高根的生长能力,增殖和生根效果与幼年

枝作为外植体的相似。

Nas 等^[17] 试验了 MS、DKW 两种培养基附加 6-BA (6.7 $\mu\text{mol/L}$, 11.1 $\mu\text{mol/L}$, 15.5 $\mu\text{mol/L}$) + IBA 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 和多胺对欧榛组培的影响, 结果表明, 基本培养基种类和不同 BA 浓度对芽的增殖均无显著影响, 多胺对芽长和芽数有极显著影响, 多胺使芽增长 83%, 芽数增加 41%。含有多胺的培养基平均芽长为 4.0 cm, 无多胺的为 2.0 cm。这表明多胺对于提高成熟外植体的形态建成有利。

1.4.2 铁 盐 Nas 和 Read^[11] 报道, 铁元素影响试管苗芽长、叶色和叶的形态建成, 对芽数无显著影响。以 FeEDTA 为铁盐时, 试管苗芽长增加但大部分叶片黄化。在 Fe138^[11] (用做螯合剂的乙二胺四乙酸及其盐类) 上形成的芽比在 Fe330 上形成的健康, 叶色浓绿。研究者建议用 Fe138 作为榛子组织培养的铁盐^[4]。

1.4.3 糖 Yu 和 Reed^[8] 首次报道了碳源对榛子芽苗增殖的影响。试验采用 DKW 培养基, 研究葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖和半乳糖 5 种碳源及不同浓度对芽增殖的影响。结果表明以葡萄糖或果糖为碳源的培养基比其他碳源更有利于芽苗的增殖和生长。葡萄糖或果糖的适宜浓度为 3%。

1.4.5 pH 值 Yu 和 Reed^[8] 认为 pH 从 4.7 ~ 5.7 的变化对芽的增殖没有显著差异。通常采用 pH 5.8。

1.4.6 其 他 此外, 榛子组培还受到培养基硬度、温度、光照和其他添加物的影响。在杂交榛组培快繁中, 每升 6 g 琼脂、(23 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、16 h 光周期、28 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光强较为适宜^[14]。欧榛组培中的污染菌已被鉴定, 单独使用一种抗生素没有抗菌效果, 而 2 种或 2 种以上的抗生素结合使用可清除大部分细菌污染^[18]。

1.5 生根培养 常用培养基为 1/2 MS 或稍加改良, 但也尝试了 DKW 等其他培养基。生长激素常用 IBA、NAA。尹成涛等^[9] 研究表明欧榛最佳生根培养基为 1/2 MS + NAA 0.1 mg/L, 生根率达 93%。随着 NAA 浓度的增高, 基部易产生疏松的愈伤组织, 形成愈伤组织根, 这种根为无效根, 移栽成活率低。Diaz-Sala 等^[7] 将芽苗基部在 100 ~ 1 000 mg/L 的 IBA 溶液中浸蘸 10 s, 然后在不含生长激素的改良 1/2 MS 培养基上培养 20 d, 可获得 100% 的生根率^[15]。Bassil 等^[15] 对 cv. Ruby、cv. Ennis、Cor145、Cor1 56 4 个品种进行生根试验, 结果表明, 与其他基因型相比附加生长素可大大提

高 Cor145 的生根率。IBA 溶液中浸蘸处理对 4 个品种生根效果最好, 生根率都达 100%, IBA 最适宜浸蘸浓度为 1.0 mmol/L。

Yu 和 Reed^[5] 首次报道了欧榛快繁的瓶外生根, 芽苗在 1/2 DKW + 4.9 $\mu\text{mol/L}$ 培养基上 48 d 后, 生根率可达 64% ~ 100%。芽苗在 1.0 mmol/L 或 5.0 mmol/L IBA 溶液中浸蘸处理, 进行瓶外生根, 移栽成活率达 78% ~ 100%。Nas 和 Read^[19] 将欧榛芽苗基部在 1 000 mg/L IBA 溶液中浸蘸处理 5 s 和 10 s, 然后转入不含植物生长调节物质的 WPM 培养基上, 植株生根率分别为 62% 和 53%。芽苗经 IBA 溶液浸蘸处理 10 s, 直接培养在泥炭上, 生根率为 98%。

除此之外, 生根也可采用其他特殊处理。Rey 等^[20] 认为欧榛芽苗在 5.0 mmol/L IBA + 多胺的溶液中浸蘸 15 s, 然后培养在 1/2 MS 培养基上可有效提高生根率, 比单独用 5.0 mmol/L IBA 的生根处理提早一半生根时间, 这是由于 IBA 和多胺对生根诱导具有协同作用。Gonzalez 等^[21] 认为乙烯在欧榛组培的生根诱导上具有重要的作用。试验表明, 乙烯 (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 能显著提高欧榛的生根数。

1.6 适应培养 茎尖培养的成功与否还涉及到再生植株对非培养环境的适应能力。将组培苗直接栽植于田间成活率很低。因此, 从培养条件到田间需要一个适应培养阶段。这一阶段主要涉及到光照、湿度、基质和营养等问题。

尹成涛等^[9] 对不同移栽基质研究表明, 欧榛组培苗成活率最高的为纯净河沙, 移栽后 10 d, 成活率可达 92%。河沙与蛭石 1 : 1 混合的成活率为 75%, 蛭石成活率约 67%。移栽的头几天要注意保持空气湿度, 温室内温度 20 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 80%。温室内炼好的小苗最适宜的大田移栽时间为 4 月下旬到 6 月上旬, 成活率可达 92%。Yu 和 Reed^[5] 认为芽苗移栽之前, 瓶盖拧松放 1 d, 植物虽然萎蔫, 但移栽后很快恢复。植株先移栽到蛭石与珍珠岩 1 : 1 迷雾下 14 ~ 21 d, 然后转到温室育苗床, 最后移栽到泥炭、铁杉树皮与珍珠岩 2 : 1 : 1 的容器中培养, 可获得较高的成活率。

2 胚培养

胚培养方面, 外植体消毒常按以下程序处理: 欧榛的种子去除种皮 → 流水冲洗 → 过夜 → 95% 酒精浸泡 5 min → 1.05% 次氯酸钠灭菌 30 min (灭菌时加洗洁剂以提高药品黏着性) → 无菌水冲洗几次 → 接

种在培养基上^[13]。

2.1 培养时期 Centeno 等^[22]试验表明,欧榛越幼嫩的子叶,胚胎发生的潜力越大,合子胚的成熟程度越高,形成胚的能力越强,诱导时间越短。

2.2 生长调节剂的影响 Perez 等^[6]首次报道了欧榛的胚培养,发现胚培养中芽苗的最佳增殖培养基为 $1/2 K(h) + BAP 8.0 \text{ mg/L}$,后期随细胞分裂素浓度的增加对生根具有抑制作用。当 BAP 浓度高于 1.0 mg/L 时不利于根的生长。 Kn_2 iP 对榛子芽数的影响和 BAP 相比较小。胚芽在 $1/2 K(h) + 0.1 \sim 2.0 \text{ mg/L BAP}$ 的培养基上培养 30 d 后芽的增殖倍数达 (5.0 ± 1.1) 。芽苗在 1.5 mg/L IBA 的溶液中处理 10 s,然后转到不含生长激素的 $1/2 K(h)$ 培养基上可获得不定根。

Perez 等^[23]以欧榛子叶为外植体,以 $K(h)$ 为基本培养基研究生长素 (IBA、2,4-D)、细胞分裂素 (BAP)、赤霉素 (GA_3) 和培养时期对胚状体诱导和生长的影响。结果表明,起初的 20 d 是子叶的诱导培养阶段。胚状体在 IBA/BAP 的培养基上几乎没有突破球状体阶段。相反,在子叶第一次继代时期,可观察到心形胚、鱼雷胚及子叶期不同的发育过程共存于同一个胚胎发生的丛芽上,而且胚状体结构形态异常。在 IBA/BAP 激素平衡中,IBA ($0.5 \mu\text{mol/L}$ 或 $5.0 \mu\text{mol/L}$) 促进子叶的胚状体诱导,BAP 促进子叶第一次继代的胚状体生长。胚状体的生长状态可由 2,4-D ($0.5 \sim 4.5 \mu\text{mol/L}$) 来控制,使大部分胚状体控制在球状体阶段,而 BAP 主要是促进胚状体两极分化。

Centeno 等^[22]以不同时期、不同基因型种子中的子叶为试材,采用 $9 \mu\text{mol/L KT} + 5.0 \mu\text{mol/L 6-BA} + 0.05 \mu\text{mol/L IBA}$ 的 T 培养基为基本培养基,研究内源激素平衡对欧榛胚培养的影响。结果表明,子叶从开始生长到成熟不同时期 IAA 和 ABA 的含量差异很小。体细胞胚中 IAA/ABA 的比率是非胚性细胞的两倍,合子胚的成熟程度与细胞分裂素的含量成负相关。IAA/ABA, iP/Zt 激素平衡可作为榛子胚胎发生的两个重要依据,提出内源激素平衡是榛子胚培养中一个很重要的因素。

此外,Berros 等^[24]研究了多胺对欧榛体细胞胚胎发生的影响,结果表明,同时减少腐胺和亚精胺的量会减少体细胞胚胎发生,而单一的低水平腐胺对胚胎发生没有影响。

2.3 低温处理 Valerie 等^[25]认为低温处理在榛子的胚培养中发挥了重要作用,将喜温的 18 个树种

的胚轴经一夜风干,然后液氮冷冻,经解冻和再水化后离体培养,发现许多品种的成活率达 100%。对于难以贮藏的喜温树种种子来说,这是一个很好的种质保存的方法。

3 存在的问题和展望

尽管榛子组织培养的研究取得了可喜的进展,但研究中尚存在一些问题,具体包括:(1)缺乏良好的研究形态发生的组织培养模式系统;(2)没有建立起适用范围较广的榛子组织培养的基本培养基;(3)外植体的选择仍局限于嫩梢茎段等幼嫩组织,以成苗的器官或组织诱导脱分化的报道很少,难度很大,今后应在这方面多进行试验探索;(4)尚有许多榛属种未进行组织培养系统化研究,部分种尽管已组培成功,但存在周期长、增殖率不高的问题;(5)胚培养等其他组织培养方式见报道较少。因此,以上方面的研究有待进一步加强。

随着研究的继续和深入,能够被普遍接受的榛子植物组织培养模式系统的建立,是多种重要榛属植物种和品种的离体繁殖、遗传转化和品种改良等方面研究的基础,将促进无性系榛子产业的发展。

参考文献:

- [1] 李秀霞,王波,崔登攀,等. 榛树种子的休眠和萌发. 植物生理通讯,2003,39(2):137—138
- [2] 姚莲芳. 榛子优良品种及高产栽培技术. 经济林研究,2004,22(4):98—102
- [3] 梁维坚,董德芬. 大果榛子育种与栽培. 北京:中国林业出版社,2002:17—20
- [4] Al-Kai H, Salesses G, Mouras A. Multiplication in vitro du noisetier (*Corylus avellana* L.). Agronomie,1984,4(4):399—402
- [5] Yu X L, Reed B M. A micropropagation system for hazelnut (*Corylus species*). HortScience,1995,30(1):120—123
- [6] Perez C, Rodriguez A, Revilla A, et al. Filbert Plantlet formation through in vitro culture. Acta Hort,1987,212:505—509
- [7] Diaz-Sala C, Rey M, Rodriguez R. In vitro establishment of cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). Plant Cell Tiss Org Cult,1990,23(3):151—157
- [8] Yu X L, Reed B M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) in vitro using glucose as carbon source. Plant Cell Reports,1993,12(5):256—259
- [9] 尹成涛,孙满芝,韩爱平,等. 欧洲榛子的组培快繁技术研究. 山东林业科技,2002(5):14—15
- [10] Rodriguez R, Rodriguez A, Gonzales A, et al. Hazelnut (*Corylus avellana* L.). In: Bajaj YPS (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1989(5):127—160
- [11] 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*. Acta Hort, 2000, 556: 251—258
- [12] Anderson W C. Micropropagation of filbert, *Corylus avellana* L. Intl Plant Prop Soc Combined Proceedings, 1983, 33: 132—137
- [13] Perez C, Rodriguez R and Sanchez-Tames R. In vitro filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. Plant Cell Reports, 1985, (4): 137—139
- [14] Nas M N, Reed P E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Scientia Horticulture, 2004, 101: 189—200
- [15] Bassil N, Mok D W S, Mok M C, et al. Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana*. Acta Hort, 1992, 300: 137—140
- [16] Diaz-Sala C, Rey M, Rodriguez R. Temporary modification of adult filbert proliferation capacity by sequential subcultures: Intense pruning as a pre-treatment for in vitro reinvigoration. Journal of Horticultural Science, 1994, 69(4): 673—678
- [17] Nas M N. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2004, 28(3): 189—194
- [18] Reed B N, Mentzer J, Tanprasert P, et al. Internal bacterial contamination of micropropagation hazelnut: identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(1/2): 67—70
- [19] Nas M N, Read P E. Ex vitro survival of hybrid hazelnut shoots produced in vitro. Acta Hort, 2003, 616: 215—219
- [20] Rey M, Diaz-Sala C, Rodriguez R. Exogenous polyamines improve rooting of hazel microshoots. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 36: 303—308
- [21] Gonzalez A, Rodriguez R, Sanchez-Tames R. Ethylene and in vitro rooting of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cotyledons. Physiologia-Plantarum, 1991, 81(2): 227—233
- [22] Centeno M L, Rodriguez R, Berros B, et al. Endogenous hormonal content and somatic embryogenic capacity of *Corylus avellana* L. cotyledons. Plant Cell Reports, 1997, 17(2): 139—144
- [23] Perez C, Rodriguez R, Tames R S. Regulation of asexual embryogenesis in filbert cotyledonary nodes, morphological variability. Plant Science, 1986, 45: 59—64
- [24] Berros B, Alvarez C, Rodriguez R. Effect of putrescine-synthesis inhibitors on somatic embryogenesis in hazelnut. Angewandte-Botanik, 1997, 71(3/4): 90—93
- [25] Valerie C Pence. Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate tree species. Cryobiology, 1990, 27: 212—218