

Rapid Propagation of “Lv Ling” Walnut (*Juglans regia* L.) through Embryo-Induced Seedlings*

Xixing Liu¹, Yuhong Gu², Baoguo Li^{1#}, Guohui Qi¹, Lu Liu², Yanzhe Hui¹, Lixin Dong¹, Liyuan Ma¹

¹College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding
²College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding
Email: liuxixing1234@126.com, #lbg888@163.com

Received: Apr. 13th, 2012; revised: Apr. 28th, 2012; accepted: May 2nd, 2012

Abstract: The mature embryo induced axillary buds were used as explants to investigate rapid propagation of precocious thin-shelled “Lv Ling” walnut in the MS basic medium with different concentrations of plant growth regulators. The results showed that MS + sucrose 30 g/L + agar 6 g/L was the most feasible medium for embryo germination, and MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 6 g/L was the best for induction and multiplication of the axillary buds in all tested treatments. The 50% of rooting rate was achieved by a two-stage rooting method, namely, the shoots were first cultivated in DKW + IBA 8.0 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 6.0 g/L medium for 20 days under dark condition, then transferred to DKW + sucrose 30 g/L + agar 6.0 g/L medium under light condition. After transplanting to the field, 33.3% of the seedlings survived.

Keywords: Walnut; *Juglans*; Embryo; Axillary Buds; Hormones

“绿岭”核桃种胚组培苗腋芽快繁体系的初步研究*

刘喜星¹, 顾玉红², 李保国^{1#}, 齐国辉¹, 刘璐², 回彦哲¹, 董丽欣¹, 马丽媛¹

¹河北农业大学林学院, 保定
²河北农业大学生命科学学院, 保定
Email: liuxixing1234@126.com, #lbg888@163.com

收稿日期: 2012年4月13日; 修回日期: 2012年4月28日; 录用日期: 2012年5月2日

摘要: 以早实薄皮核桃“绿岭”成熟种胚诱导出的腋芽为外植体, MS为基本培养基, 通过调节激素种类和浓度配比, 初步研究了“绿岭”核桃种胚组培苗腋芽快繁体系。比较试验结果表明: 最佳种胚萌发培养基为MS + 蔗糖30 g/L + 琼脂6 g/L; 最佳腋芽诱导和增殖培养基为MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6 g/L。生根采用两步生根法: 先在DKW + IBA 8.0 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.0 g/L暗培养20 d, 然后转入DKW + 蔗糖30 g/L + 琼脂6 g/L培养基中进行光照培养, 生根率为50%。诱导生根的组培苗移栽到大田后成活率为33.3%。

关键词: 核桃; 核桃属; 胚; 腋芽; 激素

1. 引言

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科核桃属多年生落

*基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201004093)、河北省科技支撑项目(11230115D)。

#通讯作者。

叶果树, 与扁桃、板栗、腰果并称为世界4大干果, 果实具有较高的营养价值及良好的医疗保健功能, 日益受到广大消费者的青睐^[1]。我国是核桃原产地之一, 栽培历史悠久, 分布广泛, 种质资源丰富^[2]。“绿岭”核桃是河北农业大学李保国教授等在河北绿岭果业

有限公司从“香玲”核桃中选育出的优良变异品种,具有壳薄、优质、早实和丰产的优良特性,深受果农欢迎,但苗木繁育跟不上该品种的产业需求。核桃组织培养是迅速繁殖种苗、保存和选育优良品种的重要手段。关于核桃组织培养,前人已有研究^[3-17],但是,薄皮核桃的组培研究相对较少,利用“绿岭”核桃成熟种胚诱导出的腋芽为外植体开展腋芽快繁以往未见报道。因此,本研究以“绿岭”核桃成熟种胚诱导出的腋芽为外植体,利用固体组织培养技术,对“绿岭”核桃种胚组培苗腋芽快繁途径进行研究,既可望提高“绿岭”核桃种胚的繁殖速度和增殖系数,又对核桃种质资源保存和苗木的快速繁殖提供一定的参考意义。

2. 材料与方法

2.1. 材料

以“绿岭”核桃(*J. regia* “Lv Ling”)的成熟干燥坚果为材料,其青皮果实于2010年9月5号采自河北省邢台市临城县绿岭果业有限公司示范园。

2.2. 方法

2.2.1. 灭菌

将“绿岭”青皮核桃用刀剥掉青皮得到坚果,坚果先用自来水冲洗干净,再用30%的次氯酸钠(含3%有效氯)清洗1遍,用蒸馏水冲洗3遍,再用75%的酒精清洗1遍,最后用蒸馏水冲洗3遍,放在通风干燥无菌处晾干备用。

接种前,取“绿岭”核桃坚果,放入超净工作台内的大烧杯中。先用30%的次氯酸钠消毒5 min,无菌水冲洗3次,每次1 min,然后用75%的酒精消毒30 s,无菌水冲洗3次,每次1 min。最后用核桃钳子小心夹开坚果取出胚,将胚置于培养皿中,用75%的酒精消毒1 min,无菌水冲洗3次,每次1 min。滤纸吸干水分后将胚接种于培养基上。

2.2.2. 种胚萌发培养基的筛选

在MS + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.0 g/L的培养基中分别添加不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)的IBA(吲哚丁酸),不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)的NAA(萘乙酸)(表1),以筛选最适宜胚萌发的激素浓度。先将胚暗培养7 d,再光照培养。每个处理接种10个

胚,3次重复。接种第10 d统计萌发数,计算种胚萌发率。接种第30 d统计成苗率。

$$\text{萌发率}(\%) = (\text{萌发种胚数} / \text{接种种胚数}) \times 100\%$$

$$\text{成苗率}(\%) = (\text{成苗数} / \text{接种种胚数}) \times 100\%$$

2.2.3. 腋芽萌发培养基的筛选

将种胚萌发长成的组培苗切成带有1~2个腋芽的茎段,长约2 cm。选用生长基本一致的茎段,分别接种于MS + 6-BA(6-苄氨基腺嘌呤)1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.0 g/L培养基和MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.0 g/L培养基上。每个处理接种10个茎段,3次重复。每2周继代1次,接种第20 d统计腋芽萌发数,计算腋芽萌发率,接种第30 d统计增殖系数。

$$\text{腋芽萌发率} = (\text{萌发腋芽数} / \text{接种腋芽数}) \times 100\%$$

$$\text{增殖系数} = (\text{萌出的腋芽茎段数} / \text{组培苗的株数}) \times 100\%$$

2.2.4. 生根培养基的筛选

将腋芽诱导的茎段先接在DKW + IBA 5.0 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.0 g/L和DKW + IBA 8.0 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂6 g/L培养基上,暗培养12 d和20 d,转入DKW + 蔗糖30 mg/L + 琼脂6 g/L培养基中。3周后统计生根数,计算生根率。每处理接种10个茎段,3次重复。

$$\text{生根率} = (\text{生根茎段数} / \text{接种茎段数}) \times 100\%$$

2.2.5. 组培苗的炼苗移栽

组培苗生根约40 d后,将生根苗的瓶盖打开,在光照培养箱(温度为25℃、光照强度为2000 lx,光周期为16 h/d)里炼苗2~3 d。然后取出小苗,移栽于沙:土(1:1)基质中。在光照培养箱里培养15 d后,在室温下炼苗5 d,然后于5月18日移栽到大田。先盖上遮阳网(遮光度为80%),注意保持土壤湿润,5 d后撩起一侧,再过2 d后撩起另一侧,直到把4侧都撩起为止,然后选择阴天去掉遮阳网。在光照培养箱培养第15 d时记录成活苗数,计算成活率I;移栽到大田第30 d时记录成活苗数,计算成活率II。

$$\text{成活率} = (\text{成活株数} / \text{移栽株数}) \times 100\%$$

2.2.6. 培养条件

以上所有培养基高压灭菌前的pH值均为5.8~6.0,在121℃下高压灭菌20 min。培养温度为25℃ ±

2℃, 光周期为 16 h/d, 光照度为 2000~2500 lx。

3. 结果与分析

3.1. “绿岭”核桃种胚萌发的诱导

不同培养基下“绿岭”核桃种胚萌发和成苗的情况如表 1 所示。处理 1、处理 3 和处理 4 种胚萌发率最高为 93.3%，处理 9 的种胚萌发率最低为 67.7%，二者差值为 25.6%；处理 1 和处理 3 成苗率最高为 90.0%，处理 2、处理 7 和处理 9 成苗率最低为 43.3%，二者差值为 47.7%。

不同培养基下“绿岭”核桃种胚萌发诱导的生长情况如表 2 所示。由表 2 可知处理 1 的种胚生长情况优于其他处理的生长情况。

Table 1. Embryo germination and seedling growth of “Lv Ling” walnut
表 1. “绿岭”核桃种胚萌发和成苗的情况

处理 Treatment	培养基 Medium	萌发率(%) Germination rate	成苗率(%) Seedling rate
1	MS	93.3	90.0
2	MS + IBA 0.5 mg/L	83.3	43.3
3	MS + IBA 1.0 mg/L	93.3	90.0
4	MS + IBA 1.5 mg/L	93.3	66.7
5	MS + IBA 2.0 mg/L	83.3	66.7
6	MS + NAA 0.5 mg/L	83.3	50.0
7	MS + NAA 1.0 mg/L	83.3	43.3
8	MS + NAA 1.5 mg/L	83.3	83.3
9	MS + NAA 2.0 mg/L	67.7	43.3

注：表中的培养基均加入 30 g/L 的蔗糖和 6 g/L 的琼脂。

Table 2. Embryo germination and induction of “Lv Ling” walnut
表 2. “绿岭”核桃种胚萌发诱导的生长情况

培养时间 (天) Culture time (d)	7	21	28
处理 1 的生长状况 Treatment 1	胚根迅速伸长, 上胚轴开始伸长	苗高约 3 cm, 叶片未展开, 主根长约 2~3 cm, 呈乳白色	幼苗高 3~4 cm, 复叶 2~3 片, 多数已生侧根
处理 2~9 的生长状况 Treatment 2 to 9	胚根很短	苗高约 2 cm, 叶片未展开, 茎基有少量愈伤	幼苗高约 3 cm, 复叶 2~3 片, 主根较短呈锥状, 茎基有少量愈伤, 少数有侧根

注：处理 1~9 分别为 MS; MS + IBA 0.5 mg/L; MS + IBA 1.0 mg/L; MS + IBA 1.5 mg/L; MS + IBA 2.0 mg/L; MS + NAA 0.5 mg/L; MS + NAA 1.0 mg/L; MS + NAA 1.5 mg/L; MS + NAA 2.0 mg/L。表中的培养基均加入 30 g/L 的蔗糖和 6 g/L 的琼脂。

综合种胚萌发率、成苗率和种胚的生长情况来看, 在本试验范围内, 最适的“绿岭”核桃种胚萌发培养基为 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L。

3.2. “绿岭”核桃组培苗茎段腋芽萌发的诱导

“绿岭”核桃组培苗茎段腋芽萌发和增殖的情况如表 3 所示。由表 3 可知, 接种在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上的茎段, 培养 15 d 后, 腋芽开始萌动, 萌发率为 60%, 增殖系数为 2.12; 接种在 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上的茎段, 培养 10 d 后, 腋芽开始萌动, 腋芽萌发率为 80%, 增殖系数为 3.54。两者萌发率相差 20%, 增殖系数相差 1.42。20 d 以后, 腋芽萌出的小茎尖长 1~2 cm(图 1)。综合萌发率、增殖系数和茎段腋芽的萌发状况可得出最适宜腋芽诱导和增殖的培养基是 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L。

3.3. “绿岭”核桃组培苗腋芽萌发茎段生根的诱导

“绿岭”核桃组培苗腋芽萌发茎段生根的过程如图 2 所示, 由图 2 可见, 茎段基部先出现小根尖, 然后发育成主根, 随后又长出侧根。在 DKW + IBA 5.0 mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 6.0 g/L 培养基上暗培养 12 d 的茎段基部形成愈伤少, 生根率为 10%; 而暗培养 20 d 的茎段基部愈伤较多, 生根率为 30%。在 DKW + IBA 8.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L 培养基上暗培养 12 d 的茎段基部有愈伤, 基部叶片也有愈伤化现象, 生根率为 20%; 而暗培养 20 d 的茎段基部长出的愈伤较多, 生根率为 50%。因此, 在本试验范围内, 适宜生根培养的方法是先在 DKW + IBA 8.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L 暗培养 20 d, 然后转入 DKW + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L 培养基中进行光照培养。

Table 3. Axillary buds germination and multiplication of “Lv Ling” walnut

表 3. “绿岭”核桃腋芽萌发和增殖的情况

培养基 Medium	萌动时间 Germination time	萌发率(%) Germination rate	增殖系数 Multiplication coefficient
MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L	培养 15 d 后	60	2.12
MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L	培养 10 d 后	80	3.54

注：表中的培养基均加入 30 g/L 的蔗糖和 6 g/L 的琼脂。



注：左右图分别为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 和 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上接种培养第 20 d 腋芽的诱导及生长情况。培养基均加入 30 g/L 的蔗糖和 6 g/L 的琼脂。

Figure 1. Axillary bud growth from *in vitro* cultured seedling's stem segment of "Lv Ling" walnut
图 1. “绿岭”核桃组培苗茎段腋芽生长的情况



注：从左往右分别为组培苗茎段在生根培养基中接种 28 d、35 d、46 d 的照片。

Figure 2. Root induction and growth of *in vitro* cultured seedling's axillary bud of "Lv Ling" walnut
图 2. “绿岭”核桃组培苗腋芽萌发茎段的生根过程

3.4. 移栽

将生根的组培苗移栽于沙:土(1:1)基质中,光照培养箱里培养 15 d 时成活率为 80%。移栽到大田的组培苗,在遮阳网下长得较好,去掉遮阳网后叶片有暂时萎蔫现象,适应条件后有的正常生长,有的植株叶片变干枯。移栽到大田后成活率为 33.3%,较低,这可能同保定地区 5 月温度高、湿度小的不良气候相关,不利于组培苗移栽成活。

4. 结论与讨论

在植物组织培养中,基本培养基、激素浓度和品种是影响茎段快繁的重要因素。田爱梅、王国强^[3]研究表明新疆大牧马核桃室外实生苗和山西太谷实生晚实核桃室内苗的茎段在改良 DKW + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 抗坏血酸 5 mg/L 培养基上腋芽萌发效果好,而山西太谷实生晚实核桃成年树的茎段在改良 DKW + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.01 mg/L + 抗坏血酸 5 mg/L 培养基上腋芽萌发效果好。刘兰英^[4]将“薄

壳香”核桃嫁接苗茎段接种在 1/2 DKW + 6-BA 1~2 mg/L + IBA 0.01 mg/L + 抗坏血酸 2~5 mg/L 培养基上,培养 7~10 d 时腋芽开始萌动生长。苗玉青等^[5]将“温 185”薄皮核桃枝条接种到 DKW + 6-BA 1 mg/L + IBA 0.01 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L 培养基上,腋芽萌发率为 60%,且较粗壮。曾斌等^[6]将新疆野生核桃田间实生苗茎段接种到 DKW + 6-BA 1 mg/L 培养基上腋芽萌发效果好。张进等^[7]研究表明室内“汾阳”核桃实生苗茎段腋芽萌发最佳激素组合为改良 DKW + 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + IBA 0.02 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L。李明军等^[8]研究发现 1/2 MS + 6-BA 0.5~4 mg/L + NAA 0.01~0.5 mg/L 不同组合均能促进黑核桃腋芽或顶芽的萌发与生长。王琴^[9]将温室栽培的“华亭”绵核桃、“武威”薄皮核桃的实生苗单芽茎段分别接种在 DKW + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.05 mg/L 和 DKW + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.01 mg/L 培养基上,平均增殖新生芽数分别为 9.5 和 5.5。宋锋惠等^[10]将黑核桃树上的当年生幼嫩枝条、室内花

盆栽的顶芽已半木质化的黑核桃幼苗带2~3个芽的茎尖和茎段接种到1/2 MS(改良) + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5 g/L 的诱导培养基中, 增殖倍数为2倍左右。本研究先将“绿岭”核桃成熟种胚接种在MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L 培养基上, 然后将组培苗茎段接种在MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L 培养基上, 腋芽萌发率为80%, 增殖系数在2.12~3.54之间, 这与其他人的研究结果不同。基于以往研究和本试验的结果, 可总结出: 在进行核桃实生苗茎段、田间枝条、组培苗茎段诱导腋芽萌发的研究中, 可以尝试以改良DKW、1/2 DKW、DKW、MS、1/2 MS为基本培养基, 在培养基中附加0.5~2 mg/L的6-BA、0.01~0.05 mg/L的IBA和0.01~0.5 mg/L的NAA。

核桃属于较难生根的树种, 生根是核桃离体快繁的重要环节, 目前多采用两步诱导生根法, 在进行核桃组培苗茎段生根的培养中, 以改良DKW、1/4 DKW、1/2 DKW、DKW为基本培养基, 先在附加IBA 1~10 mg/L的培养基中暗培养8~20 d, 然后在无激素的培养基上光照培养15~30 d诱导生根。田爱梅、王国强^[3]得出新疆大牧马核桃、山西太谷实生晚实核桃组培苗茎段在改良DKW + IBA 5 mg/L培养基上培养7 d后转入无激素的改良DKW培养基中生根率为50.1%。刘兰英^[4]发现“薄壳香”核桃组培苗茎段在1/2 DKW + NAA 2 mg/L + IBA 2 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L培养基上培养8~10 d后转到用培养液浇灌的蛭石培养基中, 其成活率为70%。苗玉青等^[5]研究表明“温185”薄皮核桃组培苗茎段在1/2 DKW + IBA 1 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L培养基上培养30 d, 生根率达70%以上。曾斌等^[6]采用间接诱导生根法, 用50 mg/L IBA浸渍处理新疆野生核桃试管苗基部60 min, 然后在无激素的1/2 DKW培养基中先黑暗培养2周, 再在16 h/d光照下培养, 试管苗生根率达96%以上。裴东等^[11]研究结果可知6个早实核桃品种试管嫩茎在1/4 DKW + IBA 5~10 mg/L的培养基中黑暗培养10~15 d, 再转移至不含IBA的DKW培养基中, 嫩茎生根率为60.5%~89.7%。王清民等^[12]把“新早丰”试管嫩茎先在1/4 DKW + IBA 5 mg/L培养基上暗培养10~15 d, 然后转到无激素的1/4 DKW培养基中光照培养14~20 d, 生根率为73%~83%。本研究表明“绿

岭”核桃组培苗茎段先在DKW + IBA 8.0 mg/L中暗培养20 d, 然后转入无任何激素的DKW培养基中进行光照培养, 生根率为50%。生根率较低, 可能与品种、培养基的类型和暗培养的天数有很大关系, 因此, “绿岭”核桃组培苗茎段的生根培养有待进一步研究和优化。

5. 致谢

作者感谢张雪梅、李杰、齐昆、胡志伟、张彦卿、魏常燕等在本研究过程中提供的热心帮助和支持; 同时感谢河北绿岭果业有限公司在试验取材过程中提供的各种方便。

参考文献 (References)

- [1] 李保国, 齐国辉. 绿色优质薄皮核桃生产[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 48-49.
- [2] 原双进, 刘朝斌. 核桃栽培新技术[M]. 西北农林科技大学出版社, 2005: 4-5.
- [3] 田爱梅, 王国强. 实生核桃茎段的组织培养及影响因子的研究[J]. 三峡大学学报, 2002, 24(4): 375-378.
- [4] 刘兰英. 核桃的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(5): 434-435.
- [5] 苗玉青, 李冠, 吴松林等. 薄皮核桃组织培养与快速繁殖[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(3): 503-507.
- [6] 曾斌, 何天明, 吴玉霞等. 新疆野生核桃的组织培养和植株再生[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(7): 1227-1230.
- [7] 张进, 张燕, 吴国良等. 核桃茎段组织培养[J]. 经济林研究, 2005, 23(2): 36-38.
- [8] 李明军, 陈明霞, 张峰等. 美国黑核桃组织培养的初步研究[J]. 河南科学, 2003, 21(3): 286-289.
- [9] 王琴. 核桃试管微繁殖培养基的筛选[J]. 甘肃林业科技, 2003, 28(4): 16-18.
- [10] 宋锋惠, 史彦江, 卡德尔. 美国黑核桃组织培养快繁技术研究[J]. 山西果树, 2004, 25(5): 4-6.
- [11] 裴东, 袁丽钗, 奚声珂. 核桃品种试管嫩茎生根的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 32-38.
- [12] 王清民, 彭伟秀, 张俊佩等. 核桃试管嫩茎生根的形态结构及激素调控研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 255-259.
- [13] 张智英, 李保国, 顾玉红等. 核桃胚培养快速成苗技术初探[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(6): 1143-1145.
- [14] 张启香, 胡恒康, 王正加等. 山核桃间接体细胞胚发生和植株再生[J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1063-1070.
- [15] B. G. Sheikh, K. Vahdati, S. H. Bahrami, et al. Enhancement of maturation and germination of somatic embryos in Persian walnut (*Juglans regia* L.) using osmolites, hormones and cold treatments. African Journal of Food Science, 2010, 4(12): 735-743.
- [16] Y. Saadat, M. Hennerty. Effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on the rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.) microshoots. Acta Horticulture, 2001, 544: 473-480.
- [17] V. Kourosh, L. Charles, Z. Zabihollah, et al. Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature tree of three Persian walnut cultivars. Hort Science, 2004, 39(2): 324-327.