

美国山核桃无性繁殖技术研究进展*

曹凡 谭鹏鹏 彭方仁

(南京林业大学南方现代林业协同创新中心,南京林业大学林学院,南京 210037)

摘要:美国山核桃是高档干果树种,具有极高的研究价值。文中详细阐述了美国山核桃嫁接技术、扦插技术和组织培养技术等方面的研究现状,总结其无性繁殖技术研究进程中存在的问题,指出解决问题的关键并针对今后研究方向提出合理化建议,旨在为美国山核桃无性繁殖技术研究提供参考。

关键词:美国山核桃,无性繁殖,嫁接,扦插,组织培养

中图分类号:S723

文献标识码:A

文章编号:1001-4241(2017)01-0076-05

DOI:10.13348/j.cnki.sjlyyj.2017.0002.y

Research Progress of Vegetative Propagation Technology for Pecan (*Carya illinoensis*)

Cao Fan Tan Pengpeng Peng Fangren

(Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Pecan (*Carya illinoensis*) is high-grade fruit tree species which is of high research value. This paper expounded on the present research on pecan grafting technology, cutting technology and tissue culture technology, summarized the problems existing in the research process of its vegetative propagation, pointed out that the key to solve the problem and put forward reasonable suggestions for the future research, which was aimed to provide reference for the research on pecan's vegetative propagation technology.

Key words: *Carya illinoensis*, vegetative propagation, grafting, cutting, tissue culture

美国山核桃(*Carya illinoensis*),又名长山核桃或薄壳山核桃,原产美国和墨西哥北部,是重要的食用油料、木材和绿化树种。美国山核桃具有果大、壳薄、肉多的优点,营养价值丰富^[1]。我国从19世纪末20世纪初开始引进美国山核桃,因为存在育种进程缓慢、优良品种资源匮乏、规模化扩繁技术落后、良种苗木供不应求和配套栽培技术不完善等问题,至今尚未形成产业化^[2]。近年来,我国学者在美国山核桃的引种栽培、种质资源收集、生物学特性、遗传多样性、品种鉴定以及综合开发利用等方面开展了大量研究工作,取得了许多重要的研究成果,但在无性繁殖研究方面进展一直比较缓慢^[2-4]。美国山核桃实生苗挂果迟,低产甚至完全不挂果,因此多采用嫁接方法

进行繁殖育苗。但由于受砧木数量和嫁接技术的限制,美国山核桃的优良品种在我国的种植一直没有得到大面积推广^[5-6]。此外,美国山核桃扦插技术和组织培养技术也都存在技术瓶颈,目前国内外有关这方面的报道文献较少。笔者拟对国内外学者在美国山核桃无性繁殖方面的研究进行总结,提出合理化建议,旨在为今后美国山核桃快繁技术研究提供参考。

1 研究进展

美国山核桃传统的繁殖方法以播种繁殖为主,实生繁殖树10年左右才开始开花结果,15~20年才进入盛果期,从播种到结果所需时间漫长,严重制约了美国山核桃的推广种植;而且实生繁殖不易保持品种

* 收稿日期:2016-03-18;修回日期:2016-10-06。

基金项目:江苏省林业三新工程项目[LYSX(2016)44];江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介:曹凡(1990-),男,江苏南通人,博士研究生,主要从事经济林栽培与应用研究,E-mail: caofan90@126.com。

通信作者:彭方仁(1963-),男,湖北阳新人,教授,博士生导师,主要从事森林培育与经济林栽培的教学与科研工作,E-mail: frpeng@njfu.edu.cn。

的优良特性,容易产生变异。国内许多学者对美国山核桃的嫁接、扦插等无性繁殖方法进行了研究,取得了一定的进展,但仍然难以满足目前国内市场对美国山核桃优良品种苗木的需求。

1.1 嫁接繁殖

在国外,美国山核桃常见的嫁接方法有芽接、插皮接、四轮接(香蕉接)和舌接等^[6]。芽接一般在6—8月份进行。插皮接通常在4月下旬至5月上旬,适合用较小规格的接穗对较粗大的砧木进行嫁接。四轮接(香蕉接)要求接穗稍大于砧木以利于结合,并且接穗和砧木规格越小,嫁接成活率越高,这也是在美国应用最早且最为成功的嫁接方式。舌接通常在2—3月份芽尚未萌发时进行。

1950—1990年江苏省植物研究所、南京林业大学、云南省林科院和江西省林科院都先后针对美国山核桃嫁接繁殖技术进行了相关研究,普遍认为美国山核桃通过嫁接,并在良好的管理条件下,能提早结果和增加收益,而且大量的嫁接结果表明,本砧嫁接成活率较高。2011年翟敏^[7]对南京地区薄壳山核桃进行了不同时期的嫁接试验,结果表明,在8月及9月初采用芽接成活率为84.2%~90%,春季枝接成活率较低。2013年李永荣等^[8]根据薄壳山核桃在南京地区生长的生物学特性,总结出了一套在特定时期内(8月中下旬至9月上旬)相适应的“方块”芽接方法,嫁接成活率可达95%以上。这为美国山核桃嫁接繁殖技术在实际生产应用提供了高效的技术支持。

1.2 扦插繁殖

国外对美国山核桃扦插繁殖技术的研究最早始于1939年,Smith等^[9]采用促进生根的化学药剂诱导美国山核桃插穗生根。随后在1975—1982年针对美国山核桃扦插后难生根的问题进行了诸多试验^[10-13]。之后,虽然有相关的解剖方面研究文献,美国山核桃扦插技术一直没有用于生产中^[14-16]。我国关于美国山核桃根插繁殖的报道较多,诸多试验表明,用1年生实生苗主根进行扦插的成活率可以达到90%以上^[17-18]。虽然美国山核桃的根插研究获得了较好的成果,但是在生产上根插无法培育优质砧木或苗木,并且材料稀缺,无法从根本上解决苗木短缺的问题。

近几年来,关于美国山核桃硬枝插穗自身特性和激素处理方式的研究都有了相关报道^[19-21]。章建红

等^[22]对不同激素种类及浓度处理美国山核桃插穗进行了深入研究,并且从解剖学层面上确定愈伤组织生根的生根类型。曹凡等^[23]从2012年11月开始连续3年参与美国山核桃硬枝扦插试验,发现一种通过激素处理插穗和电热温床加热基质相结合的方法可以极显著地提高美国山核桃插穗的生根率,并且能够加速其不定根的生长。张计育等^[24]也证明这种利用当年生实生苗休眠枝条作为插穗进行扦插的育苗方式在实际生产应用中具有可行性。

1.3 组培及体胚发生

美国山核桃的组培技术比较困难,目前国内仍未见成功的报道,国外相关报道也较少^[25]。Wood^[26]利用实生苗的带腋芽茎段作为外植体诱导芽增殖,没有获得有效的增殖途径,虽然诱导出根,但未移栽成活。Phillips等和Corte-Olivares等^[27-28]利用美国山核桃的顶芽和腋芽作为外植体诱导芽生长,但生根困难,没有建立植株转化体系。

体胚培养具有增殖系数高、繁殖速率快等优点,但是木本植物体胚发生比较困难,尤其是胡桃科植物,外植体材料容易褐化而难以诱导分化。目前,在核桃(*Juglans regia*)、黑核桃(*J. nigris*)、灰核桃(*J. cinerea*)、函滋核桃(*J. hindsii*)等胡桃科植物中均有体胚发生方面的报道^[29-32]。有关美国山核桃的体胚发生技术也有几篇相关报道,不同程度地诱导了体胚发生,但都因为诱导体胚发育困难或者难以诱导生根而没有获得完整的植株^[33-36]。1990年Yates等^[37]通过体胚发生获得了极少量的植株。Burns等^[38]通过悬浮培养获得了体胚,之后再用固体培养基诱导发育成植株。

2 存在的主要问题

2.1 芽接快繁技术尚需完善

嫁接作为一种传统的无性繁殖方法,已被广泛应用于农林领域中的良种扩繁保存、品种改良、新品种选育等方面,它能够有效提高作物产量、抗逆性,改变植物的开花结果习性以及改良果实品质。勒栋梁等^[39]采用的美国山核桃“方块”芽接方法在砧木准备、嫁接技术以及嫁接后管理等方面都还需改进。首先,需要加强规模化和产业化实生种子育苗技术体系研究,尤其是对矮化砧木的培育工作,才能为这种成活率和繁殖系数较高的芽接技术提供优质矮化壮苗,也为美国山核桃合理矮化密植创造有利条件。其次,在实际

生产中对嫁接技术进行相关改良,如嫁接刀规格、嫁接膜材质及伤流导口位置等。嫁接后管理也可以采取适时灌溉或是补充植物营养液等技术手段,可以显著提高嫁接成活率。

2.2 品种苗扦插难题未解决

近年来,通过生长调节剂处理组合的选择及扦插后环境调控等方面的相关研究以及美国山核桃实生苗插穗硬枝扦插技术研究已经有所进展,而优良品种苗插穗扦插后仍然难形成不定根^[23-24]。针对该难题,可以参考其他核桃属品种苗扦插生根的成功方式^[40],从插穗采集处理到扦插后管理整个扦插育苗过程进行改良,比较实生苗和嫁接品种苗枝条的差异,对品种苗插穗进行合理处理并提供合适的扦插环境,以探索一套有效的美国山核桃品种苗硬枝或嫩枝扦插方法。

2.3 组培及体胚发生技术有待摸索

美国山核桃是较难进行组织培养的树种之一。综合已有的研究成果报道,可以从概括出一些具有价值的信息:美国山核桃的组培技术多数以合子胚为材料,先获得实生幼苗,再进行丛生芽诱导,诱导生根可采用 IBA 作为诱导激素;WPM 培养基(去除甘氨酸)效果较好,原因还有待进一步试验论证;前期进行暗培养可以提高体胚发生率;果实的发育阶段直接影响体胚的发生,胚乳发育中晚期(即授粉后约 14 周之内,胚乳呈液体状态时)为最佳阶段;生长素和细胞分裂组合、单独使用生长素均能诱导体胚产生;诱导体胚萌发要转入无激素的培养基中;NAA 和 2,4-D 均能诱导产生体胚,决定体胚发生的是激素种类而非浓度;体胚发生取决于外植体的发育阶段,胚乳成液体状态,子叶迅速展开阶段最理想,较成熟的果实很难诱导出体胚;体胚大多产生于表皮或表皮下的数层细胞,这些细胞分裂活跃,增殖迅速;深层的细胞较少产生体胚。

3 研究展望

随着生物技术的发展,应该借鉴其他植物无性繁殖技术多元化的开发及应用模式,为美国山核桃无性繁殖技术研究开辟新的途径。

3.1 芽苗砧接

芽苗砧接是采用刚出土未展叶的幼苗作为砧木嫁接胚芽、嫩枝或成熟枝条的一项无性繁殖新技

术^[41],具有简化嫁接复杂工序、提高嫁接成活率、保持遗传增益和加快良种繁育进程等特点,已在油茶(*Camellia oleifera*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、板栗(*Castanea mollissima*)、核桃等多个植物展开相关研究^[42]。李小飞等采用‘斯图尔特’‘卡多’‘契科特’和‘德西拉布’4个美国山核桃国外优良品种休眠枝接穗,进行芽苗砧嫁接试验,并对嫁接苗接芽萌发动态、成活率及新梢生长量的差异进行分析,其中‘卡多’成活率最高,达到 82.9%;‘契科特’和‘德西拉布’接芽成活和生长最快^[43]。芽苗砧接在美国山核桃无性繁殖发展中具有极大的应用前景,但是其嫁接方式还需进一步改良,具体嫁接适宜时间也需进一步试验以确定。

3.2 砧木品种化利用

合理的矮化密植符合我国美国山核桃栽种现状的要求,因而迫切需求加强美国山核桃优良品种矮化砧木的培育。靳栋梁等^[39]对美国山核桃嫁接未剪砧矮化苗和矮化实生苗进行初选和复选,获得极矮化美国山核桃已嫁接单株 10 个和实生单株 12 个。但是,这些通过表型选择的单株具有不确定性,其嫁接是否矮化需要验证。此外,矮化单株的无性系扩繁、矮化砧木抗逆性、矮化调控机制及矮化相关基因等研究也需要更加深入,以实现美国山核桃品种矮化砧木在实际生产中的运用。

3.3 微嫁接

微嫁接是一种在试管内将砧木与接穗进行嫁接的技术,是组培与嫁接技术的结合。自从 1972 年 Murashige 等^[44-46]创立了微芽嫁接技术以来,微嫁接技术已广泛应用于多个经济树种的研究与生产中。在美国山核桃无性繁殖研究中尝试微嫁接技术,可以采用种胚组织培养,以避免品种苗茎段中的酚类物质抑制生根。该方法目前尚存在 2 个技术瓶颈,一是组培苗胚根的诱导,二是微嫁接砧穗之间的亲和性,这些都有待试验摸索相应的方案。总之,微嫁接技术不受时间和空间的限制,如果能在美国山核桃上得到应用将是对传统无性繁殖技术的重要突破,具有极高的应用价值。

3.4 不定根形成机理

深化美国山核桃不定根形成机理的研究,对解决目前扦插和组培技术瓶颈有重要的指导意义。可从转录组、蛋白质组和代谢组学等方面采取相应的技术手段,分析不定根形成调控基因、激素的分子作用机

理,鉴定激素调节的信号作用相关途径等。在生理机理方面,除了分析贮藏营养和内源激素外,可以尝试从微量元素(如硼元素等)、生根相关酶(如IAAO、SOD等)和抑制生根物质(如单宁、核桃醌等)等方面进行研究。只有有效地诱导美国山核桃不定根的形成,才能采用除了嫁接以外的其他无性繁殖技术实现美国山核桃品种苗的大规模扩繁。

参 考 文 献

- [1] GOFF W D, McDANIEL R, GARDEN E. Pecan cultivars for landscape and home plantings in the southeastern US[J]. *Journal of Arboriculture*, 1991, 17(3): 73-78.
- [2] 彭方仁,李永荣,郝明灼,等. 我国美国山核桃生产现状与产业化发展策略[J]. *林业科技开发*, 2012, 26(4): 1-4.
- [3] WOOD B W. Production unit trends and price characteristics within the United States pecan industry[J]. *Hort Technology*, 2001, 11(1): 110-118.
- [4] 彭方仁. 美国薄壳山核桃产业发展现状及对我国的启示[J]. *林业科技开发*, 2014, 28(6): 1-5.
- [5] 李永荣,吴文龙,刘永芝. 薄壳山核桃种质资源的开发利用[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(27): 13306-13308.
- [6] ZHANG R, PENG F, LI Y. Pecan production in China[J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 197: 719-727.
- [7] 翟敏. 薄壳山核桃容器育苗及嫁接技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [8] 李永荣,张计育,翟敏,等. 南京地区薄壳山核桃高效嫁接育苗技术[J]. *现代农业科技*, 2013(10): 75-75.
- [9] SMITH C L, ROMBERG L D. A method for the treatment of cuttings and roots of the pecan with root-inducing chemicals[J]. *Plant Physiology*, 1939, 14(1): 177-178.
- [10] WOLSTENHOLME B, ALLAN P. Progress and problems in pecan clonal propagation by stem cuttings[J]. *Gewasproduksie Crop Production*, 1975(1): 29-32.
- [11] BRUTSCH M O, ALLAN P. Anatomy of adventitious root-formation in adult-phase pecan [*Carya illinoensis* (Wang) K-Koch] stem cuttings[J]. *Horticultural Research*, 1977, 17(1): 23-31.
- [12] SMITH M W, CHIU H J. Seasonal-changes in the rooting of juvenile and adult pecan cuttings[J]. *HortScience*, 1980, 15(5): 594-595.
- [13] NELSON K L, GUSTAFSON W A. A propagation technique for producing clonal rootstocks of pecan root cuttings[J]. *HortScience*, 1982, 17(3): 494-494.
- [14] FOUAD M, ABOU-TALEB S. Propagation of pecan by stem and root cuttings[J]. *HortScience*, 1992, 27(6): 691-691.
- [15] FAYEK M, GOMAA A, KHALIL F, et al. Anatomical studies on adventitious root of pecan stem cuttings[J]. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 1994, 21(2): 487-500.
- [16] VINCENTIUS T. Studies on the anatomy of root formation and rooting of semi-harwood pecan cuttings[D]. Mississippi State University, 2002.
- [17] 刘梦华,郭忠仁,耿国民. 薄壳山核桃育苗技术及其研究概述[J]. *江苏林业科技*, 2009, 36(2): 52-54.
- [18] 佟海英,吴文龙,闫连飞. 薄壳山核桃繁殖技术[J]. *林业科技开发*, 2005, 19(3): 73-74.
- [19] 黄有军,王正加,郑炳松,等. 植物生长调节剂对美国山核桃硬枝扦插生根的影响[J]. *西南林学院学报*, 2006, 26(5): 42-44, 49.
- [20] 耿国民,周久亚,朱灿灿. 美国山核桃扦插繁殖技术初报[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 249-250.
- [21] 李俊南,李莲芳,熊心武,等. 插穗母树树龄和粗度对美国山核桃硬枝扦插的影响[J]. *西北林学院学报*, 2013, 28(4): 94-97.
- [22] 章建红,施娟娟,夏国华,等. 薄壳山核桃硬枝扦插及生根机理研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2014, 41(2): 203-208.
- [23] 曹凡,梁有旺,彭方仁,等. 美国山核桃硬枝扦插技术研究[J]. *江苏林业科技*, 2015, 42(1): 44-47.
- [24] ZHANG J Y, GUO Z R, ZHANG R, et al. Auxin type, auxin concentration, and air and substrate temperature difference play key roles in the rooting of juvenile hardwood pecan cuttings[J]. *Hort Technology*, 2015, 25(2): 209-213.
- [25] NILIMA N R, MUTHUSAMY M, JAMES O G. In vitro propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wang) K-Koch][J]. *Plant Biotechnology*, 2010, 27: 211-215.
- [26] WOOD B W. In vitro proliferation of pecan shoots[J]. *HortScience*, 1982, 17: 890-891.
- [27] PHILLIPS G C, RAMIREZ J J. Pecan tissue culture [C]// Proceedings of the 17th Western Pecan Conference, New Mexico, 1983: 101-109.
- [28] CORTE-OLIVARES J, PHILLIPS G C, BUTLER-NANCE S A. Micropropagation of pecan[J]. *HortScience*, 1990, 25: 1308.
- [29] 汤浩茹. 核桃的体细胞胚胎发生与转基因研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2000.
- [30] 方宏筠,王美林. 黑核桃体细胞胚胎体发生及基因转化系统的建立[J]. *园艺学报*, 2000, 27(6): 406-411.
- [31] PIJUT P M. Somatic embryogenesis in butternut, *Juglans cinerea* [J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 1993, 23(5): 835-838.
- [32] TULECKE W, McGRANAHAN G H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. [J]. *Plant Science*, 1985, 40(1): 57-63.
- [33] 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.
- [34] MERKLE S A, SOMMER H E, WETZSTEIN H Y. Somatic embryogenesis in tissue cultures of pecan[J]. *Hort Science*, 1987, 22(1): 128-130.

- [35] WETZSTEIN H Y, AULT J R, MERKEL S A. Further characterization of somatic embryogenesis in pecan (*Carya illinoensis*) [J]. *Plant Science*, 1989, 64(2): 193 - 201.
- [36] WETZSTEIN H Y, AULT J R, MERKLE S A. Factors influencing somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan, *Carya illinoensis* [J]. *Acta Horticulturae*, 1990, 280: 69 - 74.
- [37] YATES I E, REILLY C C. Somatic embryogenesis and plant development in eight cultivars of pecan [J]. *HortScience*, 1990, 25(5): 573 - 576.
- [38] 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.
- [39] 勒栋梁, 李永荣, 彭方仁, 等. 美国山核桃矮化砧的筛选 [J]. *南京林业大学学报*, 2015, 39(4): 13 - 18.
- [40] 吕保聚, 裴东, 徐虎智, 等. 核桃属植物嫩枝扦插生根的影响因素分析 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(29): 12659 - 12660.
- [41] 王康. 板栗芽苗砧嫁接技术 [J]. *林业科技开发*, 2000, 14(4): 48 - 49.
- [42] 倪穗. 芽苗砧嫁接及在我国的研究现状与展望 [J]. *宁波大学学报*, 2007, 19(4): 451 - 456.
- [43] 李小飞, 彭方仁, 梁有旺, 等. 不同品种美国山核桃芽苗砧嫁接成活率及生长过程分析 [J]. *林业科技开发*, 2015, 29(6): 59 - 62.
- [44] HASSANEN S A. In vitro grafting of pear (*Pyrus spp.*) [J]. *World Applied Sciences Journal*, 2013, 21(5): 705 - 709.
- [45] YILDIRIM H, AKDEMIR H, SÜZERER V, et al. In vitro micrografting of the almond cultivars “Texas”, “Ferrastar” and “Nonpareil” [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013, 27(1): 3493 - 3501.
- [46] HUSSAIN G, WANI M S, MIR M A, et al. Micrografting for fruit crop improvement [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2015, 13(25): 2474 - 2483.