

核桃胚培养快速成苗技术初探

张智英¹, 李保国^{1,*}, 顾玉红², 齐国辉¹, 郭素萍¹, 张旺林³

河北农业大学¹ 林学院, ² 生命科学学院, 河北保定 071000; ³ 沧州林业科学研究所, 河北沧州 061001

摘要: 以核桃品种‘香玲’的成熟种胚为试材, 分别以带2片子叶、带1片子叶和不带子叶的胚接入MS培养基上的成苗情况和比较HgCl₂消毒2 min、5 min、NaClO消毒10 min 3种消毒的灭菌效果表明: HgCl₂消毒5 min的效果最佳, 1周后的材料污染率仅为7%; 采用MS为基本培养基, 不附加任何生长调节物质, 以不带子叶的胚培养4周后即可成苗, 未经过锻炼的苗直接移栽到装有蛭石的营养钵中, 其最终成活率可达84.6%。

关键词: ‘香玲’核桃; 快速成苗; 胚培养

Preliminary Study on Embryo Culture Technology for Rapid Seedling of Walnut

ZHANG Zhi-Ying¹, LI Bao-Guo^{1,*}, GU Yu-Hong², QI Guo-Hui¹, GUO Su-Ping¹, ZHANG Wang-Lin³

¹College of Forestry, ²College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; ³Forestry Science Institute of Cangzhou, Cangzhou, Hebei 061001, China

Abstract: Mature embryos with two cotyledons, one cotyledon or no cotyledon of walnut cultivar ‘Xiang Ling’ were used as materials to be inoculated on MS medium substrate in this trial and the sterilization effects were examined by 3 sterilization methods in which the materials were treated with HgCl₂ for 2 min, 5 min or NaClO for 10 min. The results showed that: the best sterilization method for materials was HgCl₂ for 5 min, the contamination rate was only 7% after materials inoculated into MS for one week; mature embryos with no cotyledon seedlings after inoculated into MS without growth regulators for 4 weeks, and transplanted directly into pots with vermiculite as a substrate, the survival rate was up to 84.6%.

Key words: ‘Xiang Ling’ walnut; rapid seedling; embryo culture

核桃产量低而不稳、品质良莠不齐、经济效益不高的主要原因之一是缺少优良品种。随着国际上对核桃品质要求的不断提高, 急需培育优良品种来提高我国核桃在国际市场上的竞争力。传统的杂交育种试验在生产上存在杂交育种困难、获得杂种苗年限长等问题, 胚培养是解决这个问题的办法之一。‘香玲’核桃是山东省果树研究所从‘新疆阿克苏9号’和‘山东上宋5号’核桃人工杂交后代中选育而成, 该品种具有壳薄、优质、早实和丰产的优良特性(杨继明等 2003)。本文以核桃品种‘香玲’的成熟种胚为材料, 采用组织培养技术, 对核桃种胚的消毒方法、接种方式进行了研究, 筛选核桃快速成苗的技术, 以供短时间内获得优良杂种单株及快速繁殖时参考。

材料与amp;方法

试验材料为2007年8月20日采集的河北临城绿岭公司基地生产的核桃(*Juglans regia* L.)品种

‘香玲’的成熟果实, 采后直接运至河北农业大学生命科学学院发育生物学实验室。在室内去果皮、风干后转入4℃冰箱贮藏30 d后用于试验。

先用洗洁净清洗核桃, 再用自来水冲洗干净, 移至超净工作台, 用镊子去掉核桃硬壳, 放入大烧杯中, 分别用0.1%的HgCl₂消毒2 min、5 min或者50%的NaClO消毒10 min, 用无菌水冲洗4次, 再用75%的酒精消毒2 min, 用无菌水冲洗3次, 置于干净容器中备用。每处理接种30个, 1周后调查材料污染率。以不灭菌为对照。污染率(%)=(污染种胚数/接种总胚数)×100%。

将消毒完毕的核桃种胚, 置于无菌滤纸上, 分别以带2片子叶的胚、带1片子叶的胚、去掉子叶的胚接入培养基。每处理接种30个, 每瓶接种

收稿 2008-08-11 修订 2008-10-14

资助 河北省科技支撑计划(07230606D)。

* 通讯作者(E-mail: lbg888@163.com; Tel: 0312-7528735)。

1个核桃种胚。在接种后每周调查1次种胚的生长情况,共调查4次,筛选核桃种胚的最佳接种方法。

以上试验均采用MS基本培养基,附加2%蔗糖和0.55%琼脂,不附加任何植物生长调节物质,pH 5.8,培养室温度为(25±1)。接种后暗培养1周后转入光照培养(光照时间为16 h·d⁻¹,光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹),1周转接一次。

实验结果

1 不同消毒方法对核桃胚培养污染率的影响

从表1可以看出,接种1周后,0.1%的HgCl₂消毒5 min的污染率最低,不消毒的污染率最高。0.1%的HgCl₂消毒5 min为最佳消毒方式。

表1 不同消毒方法对污染率的影响

Table 1 Effect of different methods on sterilization rate of pollution

试剂及其浓度 /%	消毒时间 /min	接种数 /个	染菌数 /个	污染率 /%
不消毒(对照)	0	30	26	87
HgCl ₂ 0.1	2	30	4	13
HgCl ₂ 0.1	5	30	2	7
NaClO 50	10	30	17	57

表2 叶片数对种胚接种后萌发情况的影响

Table 2 Effects of leaf number on the germination of embryos after inoculation

带子叶数/片	接种数/个	子叶转绿数/个	子叶膨大数/个	胚根突起伸长数/个	子叶开裂数/个
2	30	9	15	4	4
1	30	20	15	3	1

表3 不带子叶的种胚接种后萌发成苗状态

Table 3 Germination of embryos without cotyledons after inoculated

接种后时间/周	种胚萌发成苗状态
1	多数种胚膨大伸长或转绿,有愈伤形成,3%的种胚不萌发。
2	上胚轴迅速伸长,胚根开始伸长生长,幼叶呈卷曲状并开始展开。
3	小苗高约3 cm,主根伸长约3.5 cm且呈乳白色,叶片基本上完全展开。
4	幼苗高达5 cm,茎粗3~4 mm,主根长2~5 cm,多数生有侧根,复叶3~4片。

色,多数种胚生有侧根(图1),此时的幼苗已可移栽。

培养4周后,选择苗高3 cm、生长健壮的生根苗移栽到经高压灭菌的蛭石中,2周后,幼苗成

2 带子叶数对核桃胚培养褐化的影响

带1片子叶和带2片子叶的种胚在接种当天,种胚下部即发生褐化,附近的培养基颜色变褐,经4次继代转瓶后,种胚附近的培养基不再变褐,但种胚尤其是子叶由最初的土黄色逐渐变为深褐色,且随着培养时间的延长褐化加重,最终失去生命力,导致培养失败。说明转瓶可减轻培养基的褐化,但不能减轻种胚的褐化。此外,在培养基中添加300~500 mg·L⁻¹的聚乙炔基吡咯烷酮或5~15 mg·L⁻¹的维生素C均不能防止这种褐化。不带子叶的种胚接种后,种胚和培养基都不发生褐化。表明在控制褐化上,以不带子叶的种胚接种明显优于带1片子叶和带2片子叶的接种方式。

3 带子叶数对核桃种胚萌发成苗的影响

由表2可知,带2片子叶和带1片子叶的种胚多数不萌发,两者萌发成苗缓慢且成苗率极低,剥去子叶观察发现少数种胚已经死亡,这可能是由材料褐化和子叶太大影响种胚吸收养分造成的。此外,从表3可知,大多数不带子叶的种胚在接种第4天开始萌动、膨大、转绿,1周后体积增大至接种时的2倍。接种第2~3周是种胚生长最快的时期,上胚轴和胚根迅速伸长,幼叶展开。接种4周后幼苗健壮,复叶3~4片,小叶多达20片且呈嫩绿

活率达84.6%。总之,无论是从褐化还是从萌发成苗情况看,都以不带子叶的种胚接种为最好的接种方式。



图1 不带子叶的核桃种胚接种4周后获得的植株
Fig.1 The plant of cotyledon embryo without cotyledons
after inoculated for 4 weeks

讨 论

有关核桃组织培养的研究报道很多,刘淑兰和韩碧文(1986)以及韩碧文(1986)曾先后从核桃的不同组织外植体诱导出丛生芽,但从种胚诱发的芽苗不容易诱导生根、不能形成完整的植株。Driver和Kuniyuki (1984)从实生苗的茎节处诱发出芽以及Tulecke和Mcgrmahan (1985)从子叶诱导出胚状体和再生植株,但成苗技术体系都比较繁琐,不宜采用。郭洪英等(1999)采用核桃成熟种胚的上胚

轴以上部分为试材诱导芽并增殖,接种40 d后长出丛芽原基,而后形成小苗,但此法成苗时间长、成苗率低,比以上两种核桃快繁技术系统效果好。本文中用核桃完整种胚直接萌发成苗仅需四周的时间,采用不添加任何生长调节物质的MS培养基,比生产中正常育苗缩短一年时间,大大缩短了育种周期,且成苗率高,试验成本下降,技术简单而快捷。

参考文献

- 郭洪英,王永清,李玉堂(1999). 核桃离体胚的培养. 四川林业科技, 20 (4): 53~55
- 韩碧文(1986). 木本植物组织培养. 北京: 高等教育出版社, 456~495
- 刘淑兰, 韩碧文(1986). 核桃(*Juglans regia*)的离体繁殖. 北京农业大学学报, 12 (2): 143~148
- 杨继明, 赵维进, 杨秀勇, 高其富, 李际华(2003). 核桃优良品种——香玲. 农业科技通讯, (4)
- Driver JA, Kuniyuki AH (1984). *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. HortScience, 19: 507~509
- Tulecke W, Mcgranahan G (1985). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut *Juglans regia* L. Plant Sci, 40: 57~63