

抗轮纹病苹果砧木 J35-8 茎尖 培养快繁体系建立

陈晓洁, 郭兴科, 张 媛, 李忠勇, 张学英, 徐继忠

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以抗轮纹病苹果砧木 J35-8 的茎尖为试材,通过筛选合适的培养基,研究了培养基中不同植物生长调节剂配比对芽苗诱导、增殖和生根的影响。结果表明:以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 35 g/L、琼脂 6.2 g/L,适宜启动培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.00 mg/L+NAA 0.05 mg/L;适宜增殖培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.050 mg/L,增殖系数可达到每周 8.50 倍;以 1/2MS 为基本培养基,附加蔗糖 15 g/L、琼脂 6 g/L,适宜组培苗生根的植物生长调节剂配比为 IAA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L,生根率达 92.68% 以上,每株苗平均生根 9.35 条,移栽成活率达 100.00%。

关键词:苹果砧木 J35-8;茎尖培养;组培快繁;植物生长调节剂;轮纹病

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0107-04

苹果(*Malus domestica* Borkh.)是世界四大水果之一,也是我国重要的优势农产品之一,近年来我国苹果产业发展迅速,是世界上苹果栽培面积最大和产量最高的国家,但目前与苹果生产技术发达的国家,如奥地利、瑞士相比,我国苹果生产还面临着单产水平较低、果实品质不高等问题,而苹果轮纹病的危害是造成这些问题的重要原因之一^[1-3]。随着苹果主栽品种的更迭,质优但感病品种的栽培面积不断扩大,轮纹病的发生与危害日趋严重,不仅危害苹果果实造成减产,而且危害枝干,削弱树势,产量下降,缩短结果年限,降低果实品质,造成较大的经济损失^[3-4]。随着果实套袋技术的逐步推广,苹果果实轮纹病受到了很好的控制,但枝干轮纹病的发生却有明显上升趋势^[5-7]。据 2008 年国家苹果产业体系病虫害防控研究室对全国 7 个主要苹果生产省市的调查显示,枝干轮纹病的病株率已达 80% 以上,其发生的普遍程度高于腐烂病^[7]。

目前苹果枝干轮纹病的防治方法有化学防治、农业防治等措施^[8-9],应用适宜的轮纹病抗性砧木是防治苹

果枝干轮纹病的重要途径之一^[10]。生产培育健壮的抗轮纹病自根砧苗木十分重要。自根砧的无性繁殖方式主要有扦插、压条与组织培养等^[11]。与扦插、压条相比,利用组织培养技术繁育自根苗可以不受季节限制,大大提高了繁殖系数,繁殖周期短,可在短时间内获得大量的砧木组培苗,且苗木整齐一致^[12]。因此,组织培养技术无疑是一种众所周知的快速稳定高效繁殖苗木的最佳方式。J35-8 是由河北农业大学园艺学院苹果课题组从鸡冠实后代中选出的,经 3 年接菌试验验证的抗轮纹病苹果砧木,对防治苹果枝干轮纹病具有重要利用价值,迄今对 J35-8 组培快繁的研究尚鲜见报道。不同外植体材料对培养基有不同的反应,培养基激素的种类、浓度配比是影响组培苗增殖的非常重要的因素之一^[13-16]。该试验以抗轮纹病苹果砧木 J35-8 为试材,采用茎尖培养的方法,通过调节启动培养基、继代培养基和生根培养基的激素配比,筛选出适宜于苹果砧木 J35-8 诱导成活、增殖与生根的最佳培养基配方,建立其快速繁殖体系,同时为无病毒苗木的生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年 3 月下旬,自河北省保定顺平县何家营村苹果砧木试验园取具饱满芽的 J35-8 未萌芽枝条,水培于光照培养箱内,光/暗周期为 12 h/12 h,光照条件下温度为(24±2)℃,黑暗条件下温度为(15±2)℃,培养箱湿度保持 70% 以上,每天喷雾保湿并更换清水 1 次。芽萌发后取大于 1.5 cm 的嫩梢,用流水冲洗干净,置于 4℃ 冰

第一作者简介:陈晓洁(1989-),女,河北张家口人,硕士研究生,研究方向为果树栽培生理。E-mail:15933593516@163.com.

责任作者:徐继忠(1964-),男,河北唐山人,博士,教授,博士生导师,现主要从事果树生物技术及果树栽培生理与生态等研究工作。E-mail:xjzhxw@126.com.

基金项目:河北省科技厅资助项目(14226307D-5);农业部公益性行业科研专项资助项目(201203075-05)。

收稿日期:2015-02-03

箱低温预处理 12 h 后取出备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒和接种 将用流水冲洗干净的外植体材料置于无菌的 100 mL 三角瓶中,在超净工作台上用 0.1% HgCl_2 溶液消毒处理 10min,然后用无菌水冲洗 4~5 次后用枪状镊取出置于无菌的玻璃皿中,再用无菌滤纸片吸掉外植体上的水分,最后去除外植体伤口部位变褐的部分,将外植体接种于启动培养基上。

1.2.2 外源激素对苹果砧木 J35-8 启动培养的影响 启动培养基以 MS 为基本培养基,其中蔗糖 35 g/L,琼脂 6.2 g/L,pH 6.0,NAA 浓度为 0.05 mg/L 保持不变,将 6-BA 设为 0.50、0.75、1.00、1.50 mg/L 4 个浓度梯度(表 1),共 4 个处理,每个处理接 30 个茎尖,重复 3 次。接种后置于光照培养室内培养,培养温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度 2 000~3 000 lx,光/暗周期 12 h/12 h。接种 25 d 后,统计诱导成活率。诱导成活率(%)=诱导成活外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 外源激素对 J35-8 组培苗继代增殖的影响 继代培养基以 MS 为基本培养基,其中蔗糖 35 g/L、琼脂 6.2 g/L,6-BA 设为 0.5、1.0、1.5 mg/L 3 个浓度梯度,NAA 设为 0.050、0.075、0.100 mg/L 3 个浓度梯度,两两组合,共 9 个处理(表 2)。选取启动培养基中生长健壮一致的芽苗,分别接种至上述 9 个不同继代培养基中,每个处理 20 株,各重复 3 次,培养条件与启动培养保持一致。接种后 30 d 左右统计接芽的增殖系数和分枝高度。增殖系数(%)=增殖茎尖数/接种茎尖数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 外源激素对 J35-8 组培苗生根的影响 选择生长健壮、长势一致、高 2.0 cm 以上的继代苗,分别接种于不同浓度配比的生根培养基中(表 3)。生根培养基以 1/2MS 为基本培养基,其中蔗糖 15 g/L,琼脂 6 g/L,IAA 浓度为 1.0 mg/L 保持不变,IBA 设置为 0.3、0.4、0.5、0.6 mg/L 4 个浓度梯度,每个处理 20 株,重复 3 次,培养条件同启动培养。接种 20 d 后统计生根率、各生根苗的生根数和生根长度。生根率(%)=诱导生根茎段数/接种茎段数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 练苗与移栽 生根培养 20 d 后,统计完各项指标后将生根苗移至温室中练苗,经 7 d 左右将三角瓶的封口膜解下,再经 2~3 d 练苗后移栽至营养钵。用 0.1%多菌灵溶液将体积比为 1:1 的蛭石和草炭混合均匀,湿度以“手握成团不滴水,落地即散”为宜。将混合好的培养基质装入事先准备好的营养钵中,栽入小苗,压实基质。移栽后立即用 0.1%多菌灵溶液浇透,最后用棚膜覆盖,以保温保湿。移栽后每 3 d 喷施 1 次多菌灵溶液,1 周左右开始放风锻炼,经过 14 d 揭开棚膜,20 d 长出新叶,统计成活率。移栽成活率(%)=移栽成活株数/总移栽株数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 浓度对芽诱导的影响

由表 1 可以看出,在 NAA 浓度为 0.05 mg/L 不变时,6-BA 的浓度对外植体的褐变和诱导成活有较大的影响。外植体的诱导成活率与褐变率呈负相关。6-BA 浓度为 1.00 mg/L 时,外植体褐变率最低为 10.00%,显著低于其它处理,诱导成活率最高,达 88.75%,显著高于其它 3 个浓度的诱导成活率。其中 6-BA 浓度为 0.50 mg/L 的外植体褐变率最高,达到 46.67%,诱导成活率最低,不足 50%。因此认为,该试验中最适宜于抗轮纹病苹果砧木 J35-8 启动培养的植物生长调节剂配比为 NAA 0.05 mg/L+6-BA 1.00 mg/L。

表 1 6-BA 浓度对外植体诱导培养的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on the induction culture of the explants

处理编号 Treatment	NAA 浓度 The concentration of NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA 浓度 The concentration of 6-BA/(mg·L ⁻¹)	诱导成活率 Survival rate /%	褐变率 The rate of browning/%
1	0.05	0.50	44.25±3.40d	46.67±3.51a
2	0.05	0.75	72.50±3.32b	23.33±3.51c
3	0.05	1.00	88.75±3.40a	10.00±3.00d
4	0.05	1.50	58.75±3.40c	31.33±5.13b

注:不同小写字母表示在 0.05 水平上的差异显著性,下同。

Note: Different lowercase letters at the same stage mean significant differences at 5% level, the same below.

2.2 不同 6-BA 与 NAA 对比对组培苗继代增殖的影响

由表 2 可以看出,6-BA 在 0.5~1.5 mg/L 浓度范围内,继代苗的增殖系数呈现先上升后下降的趋势,6-BA 浓度为 1.0 mg/L 的增殖系数显著高于其它浓度,高达 7.81~8.50,6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时继代苗的增殖系数显著高于浓度为 0.5 mg/L 的增殖系数。6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,分枝高度大于 4 cm,显著高于 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 与 1.5 mg/L 的分枝高度。6-BA 浓度在 0.5~1.5 mg/L 范围内,继代苗的分枝高度均在 NAA 浓度为 0.075 mg/L 时达到最大。继代培养基筛选的 9 个处理中处理 5 的组培苗分枝高度最高,为 4.63 cm,显著高于其它处理,但处理 4 的增殖系数显著高于处理 5,高达 8.50,且组培苗分枝高度大于 4 cm,生长健壮,顶端生长旺盛,叶片深绿,玻璃化率较低(图 1-A)。综合考虑增殖系数、分枝高度和组培苗生长状态认为,更适宜于抗轮纹病苹果砧木 J35-8 增殖培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.050 mg/L。

2.3 不同 IAA 与 IBA 对比对组培苗生根及移栽成活率的影响

由表 3 可以看出,当 IAA 浓度为 1.0 mg/L,IBA 浓度为 0.3 mg/L 时,不论生根率、根系长度、生根数目和成活率都显著高于 IBA 为其它浓度的,生根率为 92.68%,每株生根苗平均生根 9.35 条,根长达 1.36 cm,移栽成活率高达 100.00%。移栽成活后,顶端分生组织

表 2 6-BA 和 NAA 浓度对苹果砧木 J35-8 组培苗增殖的影响

Table 2 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA on the multiplication of the apple rootstock J35-8 tissue culture seedling

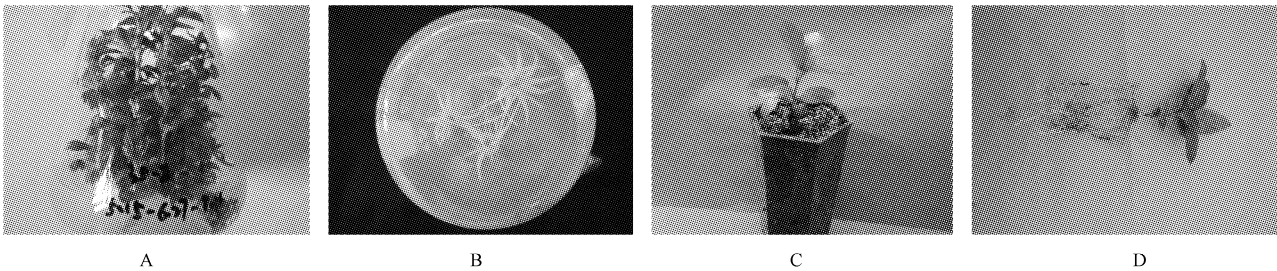
处理编号 Treatment	6-BA 浓度 The concentration of 6-BA / (mg · L ⁻¹)	NAA 浓度 The concentration of NAA / (mg · L ⁻¹)	增殖系数 Coefficient of multiplication	分枝高度 Height/cm	玻璃化率 The rate of vitrification/%
1	0.5	0.050	4.24±0.10h	3.26±0.06f	11.14±0.73d
2	0.5	0.075	5.43±0.11f	3.67±0.12e	11.02±1.09d
3	0.5	0.100	4.74±0.10g	3.66±0.09e	11.20±0.58d
4	1.0	0.050	8.50±0.11a	4.22±0.08b	11.24±0.56d
5	1.0	0.075	7.84±0.11b	4.63±0.07a	11.98±0.81d
6	1.0	0.100	7.81±0.09b	4.05±0.09c	12.10±0.62d
7	1.5	0.050	6.42±0.12c	3.71±0.12e	28.64±0.85c
8	1.5	0.075	5.77±0.12d	3.86±0.13d	29.76±1.00b
9	1.5	0.100	5.59±0.10e	3.85±0.12d	32.36±0.85a

停长晚,易长出新叶(如图 1-B、C、D)。其它处理的生根率仅为 62.22%~65.12%,每株生根 7~8 条,根长小于 1 cm,处理 3 的移栽成活率为 92.59%,处理 2 和处理 4 的成活率仅 88.24%,且瘦弱矮小,缺乏活力。因此,适宜苹果抗轮纹病砧木 J35-8 组培苗的生根培养基为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L。

表 3 IAA 与 IBA 浓度对苹果砧木 J35-8 组培苗生根的影响

Table 3 Effect of different concentrations of IAA and IBA on the rooting of the apple rootstock J35-8 tissue culture seedling

处理编号 Treatment	IAA 浓度 The concentration of IAA / (mg · L ⁻¹)	IBA 浓度 The concentration of IBA / (mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate / %	生根数目 The number of rooting / 条	根长 The length of rooting / cm	移栽成活率 Survival rate / %
1	1.0	0.3	92.68±1.53a	9.35±0.08a	1.36±0.04a	100.00±0.00a
2	1.0	0.4	64.02±1.39c	7.06±0.14d	0.66±0.03c	88.24±6.65c
3	1.0	0.5	65.12±1.24b	7.39±0.09c	0.60±0.03d	92.59±7.72b
4	1.0	0.6	62.22±6.38d	8.43±0.07b	0.91±0.06b	88.24±8.05c



注:A:芽苗增殖;B:生根;C:移栽成活;D:成活苗根。

Note:A;Subculture medium;B;Rooting;C;Transplantation;D:The roots of survival.

图 1 苹果砧木 J35-8 的组织培养与快速繁殖

Fig. 1 Tissue culture and rapid propagation of apple rootstock J35-8

3 结论与讨论

组培苗的继代是生根的前处理,要为生根提供尽可能多的健壮、有活力的生根苗,使其能尽快适应生根培养,有利于壮苗的培育和移栽成活。所以筛选继代增殖培养基时,组培苗的生长状态与增殖系数、分枝高度同等重要,应该综合考虑。继代培养基筛选试验中,处理 5 的分枝高度最大,但增殖系数不如处理 4 高,且茎叶较处理 4 弱,玻璃化率也略高于处理 4。所以选择处理 4 的培养基配方为最佳继代培养基。

苹果苗在组织培养中很容易出现褐变现象,取材时期、消毒时间和激素水平^[17]等都会影响褐变的发生,是影响外植体诱导成活的重要因素。据报道^[18-19]通过低温预处理、调整激素水平、加入抗氧化剂或吸附剂等可

减轻褐变的危害。该试验中对外植体材料进行水培处理和低温预处理,可减少组织氧化褐变。该试验筛选出的适宜于苹果抗轮纹病砧木 J35-8 诱导成活,继代繁殖的培养基中的激素配比可有效抑制褐变,有利于外植体材料的生长发育。该试验在培养基中加入 1 g/L 的活性炭粉末可吸附有害物质,减轻外植体褐变的程度。接种前,用无菌滤纸片吸去外植体表面的水分也可以使外植体褐变程度减轻,有利于外植体成活。

师校欣等^[20]在苹果砧木 M7 和苹果品种富士等的研究中发现,培养基中 BA 含量的高低,直接影响玻璃化苗的发生与否,随 BA 浓度的升高,玻璃化苗发生显著增多。丰锋等^[21]也认为,细胞分裂素过高,易引起玻璃化苗的发生。Mujib 等^[22]认为 BA 是组培苗玻璃化的根源之一,一定的 BA 浓度诱导细胞分裂活性增强,加上衬质

势高,新分裂的细胞膨胀、伸长,打乱了正常的生长发育过程,出现不平衡,产生玻璃苗。玻璃化苗的发生一般是多种因素综合作用的结果^[23-24],如培养环境温湿度、铵离子浓度、琼脂浓度、封口材料的透气性等。当苹果砧木 J35-8 继代培养基的激素浓度配比不适宜时也容易出现玻璃化苗,严重影响繁殖速率。该试验中,6-BA 浓度在 0.5~1.5 mg/L 范围内,继代苗玻璃化程度随 6-BA 浓度升高而升高,但 6-BA 0.5 mg/L 时的玻璃化率与 1.0 mg/L 的无显著差异,6-BA 1.5 mg/L 时,继代苗的玻璃化率高达 30%左右。试验得出的适宜于继代培养的激素配比 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.050 mg/L,发生玻璃化的几率也较小。

组培苗生根处理中,有的处理在接入生根材料 7 d 左右出现叶片黄化的现象,分析原因可能是生根培养基中的营养物质减半,而生根材料尚未长根,不能吸收足够的营养而造成的缺素症。而生根培养基为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L 的处理中未发现此现象,可能此培养基有利于苹果砧木 J35-8 生根,且生根早于其它处理,有待于进一步观察证实。

参考文献

- [1] 国家统计局农村社会经济调查司. 中国农村统计年鉴 2013[M]. 北京:中国统计出版社,2013.
- [2] 李志霞,聂继云,李静,等. 我国苹果产业发展分析与建议[J]. 中国果树,2014(5):81-84.
- [3] 康玲,郝红梅,杨振英,等. 苹果轮纹病研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(9):188-191.
- [4] 高艳敏,沈永波,张恩尧,等. 苹果轮纹病发生规律及条件的研究[J]. 安徽农业科学,2007(3):751-754.
- [5] 国立耘,李金云,李保华,等. 中国苹果枝干轮纹病发生和防治情况[J]. 植物保护,2009,35(4):120-123.
- [6] 宋理想. 苹果轮纹病无公害防治技术[J]. 山西果树,2011,4(7):28-29.
- [7] 曹克强,王春珠,耿硕. 我国苹果主要病虫害及其防治策略[J]. 河北农业科学,2010,14(8):72-74,81.
- [8] 宋哲,徐贵轩,高艳敏,苹果轮纹病综合防控技术[J]. 中国果树,2009(2):60-61,68.
- [9] 王彦荣,胡同乐,曹克强. 5 种杀菌剂对苹果轮纹病菌的室内毒力测定及田间药效试验[J]. 中国果树,2013(3):55-58.
- [10] 姜中武,李元军,于青,等. 苹果抗轮纹病新砧木——烟砧一号的选育[J]. 果树学报,2011,28(2):363-364.
- [11] 王荣,沈向,黄翠香,等. 关于苹果砧木与自根砧快繁技术的综述[J]. 天津农业科学,2012,18(3):115-119.
- [12] 张庆田. 几种苹果砧木组织培养技术的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [13] 王玲,杨丽鹏. 东北百里香组培再生体系的建立[J]. 园艺学报,2011,38(6):1185-1190.
- [14] 李新江,郑永春,迟丽华,等. 草莓组培苗继代培养基筛选试验[J]. 吉林农业科学,2013,38(4):63-65.
- [15] 贾梦雪,徐瑾,叶香娟,等. 春石斛优良品种‘森禾 2006’组培快繁体系的建立[J]. 植物生理学报,2013,49(12):1363-1367.
- [16] 陈丽静,于春叶,李浩戈. 南果梨茎尖离体快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2011,27(31):168-173.
- [17] 刘兰英. 薄壳核桃组织培养中的褐变及防止措施研究[J]. 园艺学报,2002,29(2):171-172.
- [18] 李川,员艳,杨松杰. 降低魔芋球茎组培褐变的技术研究[J]. 中国农学通报,2012,28(31):243-246.
- [19] 陈蕾,曹后男,宗成文. 降低苹果梨组培过程中外植体褐化的研究[J]. 北方园艺,2008(10):139-142.
- [20] 师校欣,陈四维,马宝昆,等. 苹果砧木离体培养中玻化问题的研究[J]. 河北农业大学学报,1990(3):12-15.
- [21] 丰锋,陈盾边. 草莓离体培养中玻化化的发生及克服措施研究[J]. 西南大学学报,2007,29(4):78-82.
- [22] Mujib A, Pal A K. Intervarietal variation in response to *in vitro* cloning of carnation[J]. Crop Research Hisar, 1995, 10:190-194.
- [23] 何芳兰,李毅,赵明,等. 影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(1):104-107.
- [24] 龚明霞,陈小凤,方锋学,等. 洋桔梗组培苗玻璃化原因及恢复的研究[J]. 西南农业学报,2009,22(6):1718-1720.

Study on Rapid Micropropagation Technique by Shoot Tip Culture of Ring Rot Resistant Apple Rootstock J35-8

CHEN Xiaojie, GUO Xingke, ZHANG Yuan, LI Zhongyong, ZHANG Xueying, XU Jizhong
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking the shoot tips of the ring rot resistant apple rootstock J35-8 as materials, by selecting the optimal medium, the effects of plant growth regulators on tissue-cultured seedling induction, multiplication and rooting were researched. The results showed that the basic medium was MS supplemented with sugar 35 g/L and agar 6.2 g/L, the optimal plant growth regulators of start culture medium that suited multiplication were 6-BA 1.00 mg/L+NAA 0.05 mg/L. The optimal plant growth regulators in subculture medium were 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.050 mg/L, and the coefficient of multiplication were exceeded 8.50 times every four weeks. The optimal plant growth regulators for rooting were IAA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L, the rooting rates of shoots were 92.68%, the average number of rooting was 9.35. Then the rooted plantlets were transplanted, the survival rates were 100.00%.

Keywords: apple rootstock J35-8; shoot tip culture; tissue culture and rapid micropropagation; plant growth regulator; ring rot