

铁核桃离体培养与快速繁殖

王沙沙^{1,2}, 潘学军^{1,2,*}, 张文娥²

¹贵州省果树工程技术研究中心, 贵阳550025; ²贵州大学农学院, 贵阳550025

摘要: 以优良单株‘纳雍-1’的单芽茎段为外植体, 建立了铁核桃(*Juglans sigillata*)离体培养与快速繁殖的体系。结果表明, 附加6-BA 1.0 mg·L⁻¹+活性炭(AC) 3.0 g·L⁻¹的DKW培养基适宜铁核桃腋芽诱导; 适宜铁核桃芽增殖的培养基为DKW+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.02 mg·L⁻¹, 40 d后增殖系数可达7.33; 试管苗的茎尖和茎段均可用于增殖培养; 一步生根法(低浓度的生长素IBA持续诱导)不利于铁核桃试管苗嫩茎生根; 采用二步生根法, 生根率最高可达71.73%, 其中, 不同IBA浓度、暗培养时间、蔗糖浓度和AC含量对试管苗嫩茎生根影响显著, 铁核桃试管苗在附加IBA 5.0 mg·L⁻¹的1/4DKW培养基中暗培养12 d, 再转移到不含IBA的1/4DKW培养基(附加AC 3 g·L⁻¹和蔗糖20 g·L⁻¹)中生根效果最好; 生根试管苗采用珍珠岩和营养土两步炼苗, 60 d后成活率达到87.50%。

关键词: 铁核桃; 单芽茎段; 离体培养; 快速繁殖; 生根

In Vitro Culture and Rapid Propagation of *Juglans sigillata*

WANG Sha-Sha^{1,2}, PAN Xue-Jun^{1,2,*}, ZHANG Wen-E²

¹Guizhou Engineering Research Center for Fruit Crops, Guiyang 550025, China; ²Agricultural College of Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Single bud stem of superior individual *Juglans sigillata* cv. ‘Nayong-1’ were used as explants to establish *in vitro* culture and rapid propagation system. Results showed that the DKW medium supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+3.0 g·L⁻¹ AC was suitable for germination of axillary buds. The DKW medium with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ IBA was optimal for the shoots multiplication, the proliferation coefficient was up to 7.33 after culturing for 40 days. Both shoot tip and single axillary bud could be used for multiplication culture. One step method (low IBA concentration sustained induction) was not suitable for rooting culture. The highest rooting rate (71.73%) was obtained by two steps method, firstly the plantlets was cultured on 1/4DKW medium with 5.0 mg·L⁻¹ IBA in the dark condition for 12 days, and then transferred to the 1/4DKW medium without IBA under light (3 g·L⁻¹ AC and 20 g·L⁻¹ sucrose). It was found that the IBA concentrations, time of dark induction, sucrose concentrations and AC contents were all related to the effect of rooting. After acclimation in perlite and nutrient soil for 60 days, 87.50% plantlets were survival.

Key words: *Juglans sigillata*; single bud stem; *in vitro* culture; rapid propagation; rooting

铁核桃(*Juglans sigillata*)是原产于我国西南地区的核桃属植物特有种, 坚果品质优良, 林果兼用(郗荣庭和张毅萍1996), 主要包括铁核桃、泡核桃和夹绵核桃3种类型, 栽培良种多为泡核桃类型, 夹绵核桃多作为砧木使用(陈杰忠2011)。与普通核桃相比, 铁核桃的果仁颜色较浅, 风味香甜, 涩味淡, 人体可利用的必需氨基酸含量高, 是一种优质蛋白质食品(潘学军等2010)。据统计, 我国西南地区的核桃种植面积已达到75.33万hm², 主要以铁核桃种群为主, 而贵州是该区域的核桃主产区(潘学军等2010), 截至2013年初, 全省核桃种植面积达到24.79万hm², 且核桃种植规划面积仍在增加。因此, 贵州乃至西南地区对优良铁核桃品种的苗木

需求量持续增加, 而传统的实生繁殖易丧失优良种性(高清华等2000)、核桃扦插繁殖切口易褐化(冀爱青等2011)、嫁接繁殖成活率低(Achim和Botu 2001; Rezaee和Vahdati 2008), 这些不利因素严重阻碍了铁核桃良种苗木的推广进程和核桃产业的良性发展。组织培养技术的发展为核桃育苗提供了快捷、可靠的途径, 商业化前景广阔。自

收稿 2014-01-16 修定 2014-01-29

资助 贵州省科技攻关项目(NY20073038)、贵州省科技重大专项子课题(20116011)和贵州大学研究生创新基金项目(2013008)。

* 通讯作者(E-mail: pxjun2050@aliyun.com; Tel: 0851-3855894)。

Driver等(1984)将Paradox核桃组织培养成功后,在核桃(*J. regia*) (汤浩茹等2000; Saadat和Hennerty 2002; Dolcet-Sanjuan等2004)、黑核桃(*J. nigra*) (Bosela和Michler 2008)、灰核桃(*J. cinerea*) (Pijut 1997)、山核桃(*Carya cathayensis*) (张启香等2011)、美国山核桃(*C. illinoensis*) (Rodriguez和Wetzstein 1994)等核桃科植物中进行了大量研究,取得了较大进展。但到目前为止,对铁核桃的组织培养未见报道。本研究以我国特有种铁核桃的优良单株‘纳雍-1’为试材,对影响铁核桃的离体培养与快速繁殖的因素进行了研究,以期建立铁核桃的高效组培快繁体系,为铁核桃优良砧木生产、优良品种快速繁殖、微型嫁接繁殖及组培苗的商业化生产奠定理论基础和技术支撑。

材料与amp;方法

1 材料

试验材料为贵州大学核桃资源圃保存的3年生铁核桃(*Juglans sigillata* Dode.)优良单株‘纳雍-1’(泡核桃类型),于2012年3~5月的晴天上午,选取直径0.5~1.0 cm的当年生无病虫害嫩梢,去顶芽后剪取3~4个节间(保留约1 cm长的叶柄)的铁核桃茎段,装入冰盒带回实验室备用。

2 方法

2.1 外植体材料的处理

将采集的新梢首先用流水快速冲洗10 min,洗掉表面的灰尘;再用洗洁精浸泡30 min,用软毛试管刷轻刷新梢表面及腋芽处(注意保护腋芽),用自来水冲洗干净;然后将新梢浸泡在含有0.1%的多菌灵抑菌剂中15 min,期间搅拌,对新梢进行表面杀菌;最后剪去新梢两端及叶柄的褐化部分,放入含有0.5 g·L⁻¹活性炭(AC)的无菌水溶液中浸泡20 min以降低新梢中的酚类含量,用无菌水漂洗干净存放在广口瓶中。在超净工作台上用75%酒精漂洗1.0 min,无菌水冲洗2~3次后,再用0.1% HgCl₂溶液消毒6 min(加2滴吐温80),期间不断摇动,无菌水冲洗5~6次。用无菌滤纸吸干表面水分,切除上下切口处的褐化部分,将材料切成2 cm左右的单芽茎段,接种到腋芽诱导培养基上诱导腋芽萌发。

2.2 启动培养

取上述处理后的单芽茎段,培养在DKW培养基中进行启动培养。设置3个处理,处理1附加

6-BA 1.0 mg·L⁻¹和AC 3.0 g·L⁻¹;处理2是在处理1的基础上附加IBA 0.01 mg·L⁻¹,以只附加6-BA 1.0 mg·L⁻¹的处理作对照(CK)。以腋芽萌发抽生出1~2个节间为诱导成活。每处理均接种180瓶,每瓶2个外植体,60瓶为1个重复,重复3次。培养20 d后观察并统计褐化率、萌芽率及腋芽生长状况。

2.3 继代增殖培养

将诱导的腋芽剪成单芽茎段,接种到附加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和不同IBA浓度(0.01、0.02、0.03、0.04和0.05 mg·L⁻¹)的DKW培养基中进行增殖培养,研究不同IBA浓度对铁核桃茎段增殖的影响。将带芽茎段分成带顶芽茎尖和带腋芽单芽茎段,分别接种到适宜的增殖培养基上,研究不同取材部位对增殖的影响。以上各处理均接种90瓶,每瓶2个外植体,每30瓶为1个重复,重复3次。培养40 d后统计增殖率、增殖系数和试管苗生长情况。

2.4 生根培养

将增殖培养20 d的试管苗(3~4个茎段)接种到生根培养基上进行生根培养。生根诱导方法分别采用“一步生根法”和“两步生根法”。“一步生根法”即只接种在一种培养基上,以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的IBA(0.75、1.00、1.25、1.50和2.00 mg·L⁻¹),接种后先暗培养12 d,后进行光照培养20 d,统计生根率、生根条数和根生长状况;“两步生根法”即顺序接种在两种培养基上,参照裴东等(2002)的方法,在第1步诱导生根培养中,附加8个梯度的IBA(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 mg·L⁻¹)到1/4DKW培养基,黑暗诱导12 d后转接到不含生长调节剂的1/4DKW生根培养基上,光照培养20 d后统计生根率和生根条数。在获得适宜IBA浓度后,对两步生根法的第1步诱导阶段的暗培养天数(10、12、14和16 d)、第2步生根阶段的蔗糖浓度(10、20、30和40 g·L⁻¹)和活性炭含量(0、1.0、3.0和5.0 g·L⁻¹)进行单因素试验,其中,第2步生根阶段的蔗糖浓度和活性炭含量试验暗诱导天数均为12 d,以期进一步提高铁核桃试管苗的生根率。以上各处理均接种60瓶,每瓶2个外植体,每20瓶为1个重复,重复3次。

2.5 培养条件

上述腋芽诱导和增殖培养基中均附加25 g·L⁻¹蔗糖,生根培养基中为20 g·L⁻¹(蔗糖梯度试验除外),所有培养基中均添加6 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8~6.2。

培养温度(25±1) °C, 光周期16 h·d⁻¹, 光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹。

2.6 炼苗移栽

选取根长2 cm以上, 2~3条根, 苗高4~5 cm的生根试管苗, 在强光(60 μmol·m⁻²·s⁻¹)下锻炼7 d后, 无菌条件下将生根苗从培养基中取出, 用无菌水洗净根部培养基, 0.1% KMnO₄浸根10 s, 移栽至盛有灭菌珍珠岩的营养钵中, 浇灌100 mL 1/8DKW营养液(以后每隔7 d浇1次), 加盖与营养钵同样大小的塑料杯(保持湿度), 放入培养室中培养2~3 d后, 浇灌4%的多菌灵(以后每隔7 d浇1次)。培养室温度为(25±1) °C, 培养初期光照时间为12 h·d⁻¹, 15 d后增至16 h·d⁻¹。培养室锻炼30 d, 地上部叶色加深后转移到盛有营养土的营养钵中进行温室锻炼, 生长30 d左右, 移栽到大田定植。

3 数据统计分析

采用Excel软件统计数据, 并用DPS v7.05软件进行数据处理和统计分析。

褐化率=褐化(死亡的)外植体数/接种外植体数×100%; 萌芽率=萌芽外植体数/接种外植体数×100%; 增殖率=增殖茎段数/接种茎段数×100%; 增殖系数=培养增长节位数/接种时节位数(已连续3次继代培养); 丛生芽率=增殖出丛生芽苗的外植体数/接种外植体数×100%; 生根率=诱导生根茎段数/接种茎段数×100%; 生根条数即每茎段平均生根数; 移栽成活率=移栽成活数/总移栽数×100%。

实验结果

1 铁核桃单芽茎段的萌芽培养

如图1所示, 铁核桃单芽茎段培养20 d后, 处理1的萌芽率最高, 达到69.70%, 褐化率最低(15.80%), 且萌芽早, 萌发的腋芽叶色浓绿, 生长健壮活力强。从萌芽率上讲, 处理1显著高于CK (55.02%), 而与处理2 (60.84%)的差异较小; 在褐化率上, 处理1明显低于CK (32.19%)的, 而与处理2 (20.70%)无明显差异, 说明处理1和2对铁核桃单芽茎段的培养效果明显优于CK, 但处理1的萌芽率略高于处理2, 褐化率略低于处理2, 且萌芽早于处理2, 说明处理1较适合铁核桃单芽茎段的萌发; 在腋芽诱导中, 铁核桃褐化主要是由体内高含量酚类物质所致, 这是限制铁核桃腋芽萌发的主要因素之一。在本试验

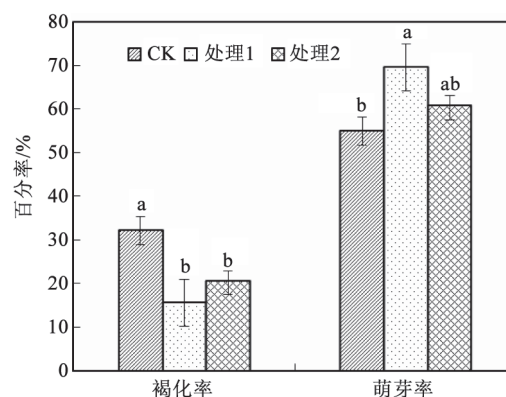


图1 铁核桃单芽茎段的腋芽诱导培养

Fig.1 Germination cultivating of the stem segments from *J. sigillata*

CK: DKW+6-BA 1.0 mg·L⁻¹; 处理1: DKW+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+AC 3.0 g·L⁻¹; 处理2: DKW+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.01 mg·L⁻¹+AC 3.0 g·L⁻¹。同一测定项目不同小写字母表示5%差异显著水平, 下同。

中, 铁核桃单芽茎段的褐化率较低, 仅有15.80%, 而获得较高的萌芽率(69.70%), 表明大田栽培的铁核桃嫩梢作为外植体, 可以成功建立无菌系, 且DKW+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+AC 3.0 g·L⁻¹的培养基较适宜诱导单芽茎段的腋芽萌发(图2-A)。

2 铁核桃试管苗的增殖培养

2.1 不同IBA浓度对铁核桃单芽茎段增殖的影响

将诱导的腋芽剪成单芽茎段, 接种到附加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和不同IBA浓度(0.01、0.02、0.03、0.04和0.05 mg·L⁻¹)的DKW培养基中进行增殖培养。由表1看出, 不同浓度的IBA对铁核桃单芽茎段的增殖率影响较小, 均为100%, 而对增殖系数的影响较大。当IBA浓度为0.01和0.02 mg·L⁻¹时, 增殖系数分别为7.07和7.33, 明显高于0.03~0.05 mg·L⁻¹ IBA时的增殖系数, 达到显著差异水平; 不同浓度的IBA同时影响新生芽的生长状态, 较低浓度(0.01~0.02 mg·L⁻¹)的IBA有利于腋芽的直立生长, 此时幼苗生长健壮, 基部仅有小的瘤状突起, 未见明显的愈伤组织, 但从生芽率略低, 分别为85.70%和76.20%; 但当IBA浓度升高到0.03~0.05 mg·L⁻¹时, 植株生长矮小, 节间变短, 基部有明显可见的愈伤组织, 丛生芽比率虽可升高至100%, 但试管苗质量变劣。由于IBA浓度为0.02 mg·L⁻¹时的增殖系数最大, 因此, 0.02 mg·L⁻¹ IBA较适合铁核桃‘纳雍-1’单芽茎段的增殖, 增殖率高达100%, 增殖系数为7.33 (图2-B)。

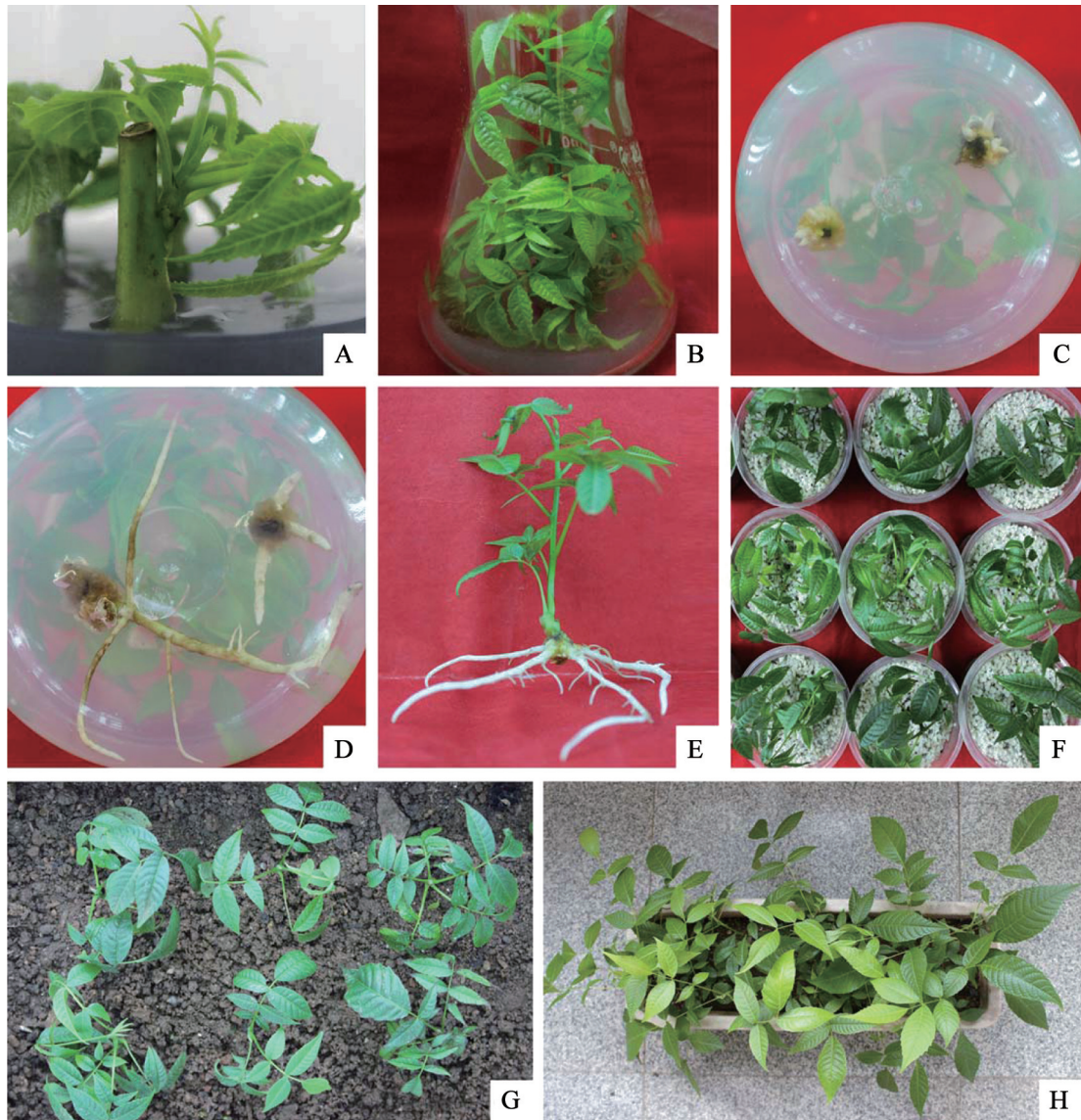


图2 铁核桃的组织培养与快速繁殖

Fig.2 Tissue culture and rapid propagation of *J. sigillata*

A: 腋芽萌发; B: 试管苗增殖; C、D: 生根; E: 附加AC生根; F: 温室炼苗; G: 营养土炼苗; H: 移栽成活。

表1 不同IBA浓度对铁核桃单芽茎段增殖的影响

Table 1 Effects of different IBA concentrations on proliferation of *J. sigillata* stem-segment

IBA浓度/mg·L ⁻¹	增殖率/%	增殖系数	丛生芽率/%	愈伤组织情况	植株生长状况
0.01	100.00±0.00 ^a	7.07±0.54 ^a	85.70±4.43 ^b	+	直立生长, 节间长
0.02	100.00±0.00 ^a	7.33±0.53 ^a	76.20±2.70 ^c	+	直立生长, 节间长
0.03	100.00±0.00 ^a	5.72±0.49 ^b	100.00±0.00 ^a	++	植株较矮小, 节间短
0.04	100.00±0.00 ^a	5.61±0.68 ^b	100.00±0.00 ^a	++	节间极短, 簇生状
0.05	100.00±0.00 ^a	5.39±0.49 ^b	100.00±0.00 ^a	++	节间极短, 簇生状

+表示茎基部有瘤状突起, 但未见明显愈伤组织; ++表示茎基部有较大瘤状突起, 可见明显愈伤组织。同列不同小写字母表示5%差异显著水平, 下表同。

2.2 铁核桃茎段不同部位对增殖的影响

由表2可知, 在继代增殖培养中, 茎尖和茎段在增殖率、增殖系数、丛生芽率、愈伤组织和试管苗生长状况5个方面均无明显差异。2种接种材料的增殖率都为100%, 茎尖和茎段的增殖系数分别为7.63和7.58, 植株叶绿色, 生长健壮, 愈伤组织小。说明茎尖和茎段都是铁核桃增殖适宜的取材部位。

表2 不同取材部位的增殖情况

Table 2 The proliferation performance of different parts of stem

取材部位	增殖率/%	增殖系数	丛生芽率/%	愈伤组织情况	试管苗生长状况
茎尖	100.00±0.00 ^a	7.63±0.34 ^a	78.42±3.70 ^a	+	叶绿色, 健壮
茎段	100.00±0.00 ^a	7.58±0.29 ^a	77.33±2.89 ^a	+	叶绿色, 健壮

表3 不同IBA浓度对铁核桃生根的影响

Table 3 Effects of different IBA concentrations on rooting of *J. sigillata* seedings

IBA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	生根条数/条	根系生长情况
0.75	13.40±0.90 ^d	1.33±0.58 ^c	生长正常, 根量极少
1.00	27.75±5.55 ^c	1.75±0.96 ^{bc}	生长正常, 根量少
1.25	38.75±1.25 ^b	2.25±0.96 ^{abc}	生长正常, 基部略有膨大
1.50	40.85±0.85 ^b	3.00±0.82 ^{ab}	基部膨大, 可见愈伤组织
2.00	48.55±1.45 ^a	3.60±0.89 ^a	基部膨大, 愈伤化严重

为48.55%和3.60条。低浓度(0.75~1.0 mg·L⁻¹)的IBA条件下, 生根率虽然较低(13.4%~27.75%), 但根系生长正常; 随IBA浓度的升高, 生根率虽有提高, 但根基部膨大, 根系愈伤化严重。综合生根率和根系生长状况来看, “一步生根法”不适合铁核桃嫩茎的生根培养。

3.2 “两步生根法”时不同浓度的IBA对铁核桃试管苗生根的影响

由图3可以看出, 随着IBA浓度的升高, 铁核桃‘纳雍-1’试管苗生根率呈现先升高后降低的变化趋势, 在附加IBA 4.0~6.0 mg·L⁻¹的1/4DKW培养基上, 生根效果较优, 其中IBA浓度为5.0 mg·L⁻¹时, 生根率最高达59.30%; 当IBA浓度低于4.0 mg·L⁻¹时, 生根率均低于50%; 当IBA浓度高于6.0 mg·L⁻¹时, 生根率下降且基部愈伤化严重。平均生根条数也随着IBA浓度的升高, 呈现先升高后降低的变化趋势, 但对IBA的敏感浓度高于生根率, 在7.0 mg·L⁻¹时, 平均生根数最大, 可达2.43条; 在1.0~6.0 mg·L⁻¹

3 铁核桃试管苗的生根培养

3.1 “一步生根法”时不同浓度的IBA对铁核桃生根的影响

由表3可知, 随着IBA浓度的升高, 铁核桃嫩茎的生根率和生根条数都呈增加趋势, 在IBA取值范围内(0.75~2.0 mg·L⁻¹), 生根率从13.4%增加到48.55%, 生根条数从平均1.33条增加到3.60条, 当IBA为2.0 mg·L⁻¹时, 生根率和生根条数最高, 分别

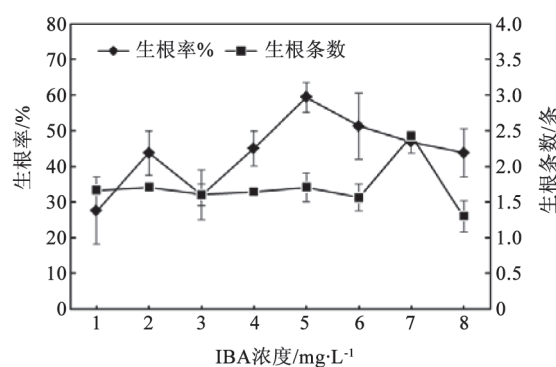


图3 不同浓度IBA对铁核桃嫩茎生根率和生根条数的影响
Fig.3 Effects of different IBA concentrations on the rooting rate and mean number of roots of *J. sigillata* seedings

之间, 生根条数变化不大; 高于7.0 mg·L⁻¹, 生根数量又有所降低。综合生根率与生根数来看, 铁核桃试管苗嫩茎在附加IBA 5.0 mg·L⁻¹的1/4DKW培养基生根效果较好。根系发生与伸长状况见图2-C、D。

3.3 不同暗培养时间对铁核桃试管苗生根的影响

不同暗培养时间对铁核桃试管苗的生根率影响明显(表4)，“二步生根法”中，在诱导阶段，随着暗培养时间的延长，生根率先明显升高，后显著下降，暗培养12 d时生根率最高，根数量最多，分别为61.10%和2.18条，生长正常，有大量侧根。生根率在14 d和16 d间无明显差异，诱导10 d的生根率最低(25.10%)；不同暗诱导天数对铁核桃嫩茎的生

根条数影响不显著，平均生根条数为2.0条；但对根系生长存在一定的影响，暗诱导10~14 d之间根系生长正常，其中，诱导12 d的根上有大量侧根出现，根生长健壮；当暗诱导16 d后，根基部出现愈伤组织。

3.4 不同蔗糖浓度对铁核桃试管苗生根的影响

由图4看出，不同蔗糖浓度对铁核桃嫩茎生根率的影响显著，在生根阶段附加20 g·L⁻¹的蔗糖最

表4 不同暗诱导天数对铁核桃生根的影响

Table 4 Effects of different dark induction days on roots of *J. sigillata* seedings

暗诱导时间/d	生根率/%	生根条数/条	根系生长状况
10	25.10±2.15 ^c	1.80±0.84 ^a	根生长正常，少量侧根
12	61.10±2.80 ^a	2.18±0.87 ^a	根生长正常，有大量侧根
14	50.00±4.50 ^b	1.83±0.41 ^a	根生长正常，侧根较少
16	49.77±2.96 ^b	1.86±0.69 ^a	根基部有愈伤化现象

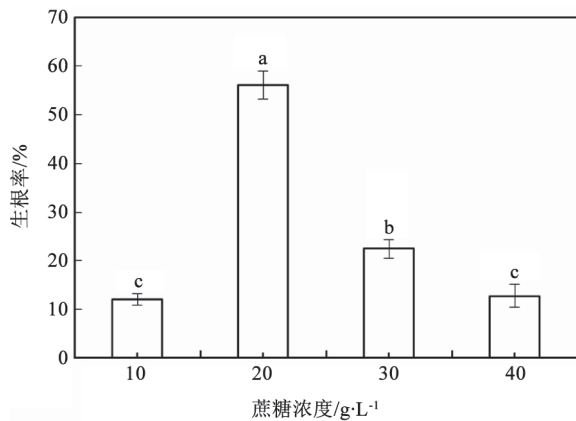


图4 不同蔗糖浓度对铁核桃嫩茎生根率的影响

Fig.4 Effects of different sucrose concentrations on rooting rate of *J. sigillata* seedings

适合生根培养，生根率最高，达到56.13%，明显高于其他处理；而附加30 g·L⁻¹蔗糖的生根率达到22.43%，显著高于10 g·L⁻¹(12.0%)和40 g·L⁻¹(12.73%)的。说明生根阶段加入20 g·L⁻¹的蔗糖有利于铁核桃嫩茎的生根培养。

3.5 不同含量的活性炭(AC)对铁核桃试管苗生根的影响

由图5可知，在“二步生根法”中的第2步，添加不同含量的AC明显影响铁核桃试管苗的生根率，而对生根数影响不明显，但与不添加AC的处理相比，添加AC后，根系颜色乳白色，侧根量大(图2-E)。

其中，加入3 g·L⁻¹的AC时，生根率最高可达71.73%，显著高于0、1和5 g·L⁻¹的；而附加AC 0 (57.98%)、1 (55.67%)、5 (54.55%) g·L⁻¹的生根率间差异不显著；AC含量对铁核桃试管苗的生根条数无显著影响，根系均为2.5~3.0条。由此可见，添加3 g·L⁻¹的AC有利于铁核桃试管苗的生根培养，此时，根系生长健壮，颜色乳白，根毛较多，利于炼苗移栽。

4 铁核桃试管苗的驯化移栽

参照潘学军等(2004)葡萄炼苗移栽的方法，温室炼苗驯化30 d后，铁核桃成活率为100%；营养土炼苗30 d后，成活率为93.0%；经珍珠岩和营养土两步炼苗后，最后定植于大田，成活率为87.5% (图2-F、G、H)。

讨 论

本研究直接从铁核桃‘纳雍-1’的优良母株上取材，并诱导腋芽生成植株，这样产生的种苗可保持母株的优良经济性状，克服了实生繁殖易丧失优良种性的缺点，具有更加实际的应用意义。试验成功建立了铁核桃的高效快繁体系和移栽技术体系，增殖系数可达7.33，且在此水平上连续继代多次，其增殖能力比较稳定，较好于普通核桃的快繁结果(樊靖等2009; 冀爱青等2011)。

核桃属植物是较难发生不定根的树种，生根与驯化是核桃试管苗微繁殖的主要限制因素

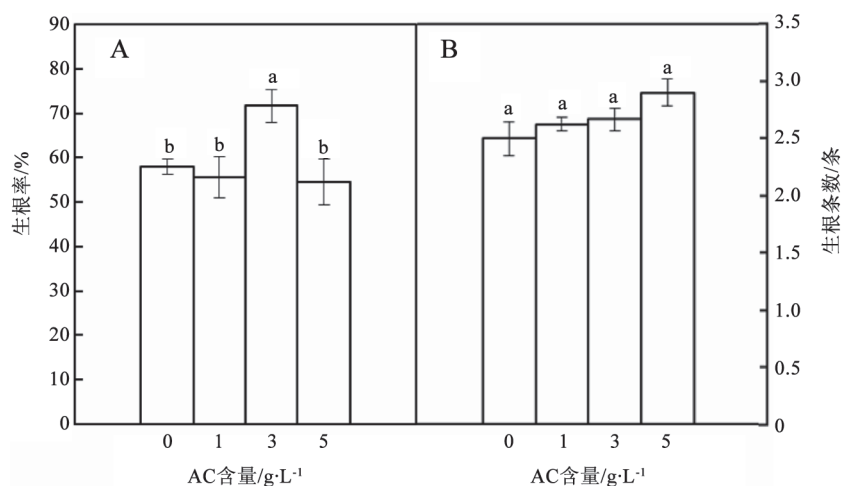


图5 不同AC含量对铁核桃嫩茎生根率(A)和生根条数(B)的影响

Fig.5 Effects of different AC contents on rooting rate (A) and mean number of roots (B) of *J. sigillata* seedlings

(Chenevard等1995)。不同基因型(Vahdati等2004)、生根诱导方法、外源IBA水平、暗处理天数(裴东等2003)、无机盐浓度(Scaltsoyiannes等1997)、蔗糖浓度(Long等1995)、活性炭(Revilla等1989)及试管苗发育状态等(樊靖等2009)明显影响普通核桃和黑核桃不定根的发生(Payghamzadeh和Kazemitarbar 2011)。本试验对生根诱导的直接法与间接法比较研究发现,铁核桃试管苗采取“一步生根法”的生根效果不理想,“两步法生根”适合铁核桃试管苗的生根培养,采取此生根方法不仅生根率较高(71.73%),而且根乳白色,侧根多,有利于移栽。该结论与裴东等(2002)和王清民等(2006)的在普通核桃方面的研究结果相一致。由此可见,“两步生根法”不仅适合于普通核桃,也适合铁核桃试管苗的生根培养。另外,有研究表明核桃树体中的高含量酚类物质被氧化成核桃醌,是导致核桃属植物难生根的主要因素(Cheniany等2010),因此,如何降低核桃酚类物质的氧化产物是组织培养中需要解决的问题之一。本试验中,在材料预处理中应用活性炭溶液浸泡铁核桃单芽茎段的预处理发现,经AC溶液浸泡后的褐化率略低于未经AC处理的(数据未列出),这可能是由于AC溶液对酚类物质产生了吸附作用,从而减少了褐化的发生。同时,在启动培养基中也加入AC,发现加入AC的处理1的褐化率仅为15.80%,显著低于未附加AC的(32.19%),并且最后获得了较高的萌芽率(69.70%);通过在“两步生根法”中的第2步添加不同浓度AC

的研究发现,添加适量的AC (3 g·L⁻¹)可明显提高铁核桃生根率(71.73%),比无AC的处理(57.98%)提高了13.75%,这可能是由于AC的吸附作用减少了茎基部核桃醌的含量,降低了其对不定根产生的抑制作用。综上,AC对铁核桃的材料预处理、无菌系建立和生根都起到了积极作用。

核桃属植物发生不定根的难易首先取决于基因型,不同核桃品种的生根率存在显著差异,大致分布在5%~95%之间(Scaltsoyiannes等1997)。本研究中,铁核桃试管苗最高生根率可达71.73%,低于核桃属其他种类和品种的最高生根率(95%)。这可能是受基因型所限,也可能仍存在一些限制生根的因素没有摸清。因此,在今后的研究中,需继续开展铁核桃不同基因型品种间的快繁研究,进一步探讨影响铁核桃组织培养的影响因素,继续优化和完善铁核桃快繁体系。本试验通过系统研究,建立起了一套较为完整的铁核桃组培快繁技术,这对今后铁核桃优良砧木生产和工厂化快速育苗等提供了技术支持,同时也为铁核桃资源的保存和可持续利用奠定了基础。

参考文献

- 陈杰忠(2011). 果树栽培学各论(南方本). 北京: 中国农业出版社
 樊靖, 刘庆忠, 张俊林, 秦岭, 陈新, 王锦(2009). 核桃离体培养和植株再生. 园艺学报, 36 (6): 867~872
 高清华, 段可, 甘霖, 张大福(2000). 我国核桃繁殖技术的研究进展. 果树科学, 17 (3): 220~224
 冀爱青, 朱超, 吴国良(2011). ‘香玲’核桃试管苗生长条件的优化.

- 应用与环境生物学报, 17 (3): 359~363
- 潘学军, 王跃进, 张剑侠, 张文娥, 江淑平(2004). 葡萄胚挽救苗移栽技术的研究. 西北植物学报, 24 (6): 1077~1082
- 潘学军, 张文娥, 刘伟, 张政, 彭剑(2010). 贵州核桃种仁脂肪酸和氨基酸含量分析. 西南农业学报, 23 (2): 497~501
- 裴东, 袁丽钗, 谷瑞升, 蒋湘宁(2003). 核桃子叶不定根发生调控的研究. 林业科学, 39 (6): 33~39
- 裴东, 袁丽钗, 奚声珂, 谷瑞生(2002). 核桃品种试管嫩茎生根的研究. 林业科学, 38 (2): 32~38
- 汤浩茹, 王永清, 任正隆, Krczal G (2000). 德国核桃'No.120'幼胚胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生. 园艺学报, 27 (1): 59~61
- 王清民, 彭伟秀, 张俊佩, 裴东(2006). 核桃试管嫩茎生根的形态结构及激素调控研究. 园艺学报, 33 (2): 255~259
- 郗荣庭, 张毅萍(1996). 中国果树志——核桃卷. 北京: 中国林业出版社
- 张启香, 胡恒康, 王正加, 袁佳, 万俊丽, 黄坚钦(2011). 山核桃间接体细胞胚发生和植株再生. 园艺学报, 38 (6): 1063~1070
- Achim GH, Botu I (2001). Results in walnut propagation by using different methods. Acta Hort, 544: 503~510
- Bosela MJ, Michler CH (2008). Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 44: 316~329
- Chenevard D, Frossard JS, Gendraud M, Jay-Allemand C (1995). Development of photosynthetic ability of hybrid walnut plantlets during acclimatization. Acta Hort, 52: 147~156
- Cheniyan M, Ebrahimzadeh H, Masoudi-nejad A, Vahdati K, Leslie C (2010). Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Afr J Plant Sci, 4 (12): 479~487
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Gruselle R, Meier-Dinkel A, Jay-Allemand C, Gaspar T (2004). Practical factors controlling *in vitro* adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. J Amer Soc Hort Sci, 129 (2): 198~203
- Driver J, Rodriguez R, Kuniyuki AH (1984). *In vitro* propagate on paradox walnut rootstock (*Juglans hindsii* × *J. regia*). HortScience, 19 (4): 507~509
- Long LM, Preece JE, Van Sambeek JW (1995). Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut). Plant Cell Rep, 14: 799~803
- Payghamzadeh K, Kazemitabar SK (2011). *In vitro* propagation of walnut—A review. Afr J Biotechnol, 10 (3): 290~311
- Pijut PM (1997). Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (butternut). In: Bajaj YPS (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.39, High-Tech and Micropropagation V. Heidelberg: Springer-Verlag, 345~357
- Revilla MA, Majada J, Rodriguez R (1989). Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. Ann Sci For, 46 (suppl): 149~151
- Rezaee R, Vahdati K (2008). Introducing of a simple and efficient procedure for topworking Persian walnut tree. J Am Pomol Soc, 62: 21~26
- Rodriguez APM, Wetzstein HY (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. Plant Cell Rep, 13: 607~611
- Saadat YA, Hennerty MJ (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Sci Hort, 95: 251~260
- Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos KP, Moulalis D (1997). Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). Silvae Genet, 46 (6): 326~332
- Vahdati K, Leslie C, Zamani Z, McGranahan G (2004). Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. HortScience, 39 (2): 324~327