

DOI:10.11937/bfyy.201602024

“平邑甜茶”组织培养微嫁接技术研究

赵 恺^{1,2}, 张志宏², 李井会¹, 李大兴¹, 吕 萌¹

(1. 松原职业技术学院 农业工程系, 吉林 松原 138005; 2. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以苹果“平邑甜茶”(Malus hupehensis var. pingyiensis)为微嫁接砧木,“寒富”(Malus do-mestica cv. ‘Hanfu’)为接穗,研究了附加不同浓度 6-BA 的培养基、接穗不同生理状态、接穗具有叶片数量、不同接穗/砧木组合对嫁接成活率和嫁接接口愈合的影响。结果表明:最适于微嫁接的培养基为 MS+IAA 0.3 mg/L+BA 1.0 mg/L,选用继代培养 40 d 的接穗和砧木,并且接穗部分具有 2 片真叶时的嫁接成活率最高;用“平邑甜茶”作为砧木的嫁接成活率高(81.3%),嫁接接口愈合最好。该研究为下一步的转基因 sRNA 信号在砧木与接穗间的传递运输研究奠定基础。

关键词:微嫁接;苹果;“平邑甜茶”;sRNA 传递

中图分类号:S 571.103.52 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)02-0088-04

组织培养微嫁接技术创立于 1972 年^[1],是一种组织培养与嫁接相结合、将不同品种的砧木与接穗组培苗在

组织培养条件下进行嫁接的技术。由于其具有所需试材少、节约土地、研究方便等优点,已被广泛地应用于多种果树的研究与生产。如桃属和柑橘属不同种间的嫁接亲和性的早期鉴定^[2],杏、柠檬的嫁接苗分类^[3]。同时微嫁接技术还被广泛应用于植株脱毒^[4]、接口部位组织结构与生理研究、果树病毒的检测以及工厂化苗木快繁等^[5]。

第一作者简介:赵恺(1981-),男,博士,讲师,研究方向为果树遗传育种。E-mail:zkpc4@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171927);松原市科技发展计划资助项目(201402)。

收稿日期:2015-09-30

参考文献

- [1] HERMAN R. Green roofs in Germany: yesterday, today and tomorrow [C]. Proc 1st North American Green Roof Conference: Greening Rooftops for Sustainable Communities, Chicago, 2003: 41-45.
- [2] WILKINSON S J, REED R. Green roof retrofit potential in the central business district[J]. Property Management, 2009, 27(5): 284-301.
- [3] 邵天然, 李超骥, 曾辉. 城市屋顶绿化资源潜力评估及绿化策略分析: 以深圳市福田区为例[J]. 生态学报, 2012, 32(8): 4852-4860.

[4] 陈华敏, 钟愈平, 黄和平. 基于 AHP 和“3R”原则的节能建筑评价指标体系的构建[J]. 生态经济, 2009(5): 92-95.

[5] 上海市质量技术监督局. 上海市屋顶绿化技术规范[S]. 2008.

[6] VIRGINIA S, DUNNETT N, HALLAM A. Green roofs-getting sustainable drainage off the ground[C]. The 6th International Conference of Sustainable, Techniques and Strategies in Urban Water Management, 2007: 11-18.

Establishment of an Evaluation Index System for Roof Greening Constructability

WANG Xinjun¹, XI Guo'an², CHEN Dan³, WANG Yan¹, WANG Jikai¹

(1. School of Art and Design, Changzhou Institute of Technology, Changzhou, Jiangsu 213022; 2. Sheng Dong Community Xinxing Management Company of Shengli Oilfield, Dongying, Shandong 257000; 3. Changzhou Landscaping Administration Bureau, Changzhou, Jiangsu 213002)

Abstract: It is great necessity to evaluate the constructability of a green roof from the aspects of scientific consideration and safety before planting on the top of an existing building. This paper, researched on a refinement of three general factors, including the attributes of a building, the attributes of its rooftop and the location of it, extracts nine indexes for roof greening constructability evaluation, namely the age of a building, the structure, the roof design capacity, the height, the belonging of the roof, the area of covered roof, the area for other purposes, the slope of the roof, the location of the building. All the indexes were limited indexes except the location of the building and the belonging of its roof. This paper also determined the weight of each index through AHP method and thus laid foundation for further advance in roof greening evaluation.

Keywords: roof greening; constructability; evaluation; index system

“平邑甜茶”是湖北海棠(*Malus hupehensis* Rehd.) 中的天然三倍体,染色体数为 $2n=3x=54^{[6]}$,无融合生殖能力很强,实生后代能保持母本性状,是重要的矮化砧木资源。但近来的研究表明,“平邑甜茶”有性后代的无融合生殖能力大大退化^[7],因此组织培养就成了快速繁殖的基础手段。

现以苹果“平邑甜茶”为微嫁接砧木、“寒富”为接穗,建立了适宜的微嫁接体系,为下一步的转基因 sRNA 信号在砧木与接穗间的传递运输研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为苹果“平邑甜茶”和“寒富”。

作为接穗使用的“寒富”组培苗在继代培养基(MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA 0.1 mg/L)中培养,作为砧木使用的“平邑甜茶”组培苗在培养基(MS+6-BA 1 mg/L+IAA 0.1 mg/L+GA 0.1 mg/L)中培养,40 d 后嫁接并进行后续研究。

1.2 试验方法

嫁接参照程玉琴等^[6]的方法并略做改进。在无菌条件下,砧木剪去顶端和茎段(长约 1.5 cm),为避免培养过程中芽增殖,用刀片沿砧木上部纵切(深约为 0.5 cm),将茎段基部侧芽切去。选择长约 2 cm,粗度与砧木相近的接穗,保留 2 片叶,并将其基部削成楔形(长约 0.5 cm)。将接穗插入砧木中,用铝铂纸将接口部位绑紧,接入培养基中进行培养。培养条件:温度恒定在 $(24\pm1)^{\circ}\text{C}$,光照强度 2 000 lx,每日光照时数 16 h。嫁接 45 d 于实验台上将铝箔纸取下,嫁接口处完全愈合并且接穗部分生活旺盛的视为成活苗,并统计嫁接成活率。每处理 25 株,重复 3 次。

1.2.1 附加不同浓度 6-BA 的培养基对嫁接成活率的影响 以苹果“平邑甜茶”为砧木,“寒富”为接穗进行嫁接。将嫁接后的组培苗接种于附加不同浓度(0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)6-BA 的培养基中,45 d 后调查各处理条件下接口愈合情况和成活率。

1.2.2 接穗不同生理状态对嫁接成活率的影响 以继代 40 d“平邑甜茶”为砧木,分别选取继代培养 30、40、50 d 的“寒富”组培苗为接穗进行嫁接。将嫁接后的组培苗接种于苹果继代培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L)中,45 d 后调查各处理条件下接口愈合情况和成活率。

1.2.3 接穗叶片数量对嫁接成活率的影响 以继代 40 d“平邑甜茶”为砧木,继代培养 40 d 的“寒富”组培苗为接穗进行嫁接,接穗顶端分别具有 0、2、4 片真叶,嫁接完成后接种于苹果继代培养基(MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L),45 d 后调查接穗叶片数量对嫁接苗成

活率的影响。

1.2.4 不同接穗/砧木组合对嫁接成活率的影响 设置“寒富”/“平邑甜茶”、“平邑甜茶”/“寒富”为不同的接穗/砧木组合,以 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 为筛选培养基,外植体处理时,接穗保留 2 片真叶进行微嫁接试验,培养 45 d 后统计成活情况。

1.3 项目测定

嫁接成活率(%)=成活个数/嫁接总数 \times 100。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 浓度对嫁接成活率的影响

由表 1 可知,不同浓度 6-BA 对嫁接成活率有显著的影响。在未添加 6-BA 的 MS 培养基中,接穗部分不能正常生长,将绑缚材料铝箔纸解除后,嫁接口愈合情况较差,嫁接成活率很低(13.3%)。但 6-BA 的浓度过高(2.0 mg/L 以上),砧木基部丛生且生长旺盛,嫁接成活率急剧下降(49.3%),砧木与接穗产生营养竞争,接口因此愈合不是很好。而浓度过低时(0.5 mg/L),嫁接成活率也较低(43.3%);只有适宜浓度的 6-BA 成活率较高,因此试验最终确定 6-BA 的最佳使用浓度为 1.0 mg/L(成活率 85.3%),此时嫁接苗生长情况最好(图 1)。

表 1 不同浓度 6-BA 对微嫁接成活率的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA on the grafting survival rate

| 培养基 Media | 6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg·L ⁻¹) | 成活率 Survival rate/% |
|-----------------|--|------------------------|
| MS+IAA 0.5 mg/L | 0.0 | 13.3c |
| | 0.5 | 43.3b |
| | 1.0 | 85.3a |
| | 2.0 | 49.3b |

注:多重比较采用邓肯新复极差法,小写字母表示差异达 0.05 显著水平(以下分析相同)。

Note: The multiple compare uses Duncan method and the lowercase letters show significance at 5%(the following analysis use the same method).

2.2 接穗不同生理状态对嫁接成活率的影响

用做砧木的“平邑甜茶”组培苗在继代 30~40 d 时,植株矮小不适于嫁接,此时适当提高 6-BA 浓度,组培苗高达到 2.5~3.5 cm,径粗 0.2~0.3 cm,适宜作为砧木使用,此时试管苗嫁接易成活。

嫁接 40 d 后将绑缚材料(铝箔纸)去除,统计嫁接成活率。由表 2 可知,接穗继代培养时间过短(30 d),茎细节间较短导致操作困难,嫁接后叶片易萎蔫,成活率低(10.7%);接穗继代培养时间过长(50 d),叶片呈深绿色,组培苗老化,嫁接成活率也较低(45.0%)。接穗继代培养时间为 40 d 时,叶片颜色新鲜、茎粗度适合,便于操作,成活率最高(73.3%),且嫁接口愈合最好(图 2)。



图1 嫁接苗在培养基 MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 中的生长情况

Fig. 1 Growth of grafting plant in MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L

表2 不同接穗苗龄对微嫁接成活率的影响

Table 2 Effect of different age of scions using for culture of apple

| 培养基 Media | 嫁接天数 Days of grafting/d | 成活率 Survival rate/% |
|-----------------|----------------------------|------------------------|
| MS+IAA 0.5 mg/L | 30 | 10.7c |
| | 40 | 73.3a |
| | 50 | 45.0b |

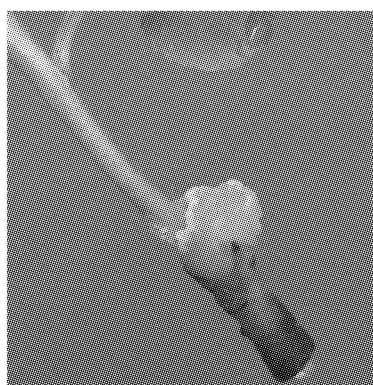


图2 嫁接40 d后接口生长愈合情况

Fig. 2 Growth of grafting plant 40 dyas after grafted

2.3 接穗叶片数量对嫁接成活率的影响

不同接穗所具有叶片数量对嫁接成活率影响显著。由表3可知,叶片少不利于嫁接苗成活,以带2~4片叶片效果较好,嫁接成活率最高(达到80%以上),但微嫁接试验操作极复杂,接穗叶片过多,嫁接时难度大,不便操作,因此一般只保留2片叶。

2.4 不同接穗/砧木组合对嫁接成活率的影响

由表4可知,无论哪一种组合,具有2片真叶的接穗成活率都高于不具叶片的成活率,二者差异显著,说明叶片在制造养分的同时,促进嫁接接口的愈合;而不具真叶的接穗,在生长过程中砧木提供的营养一部分提

供给基部的叶芽,因此生长初期接口的愈合较差,导致成活率较低。

另外“平邑甜茶”其本身在生产中作为砧木使用,吸收营养能力强,因此做为微嫁接苗砧木,嫁接成活率更高。砧木根系吸收养分的能力一般要比栽培苹果高,但该试验未进行砧木带根方面的研究。

表3 不同接穗叶片数量对嫁接成活率的影响

Table 3 Effect of different leaves of scion on the grafting survival rate

| 接穗留叶数量 Leaves number of scion/个 | 成活率 Survival rate/% |
|------------------------------------|------------------------|
| 0 | 13.3c |
| 2 | 81.3a |
| 4 | 85.3a |

表4 不同接穗/砧木组合及叶片数量对嫁接成活率的影响

Table 4 Effect of different kinds of scion/rootstock and leaves of scion on survival

| 接穗砧木组合 Scion and rootstocks | 接穗带叶成活 Survival of scion with leaves | 接穗不带叶成活率 Survival of scion without leaves |
|--------------------------------|---|--|
| “寒富”/“平邑甜茶” | 81.3a | 34.6a |
| “平邑甜茶”/“寒富” | 65.3b | 24.0b |

3 讨论

目前,国内多数的嫁接绑缚材料为锡箔纸或铝箔纸。而国外的一些研究则使用硅胶管作绑缚材料,优点是能及时观察到接口的愈合程度,及时排除死亡的植株,且操作便利^[8],但如嫁接接口愈伤组织过于膨大则不利于成活,因此绑缚材料也会不断更新。进行组培苗嫁接试验时叶片容易失水萎蔫,不利于嫁接的成活,所以在嫁接时应尽量提高速度^[9]。

该试验结果表明,接穗继代培养30 d左右,组培苗虽生长旺盛,但叶小而鲜嫩,茎细,植株不高不适于嫁接。当提高细胞分裂素类浓度(6-BA 1.0 mg/L),此时苗高2.5~3.5 cm左右,径粗0.2~0.3 cm,顶端有明显的新梢,嫁接易成活。

在2006年召开的国家苹果育种研讨会上,山东农业大学束怀瑞院士建议并提出“利用中国特色的资源,重视远缘杂交,生物技术与常规技术结合,转基因育种仍然不能放松”。可见利用转基因技术将在苹果育种方面的应会有大幅度的提升。但是,转基因食品的安全性一直备受关注。RNAi是沉默目的基因的有效手段。所产生的sRNA(small RNA)能进行细胞-细胞的短距离传递,也能经由韧皮部进行长距离运输,长距离运输也被称为系统性沉默。由于木本植物木质化的影响,果树生物技术取得的成果不多,而其中嫁接技术则是最有可能获得成功的技术之一^[10]。借助于嫁接传递转基因砧木中的sRNA已有报道^[11-12]。基因沉默信号如果通过了嫁接接口,这样信号分子就能影响到接穗部分,此方向的

研究已有报道。如周瑞金等^[13]研究表明,外源 *npt* II基因只在转化植株体内表达,不通过嫁接在接穗和砧木间进行传导;FLACHOWSKY 等^[14]将内源 ANS 和外源 *GUS* 基因构建成 RNAi 表达载体,分别转入苹果品种“Pinova”并以此为砧木进行器内嫁接,结果发现砧木部分的基因沉默信号 sRNA 经由韧皮部传递到接穗部分的传递运输方式不同,*GUS* 基因属于系统性的长距离运输,而 ANS 基因则是区域性短距离运输。

以上结果似乎表明木质化决定嫁接信号沉默,但是这也为下游调控砧木中的特定基因而不影响非转基因接穗提供了可能性。如 BULLEY 等^[15]将反义 *MpGA20ox1* 基因导入砧木“M26”,结果发现不仅转基因系植株高度减少了近 50%,而且用转基因系作为砧木嫁接时,接穗部位也有明显的矮化特性。在后续试验中,课题组通过 RNAi 技术下游调控苹果 *GA20-ox* 基因获得了具有明显矮化效应的转基因系,进行组培苗嫁接研究时发现接穗部分矮化特征明显(如节间数量和长度,叶片颜色等),目前正在进行田间苗的嫁接。

果树的优势在于可以选用嫁接的繁殖方式,若能通过试验的方法来探讨目的基因在砧木和接穗之间的传递性,如某些基因的 sRNA 能从砧木传向接穗,也就意味着抗性选择标记仍然留在砧木部分,而不影响果树的可食用部分,这样则有可能解决食品安全性的难题,为今后的转基因育种开阔更广泛的空间,显然基于组织培养微嫁接技术将成为这方面研究的重点课题。

参考文献

- [1] MURASHIGE T, BITTERS W, RANGAN T, et al. Technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones[J]. Horticultural Science, 1972(2): 19-25.
- [2] NAVARRO L. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species[J]. International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species, 1987, 227: 43-56.
- [3] JONARD R, LUKMAN D, SCHALL F, et al. Early testing of graft in-

compatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* techniques[J]. Scientia Horticulturae, 1990, 43: 117-128.

- [4] SINGH B, SHARMA S, RANI G, et al. *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora)[J]. Plant Biotechnology Reports, 2008(2): 137-143.
- [5] KADAM J, KARALE A, GARAD B, et al. Micrografting in wood apple, recent trends in horticultural biotechnology, national symposium on biotechnological interventions for improvement of horticultural crops[J]. New India Publishing Agency, 2007(2): 371-373.
- [6] 程玉琴, 韩振海, 许雪峰, 等. 试管微嫁接早期鉴定小金海棠与苹果品种的亲和性[J]. 农业生物技术学报, 2003(11): 472-476.
- [7] 王颖, 商月惠, 王玉霞, 等. 平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代的胚胎发育特征研究[J]. 园艺学报, 2008, 35: 1093-1100.
- [8] KANEHIRA A, YAMADA K, IWAYA T, et al. Apple phloem cells contain some mRNAs transported over long distances[J]. Tree Genetics and Genomes, 2010(6): 635-642.
- [9] 陈蕾. 梨组织培养及器内嫁接技术的研究[D]. 延吉: 延边大学, 2008.
- [10] HAROLDSEN V, PAULINO G, CHI-HAM C L, et al. Research and adoption of biotechnology strategies could improve California fruit and nut crops[J]. Calif Agr, 2012, 66(2): 62-69.
- [11] SANO T, ISONO S, MATSUKI K, et al. Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants[J]. Virus Genes, 2008, 373: 298-303.
- [12] HAROLDSEN V, SZCZERBA M, AKTAS H. Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement[J]. Front Plant Sci, 2012(3): 39.
- [13] 周瑞金, 杜国强, 师校欣. 标记基因 *nptII* 在转基因苹果嫁接砧穗间无相互传导[J]. 园艺学报, 2006(33): 1329-1330.
- [14] FLACHOWSKY H, TRANKER C, SZANKOWSKI I, et al. RNA-mediated gene silencing signals are not graft transmissible from the rootstock to the scion in greenhouse-grown apple plants *Malus* sp[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012(13): 9992-10009.
- [15] BULLEY S, WILSON F, HEDDEN P, et al. Modification of gibberellin biosynthesis in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005(3): 215-223.

Research on *in vitro* Micrografting of *Malus hupehensis* var. *Pingyiensis*

ZHAO Kai^{1,2}, ZHANG Zhihong², LI Jinghui¹, LI Daxing¹, LYU Meng¹

(1. Department of Agricultural Engineering, Songyuan Vocational Technical College, Songyuan, Jilin 138005; 2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: Taking ‘Pingyitiancha’ (*Malus hupehensis* var. *pingyiensis*) as rootstock and ‘Hanfu’ (*Malus domestica* cv. ‘Hanfu’) as scion, the effect of different concentrations of 6-BA, ages of scion, leaves number of scion, kinds of scion/rootstock on the grafting survival rate was researched. The results showed that MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L, rootstocks and scions were cultured for 40 days, with 2 leaves on the scion and ‘Pingyitiancha’ was used as the rootstock, the survival rate of micrografting was 81.3%. Those were the foundation of transferring sRNA from rootstocks to scions.

Keywords: micrograft; apple; *Malus hupehensis* var. *pingyiensis*; sRNA transmission