

吕运舟,董筱昀,蒋泽平,等.不同无性系薄壳山核桃播种苗的组织培养[J].江苏农业科学,2017,45(1):47-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.013

不同无性系薄壳山核桃播种苗的组织培养

吕运舟,董筱昀,蒋泽平,黄利斌
(江苏省林业科学研究院,江苏南京 211153)

摘要:以 9 个无性系播种苗的幼茎为外植体,进行薄壳山核桃组织培养研究。结果表明,9 个无性系都具有腋芽萌发能力,可通过组织培养再生植株,但是不同无性系在不定芽分化、生根能力上有很大差异;9 号无性系的不定芽增殖能力相对较强,平均增殖系数达到 5.6 个/外植体,是无性系科瑞克的 1.9 倍;9 号无性系的生根能力相对最好,生根率为 41.7%;6-BA 浓度为 4.0 mg/L 时,多数无性系不定芽增殖较好;6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时更适于不定芽的生长。

关键词:薄壳山核桃;组织培养;增殖系数;无性系;生根能力

中图分类号: S664.104⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0047-03

薄壳山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.] 别称美国薄壳山核桃、长山核桃,世界著名干果之一,原产北美,为胡桃科山核桃属雌雄同株植物,花单性,雌雄异熟^[1],是优良的果材兼用树种^[2]。我国于 19 世纪末 20 世纪初开始引种美国山核桃,目前种植范围比较广,干果深受消费者欢迎。薄壳山核桃丰产性与品种密切相关,主要靠本砧嫁接扩繁。但是,嫁接繁殖需要大量砧木,且技术要求高、人工成本大,同时受到季节限制,不利于快速扩繁良种种苗。组织培养快繁是保持薄壳山核桃优良性状、加快其繁殖的有效手段,可促进薄壳山核桃的推广和利用。目前,国外学者开展薄壳山核桃组织培养研究相对较早,并取得一些进展,但尚未建立成熟的再生体系^[3-5]。Mathews 等利用未成熟胚成功诱导出薄壳山核桃体细胞胚,但未能实现增殖和生根^[6];Phillips 等用薄壳山核桃实生幼苗的顶芽和腋芽为外植体分化出不定芽,但继代困难、重复性差^[7];Burns 等以 8 个薄壳山核桃品种的未成熟胚为外植体诱导体细胞胚发现,除植物激素等培养条件外,外植体基因型是影响再生体系建立的关键因素,品种 Schley 的体细胞诱导率远高于其他 7 种供试材料^[8];Renukdas 等以薄壳山核桃 Desirable 和 Cape Fear 2 个品种的试管无菌苗为材料诱导茎段腋芽分化,并建立了植株再生体系^[9]。目前,国内对薄壳山核桃组织培养研究主要集中于外植体脱毒及腋芽分化^[10-11],而由于成年大树外植体脱毒困难,未能实现其无菌培养。

本试验收集 9 种薄壳山核桃品种或优良单株种子,培育半同胞子代实生幼苗,以带腋芽茎段为外植体,研究不同品种子代、不同激素浓度对薄壳山核桃不定芽分化及植株再生的影响,以期探讨薄壳山核桃组织培养再生过程的影响因子,为其扩繁提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 外植体的构建 科瑞克 (Creek)、波尼 (Pownee)、马罕 (Mahan)、碧根源 3 号 (Bigenyuan 3) 的种子,采自江苏省常州市金土地农牧科技服务有限公司的薄壳山核桃果园内;结合南京市实生大树优选,收集优良薄壳山核桃种子,1 号、5 号采自中国科学院南京中山植物园内,6 号采自江苏省南京市雨花台区景区内,8 号、9 号采自江苏省林业科学研究院内。2014 年 1 月 14 日进行播种,采取恒温培养箱 30 ℃ 催芽;出芽后育苗盘移植,置于室温 25 ℃ 的温室内生长,日光灯为光源照射 16 h/d;剪取带腋芽茎段作为外植体材料 (图 3-a)。

1.1.2 培养基 选用 WPM 培养基为基本培养基,同时添加蔗糖 30 g/L,琼脂粉 6 g/L。在此基础上,添加 NAA 0.01 mg/L、6-BA 0.5 mg/L 作为芽诱导及伸长培养基;添加 NAA 0.5 mg/L、6-BA 1.0~5.0 mg/L 作为芽增殖培养基;添加 IBA 0.5~5 mg/L、活性炭 3.0 g/L 作为生根培养基。培养基 pH 值均为 5.8。

1.2 试验方法

待温室幼苗长至 7~8 cm 时,切取 1.0~1.5 cm 茎段,作为起始外植体;流水冲洗 30 min,体积分数为 70% 的乙醇消毒 30 s;用 0.1 mg/L HgCl₂ 消毒 6 min,无菌水冲洗 4 次;接种于芽诱导培养基上,后续试验以分化的无菌芽为材料。每处理 15 个外植体,重复 3 次。培养条件:温度为 (25±2) ℃,光照度为 1 500~2 000 lx,光照时间为 16 h/d。培养 30 d 进行调查统计。

1.3 数据分析

数据采用 Excel、DPS 软件进行处理,采用 Origin 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同无性系腋芽萌发和生长的差异

由表 1 可见,薄壳山核桃不同无性系子代在腋芽诱导及生长上有明显的差异;9 号无性系子代的腋芽萌发率相对最高,为 97.8%,与 1 号无性系的腋芽萌发率差异不显著,与其

收稿日期:2015-12-01

基金项目:江苏省科技基础设施建设计划 (编号:BM2015021-4);江苏省林业科学研究院青年基金 (编号:JAF-2012-08);江苏省林业三新工程 (编号:LYSX[2015]40)。

作者简介:吕运舟 (1983—),博士,助理研究员,主要从事林木遗传育种及栽培技术研究。E-mail:yunzhouly@163.com。

他无性系的腋芽萌发率差异显著;最低的为马罕子代,腋芽萌发率为 65.7%,其他无性系均在 70% 以上;腋芽生长量最大的为 5 号无性系,平均腋芽长为 4.2 cm,单芽最长达 5.2 cm;腋芽生长量最小的为碧根源 3 号,平均腋芽长为 2.1 cm,且生长状态相对较弱,与其他无性系差异显著。

表 1 不同无性系子代腋芽分化和腋芽长特征比较

| 无性系 | 腋芽萌发率 (%) | 腋芽 | |
|---------|--------------|----------|----------|
| | | 平均长度(cm) | 长度范围(cm) |
| 科瑞克 | 74.7c | 2.9b | 1.9~3.7 |
| 波尼 | 80.9bc | 3.7ab | 2.5~4.3 |
| 马罕 | 65.7d | 3.2b | 2.8~4.0 |
| 碧根源 3 号 | 76.2c | 2.1c | 2.7~3.2 |
| 1 号 | 96.3a | 3.6ab | 2.9~4.6 |
| 5 号 | 82.1b | 4.2a | 3.1~5.2 |
| 6 号 | 85.6b | 3.8ab | 2.8~4.7 |
| 8 号 | 76.4c | 3.5ab | 1.9~4.9 |
| 9 号 | 97.8a | 4.1a | 3.5~5.1 |

注:同列数据后标注不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 不同 6-BA 浓度对不同无性系子代芽增殖的影响

由图 1 可见,在一定浓度范围内,随 6-BA 浓度的增加,薄壳山核桃子代不定芽的分化数呈增加趋势;对碧根源 3 号而言,6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时芽的增殖数相对最多,平均为 3.4 个/外植体;6 号无性系芽增殖数相对最多时 6-BA 浓度为 3.0 mg/L;其他 7 个无性系芽增殖数相对最多时 6-BA 浓度为 4.0 mg/L,其中 9 号无性系的芽增殖数最多,平均为 5.6 个/外植体。由图 2 可见,无性系 1 号、5 号、8 号、9 号、波尼具有相同的变化趋势,芽长与 6-BA 浓度呈负相关;马罕、无性系 6 号分别在 6-BA 浓度为 3.0、2.0 mg/L 时芽长达到最大,后随 6-BA 浓度的增加而芽长减小;随 6-BA 浓度的增加,科瑞克、碧根源 3 号的芽长表现出先降低后升高再降低的趋势;6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,5 号、9 号无性系的芽生长状态相对较好,芽长分别为 4.1、4.0 cm,且最为健壮。方差分析结果表明,薄壳山核桃芽分化数量与芽长在不同 6-BA 浓度间、不同无性系间均存在极显著性差异(表 2)。

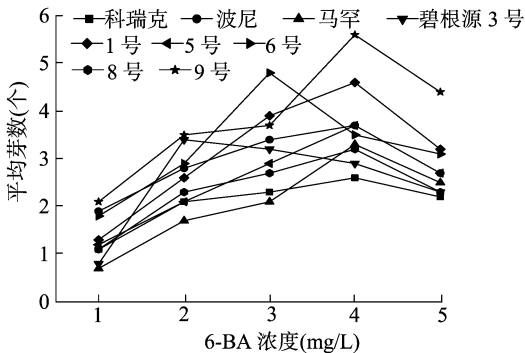


图 1 不同 6-BA 浓度对不同无性系不定芽增殖的影响

2.3 不同 IBA 浓度对组培苗生根的影响

将不定芽转移至低浓度 6-BA 培养基上过渡生长,当不定芽长至 3~4 cm 时剪下,将 4 个无性系转移至添加不同质量浓度 IBA 的生根培养基上进行培养。由表 3 可见,添加不

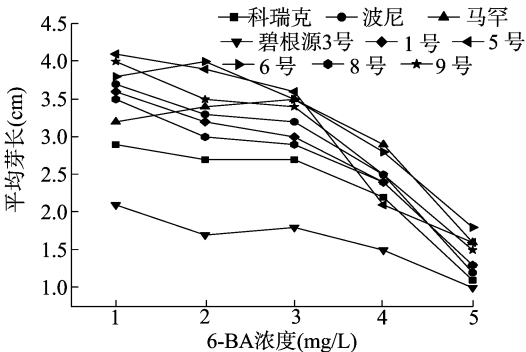


图 2 不同 6-BA 浓度对不同无性系芽生长的影响

表 2 不同无性系在不同激素组合培养基上芽增殖数及芽长的方差分析

| 变异来源 | 自由度 | 不定芽数 | | 芽长 | |
|-----------|-----|-------|----------|-------|----------|
| | | 均方 | F 值 | 均方 | F 值 |
| 无性系 | 8 | 5.53 | 7.54 ** | 3.41 | 6.14 ** |
| 培养基 | 4 | 22.41 | 30.57 ** | 18.50 | 33.30 ** |
| 无性系 × 培养基 | 32 | 2.50 | 6.88 ** | 1.21 | 3.93 ** |
| 误差 | 90 | 1.01 | | 1.12 | |

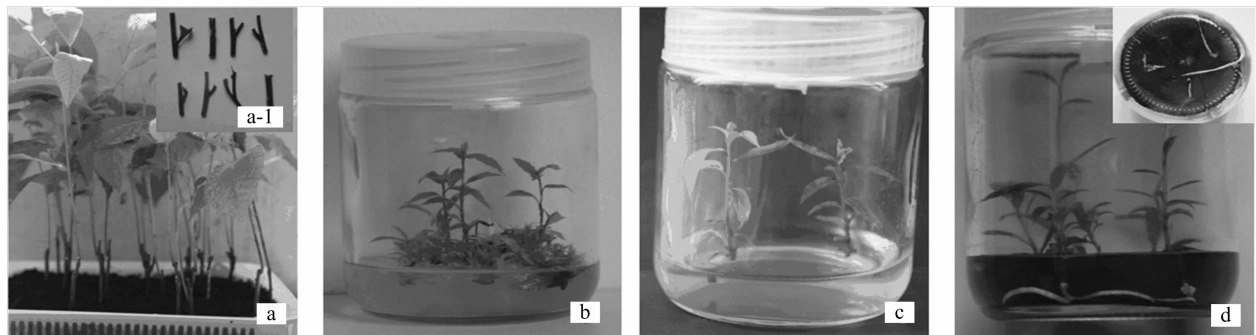
注:数据后上标“**”表示测定指标在变异来源上有极显著差异。

同质量浓度 IBA 的生根培养基均可诱导科瑞克等 4 个无性系生根,但不同无性系所需的最佳 IBA 浓度及不同无性系的生根能力均存在差异;低浓度 IBA 不能诱导科瑞克生根,当 IBA 浓度为 5.0 mg/L 时才能生根;IBA 浓度 3.0 mg/L 时,波尼、6 号的无性系生根率相对较高,分别为 23.9%、37.9%;随 IBA 浓度的增加,9 号无性系的生根率逐渐增加;参试的 4 个无性系中,9 号无性系的生根能力相对最强,IBA 浓度为 5.0 mg/L 时,生根率高达 41.7%;薄壳山核桃属于直根系树种,侧根生长能力相对较差,4 个无性系的生根数均相对较少,在 1~4 个之间(图 3-d)。

表 3 不同 IBA 浓度诱导不同无性系的生根情况

| 无性系 | IBA 浓度 (mg/L) | 生根数 (个) | 生根率 (%) | 植株生长特征 |
|-----|------------------|------------|------------|-----------------|
| 科瑞克 | 0.5 | 0 | 0 | 苗较细,叶片较大 |
| | 1.0 | 0 | 0 | 苗较细,叶片较大 |
| | 3.0 | 0 | 0 | 苗细弱,叶黄 |
| | 5.0 | 1.2 | 10.6 | 苗细弱,叶黄,无须根 |
| 波尼 | 0.5 | 1.1 | 6.5 | 苗较细,叶片较大,无须根 |
| | 1.0 | 1.8 | 21.7 | 苗细弱,叶黄,根短,无须根 |
| | 3.0 | 2.1 | 23.9 | 苗细弱,叶黄,根短,无须根 |
| | 5.0 | 1.7 | 15.8 | 苗细弱,叶黄,根短,无须根 |
| 6 号 | 0.5 | 1.2 | 11.9 | 苗健壮,叶片较大,根细,无须根 |
| | 1.0 | 1.6 | 25.8 | 苗健壮,叶片较大,根细,无须根 |
| | 3.0 | 1.9 | 37.9 | 苗健壮,叶片较大,根细,无须根 |
| | 5.0 | 2.7 | 26.5 | 苗细弱,叶黄,根细,无须根 |
| 9 号 | 0.5 | 1.9 | 25.3 | 苗健壮,根粗壮,无须根 |
| | 1.0 | 2.8 | 28.6 | 苗健壮,根粗壮,无须根 |
| | 3.0 | 3.1 | 38.9 | 苗健壮,根粗壮,无须根 |
| | 5.0 | 2.5 | 41.7 | 叶发黄,根粗壮,无须根 |

注:由于其他 5 个无性系生长的芽数量不足 50 个,故没有进一步开展生根试验。



a—供试薄壳山核桃材料；a-1—外植体；b—芽增殖；c—芽生长；d—不定根再生

图3 薄壳山核桃幼茎不定芽分化及植株再生途径

3 结论与讨论

无性繁殖是短时间内实现薄壳山核桃良种种苗工厂化繁育的理想手段。目前,薄壳山核桃已有成功建立体胚发生的报道^[6,8],但是低分化率、低生根率限制了通过此方法建立植株再生体系。Renukdas 等曾报道以薄壳山核桃试管无菌苗诱导茎段腋芽分化成功建立植株再生体系^[9],但由于成熟胚脱毒进瓶污染率较高而限制了外植体来源数量,进一步影响在生产中的应用。笔者以成熟种子培育的幼苗为材料,大大增加了外植体数量,同时也减少了脱毒过程的污染,研究结果表明,薄壳山核桃 9 个无性系子代都具有腋芽萌发能力,可通过组织培养再生植株,但是不同无性系子代在不定芽分化、生根能力上有很大差异;各无性系芽增殖数在 2.9 ~ 5.6 个/外植体之间,9 号无性系子代的不定芽增殖能力相对较强,科瑞克相对最差,9 号无性系不定芽的增殖能力是无性系科瑞克的 1.9 倍;9 号无性系子代的生根能力也相对较好,生根率达到 41.7%,但生根率不是很高。这种差异说明薄壳山核桃的芽增殖能力与生根能力可能受遗传因素影响较大。

工厂化繁育薄壳山核桃良种苗木需要从优良品种植株上采集外植体,而大树外植体灭菌较为困难,傅玉兰等研究不同灭菌方法在薄壳山核桃当年生带芽茎段无菌培养体系建立中的效果发现,经过暗培养、70% 乙醇浸泡 30 s、0.2% HgCl_2 处理 15 min 等措施可将无菌率提高到 95%^[12],但未见无菌材料获取及后续扩繁体系建立报道。笔者前期在大树外植体脱毒试验中发现, HgCl_2 浓度过高或浸泡时间过长,都会严重影响腋芽的萌发,造成无菌材料获取失败。总的来看,通过组织培养可实现薄壳山核桃的体外植株再生,但要实现工厂化快繁还须进一步摸索培养条件以提高生根效率和成苗率。

参考文献:

[1] Benucci G M, Bonito G, Falini L B, et al. Mycorrhization of pecan

trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. [J]. Mycorrhiza, 2012, 22 (5): 383 – 392.

[2] Grauke L J, Starr J L. Phenotypic screening of pecan seedling rootstocks in search of nematode resistance [J]. Trees, 2014, 28 (5): 1333 – 1341.

[3] 陈 芬, 姚小华, 高焕章, 等. 薄壳山核桃不同无性系开花物候特性观测和比较 [J]. 林业科学研究, 2015, 28 (2): 209 – 216.

[4] Hansen K C, Lazarte J E. In vitro propagation of pecan seedlings [J]. HortScience, 1984, 19 (2): 237 – 239.

[5] Kamal P, Kamal S K. In vitro germination of pecan (*Carya illinoensis*) embryo [J]. Biharean Biologist, 2010, 4 (1): 37 – 43.

[6] Mathews H, Wetzstein H Y. A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis* [J]. Plant Science, 1993, 91 (1): 103 – 108.

[7] Phillips G C, Corte Olivares J, Butler N S A. Micropropagation of pecan [J]. HortScience, 1990, 25 (10): 1308.

[8] Burns J A, Wetzstein H Y. Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1997, 48 (2): 93 – 102.

[9] Renukdas N N, Mahoharan M, Gamer J O. In vitro propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] [J]. Plant Biotechnology, 2010, 27 (2): 211 – 215.

[10] Hassanen S A, Gabr F M. In vitro rooting of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] [J]. World Applied Sciences Journal, 2013, 21 (3): 315 – 319.

[11] 董筱韵, 蒋泽平, 蒋 春, 等. 薄壳山核桃试管离体培养中不定芽诱导及增殖技术的研究 [J]. 江苏林业科技, 2013, 40 (3): 10 – 14.

[12] 傅玉兰, 谷 风, 吴 炜, 等. 美国山核桃组培中材料灭菌的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31 (2): 169 – 172.