

实生核桃茎段的组织培养研究

张丽娟, 陈建华

(中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004)

摘要:以室内实生核桃苗的茎段为试材,以MS培养基为基本培养基,适当添加植物生长调节剂,对核桃组织培养的一系列影响因子进行了研究。结果表明,适宜于室内实生核桃组织培养的各项因子分别为:最佳外植体取材时间为5月~6月份;初代培养培养基为MS+琼脂5g/l+蔗糖30g/l;继代培养基为MS+BA_{0.5}+IBA_{0.01}+琼脂5g/l+蔗糖30g/l,核桃芽苗在增殖过程中的继代周期以28d~30d为宜;生根培养基为1/2MS+IBA_{0.5}+琼脂5g/l+蔗糖30g/l。

关键词:核桃;茎段;组织培养

核桃是世界四大干果之一,以其很高的经济、生态和社会效益而被广泛栽培,其潜在的营养价值和医疗保健功能日益受到国内外专家学者的关注,深受消费者喜爱。我国是核桃原产地之一,栽培历史悠久^[1]。目前核桃在我国分布广泛,种质资源极为丰富。

当前生产中存在的问题是利用实生核桃繁殖苗木,由于自然杂交及实生变异,容易丧失优良品种性状,使得苗木良莠不齐,种性混杂,造成产量低、结果晚、品质差,降低了核桃生产的经济价值^[2]。采用嫁接繁殖虽然可以有效防止上述弊端的发生,但生产中存在嫁接繁殖系数低、速度缓慢、成活率不稳定、穗条数量限制等不利因素影响。另外,核桃树体内存在着大量单宁类物质,使得扦插不易成活^[3]。上述种种不利因素严重制约着核桃生产的发展。

植物组织培养的兴起,为核桃的快速繁殖和组织、细胞水平上的遗传改良提供了一条有效的途径。利用组培技术繁育苗木,不仅能够大大提高繁殖系数,而且可以获得遗传上高度一致并具有良好表现型的无病毒苗木群体。对核桃离体快速繁殖虽然上世纪60年代末就开始了试验研究,目前只有少数几个国家有成功应用生物技术繁殖核桃的报道,在我国尚处于研究和探索中。本试验的主要目的是通过核桃组织培养试验研究^{[4],[5]},寻求核桃组织培养的最适条件,为核桃的良种化、区域化、产业化栽培提供基础,为探索核桃良种快繁技术的研究工作提供参考。

一、材料与方法

(一)实验材料 室内一年生实生核桃茎段初代培养基为MS和1/2MS,继代培养基为MS,初代、继代培养基均附加生长调节物质,两种培养基均加入琼脂0.5%、蔗糖0.3%,适量抗氧化剂。培养条件均为PH值5.8,温度为25℃±3℃,光照基本为自然光。生根诱导培养基为MS、1/2MS、1/4MS,附加IBA、NAA,培养条件为PH值5.8、温度25℃±3℃,黑暗条件下培养7d。实验时间为2006年1月至2006年12月。

(二)试验方法

1. 外植体材料的处理。一是外植体材料的准备。选择大小相对一致的实生核桃种子进行层积处理45d~50d,然后在恒温培养箱内进行催芽,在25℃下培养10d~20d,种皮先后破裂、白色幼嫩的胚根伸出时,用富含有机质的土壤和沙子按2:1的比例混合作基进行播种。播种时将核桃的缝合线与地面垂直,种子尖向一面摆放,这样不仅有利于出苗,而且有利于幼苗的生长。播种后15d~20d种子先后发芽出土。等到幼苗长出3对~5对叶子时,即可采集带有腋芽的茎段备用。二是实生幼苗茎段的处理。采集培育好的实生幼苗茎段,在流水下冲洗10min~15min,剪掉叶片,再用加有洗涤剂的水刷洗10min~20min,然后将其剪成1.0cm~1.5cm并带有1个至2个腋芽的茎段,浸于无菌水中,置于超净台上,先用75%的酒精浸泡30s,倒掉酒精后,加入0.1%升汞溶液并用力振荡5min~7min,最后再用无菌水冲洗3次备用。

2. 初代培养。一是在培养基中加入不同的抗氧化剂和吸附剂试验。取最易表面消毒的室内盆栽一年生核桃苗茎段消毒后备用。试验采用MS培养基,在其他处理都相同的情况下,在培养基中添加不同的抗氧化剂和吸附剂,分别为AC(1g/l)、Vc(5mg/l)、20%Na₂S₂O₃(5ml/l),将消毒好的茎段接种于培养基中,两周后统计其褐变率。二是基本培养基筛选试验。以MS和1/2MS为基本培养基,以室内一年生播种苗为试材。实验分两组:一组是两种培养基中均加入生长激素,配比为BA_{1.0}+IBA_{0.1},各加琼脂5g/l、蔗糖30g/l;另一组是两种培养基均不加生长激素,其他同一。两组均在相同条件下培养。三是在培养基中添加不同激素的试验。试验以MS为基本培养基,分别选取了生长素NAA、IAA、IBA、2,4-D(0.01;0.5;1.0)mg/l,细胞分裂素BA、ZT(0.5;1.0;2.0)mg/L配置组合36个,每个组合接种20个外植体(一年生核桃实生带腋芽茎段),14d~21d后观察各个组合的生长分化情况。

3. 继代培养。一是不同的激素组合对无菌芽苗增殖的试验。继代培养试验在MS+GA_{0.5}+琼脂5g/l+蔗糖30g/l的培养基中分别加入不同浓度的激素组合,研究其对诱导芽丛分化和伸长的效果。二是继代周期对芽苗增殖率的影响。将初代培养获得的无菌芽苗,在无菌条件下切成1cm长的茎段,接于MS+BA_{0.5}+IBA_{0.01}+GA_{0.5}培养基中,设置不同的继代周期(15d、20d、25d、28d、30d、35d、40d),观察继代后芽苗的生长分化情况。

4. 生根培养。一是生根诱导。经继代培养后的芽苗长到2cm~4cm时,从芽苗基部切割芽丛为单个芽苗,转入生根诱导培养基中诱导生根。二是培养基中添加不同生长素的试验。在培养基中加入不同浓度的生长素,15d~20d后统计生根率。三是

在不同光照条件下的培养试验。试验采用继代两次后2cm~4cm的芽苗,在生根诱导期设置不同的光照处理,20d~25d后统计其生根率。

二、结果与分析

(一)初代培养试验结果

1. 不同的抗氧化剂和吸附剂对防止核桃外植体褐变的效果。取最易表面消毒的室内盆栽一年生核桃苗,在其他处理都相同的情况下,培养基中添加不同的抗氧化剂和吸附剂,分别为AC(1g/l)、Vc(5mg/l)、20%Na₂S₂O₃(5ml/l),2周后统计其褐变率。结果表明,每一种处理(包括对照组)均没有发现褐变,有个别外植体死亡,但没有发现其褐变,只是茎段变黄而死,培养基颜色正常,可见其不是因为褐变而死。但是将不同核桃优良品种的枝条也在其他处理都相同的情况下,在培养基中添加不同的抗氧化剂和吸附剂,(用量见表1),则发现所有的外植体均褐变而死,只是在时间上不同而已。其中西林2号、陇南8号、绿波和香玲四个品种在接种后1h后就开始褐变,剩下的鲁光和新早丰是在3d以后才慢慢褐变而死。由此可见,半木质化的一年生实生核桃幼苗最不易褐变,这可能是由于其体内的酚类物质含量少的原因。而成年树也因基因型的不同,体内含酚类物质的量也不同,褐变的时间也不同。(结果见表1)。

2. 基本培养基筛选结果。以MS和1/2MS为基本培养基,以表1.不同的抗氧化剂和吸附剂对防止核桃外植体褐变的效果

抗氧化剂、 吸附剂	用量*	处理茎段数	褐化数	褐化百 分率(%)
对照	0	26	0	0
PVP	5	29	0	0
20%Na ₂ S ₂ O ₃	5	32	0	0
AC	1	24	0	0
Vc	5	32	0	0

□用量单位:PVP和AC为g/L;Na₂S₂O₃为ml/L;Vc为mg/L。

室内一年生播种苗为试材。试验分两组:一组是两种培养基中均加入生长激素配比为BA_{1.0}+IBA_{0.1},各加琼脂5g/l、蔗糖30g/l;另一组是两种培养基均不加生长激素,两组均在相同条件下培养。结果表明两组培养基上培养的外植体在腋芽启动速度上基本是一致的,并且都可以生长。接种3d后,两组培养基中的外植体几乎同时转绿,腋芽膨大,开始启动。但相比之下,两组培养基中均以MS培养基中的外植体能保持较好的生长势,表现为芽苗始终保持嫩绿,生长迅速健壮。而1/2MS两种培养基中的外植体则表现为生长速度较慢、芽苗矮小,随着生长期的延长,部分顶芽及叶片自上而下变黄脱落,继而死亡。因此,MS培养基适合于核桃外植体的生长。试验结果见表2。

表2. MS和1/2MS培养基对实生核桃腋芽的诱导

培养基	接种数	萌芽数	萌芽率(%)	污染数	褐变数	芽生长情况
MS	44	38	86	4	2	生长快,健壮
1/2MS	43	35	81	5	3	生长较慢,苗较弱

3. 培养基中不同激素对核桃外植体生长分化的作用效果。生长素和细胞分裂素的运用及其浓度的大小直接影响着外植体生长和分化的方向,因而培养基中选择何种激素及其相互搭配对试验的成败意义重大。本试验以MS为基本培养基,分别选取了生长素NAA、IAA、IBA、2,4-D(0.01、0.5、1.0mg/l),细胞分裂素BA、ZT(0.5、1.0、2.0mg/L)配置组合36个,每个组合接种20个外植体(一年生核桃实生带腋芽茎段),2周~3周后观察各个组合的生长分化情况。结果表明,BA诱导腋芽分化的效果优于ZT,IBA和BA搭配比较合适,表现为芽苗深绿色,生长迅速、健壮;其次为NAA和BA的组合;其他组合则表现为生长势弱,生长缓慢,且以2,4-D促进生长的效果最差。

在选择出的最佳组合IBA和BA的基础上,再分别设置不同的浓度组合,进一步研究适合于外植体生长发育的最佳浓度组合,组合为I(BA_{0.5}+IBA_{0.001})、II(BA_{0.5}+IBA_{0.01})、III(BA_{0.5}+I-BA_{0.1})、IV(BA_{1.0}+IBA_{0.001})、V(BA_{1.0}+IBA_{0.01})、VI(BA_{1.0}+IBA_{0.1})、VII(BA_{2.0}+IBA_{0.1}),各处理均设4次重复。结果表明,接种的材料在3d~5d内开始启动,腋芽膨大并开始伸长。适合于核桃带腋芽茎段初代培养的最佳激素组合为II(BA_{0.5}+IBA_{0.01}),该组合处理表现为在初代培养的中后期生长迅速,有效新苗率高,芽苗生长健壮、深绿色。而其他组合相对较差。

(二)继代培养试验结果

1. 不同的激素组合对无菌芽苗增殖的影响。试验在MS+GA_{0.5}+琼脂5g/l+蔗糖30g/l的培养基中分别加入以下不同浓度的激素组合,研究其对诱导芽丛分化和伸长的效果。实验共设置了9个不同的激素组合,每个组合平均接种25个外植体,激素组合为I(BA_{0.5}+IBA_{0.01})、II(BA_{1.0}+IBA_{0.01})、III(BA_{1.5}+IBA_{0.01})、IV(BA_{0.5}+IBA_{0.05})、V(BA_{1.0}+IBA_{0.05})、VI(BA_{1.5}+IBA_{0.05})、VII(BA_{0.5}+I-BA_{0.1})、VIII(BA_{0.5}+IBA_{0.1})、IX(BA_{1.5}+IBA_{0.1})。由表3可以看出,组合I(BA_{0.5}+IBA_{0.01})最适合于芽的增殖;其次是IV(BA_{0.5}+IBA_{0.05}),而VIII(BA_{0.5}+IBA_{0.1})和IX(BA_{1.5}+IBA_{0.1})组合显然是抑制了芽苗的生长,芽苗不但不分化芽丛,甚至出现生长停止或者死亡的现象;其他的组合随着BA的增加,都在芽苗基部产生愈伤组织,BA浓度高产生的愈伤组织就越多,且是芽苗茎粗的3倍~4倍,虽然芽丛较多,但生长不旺盛,芽苗细弱,达不到增殖的效果。只有在I(BA_{0.5}+IBA_{0.01})组合中芽苗生长迅速,芽丛多、而且芽苗易于伸长。

2. 继代周期对芽苗增殖率的影响。在无菌条件下将初代培养表3. 继代培养中不同激素组合下的芽增殖系数

植物生长调节剂 IBA	BA0.5	BA1.0	BA1.5
0.01	4.8	1.4	1.2
0.05	1.8	1.0	0.8
0.1	0.5	0	0

养获得的无菌芽苗切成1cm长的茎段,在MS+BA_{0.5}+IBA_{0.01}+GA_{0.5}的培养基上能分化出芽丛,并健壮生长,大多数芽苗在继代25d~30d后可以伸长3cm~5cm。试验同时设置了不同的继代周期15d、20d、25d、28d、30d、35d、40d,观察继代后芽苗的生长分化情况。结果表明,继代周期为15d的芽苗启动慢、生长势弱,其

后以继代周期在 28d 到 30d 的时候芽苗启动最快、生长势最强、生长分化最迅速。但当继代周期超过 30d 的时候,芽苗的启动速度又呈减慢趋势,生长势也一起减弱,有的叶片慢慢变黄直至死亡。因此,适宜于核桃芽苗在增殖过程中的继代周期以 28d~30d 为佳。

(三)生根培养试验结果

1. 生根诱导结果。经继代培养后的芽苗长到 2cm~4cm 时,从芽苗基部切割芽丛为单个芽苗,转入培养基生根诱导培养基中诱导生根。结果 15d 后发现只有少数芽苗生根。

2. 不同生长素对核桃芽苗生根的影响。在培养基中添加不同浓度的生长素 NAA、IBA, 采用经 3 次继代后的芽苗诱导 7d 后,于 15d~20d 后芽苗生根,25d 后统计生根率。结果表明,在 NAA 浓度为 0.5mg/l 的 1/2MS 培养基中,有部分芽苗生根,而在其他的组合当中没有发现生根。统计生根芽苗数后,发现生根率非常低,达不到统计要求,而且生出的根只有主根,没有侧根以及须根,并且在以后的生长过程中芽苗渐渐发黄而死,根也慢慢萎缩死亡。其原因可能是 MS 培养基不适合核桃的生根培养,由于时间关系未再进一步进行筛选,故适宜于核桃芽苗生根的培养基有待于进一步研究。试验中还发现,高浓度的 IBA 会使芽苗基部先产生大量浅褐色愈伤组织,然后部分芽苗可从愈伤组织处再生出根系。McCown 曾在 1978 年报导,桦木从愈伤组织上诱导出的根,不与分化芽的输导系统相通。李曙轩等发现花椰菜等芸苔属蔬菜第一次培养可诱导成苗,但培养出来的苗的根系是从愈伤组织处产生的,与茎叶维管束不相通,需将芽苗切下转移到生根培养基上再生根,才与茎的维管束相通,才能进行正常的代谢活动。可见,由愈伤组织处产生的根系不利于根枝之间的水分运输。

3. 不同的光照处理对诱导芽苗生根的影响。试验采用继代两次后 2cm~4cm 的芽苗,在生根诱导期设置不同的光照处理,20d~25d 后统计其生根率。由表 4 可以看出生根诱导期对外植体进行暗培养能提高芽苗生根率。暗培养 7d 生根率比对照高出 15 个百分点,并且在 7d 内随暗培养天数的增加芽苗生根率也上升,但是继续增加暗培养天数则生根率却没有上升,而且有部分芽苗基部出现坏死现象。这说明暗培养虽然可以提高芽苗生根率,但是这样的生根率仍然达不到实际生产的需要。

三、结论与讨论

表 4. 不同的光照条件对芽苗生根的影响

暗培养天数	处理株数	生根株数	生根率(%)
0	18	1	5.0
4	16	3	18.8
7	20	5	20
9	22	6	27.3

通过对核桃组织培养的研究过程可得出以下结论:适宜于室内实生核桃组织培养的最佳外植体取材时间为 5 月~6 月份;初代培养的最适培养基为 MS+琼脂 5g/l+蔗糖 30g/l;继代培养的最适培养基为 MS+BA_{0.5}+IBA_{0.01}+琼脂 5g/l+蔗糖 30g/l,

核桃芽苗在增殖过程中的继代周期以 28d~30d 为宜;生根培养基为 1/2MS+IBA_{0.5}+琼脂 5g/l+蔗糖 30g/l。

在对核桃的组织培养研究过程中发现如下问题应慎重对待。一是初代培养中的问题。核桃的初代培养是组织培养中最关键的一步。核桃是多年生高大乔木树种,枝条长期暴露在田间,容易滋生各种各样的细菌,有的细菌甚至长入组织内部,外植体即使经过细致的表面灭菌,仍然会发生污染。另一方面,木本植物的组织培养过程中褐化也是影响无菌体系建立的重要因素之一,褐化是由于外植体中所含的酚类化合物在多酚氧化酶的作用下,氧化成褐色或黑色的醌类物质,醌类物质会与组织中的蛋白质聚合,引起其他酶类的失活,从而对其他组织产生毒害。核桃树体内酚类物质含量高,因而克服污染和褐化这两大难题,则对核桃初代培养成功与否是至关重要的。二是继代培养中的问题。这一阶段的主要任务是繁殖大量有效芽苗。用芽增殖的方法比通过愈伤组织分化途径更有利于保持遗传稳定性,而且以腋芽或不定芽增殖的植物在培养许多代后,仍然保持着旺盛的增殖能力,一般较少出现再生能力丧失的问题。植物生长调节剂在试管苗增殖中起着决定性的作用。由于植物体内内源激素难以测定,因此外源激素加入的种类及用量只能通过试验来确定。本试验在经初代培养获得的无菌芽苗的基础上设置了不同的激素组合,筛选出适宜于芽苗增殖的激素组合 BA_{0.5}+IBA_{0.01}。一般认为高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素的配比,既能提高腋芽的增殖速度,也能保证腋芽的正常生长。但是细胞分裂素浓度过高,生长素浓度过低,就会形成细密的嫩芽,芽多而弱、质量也差,反而不会提高增殖速度。三是生根培养中的问题。生根是试管繁殖的最后一道复杂的工序,是能否进行大量生产和实际应用的重要环节,也是商品化生产取得效益的最终环节。本试验在诱导芽苗生根过程中使用了不同的 NAA 和 IBA,发现只有 0.5mg/l 的 IBA 能诱导生根,但其生根率还是很低,并且所生根只有主根并无侧根,同时芽苗生长也不旺盛,随着时间的延长,芽苗出现发黄枯萎以至死亡。增加 IBA 的用量或者提高 IBA 的浓度,未能有效的促进生根,而是使芽苗基部形成愈伤组织的几率增加。究其原因有可能是 MS 培养基不适合核桃芽苗的生根,也有可能其他的原因,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 郝荣庭,张毅萍. 中国果树志·核桃卷[M]. 北京:中国林业出版社,1996.
- [2] 袁巧平,董茂山. 离体培养条件下核桃器官发生和体细胞胚胎发生[J]. 林业科学,1990,26,(6).
- [3] 石荫坪,王强生. 中国落叶果树育种五十年[J]. 落叶果树,1999,(4).
- [4] 韩素英,齐立旺. 核桃组培中防止组织氧化褐变措施的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),1995,15,(4).
- [5] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1999.

(编辑 赵鹏飞)