

核桃试管嫩茎生根的形态结构及激素调控研究

王清民¹ 彭伟秀² 张俊佩¹ 裴 东^{1*}

(¹中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局森林培育重点实验室, 北京 100091; ²河北农业大学园林与旅游学院, 保定, 071000)

摘 要: 以核桃品种‘新早丰’试管嫩茎为试材, 对其诱导生根过程中的形态结构及相关的生长素(IA)和脱落酸(ABA)变化进行了研究。证实诱导生根过程中核桃嫩茎不定根原基发生于形成层, 特别是髓射线正对的形成层部分; 根原基起始分化期为诱导第6天左右, 伸长期是第10天; 如果12 d之后仍放在诱导培养基中, 生根率下降, 并且出现茎基愈伤化、茎尖变黑和叶片脱落等现象; 若生根诱导10 d后转入无植物生长调节剂培养基, 培养5 d左右可见根尖突出表皮, 根系发育正常; 同时与不定根形态发生相应的内源IA和ABA的变化是根原基的发生期和伸长期, 内源IA出现高峰, 内源ABA呈上升趋势, IA/ABA值在根原基的发生前为最大, 随后降低。本研究不仅从形态结构证实了二步生根法的合理性, 而且从生理学角度阐述了不定根发生的IA/ABA调控机制。

关键词: 核桃; 试管嫩茎; IA; ABA; 不定根; 解剖构造

中图分类号: S 664.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 02-0255-05

Histological and Hormonal Characters during the Rhizogenesis of in Vitro Walnut Shoots

Wang Qingmin¹, Peng Weixiu², Zhang Junpei¹, and Pei Dong^{1*}

(¹Key Laboratory Silviculture, the State Forestry Administration the Research Institute of Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ²College of Gardens and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: Histological characters and the modification of endogenous IA and ABA during the rhizogenesis of walnut shoots were investigated with in vitro cultivar of Xinzaofeng (*Juglans regia* L.). It was identified that the adventitious root primordia of in vitro shoot originated from the vascular cambium cells, especially, the cross areas of cambium and pith ray and they started to differentiate at the 6th day and lasted to the 10th day. If the shoots were cultured in the root inducing medium for 12 days, led to not only descend of rooting rate, but also the damaged plantlets, showing black shoot tips, callus of stem base, and leaf senescent. However, if they were transferred into the medium without hormone in time, the root primordial protruded the epidermis and developed normally after 5 days culture. It was also found that when the adventitious root primordia formed and lengthened, endogenous IA concentration reach the peak and ABA was still increasing. The rate of IA and ABA was maximum before the adventitious root primordium forming, afterwards, it decreased. The research not only confirmed that the two steps method is reasonable for walnut rhizogenesis; but also expounded the mechanism of the hormone regulation during the induced rooting on the physiological level.

Key words: Walnut; In vitro shoot; Hormone; Adventitious root; Histology and morphology

植物组织培养作为工厂化育苗的重要手段已经得到广泛应用, 在常规的试管快繁过程中, 生根和移栽是决定能否进行大量生产和应用的关键环节。核桃是一种难于生根的经济林树种, 目前虽然在试管嫩茎生根研究方面已取得突破性进展^[1], 但是如何提高试管苗的生根和移栽成活率又成为了能否

收稿日期: 2005-04-22; 修回日期: 2005-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370234); 国家‘十五’攻关项目 (2004BA515B0602)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: peidu@forestry.ac.cn)

工厂化育苗的瓶颈问题, 针对该树种在试管中难以生根或根系发育不良, 吸收功能弱, 移栽后不易成活的特点, 我们从不定根发生、发育的形态解剖学和生根生理学, 特别是植物内源激素变化两方面入手, 阐述根系在发生发育过程中的变化机制, 为核桃及相关难生根植物发根研究提供科学理论和技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

核桃 (*Juglans regia* L.) 品种 ‘新早丰’ 无根试管苗及带根试管苗。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 基本培养基为 DKW, 继代培养基为 DKW 附加 1.0 mg/L BA 和 0.001 mg/L BA, 继代周期 20 d; 生根培养采用二步生根法: 第 1 步诱导生根培养, 培养基为 1/4DKW + 5mg/L BA, 暗培养; 第 2 步生根培养, 其培养基为 1/4DKW, 培养 14~20 d 后进行移栽; 转移培养的介质为蛭石、草炭土附加 DKW 大量元素营养液 (4 2 1.8), 光照强度为 1 800 lx, 移栽初期光照强度为 1 800~3 000 lx, 每天 16 h 光照和 8 h 黑暗。培养温度为 (25 ± 3) °C, 继代、生根诱导和生根培养均在 250 mL 圆柱状培养瓶中进行, 转移培养在直径为 10 cm 的营养钵中。

1.2.2 形态观察方法 用石蜡切片法^[2]研究试管嫩茎不定根发生过程中的组织学变化, 找出不定根的起源和发生时期。从诱导生根培养起, 每 2 d 取材 1 次, 每次取 6 株, 重复 3 次, 切取嫩茎基部 0.5~1.0 cm 长的茎段, 用 FAA 固定液固定 (固定时间 > 24 h), 然后用梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 转动切片机切片, 切片厚度 12 μm, 番红-固绿对染法染色, Olympus 显微镜观察并照相。

1.2.3 生长素 (IAA) 和脱落酸 (ABA) 测定 采用高效液相色谱进行分析。诱导生根培养初期每 1~2 d 取材 1 次, 5 d 以后每 2~4 d 取材 1 次, 直到培养的第 16 天; 每次取样量为 30 株, 充分混匀后用于分析, 重复 3 次。准确称取样品 1~3 g, 在研钵中剪细并加入 80% 冰甲醇 10 mL, 研细后转至 150 mL 三角瓶中, 再加 20 mL 80% 冰甲醇后加塞, 在超声波内振荡 2 h (不断加入冰块, 保证温度低于 4 °C), 过滤, 滤渣中再加入 20 mL 80% 冰甲醇, 摇匀后放置冰箱中过夜, 再过滤合并滤液。取 10 mL 滤液通过 Seppar C18 小柱, 弃去流出液, 用 2 mL 乙晴冲洗 Seppar C18 小柱, 收集洗出液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 待上 HPLC 分析。IAA 提取回收率大于 90%。

1.2.4 数据统计分析 数据由 SAS 系统中 AVOVA 程序进行统计分析, 按 Duncan's 新复极差分析进行多重比较, 如未特殊标记, 每处理 30~36 株嫩茎, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 诱导生根培养阶段外源 IBA 处理时间对生根的影响

二步诱导生根法, 极显著地提高了生根率和降低了嫩茎基部愈伤化发生, 是核桃品种生根的最好方法。但第 1 步生根诱导阶段的诱导时间, 也直接影响这根系的发生发育。结果 (图 1) 表明: 在 1/4 DKW 基本培养基中附加 BA 5 mg/L, 黑暗培养的嫩茎最佳处理时间为 10~15 d, 生根率为 73%~83%。时间太短和过长都对生根不利。时间短生根率低, 超过 12 d 不仅生根率略有下降更重要的是会出现茎基愈伤化, 茎尖变黑和叶片脱落现象, 对以后的移栽会造成不利的影响。

2.2 嫩茎生根过程中内源 IAA 和 ABA 含量的变化

核桃试管幼态嫩茎在 1/4DKW 附加 BA 5.0 mg/L 培养基中, 暗培养条件诱导生根。内源 IAA 和 ABA 测定结果见图 2。

从图 2 可以看出: 内源 IAA 的变化曲线峰呈尖顶型, 且呈双峰; 嫩茎最初 4 d 检测不到 ABA, 从第 6 天开始嫩茎 ABA 含量逐渐上升, 第 12 天达到高峰, 之后又下降; IAA/ABA 开始较低, 第 6 天升高为 1.53 μg/g, 第 8 天急剧下降为 0.124 μg/g, 原因是由于嫩茎内 ABA 含量提高得比较快的结果,

但随着诱导 11 d 试管嫩茎转移至无激素的 1/4DKW 生根培养基, 第 2 天 (即 12 d), IAA 和 ABA 又出现 1 次高峰, 之后又都很快降下来, 第 2 次高峰的出现由于伴随着培养基的转换和试管嫩茎的移栽, 还有待于进一步研究。

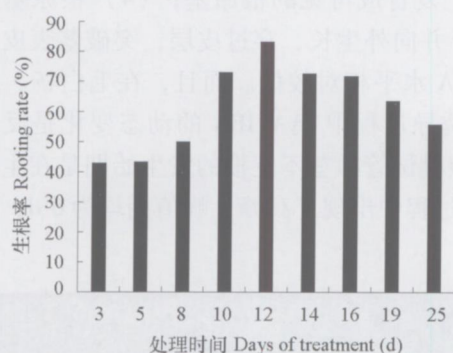


图 1 IBA 处理时间对核桃试管嫩茎生根的影响

Fig. 1 Impact of treatment time on in vitro shoot rooting of Xinzaofeng

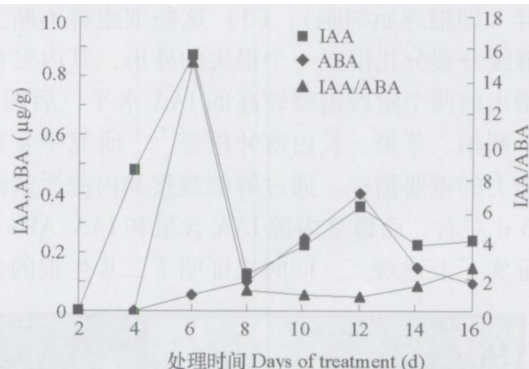


图 2 新早丰试管嫩茎在生根过程中 IAA、ABA 含量和 IAA/ABA 的变化

Fig. 2 Changes of IAA, ABA content and IAA/ABA in shoots inducing rooting of Xinzaofeng

2.3 核桃不定根原基的发生部位和发生时间

通过对核桃试管嫩茎生根过程的组织形态学观察发现, 试管苗嫩茎中不存在潜生根原基, 不定根原基属于诱生根原基类型。在诱导生根的过程中, 茎基切口处伴随有两部分的细胞发生分裂。一部分是在诱导生根 3 d 切口处皮层细胞处 (图 3, A), 6 d 后随着形成层细胞开始分裂, 它的分裂逐渐减弱, 皮层细胞的活动仅存在细胞分裂, 而未发现分化现象。另一部分是在形成层处, 第 5 天镜检形成层部位时, 还未发现分裂的迹象; 第 9 天镜检结果显示形成层细胞已经分裂 (图 3, B), 由原来的 6~8 层细胞增至 10~17 层细胞, 而此时细胞质浓, 细胞核位于中央, 核仁较大, 染色较深之后的镜检结果显示, 髓射线正对的形成层分裂最旺盛, 分别进行平周和垂周分裂, 形成一球形细胞团, 该细胞团继续分裂分化形成根原基轮廓 (图 3, C), 最后在根冠分泌物和机械压力的作用下, 不定根顺利的穿越韧皮部、皮层和表皮而长出茎外 (图 3, D、E)。

从形态学观察认为: 核桃的不定根原基起源于维管束形成层细胞, 特别是髓射线正对的形成层部分, 这与曹月华等在柚木^[3]、马俊红等在苹果^[4]、廖康等在葡萄^[5]、张晓平等在杂种鹅掌楸^[6]研究中发现的不定根起源于形成层一致, 属于诱生根原基, 而且是单位点发生, 所以核桃属于难生根树种; 不定根的发生始期应该是在生根诱导 6 d 左右。这个结果与茎内内源 IAA 含量和 IAA/ABA 在生根诱导过程中的峰值均出现在第 6 天是一致的。

3 小结

3.1 外源生长素诱导核桃试管嫩茎根的发生

自从 1934 年发现生长素吲哚乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (BA) 对植物插条生根的效应以后, 为研究插条的生根提供了有利的手段。外源生长调节剂可以改变内源激素的水平, 通过调节内源激素平衡进而对细胞分化和发育发挥作用。生长素具有调节细胞分裂周期实现细胞的有序分裂, 与根原基的发端密切相关。通常情况下, 用于不定根诱导的植物生长调节剂为 BA, BA 诱导不定根的主要方式是通过转化为 IAA 而起作用的。我们的研究再次证实了上述观点, 结果表明核桃试管嫩茎生根诱导培养 3~12 d 时, 生根率随培养时间的延长而提高, 超过 12 d 则生根率随之下降; 而且外源 BA 诱导核桃嫩茎的内源 IAA 和 ABA 升高, 改变了嫩茎原有的激素平衡, 进而促进不定根的发生。

3.2 核桃试管嫩茎不定根发生过程与内源激素变化的关系

关于木本植物根原基的发生部位和发育过程的观察首先是由 Bonchardat 发现和定名的, 其后经

Trcucl, Bortwick, Van Gravenies等相继证实, 是一种分生组织, 存在于枝条的髓射线和形成层交叉部位。本研究发现: 核桃的不定根原基起源于维管束形成层细胞, 特别是髓射线正对的形成层部分。

插条内不定根的发育过程可分为 4 个阶段: (1) 某些部位组织脱分化; (2) 转变为分生组织细胞群 (即根原始细胞); (3) 这些细胞群不断分裂和分化, 发育成可见的根原基; (4) 根原基内细胞继续分裂分化形成一个根尖的外形, 其内发育出维管束, 并向外生长, 穿过皮层, 突破茎表皮。同时指出前两个阶段需要较高的 IAA 水平, 后两个阶段需 IAA 水平相对较低。而且, 在毛白杨、北京杨、圆柏、苹果、长白落叶松等^[7~9]研究中发现, 在生根诱导过程中 IAA/BA 的动态变化是反映生根能力的重要指标。通过解剖观察和内源激素测定发现: 核桃试管嫩茎不定根的发生始期是在生根诱导 6 d 左右, 而嫩茎内源 IAA 含量和 IAA/ABA 在生根诱导过程中出现了高峰, 峰值期均为 6 d; 该结果证实了上述观点, 同时也证明了二步生根的合理性。

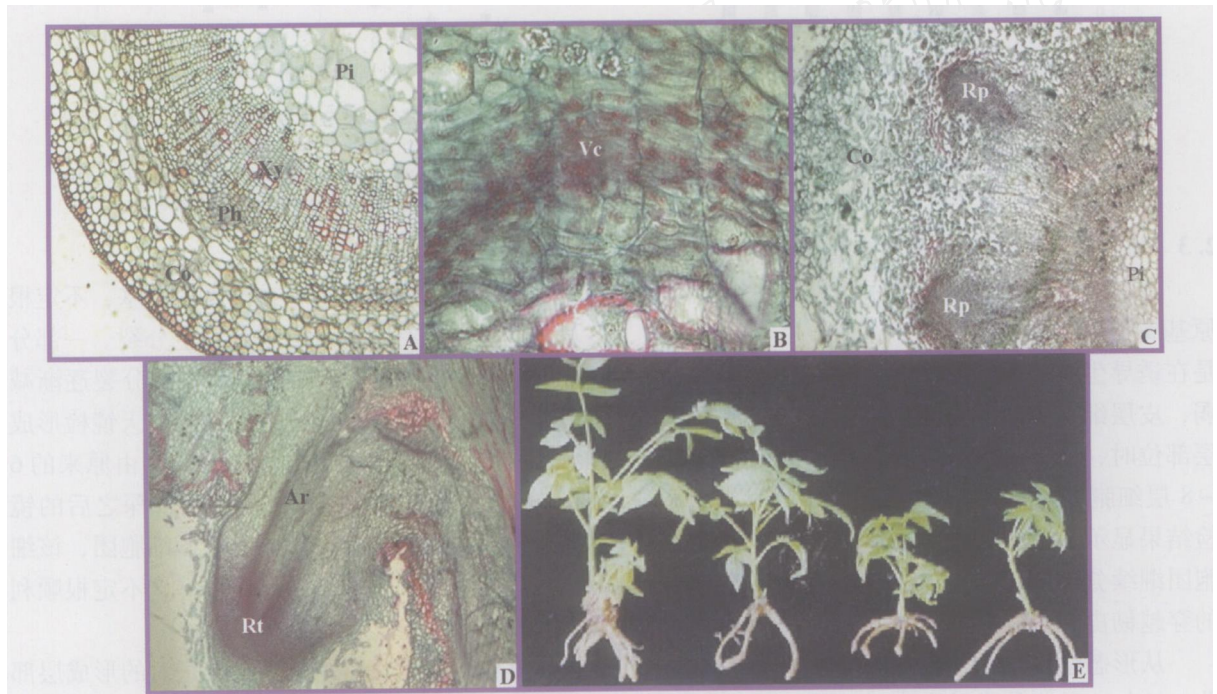


图 3 核桃试管嫩茎生根过程的解剖结构

A. 生根诱导 3 d, 皮层细胞发生分裂; B. 生根诱导 9 d, 形成层细胞分裂旺盛; C. 生根培养 3 d, 形成根原基轮廓; D. 生根培养 14 d, 不定根突出皮层; E. 试管生根苗。

Ar: 不定根; Co: 皮层; Ph: 韧皮部; Pi: 髓; Rp: 根原基; Rt: 根尖; Vc: 微管形成层; Xy: 木质部。

Fig 3 Histological structure of walnut shoot rooting

A. 3 d after root inducing, the cell of cortex differentiate; B. 9 d after root inducing, the cell of vascular cambium differentiate strongly; C. 3 d after rooting culture, from root primordia; D. 14 d after rooting culture, from adventitious root; E. Rooted shoot of xinzaofeng walnut cultivar

Ar: Adventitious root; Co: Cortex; Ph: Phloem; Pi: Pith; Rp: Root primordia;
Rt: Root tip; Vc: Vascular cambium; Xy: Xylem.

参考文献:

- 裴东, 袁丽钗, 奚声柯, 谷瑞升. 核桃品种试管嫩茎生根的研究. 林业科学, 2002, 38 (2): 32~37
Pei D, Yuan L C, Xi S K, Gu R S. Shoot rooting in vitro for walnut cultivars. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38 (2): 32~37 (in Chinese)
- 李正理. 植物组织制片学. 北京: 北京大学出版社, 1996. 130~142
Li Z L. Technology of plant tissue section. Beijing: Beijing University Publishing Company, 1996. 130~142 (in Chinese)
- 曹月华, 王保生. 柚木培养中诱导生根和移栽成活的研究. 植物学报, 1981, 23 (6): 434
Cao Y H, Wang B S. Study on the transplant and root induction of teak during culturing. Botany Gazette, 1981, 23 (6): 434 (in Chinese)

- 4 马俊红, 陈四维, 马宝, 吕增仁. 苹果试管苗不定根起源及其发育状况的研究. 河北农业大学学报, 1992 (4): 46~49
Ma J H, Chen S W, Ma B K, L ŪZ R. Study on the origination and development of adventitious root in plantlets of tissue-cultured apple. Journal of Hebei Agricultural University, 1992 (4): 46~49 (in Chinese)
- 5 廖 康, 刘全华, 田兴朴. 葡萄试管苗不定根发生发育的组织学和细胞学观察. 新疆农业大学学报, 1997 (3): 37~41
Liao K, Liu Q H, Tian X P. A study on histology and cytology of origination and development of adventitious root of grape plantlets in test-tube. Journal of Xinjiang Agricultural University, 1997 (3): 37~41 (in Chinese)
- 6 张晓平, 方炎明. 杂种鹅掌楸插穗不定根发生与发育的解剖学观察. 植物资源与环境学报, 2003, 12 (1): 10~15
Zhang X P, Fang Y M. Anatomical observation of the origin and development of adventitious roots in hybrid tulip trees during cutting. Journal of Plant Resources and Environment, 2003, 12 (1): 10~15 (in Chinese)
- 7 郑均宝, 刘玉军, 裴保华, 蒋湘宁. 几种木本植物插穗生根与内源 IAA、ABA 的关系. 植物生理学报, 1991, 17 (3): 313~316
Zheng J B, Liu Y J, Pei B H, Jiang X N. Endogenous IAA, ABA levels in cuttings of woody plant and their relations to rooting. Acta Physiologia Sinica, 1991, 17 (3): 313~316 (in Chinese)
- 8 Noiyon D, Vine J H, Mullins M G. Effects of serial subculture in vitro on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and rootability in microcutting of Joostan apple. Plant Growth Regul, 1992, 11 (4): 377~384
- 9 熬 红, 王 昆, 冯玉龙. 长白落叶松插穗的内源激素水平及其与扦插生根的关系. 植物研究, 2002, 22 (2): 199~195
Ao H, Wan K, Feng Y L. Endogenous hormones levels in cuttings of *Larix olgensis* and their relations to rooting. Bulletin of Botanical Research, 2002, 22 (2): 199~195 (in Chinese)

《园艺学报》发表的论文 获第三届中国科协期刊优秀学术论文奖

在 2005 年《园艺学报》编辑部提名、经中国园艺学会推荐的论文中, 发表在《园艺学报》2004 年第 31 卷第 3 期的《黄瓜‘花打顶’茎尖的组织与细胞学特征》一文(作者李志英、李兴国、徐立、郑成超), 经过中国科协期刊优秀学术论文专家评审委员会评选, 获得第三届中国科协期刊优秀学术论文奖, 《园艺学报》编辑部和中国园艺学会同时获奖, 此次获奖论文 100 篇, 获奖刊物 92 种, 获奖学会 50 个。

《园艺学报》编辑部

“全国茄子育种工作交流会”在海南召开

为了总结“十五”期间我国茄子育种工作的经验, 交流茄子育种技术和材料创新技术, 加强今后茄子育种研究协作, 由中国园艺学会蔬菜专业委员会主办, 中国农科院蔬菜花卉研究所协办, 海南省农业科学院蔬菜研究所承办的“全国茄子育种工作交流会”于 2006 年 3 月 10~12 日在海口召开。来自全国 30 个科研、教学和企业单位的 48 位代表及专家参加了会议。与会代表就近年来我国茄子育种和资源新技术进行了交流, 针对我国当前茄子育种和新品种推广工作现状、存在问题进行了充分的商讨, 指出“十一五”期间我国茄子育种工作应加强多抗与专用型品种选育, 对于茄子育种中的难点和共性问题今后要加强研究协作, 共同攻关。

会议期间, 为检阅我国“十五”期间的育种工作水平和成果, 展示了我国“十五”期间育成的一些茄子新品种(组合), 与会代表及专家现场考察了各个参展品种, 对这些品种在海南种植的表现情况均感到满意, 对参展品种给予较高评价, 认为这些品种基本上代表了我国茄子育种的水平和成果, 对“十五”期间我国茄子育种工作给予了充分肯定, 《海南日报》对此次茄子新品种(组合)展示做了专题报道。

会议商定, 于 2008 年 6 月在湖北省武汉市召开第 2 次交流会, 会议由湖北省武汉市农业科学院蔬菜科学研究所承办, 并筹备申请成立中国园艺学会茄子分会。

(海南省农科院蔬菜研究所 肖日新, 陈贻诵)