

# 嫩枝扦插不同处理对“香玲”核桃组织再生能力的影响

于艳萍<sup>1</sup>, 韩善峰<sup>2</sup>, 赵登超<sup>3</sup>, 鲁仪增<sup>4</sup>, 韩传明<sup>3</sup>, 侯立群<sup>3</sup>

(1. 山东师范大学 生命科学院, 山东 济南 250014; 2. 山东省莒南县坊前镇初级中学, 山东 莒南 276617;

3. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014; 4. 山东省林木种质资源中心, 山东 济南 250014)

**摘要:**以5 a生“香玲”核桃为试材,在全光照间歇自动喷雾、细沙基质条件下,研究了扦插时间、不同外源生长调节剂种类及浓度对“香玲”核桃嫩枝组织再生特性的影响。结果表明:在核桃迅速生长的5~8月份,以7月上旬扦插效果最好;IBA处理较2,4-D处理对核桃嫩枝愈伤组织的产生更为显著,且以IBA浓度900~1 200 mg/kg时效果最好,其中IBA 900、1 500 mg/kg的处理均能诱导插穗分化出根系;不同浓度的IBA处理对插穗内源激素的含量亦有显著影响。

**关键词:**核桃;嫩枝扦插;愈伤组织;IBA

**中图分类号:**S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)17-0091-04

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科核桃属落叶乔木,是重要的坚果和木本油料树种,以其较高的经济、生态和社会效益而被广泛栽培。但传统的实生繁殖在自然授粉过程中易发生变异<sup>[1]</sup>,不能保持品种的优良性状,降低了核桃生产的经济价值。因而近年来,核桃的无性繁殖技术一直是科研工作者研究的热点,且在木本植物上已得到较为广泛的应用,其中扦插繁殖是一种极为有效的无性繁殖方式。裴东<sup>[2]</sup>研究发现,嫩枝基部经过黄化处理的奇异核桃和“辽宁1号”核桃,嫩枝扦插生根率分别可达93.3%、69.17%。郭志民等<sup>[3]</sup>认为嫩枝基部黄化能显著提高核桃生根率,外源激素IBA诱导生根效果较好,而且插穗对IBA浓度要求不是很严格,0.5~2.0 mg/mL IBA均有较好的诱导效果,嫩枝生根率均在83.3%以上。耿国民等<sup>[4]</sup>在研究薄壳山核桃硬枝扦插试验中,得到了成苗率为4%的试验结果。虽然扦插繁殖在核桃繁育工作中经济、高效,但是由于核桃等难生根树种自身的潜在根源基很少<sup>[5]</sup>,扦插后不定根的诱导也相对困难,这就在很大程度上限制了此项技术在核桃等难生根树种上的推广应用<sup>[2]</sup>。目前,扦插繁殖在核桃育苗工作中尚处于试验探索阶段。

现以“香玲”核桃为试材,研究了不同扦插时间、不

同种类及浓度的外源生长调节剂对核桃组织再生特性的影响,以探讨核桃组织再生的最佳条件,为高效的核桃嫩枝扦插繁殖技术提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用嫩枝插穗采自山东省林木种质保护中心(章丘市枣园基地)核桃资源圃,采穗母株为5 a生“香玲”核桃,砧木为普通核桃。所采嫩枝插穗为核桃植株生长阶段的新梢梢段,要求梢段达半木质化以上程度。保留1片复叶。

Waters510型高效液相色谱仪,Waters2487双波长紫外检测器,Thermo Hypersil GOLD AQ 250 mm×4.6 mm色谱柱。流动相流动相:20 mmol/L磷酸二氢铵(磷酸调pH 2.5):甲醇=98:2。检测波长:210 nm。流速:0.8 mL/min。柱温:室温。进样量:10 μL。

标准品均为FLUKA产品,其它试剂均为色谱纯,试验用水为重蒸馏水。

### 1.2 试验方法

试验于2012年5~8月份在山东省林业科学研究院进行;外源激素处理采用IBA和2,4-D,浓度梯度设定为:0、500、1 000 mg/kg;另设不同浓度IBA处理:0、300、600、900、1 200、1 500、1 800、2 100 mg/kg。采用完全随机设计,每处理20插穗,3次重复。

扦插处理在全光照间歇自动喷雾扦插池中进行,扦插前,用多菌灵对扦插池进行消毒处理。插穗长度在3~5 cm之间,穗粗在8~12 mm。扦插时间安排在清晨和傍晚,扦插深度为2~3 cm。

**第一作者简介:**于艳萍(1988-),女,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为植物生理与分子生物学。

**责任作者:**侯立群(1959-),男,博士,研究员,现主要从事经济林木育种与栽培技术研究。E-mail:lqhou@163.com

**基金项目:**国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004009-3);山东省农业良种工程资助项目(2010LZ10-03;2011LZ10-03)。

**收稿日期:**2013-04-10

### 1.3 项目测定

愈伤组织内源激素含量采用高效液相色谱法测定。

愈伤组织量测定:将取回的插穗冲洗干净,擦干,用手术刀片把愈伤组织切下,放入称量瓶,用 AG-245 型电子分析天平测定。

### 1.4 数据分析

对所得试验数据采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同扦插时间对香玲核桃愈伤组织产生情况的影响

从表 1 和图 1 可以看出,不同扦插时间对香玲核桃插穗切口的愈合情况、插穗基部产生愈伤组织的多少、生根情况都有显著影响。在 7 月上旬进行核桃嫩枝扦插的切口愈合率最高,可达 87.50%,平均每插穗产生愈伤量 0.4207 g。皮孔、切口上下端都有愈伤组织产生,其中叶柄下方最多,叶柄基部有膨大现象,插穗基部有不定根产生,不定根产生在切口上方,而非切口处(图 1)。在 6 月份扦插试验中发现,愈伤组织均产生在下端切口,围绕四周,叶柄下方最多,平均每插穗愈伤产量为 0.2512 g。而在 8 月份,没有发现叶柄基部有明显膨大,穗条产生的愈伤很小,而且有玻璃化现象,平均每插穗愈伤产量 0.1401 g,而且多数已变黑,插穗上下端切口都有腐烂变黑现象。在 5 月份进行扦插的核桃嫩枝,没有

表 1 不同扦插时间对“香玲”核桃嫩枝扦插的影响

Table 1 Effect of different cutting time on the softwood cutting of <i>Juglans regia</i> 'Xiangling'			
扦插月份	切口愈合率/%	平均每插穗愈伤产量/g	有无生根现象
5 月	0	0	—
6 月	72.67	0.2512	—
7 月	87.50	0.4207	+
8 月	35.00	0.1401	—

注:“+”表示有不定根产生;“—”表示无生根现象。

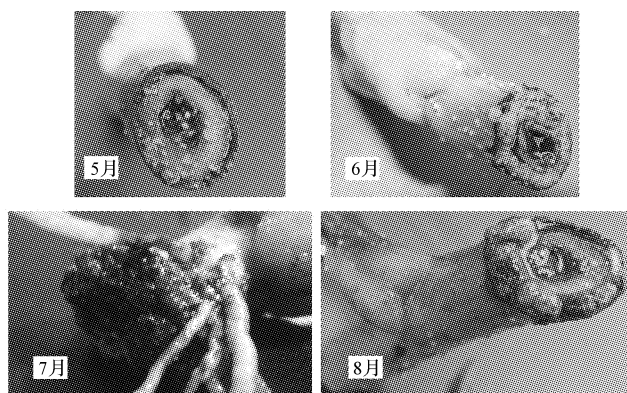


图 1 不同扦插月份对“香玲”核桃愈伤组织产生情况的影响

Fig. 1 Effect of different cutting time on the callus formation situation of *Juglans regia* 'Xingling'

观测到愈伤,插穗上下切口处都出现了变黑腐烂现象。

### 2.2 不同外源激素对“香玲”核桃嫩枝扦插的影响

由图 2 可知,IBA 的诱导效果要明显优于 2,4-D, IBA 诱导切口平均愈合率为 87.5%,而后者是 75.0%。在选用 2,4-D 进行处理的试验组,500 mg/kg 处理组表现的切口愈合率最高,而经 IBA 诱导处理的插穗,在浓度 1 000 mg/kg 时有较高的伤口愈合率,且高于 2,4-D 500 mg/kg 处理组。此外,试验中还发现,用 IBA 处理过的插穗,叶柄基部膨大明显,愈伤组织多产生于叶柄下方;而用 2,4-D 处理的穗条,叶柄基部膨大不明显,愈伤多围绕切口四周,且皮孔处多有愈伤产生(图 3)。

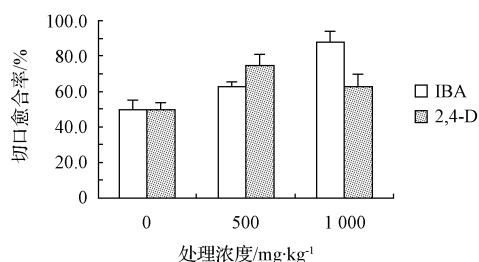


图 2 不同外源激素种类对“香玲”核桃切口愈合率的影响

Fig. 2 Effect of different hormones on the wound healing rate of *Juglans regia* 'Xiangling'

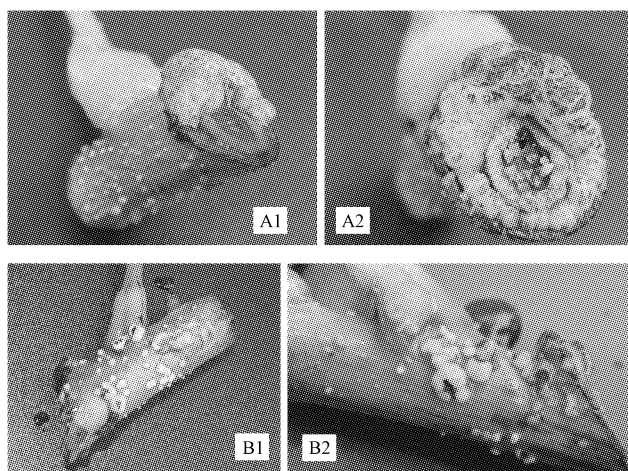


图 3 IBA 与 2,4-D 处理插穗产生愈伤情况

注:A1,A2 为 IBA 处理;B1,B2 为 2,4-D 处理。

Fig. 3 Callus formation situation under IBA and 2,4-D treatment

Note: A1, A2: IBA treatment; B1, B2: 2,4-D treatment.

### 2.3 不同浓度 IBA 处理对“香玲”核桃嫩枝扦插的影响

2.3.1 对穗条基部愈伤组织产生量的影响 由图 4 可知,IBA 诱导效果较好,且较稳定。但是不同处理浓度试验结果差异显著。IBA 浓度为 900~1 200 mg/kg 时,插穗基部更易产生愈伤组织,更有利于伤口的愈合。其中 900 mg/kg IBA 处理组愈伤产生量最多,平均每插穗 0.2712 g,是对照组的 18.7 倍。在浓度分别为 900、1 500 mg/kg 时,插穗有不定根产生,而且都是皮孔部位生根,



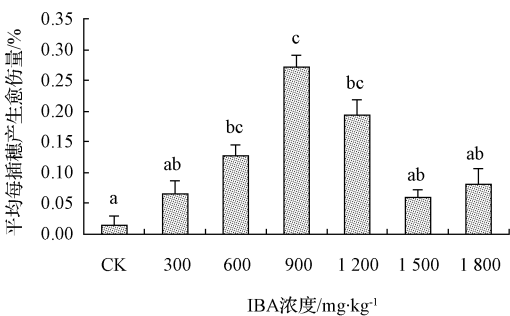


图 4 不同浓度 IBA 对“香玲”核桃插穗愈伤组织产生情况的影响  
注:图中数据是各组数据的平均值±SD;不同字母表示在  $P=0.05$  水平上差异显著。  
Fig. 4 Effect of different concentrations of IBA treatments on the callus formation situation  
Note: Data are Mean±SD; different letters respect significant difference at 0.05 level.

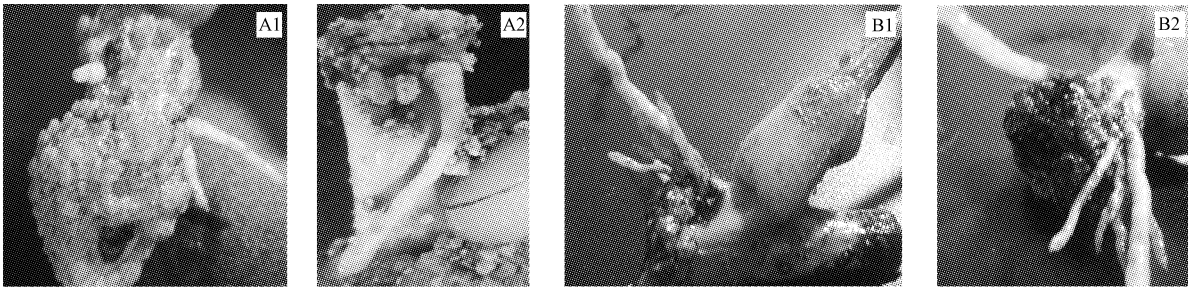


图 5 经 IBA 处理后香玲核桃插穗不定根的产生情况  
Fig. 5 The situation of adventitious roots generation under IBA treatment  
注: A1、A2 是 IBA 900 mg/kg 处理组; B1、B2 是 IBA 1500 mg/kg 处理组。

而非切口生根(图 5)。

2.3.2 对扦插后叶片中内源激素含量的影响 内源激素是植物体内天然存在的有机化合物,虽然含量很低,但它们与植物生长发育关系密切,影响着植物生命活动的整个过程。在植物愈伤组织培养中,外源激素起着传递遗传物质的脱分化、再分化等发育信号的作用,而外源激素的作用效果与外植体以及愈伤组织本身内源激素的种类和水平有密切关系,外源激素必须通过内源激素才能发挥其作用<sup>[6]</sup>。从表 2 可以看出,低浓度 IBA 处理的插穗中 IAA、IBA 含量相对较高,而在高浓度 IBA 处理的愈伤中二者含量反而降低了,这可能是高浓度的 IBA 超过了促进植物产生愈伤组织的阈值,对其引起了

抑制。在 900、1 200 mg/kg IBA 处理组中,愈伤组织产生量最多,ABA 含量也较其它处理组高,分析认为 ABA 可以提高核桃组织再生能力,ABA 在植物组织培养中的作用已有过研究报道,ABA 处理能提高松树植株再生率<sup>[7]</sup>;在培养基中补充外源 ABA 能够提高小麦胚性愈伤组织的发生频率<sup>[8]</sup>;小麦中胚性愈伤组织发生能力强,外植体唯一的特点是脱落酸含量较高<sup>[9]</sup>。愈伤组织的分化不是单纯某一种或某一类激素作用的结果,是通过多种内源激素平衡调控来实现的。

### 3 结论与讨论

试验发现,插穗以 3~5 cm 为最适宜长度,既能保证良好的通风透气条件,又可以减轻基部变黑霉烂的现

表 2 不同浓度 IBA 处理对“香玲”核桃插穗愈伤组织内源激素含量的影响

Table 2 Effect of different concentrations of IBA treatments on endogenous plant hormones levels in hardwood

处理浓度 /mg·kg <sup>-1</sup>	IAA 含量 /×10 <sup>-3</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	IPA 含量 /×10 <sup>-3</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	IBA 含量 /×10 <sup>-3</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	ABA 含量 /×10 <sup>-5</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	GA 含量 /×10 <sup>-5</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	ZT 含量 /×10 <sup>-5</sup> mg·kg <sup>-1</sup>	6-BA 含量 /×10 <sup>-5</sup> mg·kg <sup>-1</sup>
600	4.58±0.39	19.63±2.54	16.84±1.72	138±11.21	2 406±65.9	211±20.19	394±34.67
900	3.48±0.31	35.22±3.57	12.80±0.93	235±17.65	654±32.11	595±45.24	703±39.21
1 200	1.36±0.24	28.31±1.98	6.19±0.56	341±32.8	508±42.04	246±22.41	163±10.09
1 500	2.38±0.29	31.40±2.89	7.87±0.45	93±1.02	532±28.20	276±18.06	162±13.21
2 100	1.03±0.17	12.21±1.09	3.23±0.24	76±0.56	838±36.11	146±10.21	242±19.07

象。穗条达到半木质化及以上水平,切口为平滑斜面,更有利于伤口的愈合。试验中还发现,插穗的粗度也是影响切口愈合率的一个因素,分析原因可能是与自身养分供给有关,粗度适宜的枝条木质化程度高、所含养分较多。常军等<sup>[10]</sup>在利用根段作插穗时,也发现养分物质积累多的枝段,其再生能力的表现会更好一些,具体机制有待进一步的试验探讨。

该试验证明,在7月上旬进行核桃嫩枝扦插,有更高的切口愈合率,基部有不定根产生。在5月份扦插,没有观测到愈伤组织的产生,而且插穗上下切口处,都出现了变黑腐烂现象,分析原因是穗条成熟度不够,离体插条不足以自身提供养分。而在8月份的调查中,切口处产生的愈伤很小,而且多已变黑,插穗上下端切口都有腐烂变黑现象,这一现象可能是外界高温高湿的天气所致。

与其它外源激素相较而言,选用适宜浓度的吲哚丁酸(IBA)并辅以适度水分管理诱导生根效果较好,能显著提高切口愈合率,促进不定根的产生,效果理想。而库尔班·苏来曼等<sup>[11]</sup>在室内扦插发现,生根粉的生根效率比萘乙酸、吲哚丁酸和纯水都高,这可能是因为不同的扦插时间在不同的试验条件下,外源激素的诱导效果不尽相同。试验中还发现,用2,4-D处理过的穗条,皮孔处大多有产生愈伤的现象,而且上下端切口处的愈伤组织多是均匀围绕在四周,而不是叶柄下方最多,分析原因可能是不同种类外源激素在穗条内的分布位置不同。不同浓度的IBA处理对插穗内源激素含量有显著影响,这说明插穗内源激素的动态平衡调控着嫩枝扦插不定根发生过程。

目前,对于添加外源激素是否能刺激或抑制某些内源激素的变化,以及外源激素是否必须通过内源激素来发

生作用等尚未明确<sup>[12]</sup>。这是因为酶联免疫和液相色谱或质谱法等激素测定方法对样品量的要求较大,不能检测出较少细胞团之间的细微差异,加之取样条件难以控制等,从而影响了内源激素动态的精准研究。但是上述问题的解决,对愈伤组织培养却有重要的指导意义<sup>[13]</sup>。

### 参考文献

- [1] 余光英. 核桃优良实生子代遗传性状的研究[J]. 贵州林业科技, 1995, 23(3): 7-16.
- [2] 裴东. 核桃等树种不定根发生及其无性繁殖[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
- [3] 郭志民, 王青龙, 徐虎智, 等. 核桃嫩枝扦插技术试验研究[J]. 河南林业科技, 2009, 29(1): 9-10.
- [4] 耿国民, 周久亚, 朱灿灿. 薄壳山核桃扦插繁殖技术初报[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 249-250.
- [5] Hackett W P. Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants[J]. Horticultural Review, 1985(7): 109-155.
- [6] 颜吕敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [7] Reberts D R. Absciscic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce[J]. Plant Physiology, 1991, 83: 247.
- [8] Brown C, Brools F J, Pearson D, et al. Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid[J]. J Plant Physiology, 1989, 133: 727.
- [9] Victor M J, Bangerth F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic in wheat[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2001, 67: 37.
- [10] 常军, 姚小华, 王开良, 等. 美国山核桃根段育苗试验[J]. 浙江林业科技, 2009, 29(3): 61-63.
- [11] 库尔班·苏来曼, 阿衣古力·阿不都瓦依提, 阿布莱克·尼牙孜, 等. 不同生根剂对四种核桃扦插成活率和根数的影响[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(9): 1657-1661.
- [12] 肖关丽. 植物组织培养过程中内源激素研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2001, 16(2): 136.
- [13] 李代丽, 康向阳. 植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 546-548.

## Effect of Different Softwood Cutting Treatments on the Tissue Regenerating Ability of *Juglans regia* 'Xiangling'

YU Yan-ping<sup>1</sup>, HAN Shan-feng<sup>2</sup>, ZHAO Deng-chao<sup>3</sup>, LU Yi-zeng<sup>4</sup>, HAN Chuan-ming<sup>2</sup>, HOU Li-qun<sup>3</sup>

(1. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014; 2. Fangqian Junior Middle School in Junan, Junan, Shandong 276617; 3. Shandong Academy of Forestry Sciences, Jinan, Shandong 250014; 4. Shandong Forest Tree Plasm Protection Centers, Jinan, Shandong 250014)

**Abstract:** Taking 5-year-old *Juglans regia* 'Xiangling' as material, the effect of different hormones and different times on its tissue regenerating ability were studied under the full sunlight and automatic intermittent spraying conditions. The results showed that walnut grew rapidly from May to August, and the cutting effect in early July was the best. IBA treatment was better than 2, 4-D treatment for callus induction. IBA 900 ~ 1 200 mg/kg was the most optimal concentration, what's more, IBA 900, 1 500 mg/kg can induce to grow roots. Different concentrations of IBA treatments had a significant impact on endogenous plant hormones levels in hardwood.

**Key words:** *Juglans regia*; softwood cutting; callus; IBA