

核桃早实品种微枝接穗试管扩繁技术的研究*

裴 东 奚声珂

摘要 以早实核桃新品种为试材,对试管微枝接穗扩繁中的主要技术环节进行了研究。结果表明:接种外植体适宜的时期为新梢长至 8~10 个节位,适宜的取样部位为顶芽和顶芽下第 4 和第 5 个带节茎段。培养基中 BA 水平、培养温度和继代间隔时间对微枝产生的数量和质量有明显影响。BA 为 0.5~1.0 mg/L,培养温度以昼夜变温即白天 25 ± 3 、夜间 18 ± 2 以及继代间隔 20 d 为微枝扩繁的适宜条件。对生长势衰退的试管微枝进行去除顶端处理,可部分恢复其生长势,抑制衰老黄化和试管内开花。采用改良 DKW 培养基显著增加了试管微枝生长势,基本上克服了退化现象的发生,是扩繁早实品种微枝接穗较好的培养基。

关键词 早实核桃品种 微枝接穗 试管扩繁技术

核桃(*Juglans regia* L.) 是重要的木本油料树种,我国科技人员经过长期的良种选育,培育出早实、丰产、优质的 53 个核桃新品种,它们的推广和应用对实现核桃产业化和改变目前较为落后的生产状况具有重要意义。然而,核桃在无性繁殖上仍存在一些问題,如常规嫁接成活率不稳定、繁殖系数低,试管苗生根困难^[1~3]等;不但如此,早实核桃良种形成长枝的能力很差,尤其对于 7~8 年生以上的树体表现更为突出^[2],接穗量远远满足不了嫁接繁殖需要,使得新品种的推广工作受到很大限制。解决早实核桃良种的快繁问题显得极为迫切。核桃微枝嫁接技术^[3]是新品种快速大量繁殖的新途径。在微枝嫁接繁殖体系中,试管微枝的质量直接影响到嫁接的成活率,其生产效率又制约着整个繁殖速度,是较关键的环节。因此建立规范和有效的核桃试管微枝扩繁技术系列,及时大量地提供优质的微枝接穗,对于成功地进行嫁接繁殖是十分必要的。本文对影响早实核桃试管微枝扩繁因素进行了研究,初步解决了微枝繁殖过程中的退化和黄化现象,获得了良好的试管繁殖率和有效微枝生产率。

1 材料与方 法

1.1 外植体初代培养

取中林 5 号、新早丰、辽宁 1 号(辽核 1 号)等早实核桃新品种的接穗,在室内进行嫁接,砧木为 2 年生的核桃实生苗,嫁接苗盆栽于温室中。次年春天以萌发的新梢为外植体进行灭菌和接种。首先取新梢茎段在流水中冲泡 5~8 h,在无菌条件下将茎段浸于 75% 乙醇中 1 min,而后用无菌水冲洗 3~5 次,再将茎段浸泡于 0.1% $HgCl_2$ 中 5~10 min,最后用无菌水冲洗 5~8 次。将茎段基部切一新面并切分成单节间的茎段接种于培养基中培养。

1.2 培养基及培养条件

1998—03—30 收稿。

裴东助理研究员,奚声珂(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)。

* 本文为 1992~1997 年林业部“八五”重点攻关课题“核桃抗性育种及微繁技术的研究”部分内容。

基本培养基为 DKW^[4], 继代扩繁培养基为 DKW 附加 1.0 mg/L BA 和 0.001 mg/L IBA, 培养温度为 25 ± 3 , 光照强度为 1 800 lx, 每天 16 h 光照和 8 h 黑暗。继代培养容器为 250 mL 圆柱状培养瓶。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体取样部位 取具有 8~10 个复叶的新梢, 将新梢按单节间切分成段, 即顶芽、顶芽下第 1~3、4、5、6、7~10 节的茎段。接种培养基为 DKW 基本培养基。

1.3.2 培养基中 BA 和 IBA 水平 以中林 5 号早实品种为试材, BA 的水平为 0.1~1.5 mg/L, IBA 为 0.000 1~0.001 mg/L。每瓶接种 4 个茎梢, 每个茎梢带 3~4 节位, 茎梢生长状况尽量选择一致, 培养 20 d 后切除基部愈伤、分离萌发新梢、转换新的培养基, 再继代培养 20 d 调查生长结果。有效微枝的标准为基部直径大于 4 mm, 高 2.5 cm 以上, 生长旺盛的幼嫩微枝。培养温度采用白天 25 ± 3 , 夜间 18 ± 2 。

1.3.3 变温处理 以辽宁 1 号早实品种为试材, 每瓶 4 个茎梢, 每个茎梢带 3、4 个节位, 茎梢生长状况尽量选择一致, 培养 20 d 后切除基部愈伤、分离萌发新梢、转换新的培养基, 再继代培养 20 d 后调查生长结果。温度处理有: (1) 常规培养温度: 25 ± 3 ; (2) 变温处理: 光照条件下为 25 ± 3 , 黑暗条件 18 ± 2 。

1.3.4 克服微枝在试管培养中生长势退化的处理 以辽宁 1 号和新早丰早实品种为试材, 去除生长势表现出退化特征的微枝顶梢约 0.5 cm。生长势退化的判断标准为: 微枝叶片由嫩绿色转至深绿色、节间变短, 叶片簇生呈莲座状。对 DKW 培养基进行改良并添加了成分。

2 结果与分析

2.1 茎段外植体取样时期和部位对其试管培养存活的影响

大量接种试验表明: 核桃新梢在旺盛生长期, 长出 8~10 个复叶时是采集外植体进行试管接种的较适宜时期, 过早采集虽然可以获得较高的试管培养存活率, 但茎段的萌发生长和不定芽分化率较低, 采集过晚则污染率明显提高。各个节段接种结果表明: 茎段在新梢上所处的位置不同, 存活率和试管萌发率明显不同, 结果见图 1。

从图 1 可知: 从新梢顶部至基部切取带单节的茎段进行试管接种, 其污染率由 73% 升高至 80%。虽然顶芽下第 1~3 个节段接种污染率较低为 10%, 但其试管褐化率很高为 90%; 萌发率极低为 0, 而靠近基部茎段接种后污染率高。因此综合试验结果认为: 新梢顶芽和顶芽下 4、5 个节段是较适宜的试管接种取材部位。它除能较好地克服接种后外植体褐化和污染问题外, 还能获得较高的萌发率(50%)。核桃新梢上不同节段接种后表现出的差异是由节段组织和所带芽体本身发育不同而引起的。近顶端节段由于腋芽质量差、木质化程度低、输导组织不健全, 不仅腋芽很

图 1 茎段外植体取样部位对试管接种存活和萌发影响
(每个处理至少取 20 个带单节的茎段, 重复 3 次)

难萌发,而且在接种时极易受到伤害而褐化死亡。处于基部的节段腋芽发育也较差,且木质化程度高,输导组织发达,因而组织内带菌严重,使得接种后的外植体污染率极高。从发育角度看,顶芽和顶芽下第4~5节段的芽体发育较好,组织带菌少,是适宜的接种材料。

2.2 BA对微枝增殖和质量的影响

茎梢培养20 d后其侧芽萌发,切取萌发新梢进行增殖培养,以生产大量优质的微枝接穗。试验表明:微枝的质量和数量与培养基中BA水平密切相关。虽然IBA等生长素类调节剂在微枝扩繁过程中是必需的,但需求水平很低^[3]。BA为0.5、1.0 mg/L时,IBA为0.001~0.01 mg/L的处理微枝生长和扩增率没有表现出明显差异。IBA水平过高,微枝基部会产生大量愈伤,进而影响微枝生长。因此试验采用IBA水平为0.001 mg/L。

表1说明:当BA浓度大于1.5 mg/L时,茎梢上侧芽萌发率显著提高,但每个萌发的新梢较为细弱,产生有效微枝数较少;当BA浓度低于0.5 mg/L时,茎梢侧芽萌发和生长受到显著抑制,新梢生长较为缓慢,长出的微枝细弱;BA浓度为0.5~1.0 mg/L时,茎梢萌发侧枝能力适中,产生的有效微枝数最多,平均每个茎梢产生新梢数和有效新梢数分别为2.1~2.4个和0.77~0.96个。

表1 培养基中BA水平对微枝接穗形成数量和质量的影响

BA(mg/L)	新梢数(个)	有效微枝接穗数(个)
2.0	212 ± 21 c	6 ± 2 c
1.5	182 ± 21 b	20 ± 5 b
1.0	146 ± 16 a	58 ± 9 a
0.5	123 ± 14 a	46 ± 10 a
0.2	80 ± 18 d	0

注:每处理为15瓶内微枝数总和,重复3次。字母表示SSR测验的显著性,相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异极显著($\alpha=0.01$)。

2.3 培养温度对试管微枝生长和增殖的影响

在微枝扩繁过程中,采取白天 25 ± 3 °C,夜间 18 ± 2 °C的变温处理,培养22 d调查产生的微枝数(每处理调查20瓶内微枝总和,3次重复),并与常规培养(温度保持在 25 ± 3 °C)比较发现:变温培养虽然对产生微枝数的多少没有明显影响,即恒温培养产生171个微枝;变温培养产生180个微枝,但可以极显著($\alpha=0.01$)地增加有效微枝的生产率,即前者产生51个有效微枝;后者产生72个有效微枝。这说明白天温度较高利于微枝光合作用,夜间温度较低可降低呼吸代谢消耗,利于营养贮藏积累,促进微枝伸长和增粗。

2.4 继代间隔时间对微枝生长增殖的影响

核桃是对继代间隔时间要求较为严格的树种之一。间隔时间过短不仅浪费培养基,而且由于试管微枝生长发育不良,影响形成的微枝质量;间隔时间过长,试管内微枝得不到及时继代,会发生基部叶片变黄、脱落、生长势减弱、茎变细形成小老苗。故及时有效地进行核桃微枝继代增殖是很重要的。

从图2可知,20 d继代间隔获得的有效微枝数最高,20株茎段(5瓶)连续3次继代培养可产生29个有效微枝;30 d继代间隔虽获得的微枝数与继代间隔20 d的相近,但有效微枝数较少(21个);40 d继代间隔由于时间过长,继代苗老化,不仅影响有效微枝的形成,而且其侧芽萌发受到抑制,产生的微枝数

图2 不同继代间隔时间对微枝数量和质量的影响
(每处理为5瓶,连续3次继代结果)

明显减少。

2.5 试管培养中微枝生长势退化和克服措施

早实核桃品种的微枝在继代扩增过程中常出现生长势衰退或老化现象,最初叶色为嫩绿色,在较短时间内突然变为深绿色,节间变短,生长势明显减弱,有的微枝形成顶芽,更为突出的是顶芽发育成雌花,造成开花后整个植株黄化死亡,这一现象尤其在春季极易发生,是早实核桃品种微枝扩繁中发生严重和亟待解决的问题,本试验针对这一问题开展一系列研究,认为去顶处理和改变 DKW 培养基组成是较为有效的措施。

2.5.1 切除叶色转化的茎梢顶端对有效微枝形成的影响 切除叶色由嫩绿色转至深浓绿色、节间变短的继代增殖的茎梢顶端,可极显著消除顶端开花,并促发侧芽萌发,恢复其生长势,产生的有效微枝数明显增加,30 个茎梢经过 2 次继代 42 d 培养,有效新梢数由未处理的 3 个增加至 11 个(表 2)。去除顶端可以改变茎梢内激素平衡,使顶芽减弱对侧芽萌发的抑制,促进侧芽萌发恢复其生长势。

表 2 切除叶色转化的茎梢顶端对有效微枝形成的影响

处 理	调查枝数(个)	42 d 经过 2 次继代	
		有效微枝数(个)	顶端开花枝数(个)
叶色转化未去除顶端	30	3	19
叶色转化去除顶端	30	11	0

2.5.2 DKW 培养基的组分改变对微枝形成和生长势的影响 核桃属于较难进行组织培养的树种之一^[5]。Driver 等^[4]报道了利用核桃杂交种 paradox [*J. hindsii* (Jeps.) Jeps. × *J. regia* L.] 实生苗茎段在 DKW 培养基上诱导顶芽和侧芽伸长。奚声珂等^[3]研究发现,在 DKW 培养基中核桃试管苗生长状况及微枝生长量要明显高于其它几种培养基。虽然 DKW 是适宜于核桃组织培养的培养基,但在早实核桃品种的培养中,试管苗生长势减退现象时有发生,为此在试管中对 DKW 培养基进行了改进,主要围绕改变 DKW 组成进而调节试管苗激素平衡为中心开展了研究,获得了效果较好的改良 DKW 培养基。与普通 DKW 培养基相比,在改良 DKW 培养基上扩繁的微枝生长势旺盛,顶梢呈嫩绿色,试管微枝中上部侧芽萌发受到抑制,叶片明显增大,有效新梢数可提高 20%,是一种良好的用于扩繁早实核桃品种微枝的培养基,目前对这一培养基正在进一步完善。

3 小 结

核桃早实品种微枝接穗试管扩繁技术包括茎段外植体接种、培养条件的优化及控制培养中生长势退化等技术环节。从污染率、萌发率、褐化率等综合指标看,新梢长至 8~10 个节位是适宜的取材时间;顶芽以下第 4、5 节位是最佳取材部位;培养中采用优化条件(BA 为 0.5~1.0 mg/L, 20 d 继代间隔,变温培养即白天 25 ± 3 和夜间 18 ± 2 等),可获得较高有效微枝生产率;通过对生长势衰退的试管微枝进行去除顶端处理和对 DKW 培养基进行改良,可有效地恢复其生长势和抑制衰老黄化及试管内开花。

参 考 文 献

- 1 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用. 北京: 高等教育出版社, 1986. 456 ~ 465.
- 2 郝荣庭, 张毅萍主编. 中国果树志. 核桃卷. 北京: 中国林业出版社, 1996. 20 ~ 27.
- 3 奚声珂, 杨彬. 核桃微枝嫁接技术的研究. 林业科学研究, 1992, 5(5): 531 ~ 535.
- 4 Driver J A, Kuniuki A H. In vitro propagation of paradox walnut root stock. Hortscience, 1984, 19(4): 507 ~ 509.
- 5 MeGranahan G, Leslie C A. In vitro propagation of mature persian walnut cultivars. Hortscience, 1988, 23(1): 220.

Mini-shoot Scion Proliferation in vitro of the Precocious Walnut Cultivars

Pei Dong Xi Shengke

Abstract A technique for mass proliferating mini-shoot scions in vitro of the precocious walnut cultivars (*Juglans regia*) has been established. Tests on the proliferation were carried out and presented in this paper. The results showed that it was the suitable time to collect the shoot node explants in tree for in vitro culture when the shoots grew to form 8 ~ 10 nodes. The shoot tip and the fourth and fifth nodes under the shoot tip in the shoot had highest survival and germination rate after being sterilized and cultured in vitro. The proliferation rate and the quality of mini-shoot scion was obviously influenced by the BA level in DKW medium, the temperature for culture and the proliferation subculture interval, and the best results were achieved when BA in the medium was 0.5 ~ 1.0 mg/L, changing temperature of 25 ± 3 °C in day and 18 ± 2 °C at night and 20 d interval of proliferation subculture. The treatment of cutting off the shoot tips (about 0.5 cm) of the deteriorated shoots clump could partly recover its growth vigor and inhibited its flowering in vitro. From our tests, a modified DKW medium was developed which could dismiss the deterioration phenomenon. After being applied in our lab, the modified DKW demonstrated a better medium for mass proliferation of the mini-shoot scion of precocious walnut cultivars.

Key words precocious walnut mini-shoot scion proliferation in vitro

Pei Dong, Assistant Professor, Xi Shengke (The Research Institute of Forestry, CAF Beijing 100091).