

# 苹果及其砧木茎尖培养研究进展

吴国栗 陈国秀

(山西农业大学)

**摘要** 茎尖培养是植物组织培养中发展很快应用很广的生物技术。本文参阅有关文献对国内外苹果及其砧木茎尖培养的现状、从基本培养基筛选、影响无性繁殖系建立的因素、激素作用、生根条件及驯化移栽等五个方面进行综述。

**关键词** 苹果 砧木 茎尖培养

组织培养作为生物工程的一项重要技术,近年来已在生物科学领域获得了长足发展,尤其是园艺植物的应用上取得了丰硕成果。据不完全统计,目前通过组织培养繁殖的果树包括30多个科的100多个种(陈振光),外植体类型从茎尖、叶片、花药、胚乳、叶肉原生质体等均再生出植株,其中以茎尖培养的研究较多,进展快,在一些果树种类上已进入实用阶段。

虽然植物组织培养工作早已开展,但苹果及其砧木的茎尖培养的研究却还只是六七十年代的事。

1977年我国研究人员首次培养出M<sub>7</sub>、M<sub>9</sub>试管苗并移栽成活,随后又获得了一系列M系及海棠、崂山柰子等苹果砧木试管苗,这些成绩表明在苹果茎尖培养领域我国科技工作已处于世界前列。从此以后,苹果茎尖培养的研究在北京、熊岳、兴城等地迅速地开展起来了。

苹果茎尖培养的最终目标是获得脱毒植株,实现良种优系育苗工厂化,要达到这个目标,必须认真、全面总结前人有关的研究内容,为苹果茎尖培养更深入,更卓有成效地进行研究做准备。我们就目前收集的资料对苹果及其砧木茎尖培养作一综述,以供果树科技工作者参考。

## 研究现状

1. 基本培养基的筛选 植物组织培养的实践已经证明:培养基的筛选是组织培养首先应该解决的问题。最早产生的培养基只是一些简单的矿质盐溶液。随着组织培养工作的开展,人们逐步认识到一些复杂有机成份对植物离体器官的培养、组织及细胞生长分化是很重要的。根据不同的培养目的,设计、配置了多种培养基,其主要成份基本相似,可以分为:无机盐、有机成份、糖、激

致谢:承蒙傅耕夫教授、常留印副教授审阅初稿并提出重要意见,深表感谢。

素成份这四大部分。

迄今为止，仅应用于木本植物组织培养的培养基不下60种，而其中应用最多的是MS。但有人指出：木本植物在较低矿质盐浓度的培养基上会生长更好，国内外的研究者在苹果及其砧木的茎尖培养中，绝大多数使用了MS及LS培养基。

Fiorino 等以三个苹果品种为试材，进

表 1 不同培养基对苹果品种新梢生长的影响

培养基	Golden			Yellow spur			Stark spur Golden		
	数目	长度	节间长	数目	长度	节间长	数目	长度	节间长
MS	20	23.3	5.7	19.8	22.5	8.8	10.2	17.3	6.6
Cheng	20.6	20.0	9.1	19.3	17.4	7.1	5.0	11.2	6.0
PM	31.7	12.0	7.4	33.9	9.7	8.3	16.2	8.5	6.5

(Fiorino, 1983)

表 2 基本培养基对苹果芽生长点分化的影响

(王际轩 1985)

基本培养基	品种	接种数	分化率	平均分化芽数	最大苗高cm	分化表现
MS	富士	26	61.5	1.0		分化、生长慢
	甜黄魁	17	41.2	1.43		分化苗较多、生长慢
N6	富士	38	39.5	1.0		分化、生长慢
	甜黄魁	16	25.0	1.75		分化苗多
H	富士	20	20.0	1.0		分化、生长慢
	甜黄魁	18	55.6	1.07		分化、生长慢
B5	富士	39	53.9	1.33	0.33	分化、生长慢
	富士	35	11.4	1.25	0.40	分化、生长慢
Nitsch	富士	32	9.4	1.0		难分化、变褐老化
	甜黄魁	15	0	0		难分化、变褐老化

上述结果表明苹果茎尖培养中以选用高矿盐浓度的MS培养基为好。具体应用中，不少人对MS配方的个别成份作了调整，成为改良MS培养基取得了令人满意的结果。

2. 影响初代培养效率的因子 在组培技术发展过程中，Murashige完整地建立了组培方法的原理及概念，提出了组织培养发展阶段的概念：组培的第一阶段——建立无性繁殖系是一个重要问题。苹果茎尖培养虽然已有大量文献，但具体论及影响初代培养——无性繁殖系建立的文献，国外并不多。事实上，象Werner早就指出的那样：初代培养中一个主要的问题就是外植体的褐变，其

次才是污染，它们使得从成年树上采样建立无性系更为困难。为了解决这一问题，G.S. Cheema等采取了多次转移的办法：一周把材料转于同种新鲜培养基上，材料较大时可以把材料水平放置，粗度的一半埋入培养基较好。为防止微生物潜伏污染，可在培养基中加入CH 2g/L，效果较好。

王际轩等比较了不同季节接种效果，结果表明（表3）：对大多数品种来说，以春季芽萌动前后接种分化率为最高（80.8%及77.5%），6~8月接种的芽分化率相近，进入休眠期后接种分化率明显降低（58.0%及53.3%）。处于深休眠期的芽其分化率最低

表 3 不同季节接种效果 (王际轩1985)

采样日期	接种芽数	分化率	分化芽数	最大苗高cm
23/4	73	80.8	3.83	0.78
4/5	40	77.5	3.58	0.55
3/6	41	70.7	2.69	0.50
2/7	46	71.7	2.1	0.43
28/7	40	62.5	2.15	0.36
7/8	35	68.6	2.67	0.30
30/8	60	78.3	3.7	0.43
4/10	56	76.8	3.68	0.45
7/11	50	58.0	2.81	0.37
7/12	65	53.8	2.11	0.4
16/12	52	19.2	1.40	0.41
12/1	43	23.3	2.40	0.4

(19.2~36.9%)。山楂茎尖培养的试验表明以生长季采样效果最差,成活率仅14%(分化率38%)。

Abbot 以桔 苹为试材比较了幼龄树与成龄树的分化反应,发现实生苗接种后4周内开始增殖,而成龄树则在第8周才增殖,幼龄材料比老龄材料易培养。

薛光荣为提高初代培养的效率,采取了如下做法:春季采一年生梢在室内水培,待萌芽抽梢后取新梢的芽接种,由此可诱导出大量芽丛。

以上种种做法之所以能提高分化率的原因,我们认为主要是植物材料的不同生理状况所致:不同生长季节,植物体内的各种酶活性不同:春季植物体内的多酸氧化酶活性可能要低些,故褐变轻,易分化;随着生长季节的到来,酶活性逐渐增强。有人指出7月份后植物体内单宁增加,使得褐变加重,降低了成活率。有资料表明:苹果茎尖培养成功者60%以上采样时期为4~6月份,其余时间则效率很低。

另一种降低褐变率的办法为:把材料接种于 $\frac{1}{2}$ MS矿质盐浓度培养基上很少褐变或不褐变,陈维伦培养金冠苹果茎尖采用暗培养的方式形成黄化芽丛效果不错。有人指出用根插段长出的黄化梢作为外植体效率好。鉴

于采用暗培养、光暗交替培养已多有报道。我们有必要探求其利于茎尖培养的内在机理。

我们认为:不论其外植体是黄化梢,还是暗培养后形成黄化芽丛,其利于茎尖培养的原因就在于“黄化”本身的特性。一般认为,黄化梢中①可塑性营养物质多。酶活性高,激素活性较绿枝中强。②组织分化未明显成熟。③黄化梢中淀粉及糖含量增多,单宁减少,生长素含量增高,枝条的皮层及髓部所占比例增多。有人在研究苹果营养系砧木扦插繁殖时采用黄化方法时看到:“黄化插穗下部淀粉和糖含量高于对照,营养期结束时根系及地上部的发育,处理比对照好,黄化插穗根的干物质数量超过对照的13倍以上”,黄化外植体的发育历程虽不同于插穗,但就其黄化作用的实质来看,应当是相似的。故黄化的外植体在组培中有较好的成活率及分化率。接种外植体后暗培养诱导出黄化芽丛,其实与外植体的黄化并无本质区别。

3. 关于初代及继代培养中激素作用问题 50年代,崔澂和Skoog关于激素控制器官形成的模式提出后,在很多植物组培中得到验证它使人们对植物激素与植物生长发育之间的关系有了较为深入的认识,现在,人们一般认为:外植体的增殖和生长对细胞分裂素及生长素是必需的,但不同树种、品种对激素种类及浓度要求不尽相同。

Jones(1967)首先报告了苜基嘌呤对苹果茎尖增殖的促进作用, Elliot等人(1972)肯定了其结果Catherine以三种激动素(BA, K, Zip)进行试验结果表明:BA对苹果茎尖的芽增殖最为有效,zip效果最差, K则介于中间。

但是,组织培养中长期于含有BA的培养基上继代培养的材料(四个月之后)出现BA伤害,而以zip替换之则可好转。也有人发现:BA浓度过高,外植体只具芽丛而无幼梢伸长,且玻璃化现象严重,为此,BA

浓度高限应为 1.15ppm。在组培实践中人们发现：生长素对 BA 的效应有一定的拮抗作用，合适的 BA:IBA(IAA) 是获得大量有效新梢的必要条件。关于激动素与生长素配合的效果问题，Catherine A. 早就有过报道，试验结果如表 4 所示：选择的三种激素分别为：BA(0,1)、IBA(0,1)、GA(0,0.1)，基本培养基为 BCM，每个处理接种 15 个嫩梢。由表 4 可看出：IBA 确有削弱 BA 的作用，而在各组合中，GA 却未显示有明显效果。试验还看出，在 BA 及 IBA 存在下，试管嫩梢较高而且叶子正常。

表 4 激素组合对茎尖培养的效应

(Catherine 1980)

BA	IBA	GA	每枚芽数	最大梢长mm	叶长mm
+	+	+	1.2b	12.8a	7.1ab
+	+	-	1.7b	14.8a	8.0a
+	-	+	4.3a	9.6bc	5.1b
+	-	-	3.2a	7.6c	6.4ab
-	+	+	1.1b	6.3c	6.6ab
-	+	-	1.1b	7.4c	6.5ab
-	-	+	1.0b	5.7c	8.3a
-	-	-	1.1b	7.0c	6.6ab
交互效应					
BA × IBA			• •		•

其它交互均不显著 邓肯氏新复极差测验

• • 0.01水平 • 0.05水平

在茎尖培养实践中。张巨祥认为 BA 是产生玻璃化梢的原因所在，培养基中加入 CH 则可减弱这种作用，为了了解产生玻璃化的原因，P.L.Pasqualetto 等人以 MS 为基本配方，对其中 K<sup>+</sup> 及 Mg<sup>2+</sup> 进行了不同浓度处理，试验结果表明，K<sup>+</sup> 浓度高低对材料是否玻璃化影响很大：较低 K<sup>+</sup> 浓度玻璃化梢比率增高，有用梢比例亦降低。试验还发现增加凝胶浓度可显著降低玻璃化梢百分率。

4. 关于生根处理条件 由于苹果茎尖培养中生根较为困难，故国内外在这方面进行了大量研究。积累了许多宝贵经验。影响生根的条件大体上可分为营养条件（与培养

基有关的）、环境条件（光照、温度等）这两大方面，由于试材不同，试验结果难免一致，但总的看来还是有其规律性。

①培养基及其添加剂的作用。据报道的结果来看，生根培养基的矿质盐浓度都较低（ $\frac{1}{2}$ MS 或  $\frac{1}{3}$ MS），激素大多使用 IBA，也有用 IAA。Werner 在 M<sub>27</sub> 的试管生根试验中采用  $\frac{1}{3}$ MS 培养基、0.27% 琼脂，试验结果是随生长素浓度增加生根率增加，但超过了 3ppm 以上时则生根不良。以 Antonovk 313（一种苹果砧木）为试材，J.N.Travers 等为了解培养基成份对生根的影响，进行试验结果是：影响生根的主要限制因子是糖及琼脂，但以滤纸桥代替琼脂的试验中其生根率亦在 45% 以上，故可以说只有糖才是 Antonovka 313 苹果砧的唯一限制因子，与其他的研究结果相比，至少可以说明这样一个问题：试材不同其生根条件差异是很大的。Jones 很早就报道了 PG 对生根的作用，而美国的 R.H.Zimmerman 曾有一篇专门的研究结果说明品种不同，PG 的效果不同，PG 并非生根的必须因子。I.Smir 观察到加有 AC（0.25%）的培养基上几乎能全部生根。并可使根长由  $16.7 \pm 0.5$ mm 增加至  $24.3 \pm 0.5$ mm 并认为，AC 的作用可能是 ①吸收过多的 IBA 及其它不利生根成份；②AC 造成的暗效应，它可帮助根发育。试验还看到：培养基中无糖时不生根，把此材料转至含糖培养基上时则 80% 以上的嫩梢都生了根。

②温度对生根影响：温度影响生根的研究不少。但结果不太一致。C.L.Le 研究了温度对 M<sub>26</sub> 生根的影响，结果可知：温度对生根有明显促进作用，当温度升高时，无论生根率还是根条数都增加了，温度更高时，生根率降低很多，这个结果与红富士中的试验结果相吻合，但却与 M<sub>9</sub> 中的结论不符：M<sub>9</sub> 在 22~29℃ 范围内生根率无变化 (James. D.J 1983)，也与苹果实生苗中温度升至

28℃时促进生根的结论相矛盾 (Lane, D. W 1978)。以元帅系品种的试验也可看出, 25~30℃范围的升温可改善生根状况, 甚至升至35℃时对“Royal 红元帅”还有正效应。

③光照对生根的影响: 红富士的研究表明: 暗培养可获得最高生根率, 随光强增加, 生根率下降。这与山桃 (董义虎)。桃李杂种试管苗 (Marina G) 中的结果一致。R. H. Zimmerman 的试验指出: 暗处理对元帅系的芽增殖及生根均有效, 而且对诱根作用更大些。

上述各事实均说明这样一个问题: 光抑制茎产生根, 生长素促进根的生长。一定的激素可以诱导嫩梢产生根原基, 低浓度时根原基才可能发育成根 (文达)。光照、温度等外界因子是通过调节内源激素的水平而起作用的, 因此可以说光抑制生根是由于生长素在光照下受到破坏造成的。这样, 我们可以认为: 在苹果的嫩梢生根中暗培的作用是①暗培造成了黄化, 使得嫩梢发生了有别于绿苗的生理变化; ②暗培避免了光对生长素的破坏作用, 利于生根。但是根的形态发生与光的关系是很复杂的, 需要进一步深入的研究才能得出结论。

④其它的处理条件。除上述谈及的激素、光照、温度等因子作用外, 下面的一些处理对试管生根也是有效的:

a. 与加入一定激素浓度的做法相反, 把材料转至不含任何激素的培养基上, 或在有生长素培养基上诱出根原基后再转至不含生长素的培养基上效果不错。

b. Malling Merton 苹果生根中采用了两面削伤的办法结合其它处理、生根率为100%。

c. 继代培养时间影响生根率: 有人报道, 获得同样高的生根率, 元帅要求比红玉继代更长的时间 (Sriskandarajah S.)。同样是元帅的不同品系, 继代培养39代 (42

个月) 的比继代培养18代 (15个月) 生根率要高许多。

d. 外植体的发育阶段对生根有影响, 这可从试验结果看出来。产生这种现象的原因可能是来源不同的外植体其制造内源激素的能力有差异所致 (杨永青)。

5. 试管苗的驯化及移栽 苹果茎尖培养中, 人们往往把注意的焦点集中在提高组织培养的增殖率及试管生根上, 却忽略了一个重要问题, 即试管苗移栽成活率低。这方面的研究为数尚少。

随着果树茎尖培养工作的开展, 人们逐步开始研究这个问题。Sutter, G等人认为成活率低是由于试管小植株体内水分平衡失调, 造成水分亏缺。从而引起植株萎蔫死亡, 但也有人认为是小苗在人工配制的培养基上行异养生长, 而移栽土中不能立即进行自养生活。最后导致营养亏缺而死亡。因此, Brainerd 等人对苹果试管苗进行了解剖构造的研究, 他们看到: 苹果试管苗的蜡质层很薄, 栅栏细胞小, 栅状组织不发达、叶肉细胞空隙大, 气孔运动性能差, 这些特点使得试管苗移栽后极易失水, 降低成活率。陈四维等人的研究指出: 虽然组培苗叶片的解剖构造不利于露地成活, 但小植株移到温室后, 其上的叶片有向正常叶发展的趋势。这个结论就为试管苗的驯化锻炼提供了依据。许多人的试验结果也说明: 试管苗移栽之前, 进行所谓的炼苗、或进行砂培, 使小苗对试管以外的环境有一个适应的过程, 可以大大提高移栽成活率。

研究证明: 试管苗在锻炼过程中, 叶片可产生蜡质, 最后产生角质层并增厚。这是适应外部环境条件的原因之一。

一般认为: 移栽成活的关键为: ①选择、培育壮苗。D. I. Dunstan曾指出易移栽成活的试管苗的特征是: 苗高1.5~2cm, 粗1~2mm, 9~12节且具伸展的叶子。②营养钵炼苗, 增加光强, 保证湿度, 促使幼苗多发

## 科技致富的金钥匙 《农业科技通讯》

根。有报告指出：在特定诱根培养基上激素种类及浓度不同，根的形态不同，最后移栽成活率各异。在较低生长素浓度下诱出许多初级根，然后又形成许多细的次级根，这类苗移栽易成活。

### 问题与展望

综观果树茎尖培养的现状：我们认为还应当注意解决以下几个方面的问题：

1. 影响茎尖的培养因素是多方面的，研究中要注意各种因子的交互作用。考察互作效应比考察单因子效应要复杂得多，困难得多，但却能更准确、更客观地了解茎尖培养的“真面目”。随着经验的积累，工作更深入地开展，应更广泛地运用生物统计学的原理，进行合理的试验设计，把电子计算机技术应用到试验数据的处理及结果分析中，提高工作效率。

2. 试材的选择中，仅仅注意其所处的不同生理状态是不够的，还必须了解其不同的遗传背景。M25易于试管繁殖，而M26、M9、M27则难度稍大，其原因是后者有一共同的亲本，这说明材料对组培的反应是受其基因型的遗传控制的。

3. 随着研究的深入，茎尖培养要同培育脱毒植株的目标密切联系起来。培育出优良品种的脱毒试管苗，其经济价值才更大。

放眼未来，组织培养作为21世纪农业科研的八大方向之一，果树茎尖培养在推动科研的深入发展、促进果林事业兴旺发达上有着巨大的潜力。当今世界果林发展的两个显著特点，一是新品种多，品种更新快；二是实行矮化密植，推广无病毒栽培。同发达国家比，我们还有很大差距，但只要运用先进的生物技术迎头赶上，就会使我国的果林事业出现一个新局面。我们应对此充满信心。（参考文献略1992年1月5日邮码030801）

（本文引用参考文献较多，有感兴趣的读者可与本刊编辑部联系）

《农业科技通讯》是国内最高农业科研机构中国农业科学院主办的中央级农牧业综合性科技普及刊物，创刊已有20年历史，在广大读者中享有盛誉。该刊面向全国、面向基层、面向生产，主要服务于广大农民、科技户、专业户、知识青年、农牧科技人员以及院校师生和各级领导同志，以最快速度报道农业科研的最新实用技术、新成果、新产品和新信息。

《农业科技通讯》是最新致富大全，包括商品生产信息、农业部推荐成果、粮经、园艺、水产养殖、加工贮藏、畜牧兽医、植保、名优品种和国外新技术等，各项技术学之能用，用之见效，众多读者靠它刊出的一条信息或技术年创收上百万元、几十万元，数万元的更是屡见不鲜。

《农业科技通讯》为月刊，国内外公开发行，各地邮局征订，邮发代号，2—602。每期定价1.50元，全年定价18元。全国各地邮局11月1日至20日收订1993年订户，希望大家不要错过时间，及时到当地邮局办理订阅手续。

请记住，每册《农业科技通讯》都是您打开致富的金钥匙。早一年订阅，早一年致富。

### 吉林省国营永吉县双河镇林场桦树苗圃提供大量优良苗木及种籽

本苗圃为适应园艺事业生产发展的需要，近10年来先后从各科研院所引进各种果树优良品种，建立了品种园。经多年示范观察，认为适宜各地栽培的品种，也是本苗圃生产的品种如下：梨苗：平香、伏香、秋香、晚香（四种梨均为山梨砧）。李子苗：绥棱红（1号）、绥李3号（小黄李子、毛樱桃砧）。砧木苗：山梨苗、山丁子苗、山杏苗、毛樱桃苗、贝达扦插苗、实生贝达苗实生山葡萄苗。

林业苗：紫穗槐、刺槐、雄性柳、小城黑杨树苗。

半成品苗（芽苗）：秋季将提供大量金红（123）苹果苗、伏香、秋香、晚香梨苗，绥棱红（1号）绥李3号李子苗。

果树种籽、山梨籽、山丁子籽、毛樱桃籽、小黄李子籽、山杏籽。本苗圃山梨籽和山丁子籽采用新工艺分离种籽和果肉，提高了种籽发芽率。各种种籽保证是当年新籽。

以上苗木和种籽，保证品种纯，根系好，多购优惠。欢迎用户来本苗圃现场看货及参观指导。

地址：吉林省国营永吉县双河镇林场从吉林市坐火车（吉沈线）双河镇站下车快车二站地。

联系人：张恩厚 邮政编码132202