

# 板栗成熟胚再生体系的建立与优化

郭素娟, 孙小兵, 秦天天, 刘正民

(省部共建森林培育保护与利用教育部重点实验室, 北京林业大学, 北京 10083)

**摘 要:**研究了外植体消毒方法、植物生长调节剂组合对胚萌发和生长的影响。以迁西板栗主栽品种‘燕山早丰’成熟胚为试验材料, 采用  $L_9(3^4)$  试验设计对增殖培养基进行筛选。结果表明, 二次消毒处理可以有效抑制污染, 污染率最低为 16.67%。胚萌发和生长最佳基本培养基为 WPM+6-BA  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 萌发率最高达到 95.00%, 胚萌发苗最高为 59.65 mm。不定芽诱导的最适培养基为: MS+6-BA  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA  $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。芽诱导率最高为 92.50%。最适增殖培养基为 GD+ZT  $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA  $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 增殖系数最大为 3.91。

**关键词:**板栗‘燕山早丰’; 种胚; 组织培养

中图分类号: S722.37      文献标志码: A      文章编号: 1001-7461(2015)03-0089-05

## Establishment and Optimization of *in vitro* Regeneration System of Mature Embryo of *Castanea mollissima*

GUO Su-juan, SUN Xiao-bing, QIN Tian-tian, LIU Zheng-min

(Key Laboratory for Silviculture and Conservation, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Effects of sterilization method and the combination of plant growth regulators on the embryo germination and growth of *Castanea mollissima* were examined by taking the cultivar ‘Yanshanzaofeng’ from Qianxi County as test material, and using  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental design. It was found that the two-time sterilization treatment could effectively inhibit the contamination, and the lowest rate of contamination was 16.67%. The optimum medium for embryo germination and its growth was WPM+6-BA  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , by which the highest germination rate reached 95.00%, seedlings from the embryo were as high as 59.65 mm. The optimum medium for adventitious buds was MS+6-BA  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IBA  $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , by which the highest induction rate of adventitious bud was 92.50%. The optimum rearing medium was GD+ZT  $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA  $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the maximum proliferation factor was 3.91.

**Key words:** ‘Yanshanzaofeng’; embryos; tissue culture

板栗 (*Castanea mollissima*) 属于壳斗科 (Fagaceae) 栗属 (*Castanea*) 植物, 原产我国, 在我国分布范围很广, 并且不与粮农作物争地, 是我国三大木本粮食树种之一。其营养价值丰富, 兼具经济效益与生态效益。中国板栗主要利用它的坚果, 其果实富含淀粉、糖、蛋白质、脂肪及多种维生素和矿物质, 甘甜可口, 并具有保健功效。中国板栗坚果品质高居各种栗的首位, 尤其是北方板栗淀粉含量高, 品质

优良<sup>[1-3]</sup>。现今, 栗实已成为我国出口创汇的主要干果之一。

组织培养快繁技术可以在短时间内生产出大量组培苗, 目前, 关于栗属植物组织培养国外已有报道, 主要以欧洲栗和美洲栗为研究对象, 以上胚轴胚珠和离体胚诱导出体细胞胚并再生成植株<sup>[4-7]</sup>。但国内关于板栗组织培养的研究较少, 主要研究有板栗无菌培养体系建立<sup>[8-9]</sup>及再生体系的建立<sup>[10]</sup>, ‘锥

栗’的愈伤组织诱导<sup>[11]</sup>,胚珠培养<sup>[12]</sup>,‘燕山红栗’的种胚培养<sup>[13]</sup>等。然而,目前尚无关于优良主栽板栗品种‘燕山早丰’组织培养研究的报道。‘燕山早丰’具有果实品质优良、丰产性好、成熟期早、抗病、耐旱特点,是一个极受栗农欢迎的早实优良品种<sup>[14-15]</sup>。板栗组织培养中存在褐化率高、增殖系数低等问题<sup>[16]</sup>,严重阻碍板栗快繁技术的应用发展和良种化推广。本研究采用‘燕山早丰’成熟种胚为外植体,对其组培快繁体系的建立及增殖培养进行研究,以期为该品种进一步研究应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2012年9月5日,在河北省唐山市迁西县板栗产业研究发展中心板栗品种园采收饱满、大小一致、无病虫害的‘燕山早丰’种子,贮藏于0~4℃冷藏柜中,第2年3月取用‘燕山早丰’种子用于试验。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将完整的板栗种子首先用洗洁清水清洗一遍,用牙刷把外部冲洗干净,再用流水将其冲洗30 min,然后在超净工作台中,用75%乙醇(体积比)消毒30 s,无菌水冲洗3次,再用NaClO

溶液进行消毒,无菌水冲洗3次,用手术刀将种子去皮以胚为中心切成0.3 cm×0.5 cm带胚乳的小方块,用吸水纸吸干表面的水分,接种于胚培养基MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>(以下未特别说明均用此培养基)中。种子消毒过程共设4个处理(表1),每瓶接种1个外植体,每处理接种30瓶,重复3次。置培养室培养21 d后统计污染、褐化和萌发情况,计算污染率、褐化率和萌发率。

污染率=  $\frac{\text{污染的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$  (1)

褐化率=  $\frac{\text{褐化的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$  (2)

萌发率=  $\frac{\text{萌发的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$  (3)

1.2.2 胚培养试验 将切割好的种胚接种于胚培养基中,胚培养基采用L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)正交设计,3因素4水平分别如下,培养基:MS、WPM、GD与B<sub>5</sub>,6-BA浓度:1.0、2.0、3.0 mg·L<sup>-1</sup>与4.0 mg·L<sup>-1</sup>,NAA浓度:0、0.5、1.0 mg·L<sup>-1</sup>与1.5 mg·L<sup>-1</sup>,培养基中均添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH5.6~5.8,每处理40株,重复2次。接种后置于组培室培养4周,统计萌发情况、胚萌发苗高,观察记录生长状况,筛选最适宜种胚萌发生长的培养基。

表 1 外植体不同消毒处理设置  
Table 1 Different sterilization of explants

处理	第 1 次消毒			第 2 次消毒		
	75%乙醇 处理时间/s	NaClO 浓度 /%	NaClO 处理 时间/min	75%乙醇 处理时间/s	NaClO 浓度 /%	NaClO 处理 时间/min
1	30	3	15	0	0	0
2	30	5	20	0	0	0
3	30	3	15	30	5	25
4	30	5	20	30	3	15

1.2.3 不定芽诱导 无菌种胚培养1个月左右长出幼嫩小植株,在无菌环境中将幼嫩小植株茎段剪成1.0 cm小段,接种于MS培养基中,诱导不定芽萌发。激素配比采用正交试验设计,6-BA浓度为1.0、2.0 mg·L<sup>-1</sup>与3.0 mg·L<sup>-1</sup>和IBA浓度为:0、0.1 mg·L<sup>-1</sup>与0.2 mg·L<sup>-1</sup>,培养基中均添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH5.6~5.8,每个处理40株,重复2次。接种后置于组培室培养4周,统计不定芽诱导率,观察记录生长状况。

1.2.4 继代培养试验 采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计,3因素3水平分别为:培养基:MS、GD、WPM,ZT浓度:1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup>与2.0 mg·L<sup>-1</sup>,NAA浓度:0.1、0.15 mg·L<sup>-1</sup>与0.2 mg·L<sup>-1</sup>,将萌发的不定芽(无菌材料)剪成1.0 cm小段,接种于正交试验设计的培养基中,培养基中均添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>,琼

脂7 g·L<sup>-1</sup>,pH5.6~5.8,每个处理40株,重复2次。接种后置于组培室培养4周,统计增殖系数,观察记录生长状况。

1.2.5 培养条件 组培室温度(24±1)℃,空气相对湿度60%,光照强度2 000~3 000 lx,光周期为光培养16 h(6:00—22:00)和暗培养8 h(22:00—次日6:00)。

1.2.6 数据处理与分析 试验采用Excel对数据进行处理,SPSS18.0进行方差分析,Duncan法进行差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对胚培养的影响

4种消毒处理的污染率、成活率差异显著,褐化率差异不显著。其中,处理1和处理2之间的污染

率、成活率及褐化率差异不显著,处理 3 和处理 4 之间的污染率、成活率及褐化率差异不显著,但是处理 3、处理 4 与处理 1、处理 2 的污染率、成活率均差异显著,即经过二次消毒处理的污染率显著低于仅进行一次消毒处理,其中,处理 4 的污染率最低为 16.67%,且成活率显著高于仅进行一次消毒处理,处理 4 的成活率最高,为 77.78%,褐化率差异不显著。综合而言,种胚经过二次消毒处理的效果较好,处理 4 的效果较好。即在超净工作台中,用 75%的乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 5%NaOCl 溶液处理 20 min,无菌水冲洗 3 次,用手术刀将种子去皮,以胚为中心切成 0.3 cm×0.5 cm 带胚乳的小方块,再用 75%的乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,3% NaOCl 溶液处理 15 min,无菌水冲洗 3 次,用吸水纸吸干表面的水分,接种于胚培养基中(图 1)。

2.2 培养基对种胚培养的影响

从极差值 R 直观分析可知,试验 3 个因素中,

表 2 胚培养 L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)试验极差分析

Table 2 Range analysis of L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>) orthogonal test on embryo culture

处理	A(培养基)	B(6-BA 浓度 /(mg·L <sup>-1</sup> ))	D(NAA 浓度 /(mg·L <sup>-1</sup> ))	萌发率 /%	胚萌发苗高 /mm
1	1(MS)	1(1.0)	1(0)	86.25	22.65
2	1(MS)	2(2.0)	2(0.5)	52.50	31.06
3	1(MS)	3(3.0)	3(1.0)	30.00	14.33
4	1(MS)	4(4.0)	4(1.5)	16.25	9.96
5	2(WPM)	1(1.0)	2(0.5)	71.25	49.70
6	2(WPM)	2(2.0)	1(0)	95.00	59.65
7	2(WPM)	3(3.0)	4(1.5)	47.50	11.78
8	2(WPM)	4(4.0)	3(1.0)	35.00	14.87
9	3(GD)	1(1.0)	3(1.0)	31.25	16.27
10	3(GD)	2(2.0)	4(1.5)	42.50	19.82
11	3(GD)	3(3.0)	1(0)	22.50	32.44
12	3(GD)	4(4.0)	2(0.5)	7.50	8.34
13	4(B <sub>5</sub> )	1(1.0)	4(1.5)	33.75	12.07
14	4(B <sub>5</sub> )	2(2.0)	3(1.0)	51.25	24.23
15	4(B <sub>5</sub> )	3(3.0)	2(0.5)	42.50	22.74
16	4(B <sub>5</sub> )	4(4.0)	1(0)	8.75	9.62
R	培养基	6-BA 浓度	x1	46.25	19.50
			x2	62.19	34.00
			x3	25.94	19.22
			x4	34.06	17.17
		NAA 浓度	x1	55.63	25.17
			x2	60.31	33.69
			x3	35.63	20.32
			x4	16.88	10.70
		培养基	x1	53.13	31.10
			x2	43.44	27.96
			x3	36.88	17.43
			x4	35.00	13.41
		6-BA 浓度	x1	53.13	31.10
			x2	43.44	27.96
			x3	36.88	17.43
			x4	35.00	13.41
		NAA 浓度	x1	53.13	31.10
			x2	43.44	27.96
			x3	36.88	17.43
			x4	35.00	13.41

注:萌发率、胚萌发苗高均为 2 次重复的均值。R:极差。

6-BA 对胚培养的萌发率、胚萌发苗高影响最大(表 2)。比较各水平均值,得知 A2B2C1 最佳,即 WPM+6-BA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>利于种胚萌发。

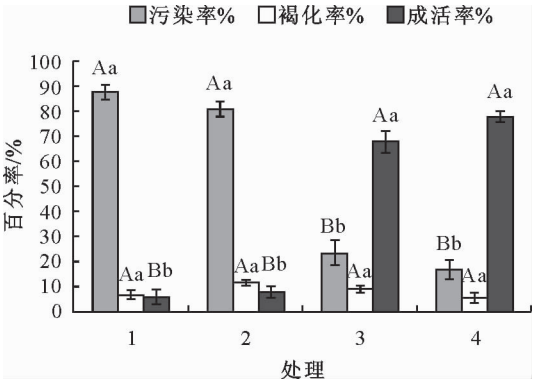


图 1 不同消毒灭菌处理对胚培养污染率、褐化率、成活率的影响

Fig. 1 Effects of different sterilization treatments on embryo contamination rates, browning rate, and survival rate

不同胚培养基显著影响胚培养的萌发率、胚萌发苗高。当培养基为 WPM 时,胚培养的萌发率最高达 62.19%、胚萌发苗高达到 34.00 mm,极显著高于其他水平。当 6-BA 浓度为 2.0 mg · L<sup>-1</sup>时,胚培养的萌发率最高达 60.31%,胚萌发苗高达到 33.69 mm,高于其他水平,但与 6-BA 浓度为 1.0 mg · L<sup>-1</sup>时的结果差异不显著。NAA 浓度为 0 时萌发率最高达 53.13%、胚萌发苗高 31.10 mm,高于其他水平,但与 NAA 浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup>时的结果差异不显著。综合分析可知,最适种胚萌发生长培养基为:WPM+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0 或 0.5 mg · L<sup>-1</sup>,在此培养基中,胚培养 15 d 后萌发出根和芽,培养 30 d 后种胚可以萌发成完整植,萌发苗健壮,生长良好。

2.3 不同激素组合对不定芽诱导的影响

MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 IBA 组合显著影响了不定芽诱导率(表 3)。极差值 R 直观分析可知,试验 2 因素组合中,处理 2 即 A1B2 的组合不定芽诱导率最高为 92.50%。所以不定芽诱导的最适培养基为:MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+IBA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>,且诱导出的不定芽健壮,长势强。

表 3 不定芽诱导 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验极差分析

Table 3 Range analysis of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test on adventitious bud differentiation

处理	A(6-BA 浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> ))	B(IBA 浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> ))	不定芽诱导率 /%
1	1(1.0)	1(0)	83.75
2	1(1.0)	2(0.1)	92.50
3	1(1.0)	3(0.2)	66.25
4	2(2.0)	1(0)	71.25
5	2(2.0)	2(0.1)	76.25
6	2(2.0)	3(0.2)	70.00
7	3(3.0)	1(0)	45.00
8	3(3.0)	2(0.1)	50.00
9	3(3.0)	3(0.2)	43.75
R	6-BA 浓度	x1	80.83
		x2	72.50
		x3	46.25
	IBA 浓度	x1	66.67
		x2	72.92
		x3	60.00
	6-BA 浓度		34.58
	IBA 浓度		12.92

2.4 培养基对继代培养的影响

从极差值 R 直观分析可知,试验 3 因素组合中,A2B3C1 的增殖效果最好,增殖系数最高,即 GD+ZT 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>(表 4)。不同培养基及激素组合显著影响了增殖系数(*p*<0.01),不同培养基种类对增殖有显著影响,在 GD

培养基上,增殖系数为 3.38,极显著高于其他水平。当 ZT 浓度为 1.5 mg · L<sup>-1</sup>和 2.0 mg · L<sup>-1</sup>时,增殖系数分别为 2.52 和 2.62 差异不显著。生长素 NAA 浓度为 0.1 时,增殖系数最大为 2.75(表 4)。所以,最适培养基为 GD+ZT 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>。

表 4 继代培养 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验极差分析

Table 4 The subculture of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test range table

处理	A (培养基)	B(ZT 浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> ))	C(NAA 浓度 /(mg · L <sup>-1</sup> ))	增殖 系数
1	1(MS)	1(1.0)	1(0.1)	2.0
2	1(MS)	2(1.5)	2(0.15)	1.88
3	1(MS)	3(2.0)	3(0.2)	1.29
4	2(GD)	1(1.0)	2(0.15)	2.88
5	2(GD)	2(1.5)	3(0.2)	3.35
6	2(GD)	3(2.0)	1(0.1)	3.91
7	3(WPM)	1(1.0)	3(0.2)	1.94
8	3(WPM)	2(1.5)	1(0.1)	2.34
9	3(WPM)	3(2.0)	2(0.15)	2.66
R	培养基	ZT 浓度	x1	1.72
			x2	3.38
			x3	2.31
			x1	2.27
			x2	2.52
			x3	2.62
			x1	2.75
			x2	2.47
			x3	2.19
培养基	ZT 浓度	NAA 浓度	1.66	
			0.35	
			0.56	

注:萌发率、胚萌发苗高均为该试验 2 次重复的均值。

3 结论与讨论

新采收的板栗种子不能直接用于种胚培养试验,主要是由于板栗坚果属于有明显休眠期的顽拗性种子,采收后需要经过一段时间的贮藏,才能打破休眠。王贵禧<sup>[17]</sup>等研究表明,在冷藏(0℃~2℃)条件下的休眠期为 3 个月左右。

常规消毒方法的效果不理想,污染严重。主要是由于板栗种子在冷藏柜中贮藏半年以上,表面有大量菌类,尤其是种子基部更容易滋生菌类。因此,试验中种子虽然经过一次细致的表面消毒处理,仍然污染严重;但当种子经过二次消毒处理后,可以有效抑制污染,污染率最低为 16.67%,成活率最高为 77.78%,并无明显的褐化现象。

板栗组织培养中褐化现象严重<sup>[18]</sup>,主要是因为板栗体内含有酚类物质<sup>[19]</sup>,当外植体组织受到损伤时酚类物质被氧化成醌,发生褐化。本研究以种胚为外植体,褐化现象较轻,这可能是因为种胚组织较幼嫩,内含酚类物质较少,而且切取种胚时胚外层被胚乳包围,减少了胚与消毒剂的接触,不容易伤及胚

部,有效地抑制了褐化现象的发生。

生长素和细胞分裂素的运用及其浓度大小直接影响外植体生长和分化的方向。本研究结果表明,细胞分裂素和生长素共同使用对芽诱导效果较好,其中,6-BA  $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合芽的诱导效果好,萌发率最高达到 95.00%,胚萌发苗高达 59.65 mm。

增殖培养中,GD 培养基适于板栗增殖培养,增殖效果显著优于其他培养基,以 GD+ZT $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基效果最好,增殖系数最大达 3.91。

参考文献:

[1] 张宇和,柳 夔,梁维坚,等. 中国果树志:板栗榛子卷[M]. 北京:中国林业出版社,2005:7-10.

[2] 柳 夔,蔡剑华,张宇和. 板栗[M]. 北京:科学出版社,1988:169-171.

[3] 王向红,桑建新,张子德,等. 不同品种板栗的营养价值和品质分析[J]. 食品科技,2004(3):95-97.  
WANG X H, SANG J X, ZHANG Z D, *et al.* Quality analysis of different chestnut[J]. Food Science and Technology, 2004(3):95-97. (in Chinese)

[4] MANZANERA J A, PARDOS J A. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1990, 21(1):1-8.

[5] ROMANO A, MARTINS-LOUÇÃO M A. Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* L.): establishment problems[J]. Scientia Gerundensis, 1992(18):17-27.

[6] XING Z Z, SATCHWELL M F, POWELL W A, *et al.* Micropropagation of American chestnut: increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis[J]. In Vitro Cellular & Development Biology, 1997, 33(1):43-48.

[7] 杨国臣,鲁重格,ASANTE T M,等. 美洲板栗愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 吉林农业大学学报,2008, 30(4):466-471  
YANG G C, LU Z G, ASANTE T M, *et al.* In vitro callus induction and shoot initiation of American chestnut (*Castanea dentata*) [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 30(4):466-471. (in Chinese)

[8] 侯竞薇. 板栗组织培养及其不定根发生蛋白质组学探讨[D]. 北京:北京林业大学,2010.

[9] 陈建华,罗丽华,苏冬梅,等. 不同板栗品种的组培技术[J]. 中南林业科技大学学报,2007, 12(6):83-87.  
CHEN J H, LUO L H, SU D M, *et al.* The technique of tissue culture for different chestnut varieties[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2007, 12(6):83-87. (in Chinese)

[10] 郭素娟,任鹏,王桂云. 燕山红栗下胚轴再生体系的建立[J]. 西南林学院学报,2005, 25(4):102-105.  
GUO S J, REN P, WANG G Y. Establishment of regeneration system from hypocotyls of *Castanea mollissima* cv. ‘Yanshanhong’[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2005, 25(4):102-105. (in Chinese)

[11] 苏冬梅,罗丽华,杨定海. 板栗愈伤组织的诱导[J]. 经济林研究,2004, 22(3):17-19.  
SU D M, LUO L H, YANG D H. Research on callus induction of Chinese chestnut [J]. Nonwood Forest Research, 2004, 22(3):17-19. (in Chinese)

[12] 张玲,尹伟伦,王华芳. 板栗胚珠培养研究初报[J]. 北京林业大学学报,2007,29(5):99-105.  
ZHANG L, YIN W L, WANG H F. Ovule culture *in vitro* of *Castanea mollissima* BL. [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007, 29(5):99-105. (in Chinese)

[13] 徐晨,陈双双,王金金,等. 板栗高效组培体系的建立和优化[J]. 北京农学院学报,2013, 28(3):6-9.  
XU C, CHEN S S, WANG J J, *et al.* Establishment and optimization of efficient micropropagation system in *Castanea mollissima* [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2013, 28(3):6-9. (in Chinese)

[14] 郭素娟,吕文君,邹峰,等. 板栗授粉后子房内源激素含量的变化[J]. 西北林学院学报,2013, 28(6):56-62.  
GUO S J, LV W J, ZOU F, *et al.* Changes in endogenous hormone contents of ovary after pollination of chestnut [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6):56-62 (in Chinese)

[15] 吕文君,郭素娟,邹峰,等. 板栗授粉前后子房中内源多胺含量的变化[J]. 西北林学院学报,2013, 28(5):109-114.  
LV W J, GUO S J, ZOU F, *et al.* Changes in polyamine contents of ovary during pollination and fertilization periods of chestnut [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(5):109-114. (in Chinese)

[16] 叶茂宗,陶月良,许秀珍. 顽拗型食用种子板栗采后贮藏方式与发芽关系及其调控途径的商榷[J]. 浙江亚热带作物通讯,1997, 18(1):10-15.

[17] 王贵禧,梁丽松,宗亦臣. 贮藏板栗休眠与萌芽的温度调控[J]. 林业科学,1999, 35(3):29-33.  
WANG G X, LIANG L S, ZONG Y C. Controlling of dormancy and sprouting of stored chestnut by means of temperature [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1999, 35(3):29-33. (in Chinese)

[18] CHEVRE AM, GILL SS, MOURAS A, *et al.* In vitro vegetative multiplication of cheastnut [J]. Journal of Horticultural Science, 1983, 58(1):23-29.

[19] BAJAJ Y P S. 林木和果树生物技术[M]. 张培果,译. 北京:中国林业出版社,1991:179, 283-284, 362.