

核桃试管苗生根的研究进展

李春燕, 肖 蓉, 张拥兵, 王国平, 田建保

(山西省农科院 果树研究所, 山西 太谷 030815)

摘 要:核桃试管苗生根一直是核桃品种组培快繁的瓶颈, 研究核桃试管苗生根问题对核桃组培工厂化育苗具有重要意义。该文主要综述了核桃试管苗的生根原理, 重点从外植体、培养基、培养条件 3 个方面分析了核桃试管苗生根的影响因素, 最后对进一步的研究提出了建议, 并指出了在核桃试管苗生根研究中需要注意的问题。

关键词:核桃; 试管苗; 生根

中图分类号:S 664. 103. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2013)01—0190—04

核桃无性繁殖一直是困扰核桃发展最为突出的问题, 常规扦插生根难, 嫁接成活率不稳定, 繁殖系数低, 形成长枝的能力差, 接穗量远远不能满足嫁接需要^[1]。试管培养具有遗传稳定, 繁殖系数高, 条件可控制, 繁殖率稳定等特点, 已被广泛地应用到植物的繁殖实践中。核桃富含抑制其生根的单宁、黄酮醇、胡桃醌、香豆酸等物质, 所以, 与其它树种相比, 核桃试管苗生根比较困难, 且所生根系发育不良, 吸收功能弱, 植株移栽后不易成活, 核桃试管苗生根成为制约核桃组培工厂化育苗的关键问题。从 20 世纪 80 年代初核桃试管繁殖研究以来, 试管嫩茎生根问题一直没有得到很好的解决, 进入 20 世纪 90 年代, 在生根研究方面虽然获得了一定的进展, 但采用的外植体多为幼态组织, 对于成龄品种的试管繁殖却少见报道^[2]。裴东等^[1]自 1992 年开始, 通

过两步诱导生根和嫩茎外植体的选择等, 成功地诱导了几个核桃品种的试管嫩茎生根。但由于核桃品种间生根能力和潜能差异较大, 其生根条件也各有区别, 所以探索核桃试管苗生根原理和影响因素很有必要。现就核桃试管苗生根原理和影响因素进行了综述, 以期核桃试管苗生根研究提供理论依据和参考。

1 生根机理

木本植物生根根据发生方式的不同可分为直接器官发生和间接器官发生, 核桃属于后者, 即愈伤组织中的拟分生组织细胞脱分化, 而后进行有序分裂, 分化出根原基, 然后进一步发育成根^[3]。

在木本植物试管苗的生根过程中, 根原基的形成是十分重要的。根原基可分为潜生根原基和诱生根原基 2 种类型, 核桃属于诱生根原基, 即其不定根的发生必须从诱导根原基开始^[3]。王清民等^[4]研究表明, 核桃不定根根原基起源于形成层, 尤其是髓射线正对的形成层部分; 不定根上的侧根起源于中柱鞘细胞; 整个不定根的发生过程属于单位点发生; 不定根的发生始期在生根诱

第一作者简介:李春燕(1979-), 女, 硕士, 研究实习员, 现主要从事核桃组织培养等研究工作。E-mail: lchy6286404@163.com.

基金项目:山西省留学基金委资助项目(晋留管办发[2009]9 号)。

收稿日期:2012—08—20

Industry Situation and Development Strategy of Heze City Features Fruits and Vegetables

GAO Xiao-ling

(Department of Resource and Environment, Heze College, Heze, Shandong 274000)

Abstract: Characteristics of fruits and vegetables production has become an important way of increasing farmers' income in Heze City, Heze County agricultural economy and efficiency, sustainable development is of great significance. To meet the increasing market demand for consumption, the the Heze stronger characteristics of vegetable industry to achieve new breakthroughs in the characteristics of fruits and vegetables industry, is the subject of the Heze agriculture faces a. In this paper, for the the Heze characteristics of fruits and vegetables industry status quo and problems, the development of countermeasures proposed Heze City, the characteristics of fruits and vegetables industry.

Key words: Heze City; features fruits and vegetables; strategy

导 6 d 左右。核桃不定根的形成过程是一系列细胞和组织有序分化、顺序性累积的过程,包括诱导期,根原基发端期,根的发育和伸长期 3 个阶段^[3],每个阶段各有其生理生化特征与相应调控因子,这些因子包括基因型、幼态性、生长调节物质、酚类化合物、外植体发育状态、过氧化物酶活性、光周期、光强和光质等^[1,5]。

2 影响因素

2.1 外植体

2.1.1 基因型 基因型是决定核桃试管苗生根的一个重要因素。品种不同,基因型不同,其生根能力或生根潜能的表达也存在较大差异,表现在不同树种和品种个体间发生不定根的能力差异悬殊。奇异核桃的生根率较高,而其它品种的核桃生根率一直较低且不稳定^[2]。一些难生根的植物通过生长素基因转移可明显提高生根率^[6],所以,通过转基因手段把目的基因转入新品种促进核桃试管苗生根,是一个值得研究的方向。

2.1.2 外植体生理和发育状态 核桃外植体的生理和发育状态是影响其生根的一个重要因素。根的生成与植物的幼嫩状态、自身营养及激素水平有关。幼嫩的外植体更容易发根,而且根能有效地保持植物的幼态^[5]。把成龄核桃树带芽的茎段,通过组培多次继代复幼,可起到促进生根的作用;继代次数越多,越容易生根^[7-8]。裴东等^[1-2]以 6 个早实核桃(*Juglans regia* L.)新品种为试材,对长期继代培养的试管嫩茎的生根进行了研究,采用两步诱导生根法,即黑暗条件下,在含有 IBA 的 DKW 培养基中诱导一定时间,而后转移至不含 IBA 的 DKW 蛭石培养基中光照培养,获得了 65%~89.7% 的生根率,平均根数 2.0~3.6;获得较高试管苗生根率的主要原因可能是试验材料经过了 4 a 继代培养,使嫩茎得到了不断幼化;因此,裴东等^[1-2]认为,探索核桃试管苗生根继代复幼临界期很有必要,长期的继代使成龄树嫩茎复幼进而提高生根率的机制也需进一步研究。

核桃试管苗的自身营养及激素水平是决定试管苗生根的关键因素,培养基中大量元素 N、P、K 的浓度及形态配比直接影响着无根苗的质量,进而影响着不定根的诱导^[9-10]。只有生长旺盛健壮的组培芽苗才能诱导生根,所以诱导生根的潜力与其内在生理生化状态存在密切关系^[11]。综上所述,核桃试管苗要选择幼嫩、自身营养及激素水平高的材料作为外植体,才更有利于其生根。

2.2 培养基

2.2.1 生长调节剂 生长素是核桃试管苗根诱导尤为重要影响因子,在根原基形成阶段起着决定性的作用。生长素影响酶的活性,可以调节细胞分裂周期,实现细胞的有序分裂,增加原生质透性,降低原生质粘性,使代谢活动加快,核糖核酸加强,这一系列重要生理生

化变化有利于不定根的发生和生长^[12]。Mohammed 和 Eriksen 认为 IAA 是根原基形成的“触发器”,Jan 和 Nanda 分析,IAA 对生根的促进作用很可能在于 IAA 解除了对 mRNA 合成的基因抑制,诱导 mRNA 的合成,从而产生根所需要的酶蛋白^[13]。不同的生长素对核桃生根诱导效果不同。通常用于核桃不定根诱导的生长素类物质为 IBA 和 NAA,IBA 比 NAA 效果显著。IBA 在核桃的生根中是不可缺少的,IBA 可以增加分生组织细胞的活性并促进根发端信息的表达。IBA 诱导不定根的主要方式是通过转化为 IAA 而起作用的,外源 IBA 均可诱导核桃嫩茎的内源 IAA 和 ABA 升高,改变嫩茎内源激素平衡状况,进而促进不定根的发生^[1,6]。不定根的发生过程不仅取决于生长素的含量,还涉及到激素间的平衡。IAA 和 ABA 含量由于受多种因素的影响,变化幅度较大,但二者的比值变化较小。IAA/ABA 比值的高低反映着离体器官的幼化程度,其动态变化也是反映生根能力的重要指标,在一定范围内比值高,有利于不定根的发生^[2]。臧运祥等^[14]、姬惜珠等^[15]、吴玉霞等^[16]分别在苹果、柿树上对试管苗进行了激素组合处理,发现组合处理比单种激素处理生根率高,效果好。所以,从激素平衡角度研究核桃试管苗生根具有重要的意义。在核桃试管苗不定根的生成中,对生长调节剂的研究是最多的。生长调节剂是启动组织器官分化最灵敏的元素,通过改变内源 IAA 和 IAAsp(IAA-aspartate)的含量而对组培苗生根起诱导作用。生长调节剂不仅直接调节 IAA 氧化酶,抑制 IAA 氧化的水平,还可以间接地诱导产生生长素保护剂,即一些高分子量的物质,从而调节植物形态发生^[3,12]。对于核桃试管苗生根,有一步法和两步法。一步法即试管苗一直在添加有生长素的培养基中培养;两步法是试管苗在一种培养基中生根诱导一定时间,然后转入不含生长素培养基中继续培养。采用一步法效果较差,因为核桃对生长素类物质较为敏感,对其茎基部采用较高浓度的生长素进行长时间的处理,会使其肿大并产生愈伤组织,这种从愈伤组织处产生的根系与茎的输导系统不相通,不利于芽苗的生长,甚至会使根脱落;若降低所用生长素浓度,又几乎没有不定根发生。对核桃试管苗采用高浓度生长素短期处理,然后在无生长素的培养基中继续培养,其生根效果比一直采用低浓度生长素处理的好,且根部愈伤化程度小。其原因可能是根原基的发端需要较高浓度的生长素,在诱导期,生长素累积到一定程度便刺激根发端,而根原基的伸长和生长则可以在没有外源生长素环境下完成^[1,11]。裴东等^[1]、张建成^[5]分别运用两步生根法,成功地诱导了核桃试管苗生根,生根率达 65%~89.7% 和 60% 以上。国外也有运用两步法成功诱导核桃杂种试管苗生根的报道^[17]。两步法在其它难于诱

导生根的树种(如扁桃、樱桃矮砧等)上也得到了成功^[18-19]。因此,核桃试管苗生根宜采用两步法。

2.2.2 无机和有机营养成分 无机盐是通过改变外植体的营养状况间接来调节其生根的。一般而言,试管苗生根均需要在低盐浓度培养基中进行,这是因为盐浓度变化会导致培养基渗透压变化,从而影响试管苗对营养吸收和向培养基中释放物质^[20]。生根培养基中大量元素含量减半的培养基可显著促进试管苗的生根^[21-22]。田爱梅^[23]对实生核桃茎段在无机盐浓度降低一半,即1/2改良DKW+IBA+维生素C中暗培养7d进行生根诱导,然后转入1/2改良DKW+AC 2 g/L中继续培养,生根率可达53.5%。矿质营养之间作用关系非常复杂,元素之间相互拮抗和促进。刘彤等^[24]研究得出,香梨生根一方面受到 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的正向作用,同时受高浓度 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子的抑制,所以在优化核桃试管苗生根培养基时,将矿质营养的梯度交互试验与植物营养成分分析结合非常必要。有机营养成分是指植物生长发育时所必需的有机碳、氢、氮等物质,主要有糖、维生素、肌醇、氨基酸等。在植物组织培养中,试管苗生根所需的碳源主要是蔗糖,其浓度多数采用低浓度^[8]。培养基中蔗糖不仅提供碳源,而且也影响培养基的渗透势,进而影响试管苗的生长和根系发育。

2.2.3 活性炭(AC) 一般活性炭和生长素一起使用。作为组培中常用的活性炭在诱导生根方面具有两面性,一方面可吸附培养基中的非极性物质和色素等有害物质,有效地减少生长素在诱发生根后的副作用,促进不定根的生长并避免严重的切口愈伤化;另一方面也因吸收生根所必需的生长素和其它营养物质而对生根有抑制作用^[20]。田爱梅^[23]对核桃试管苗运用两步法,即在1/2改良DKW+IBA+维生素C中暗培养7d,然后转入1/2改良DKW+AC 2 g/L中继续培养,生根率可达53.5%。而在其它果树(如李、榉榉)上,AC对生根起促进还是抑制作用研究结果不一^[25]。所以,AC对核桃不定根的生成起促进还是抑制作用有待进一步研究。

2.2.4 多胺和酚类物质 多胺在一些植物根诱导中起着重要作用。许多研究表明,外施多胺(尤其是腐胺)有利于不定根的发生。多胺腐胺在生根过程中的变化规律与生长素相似,外源生长素在根出现之前可促进内源多胺的积累。在一定范围内单独使用腐胺能促进不定根的发生,一些木本植物往往通过外施多胺来解决生根难这一问题。目前,对多胺在生根形成过程中的作用机理还不明确,需要进一步深入研究探讨。有研究显示^[3],邻位酚类化合物对组培苗生根有促进作用,是它们与生长素相互作用的结果。

2.2.5 琼脂和 pH 琼脂在离体生根中用来充当支持物,其生理作用表现较弱,但其浓度的高低通过影响培

养基的硬度,进而影响试管苗的生根。降低琼脂浓度有利于对营养物质的吸收,但会增加培养基中的水分蒸发^[25]。培养基 pH 值影响试管苗的生长和增殖,自然影响到根系的生长。

2.3 培养条件

2.3.1 暗处理 暗处理对核桃试管苗生根是必需的,其原因是暗处理可以降低 POD(过氧化物酶)的活性,增加生长素保护剂的水平,从而提高生长素的浓度^[1]。暗处理时间对核桃试管苗不定根形成具有重要的影响,不同品种、不同处理方法需要的暗处理时间也不同^[1,5,23]。暗处理时间过长,会使试管苗出现黄化、衰老、落叶及产生愈伤组织等,对不定根的发生产生不良影响。刘进平等^[26]、Rugini 等^[27]在扁桃上的相关研究显示,暗处理的有效部位为无根苗基部^[26-27]。郑红军^[28]在中国樱桃抗病毒优系 39 号试管苗的培养基中滴加碳素墨水可大大地促进了中国樱桃试管苗根的发生,这与试管苗基部遮光是同样的原理。无论是基部遮光处理还是完全遮光处理,根本目的是在试管苗嫩梢发根初期给根端一个黑暗条件,所以,核桃试管苗生根暗处理有效部位值得深入研究。有研究表明,暗处理和 IBA 诱导有互补作用,IBA 浓度低时,适当延长暗培养时间可提高生根率,而 IBA 浓度较高时,直接光培养便可获得高的生根率^[7]。另外,李胜等^[25]对容易生根的梨品种‘Conference’生根进行了研究,结果发现它在白光、蓝光和红光下无外源生长素诱导也能生根,但在远红光和黑暗下无不定根发生,说明光敏色素系统参与了根的形态发生。由此看来,光质是否也对核桃试管苗生根有影响有待进一步研究。

2.3.2 温度、湿度与通气 试管苗在生根培养基中生根,要求一定的适宜温度,一般在 16~25℃,过高过低均不利于生根。湿度和通气对生根的影响没有系统研究。温度、湿度与通气虽然不是影响核桃试管苗生根的主要因素,但在优化其生根条件时也不可忽视,需要摸索其最佳条件。

3 展望

核桃试管苗生根难一直是核桃品种组培快繁的瓶颈,已有的研究多集中在生长调节剂和暗处理上。因此应从以下几方面加强研究。一是各种激素间(尤其是 IAA/IBA)的动态变化是反映生根能力的重要指标,暗处理对核桃试管苗不定根生成具有重要的影响,且有研究表明,暗处理和 IBA 诱导有互补作用,因此作者建议把试管苗暗处理和激素处理相结合,尤其要考虑到各因素的互作效应,探索核桃试管苗暗处理时间、激素种类和浓度的最佳组合条件,达到核桃试管苗的最佳生根效果。二是由于不同品种核桃试管苗生根能力和潜能的表达存在较大差异,且有报道,一些难生根的植物通过

生长素基因转移可明显提高生根率^[2],所以从基因水平探索其造成差异的原因,通过转基因手段把目的基因转入新品种促进核桃试管苗生根是个值得研究的方向。三是核桃试管苗生根暗处理有效部位和有效累积量等问题需进行深入研究。四是虽然有关有机营养成分、多胺、酚类物质、琼脂、光质、pH、温度、湿度与通气对核桃试管苗生根影响的研究未见报道,但它们在植物试管苗生根中均起着重要的作用,在其它果树上也有很多相关研究,所以上述指标在核桃试管苗生根中的影响值得进一步研究探讨。

在核桃试管苗生根的研究中,还应注意以下三方面。一是核桃试管苗要选择幼嫩、自身营养及激素水平高的材料作为外植体,才更有利于生根。二是核桃试管苗生根宜采用两步法。三是在研究无机营养对核桃试管苗不定根生成的影响时要考虑到元素间的相互促进与拮抗作用。

参考文献

- [1] 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(2):32-37.
- [2] 裴东.核桃不定根发生调控机制与蛋白组学探讨[D].北京:北京林业大学,2004.
- [3] 裴东,袁丽钗.核桃等木本植物不定根发生的研究进展[A].中国园艺学会干果分会成立大会暨第二届全国干果生产与科研进展学术研讨会论文集[C].2001:234-235.
- [4] 王清民,彭伟秀,吕保聚,等.核桃试管不定根的组织学研究[J].西北植物学报,2006,26(4):719-724.
- [5] 张建成.核桃试管苗生根培养的研究[J].河北林果研究,2005,20(4):364.
- [6] 邹朋波.核桃微体繁殖的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [7] Morgan C S, Carmen S M. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut[J]. Journal of Horticultural Science, 1997, 72(3):433-443.
- [8] 邱运亮.提高植物试管苗生根率的技术与方法[J].中国种业,2004(5):28.
- [9] 张继涛.植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2006:88-99.
- [10] 克黑默尔 P T,考兹洛夫斯基 T T.木本植物生理学[M].北京:中国林业出版社,1983:307-310.
- [11] 吕守芳,闫爱玲,吴燕民,等.核桃离体繁殖技术[J].经济林研究,2004,22(1):14.
- [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):257.
- [13] 钟士传,刘琳.欧李试管苗生根与移栽技术的研究[J].西北农林学报,2005,14(4):88.
- [14] 臧运祥,郑伟尉,达克东,等.生长素对乔纳金苹果试管苗生根的影响[J].石河子大学学报,2004,22(3):201.
- [15] 姬惜珠,张爱军,王红,等.不同调节剂处理对柿树试管苗繁殖与生根的影响[J].河北农业大学学报,2005,28(4):35.
- [16] 吴玉霞,常永义,张有富,等.两种生长素对“粉红佳人”苹果脱毒试管苗生根的影响[J].甘肃农业大学学报,2008(6):77-78.
- [17] Jay-allmend C, Peng S, Capelli P, et al. Micropropagation of hybrid walnut trees; some factors involved in rooting[J]. Acta Horticulturae, 1993, 311: 117-124.
- [18] 张利彩,郭春会,孙占育.普通扁桃试管苗生根培养研究[J].西北农业学报,2008,17(2):188-192.
- [19] 任凝辉,叶霞,夏国海.樱桃矮砧试管苗生根技术研究[J].河南科学,2002,20(3):263.
- [20] 汤浩茹,刘翠琼,罗娅.培养基和培养条件对4个梨基因型试管苗生根的影响[J].果树学报,2006,23(2):283-286.
- [21] 黄文江,周守标,马锋旺.甜樱桃矮砧木试管苗离体生根条件的优化[J].南京林业大学学报,2005,29(5):53.
- [22] 李春燕,肖蓉,张拥兵,等. IBA 和暗处理对核桃试管苗生根影响的研究[J].山西林业科技,2010,40(4):30.
- [23] 田爱梅.实生核桃茎段的组织培养及其影响因子的研究[D].太原:山西农业大学,2001.
- [24] 刘彤,赵新俊,任丽彤,等.新疆香梨试管苗最佳生根培养基研究[J].果树学报,2004(2):124-127.
- [25] 李胜,杨德龙,李唯,等.植物试管苗离体生根的研究进展[J].甘肃农业大学学报,2003(4):378.
- [26] 刘进平,曹孜义,李唯,等.扁桃试管苗生根培养的研究[J].甘肃农业大学学报,2001(2):135-139.
- [27] Rugini, Verma. A simple in vitro method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees [J]. Acta Horticulture, 1988, 227: 438-440.
- [28] 郑红军.黑色培养基促进中国樱桃试管苗生根的研究[J].落叶果树,2001(4):6.

Research Progress on Rooting of Walnut Plantlet

LI Chun-yan, XIAO Rong, ZHANG Yong-bing, WANG Guo-ping, TIAN Jian-bao
(Institute of Pomology, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taigu, Shanxi 030815)

Abstract: Rooting difficulty to walnut plantlet is always bottlenecks of tissue culture and rapid propagation, rooting of walnut plantlet has important significance to industrial seedling of walnut tissue culture. The theory and influence factors (explants medium and culture condtion) of rooting of walnut plantlet were reviewed, further research were suggested as well, Meanwhile, some problems worth emphasizing in the process of rooting of walnut plantlet were pointed out.

Key words: walnut; plantlet; rooting