

苹果茎尖培养快繁体系的优化

谢璇, 许轲, 谢闽新, 朱元娣*

中国农业大学农学与生物技术学院果树系, 北京100193

摘要: 为提高苹果苗木繁殖速度及苗木品质, 本文以‘红富士’苹果组培苗为试材, 探索苹果茎尖启动培养过程中黑暗培养对不定芽再生、生根诱导培养过程中IBA和蔗糖浓度对不定根发生及不同炼苗方式对组培苗移栽成活的影响, 优化了苹果茎尖培养的快繁体系。结果表明, 茎尖启动培养中, 在培养基MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+山梨醇20 g·L⁻¹+蔗糖10 g·L⁻¹上, 20 d暗培养后再转入不含NAA的MS培养基(其他成份同上)进行光照培养, 茎尖愈伤组织的诱导率和不定芽再生率较高, 优于黑暗培养40和60 d。培养基1/2 MS+IBA 1.00 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹适宜不定芽的诱导生根, 并且在低浓度IBA的生根培养基中, 蔗糖浓度的提高有利于苹果组培苗的不定根发生。炼苗的初始2周采用改良的霍格兰德半营养液覆膜水培炼苗, 后转入全营养液中敞口培养3周, 再移栽至营养钵中, 组培苗移栽成活率可达到75%, 优于常规的苹果组培苗炼苗处理。

关键词: 苹果; 茎尖培养; 不定根诱导; 水培炼苗; 组培快繁

Optimization of Rapid Micropropagation System of Apple Meristem-Tip Culture

XIE Xuan, XU Ke, XIE Min-Xin, ZHU Yuan-Di*

College of Agriculture and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100193, China

Abstract: To speed up the propagation and improve the quality of apple nursery plants, a system of apple meristem-tip culture was optimized. In this study, ‘Red Fuji’ plantlets were used to explore appropriate incubating time in darkness for generating adventitious shoots during the initiation of meristem-tip cultures, concentrations of sucrose and IBA for inducing adventitious roots and acclimating plantlets. The results showed that the rates of callus induction and regeneration of adventitious shoots were relatively high, respectively, when meristem-tip explants were cultured in 20 days of darkness on the MS medium supplying with 6-BA 4.0 mg·L⁻¹, NAA 0.5 mg·L⁻¹, sorbitol 20 g·L⁻¹ and the following lighting on NAA free MS medium. Twenty-days culture in darkness was more suitable for initiation of apple meristem tips than 40-days and 60-days darkness. The 1/2 MS medium supplementing with IBA 1.0 mg·L⁻¹ was suitable for inducing rooting. Higher concentration of sucrose, combined with low concentration of IBA led to better rooting of apple plantlets. The survival rate of apple plantlets reached 75% after the hydroponic acclimation, by which apple plantlets were sealed in bottles and cultured in semi-nutrient Hoagland solution for the first two weeks, and then unsealed in total nutrient Hoagland solution for three weeks before transplanting to pots. This hydroponic method was superior to the usual acclimating method for the survival of plantlets.

Key words: *Malus × domestica*; meristem-tip culture; adventitious root induction; hydroponic acclimation; *in vitro* rapid propagation

我国是世界上苹果生产大国。2013年, 我国苹果的种植面积约为241万公顷, 产量达到约3 968万吨, 居世界第一(FAO统计数据)。现代化苹果产业的迅速发展, 需要大量的高品质无病毒苗木。现阶段我国苹果品种的苗木繁育以嫁接繁殖为主, 育苗受季节限制, 苗木繁育速度慢, 容易感染病毒(钟晓红等2003)。国内目前的苹果主栽品种及砧木普遍带有病毒, 带毒率一般为60%~80% (王亚南等2010)。茎尖组织培养是快速繁殖优良苗木的有效途径, 而且能在一定程度上脱除病毒, 繁殖系数

高, 可在短时间内为生产提供大量整齐一致的苗木(张虎平等2009; 王淼淼等2014)。

植物茎尖培养通常要经过启动培养、增殖培养、生根诱导和驯化移栽四个过程。苹果茎尖培养最常用的培养基是MS培养基, 不定芽再生效率高(Welander 1985)。其他培养基如LS适合于‘嘎

收稿 2015-08-27 修定 2015-12-08

资助 国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-30)。

* 通讯作者(E-mail: zhuyd@cau.edu.cn; Tel: 010-62733995)。

啦’苹果茎尖培养(AL-Juboory和AL-Niami等1996), DKW适用于苹果砧木‘MM106’和‘M9’的茎尖培养(Muleo和Morini 2006, 2008)。不同的糖源种类影响苹果茎尖培养的不定芽的生长和增殖, 通常使用3%的蔗糖作为碳源(Dobrąnszki和Teixeira da Silva 2010)。山梨醇作为碳源可以促进‘嘎啦’苹果繁殖体的不定芽生长, 但‘旭’苹果和‘Make’苹果则以葡萄糖或蔗糖作为碳源优于山梨醇, 山梨醇作为糖源后使不定芽的增殖量减少(Dobrąnszki和Teixeira da Silva 2010)。启动培养阶段可通过暗培养的方法诱导外植体愈伤组织的产生和再分化(Caboni等2000)。“国光”苹果和“富士”苹果的叶片培养过程中, 直接进行光培养的愈伤诱导率只有50%~55%, 先暗培养14或21 d再光培养, 叶片的愈伤组织诱导率达100%(崔美等2012)。组培过程中, 培养基中生长调节物质如BA、IBA、KT等的浓度和配比因品种和外植体类型及培养过程而异(钟晓红等2003)。苹果不定芽增殖以BA作为常用的细胞分裂素, 浓度通常在0.5~2 mg·L⁻¹之间。高浓度的细胞分裂素, 且不含IBA的培养基有利于腋芽分生组织培养(Fouad等1995)。试管苗生根诱导以MS或1/2MS(Fouad等1995; Kaushal等2005)为基本培养基。不同苹果品种组培诱导生根所需要的生长调节剂浓度不同, 如‘旭’苹果在1 mg·L⁻¹ IBA上生根良好, 而‘皇家嘎啦’苹果在2 mg·L⁻¹ IBA水平上生根良好, ‘Prima’苹果则在3 mg·L⁻¹ IBA水平上生根良好(Dobrąnszki和Teixeira da Silva 2010)。组培苗的驯化移栽是苹果茎尖培养过程中的关键环节, 未经驯化将组培苗直接移植于田间, 组培苗的成活率很低(钟晓红等2003)。驯化阶段一般包括闭瓶炼苗和开瓶炼苗两个阶段。苹果试管苗在30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹的强光下闭瓶炼苗20 d左右, 其幼嫩组织充实, 叶大而浓绿、有光泽, 根系数量增多(王鹏飞和杜俊杰2004)。开瓶炼苗时间以2~3 d为宜, 但不同树种的炼苗在具体操作时有较大差异, 开瓶炼苗要在充分试验后确定最佳的天数(王鹏飞和杜俊杰2004)。

‘红富士’是生产上推广应用的优良品种, 而目前对于‘红富士’苹果茎尖培养体系的报道较少。本研究以‘红富士’苹果组培苗为试材, 探索黑暗培养对不定芽再生的影响、生根诱导培养过程中生

长素和蔗糖浓度对不定根发生的影响及驯化移栽过程中不同炼苗方式对苹果组培苗移栽成活的影响, 优化苹果茎尖培养快繁体系, 为将组培快繁技术应用于苹果无病毒苗木繁育和商业化生产, 提供试验数据。

材料与方法

1 试验材料

健壮生长的‘红富士’(*Malus × domestica* Borkh. cv ‘Red Fuji’)苹果的组培苗(由实验室保存)。组培苗在培养基MS(蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂6.8 g·L⁻¹)+IBA 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+GA 0.2 mg·L⁻¹, 温度(25±2) °C, 光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间14 h·d⁻¹条件下培养。

2 试验方法

2.1 苹果组培苗茎尖培养

在超净台内利用解剖显微镜及解剖针将生长一致的组培苗的长约0.25 mm的茎尖剥离, 放入诱导培养基(MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+山梨醇 20 g·L⁻¹+蔗糖10 g·L⁻¹+琼脂6.8 g·L⁻¹)中, 分别进行20、40和60 d黑暗培养处理。之后将茎尖发生的愈伤组织转移至再生培养基(MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+山梨醇 20 g·L⁻¹+蔗糖 10 g·L⁻¹+琼脂 6.8 g·L⁻¹)中, 在光照条件(30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 14 h·d⁻¹)下培养。以上3个处理各含15个苹果组培苗茎尖, 重复3次。统计茎尖的愈伤诱导率 and 不定芽再生率。愈伤诱导率=(诱导出愈伤组织的外植体个数/接种外植体数)×100%, 不定芽的再生率=(萌芽的愈伤组织数/总愈伤组织数)×100%。

2.2 苹果组培苗不定根的诱导培养

当茎尖愈伤组织再生出的不定芽长度为4 cm左右时, 对其剪切并转移至不同的培养基中进行不定根诱导处理。添加IBA的生根培养基基本成分为1/2MS、蔗糖20 g·L⁻¹和琼脂6.8 g·L⁻¹, 添加5个浓度(0.25、0.5、0.75、1.00和1.5 mg·L⁻¹)的IBA。添加蔗糖的生根培养基的基本成分为1/2 MS、琼脂6.8 g·L⁻¹、IBA 0.25 mg·L⁻¹, 添加3个浓度(10、20和30 g·L⁻¹)的蔗糖。光照条件同2.1节。以上共8个处理, 每个处理含苹果组培苗15株, 各重复3次。30 d后统计生根数及平均根长, 平均根长为每株组培苗最长3条不定根的平均值。

2.3 苹果组培苗驯化移栽

选取生根培养30 d后的‘红富士’苹果组培苗200株,进行常规炼苗和水培炼苗2种驯化移栽处理,每处理含100株组培苗。

常规炼苗将生长健壮的组培苗置于室内自然光照下,从散射光到直射光照炼苗5~7 d后,去掉封口膜炼苗3 d。将组培苗从瓶中取出,用清水将根部残留的培养基冲洗干净后,移栽入营养钵中,营养土配方是蛭石:草炭:营养土为2:2:1 (V:V:V)。温室条件下5周后统计苹果组培苗的移栽成活率。

水培炼苗将生长健壮的组培苗从培养基中取出,用清水将根部残留的培养基冲洗干净后放入改良的霍格兰德半营养液,即霍格兰德配方用量减半(Arnon和Hoagland 1944)的广口瓶中加封口膜覆盖,室内自然光下培养2周。之后将苹果组培苗转移至含全霍格兰德营养液的广口瓶中,室内自然光下敞口炼苗培养3周。每周更换一次相同的营养液。炼苗5周后移栽入营养钵中(营养土配方

同上),温室条件下5周后统计苹果组培苗的移栽成活率。

实验结果

1 黑暗培养对苹果茎尖培养再生不定芽效率的影响

在超净台内利用解剖显微镜及解剖针将组培苗的长约0.25 mm的茎尖剥离,放入愈伤诱导培养基中,分别进行黑暗培养20、40和60 d,之后转移至不定芽再生培养基中光照培养(图1)。3个处理的愈伤诱导率无显著差异,均在90%以上。经过黑暗培养20 d的茎尖愈伤组织的不定芽的再生率显著高于黑暗培养40和60 d的茎尖愈伤组织,可达到93.33%(表1)。

将茎尖诱导生成的愈伤组织捣碎并在显微镜下进行细胞形态观察及检测(图2),发现茎尖诱导的愈伤组织中细胞大多呈圆形或近圆形,为潜在的胚性细胞。由此推测,茎尖分生组织的细胞在培养过程中保持了较好的分裂能力与较低的分化程度,更易于芽再生。

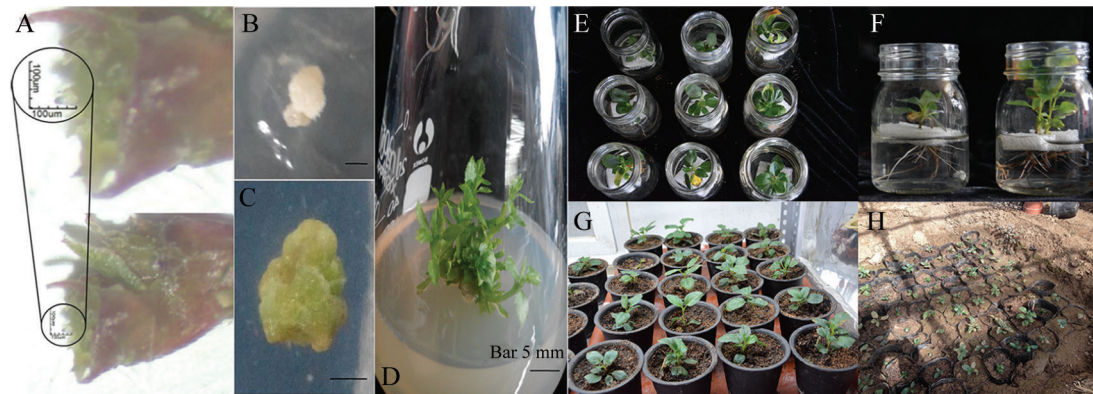


图1 苹果茎尖培养快繁体系的优化过程

Fig.1 Optimization of rapid micropropagation system of apple meristem-tip culture

A: 苹果茎尖分生组织的剥离; B: 黑暗培养20 d后茎尖诱导生成的愈伤组织; C: 光照培养4周愈伤组织转绿膨大; D: 光照培养15周后的再生不定芽; E、F: 苹果组培苗水培炼苗; G: 苹果组培苗移栽到营养钵中; H: 苹果组培苗定植进入温室。

表1 黑暗培养时间对苹果茎尖不定芽再生效率的影响

Table1 Effect of incubating time in darkness on the adventitious shoots' regeneration efficiency of apple

黑暗培养时间/d	茎尖数/个	诱导出愈伤组织数/个	愈伤诱导率/%	再生不定芽数/个	不定芽再生率/%
20	45	43	95.33±4.04 ^a	40	93.33±6.50 ^a
40	45	41	91.00±10.14 ^a	22	53.33±3.51 ^b
60	45	41	91.00±3.46 ^a	7	16.67±3.79 ^c

采用Duncan多重比较法,表中数字为平均数±标准差,小写字母表示在0.05水平下的差异显著。下表同此。

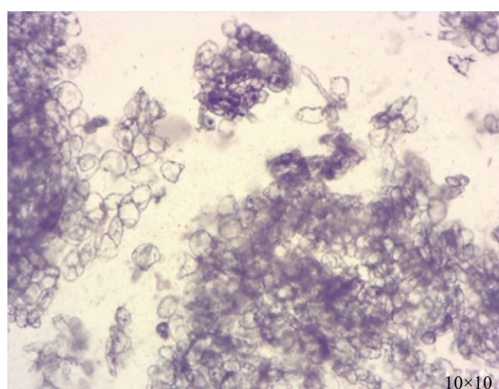


图2 苹果茎尖愈伤组织的细胞显微观察
Fig.2 The microscopic observation of callus cells from apple meristem tips

2 不同IBA和蔗糖浓度对苹果组培苗不定根发生的影响

将长度达到4 cm左右的芽剪切, 转移至不同的培养基中进行不定根诱导处理。表2显示, 平均生根数随添加IBA浓度的增加而显著增加, 当添加IBA浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 平均生根数最多; 当添加IBA浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 平均根长最长。

表2 IBA浓度对苹果组培苗不定根再生的影响
Table2 Effect of IBA concentration on regenerating adventitious roots from apple propagules

IBA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均生根数/条	平均根长/cm
0.25	4 ± 0.63^d	5.39 ± 1.60^b
0.50	6 ± 1.21^c	5.38 ± 0.79^b
0.75	9 ± 1.97^b	5.94 ± 1.66^{ab}
1.00	10 ± 1.41^b	7.26 ± 1.80^a
1.50	14 ± 2.19^a	5.62 ± 0.62^{ab}

为验证糖源浓度对苹果组培苗生根的影响, 在含有IBA $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的1/2MS培养基中添加不同浓度的蔗糖。表3显示, 当蔗糖浓度提高至 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 平均生根数最多, 显著高于其他两个处理; 当蔗糖浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 平均根长最长, 显著高于其他两个处理。在低浓度IBA的生根诱导培养基中, 蔗糖浓度的提高也有利于苹果组培苗的不定根发生。

3 炼苗过程对苹果组培苗移栽成活率的影响

选取生根培养30 d后的‘红富士’苹果组培苗200株, 进行常规炼苗和水培炼苗两种驯化处理,

表3 蔗糖浓度对苹果组培苗不定根再生的影响

Table3 Effect of sucrose concentration on regenerating adventitious roots from apple propagules

蔗糖浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	生根数/条	平均根长/cm
10	6 ± 0.44^b	5.39 ± 0.56^b
20	6 ± 0.72^b	6.15 ± 0.44^a
30	10 ± 1.22^a	5.28 ± 0.47^c

炼苗后分别移栽入营养钵中, 温室条件下5周后统计移栽成活率(图1)。水培炼苗5周后, 移栽成活率可达到75%, 常规炼苗移栽成活率仅为40%。水培炼苗过程中炼苗时间的延长使组培苗叶色变绿, 生长健壮。营养液培养替代常规炼苗时的琼脂培养基, 使根系生长健壮, 移栽后缓苗容易, 成活率高。

讨 论

植物茎尖组织培养, 根据茎尖培养的目的和外植体大小可分为茎尖分生组织培养和普通茎尖培养两种类型(钟晓红等2003)。茎尖大小对茎尖培养的分化与再生能力影响达极显著水平, 茎尖大, 分化率高; 而脱毒率与茎尖大小成反比, 茎尖越小, 脱毒率越高(董淑英等2001)。病毒在植物体内分布是不均匀的, 植物茎尖处存在一个直径为0.1 mm, 长为0.25 mm的无毒区, 这是茎尖培养可以脱毒的依据(胡国君等2014)。为了提高茎尖培养的成功率、减轻茎尖初始培养的褐化程度, 多采用约0.5 mm大小的茎尖组织(由茎端分生组织和几枚叶原基所构成)或者是更大的组织为外植体进行组培繁殖(Caboni等2000)。普通茎尖培养, 病毒脱毒效果有限。因此, 苹果无病毒苗木生产上, 主要采用热处理和普通茎尖培养相结合, 对于苹果褪绿叶斑病毒、茎痘病毒和茎沟病毒的脱毒率可达50%~83.3% (程玉琴等2003; Hu等2015)。以0.1~0.3 mm的苹果茎尖为外植体培养, 苹果褪绿叶斑病毒的脱除率达100%, 苹果茎沟病毒的脱除率可达77%~88% (董淑英等2001)。无叶原基的菊花茎尖培养(茎尖 $<0.2\text{mm}$)能有效脱除较难脱毒的病毒和类病毒(Hosokawa 2008)。本研究在超净台中剥取了长度0.25 mm左右的‘红富士’苹果茎尖分生组织, 进行愈伤诱导和不定芽再生培养, 愈伤诱导率和不定芽再生率均达到90%以上, 克服了小体积

茎尖培养不定芽再生困难的问题。同时, 0.25mm 茎尖培养从理论上讲可以脱除苹果病毒和类病毒, 但病毒脱除率还需进行检测。本文优化的苹果茎尖组培体系为苹果无病毒苗木的繁育提供了实验数据。

不定根诱导是组培过程中关键的一步, 碳源种类和浓度影响组培苗的生根诱导效率(孙洪雁等2014)。培养基中蔗糖浓度从1%提高到3%, 苹果砧木‘MM.106’的生根率、单株生根数及根的长度都随之增加(Bahmani等2009)。将培养基中蔗糖浓度从2%提高到3%, 苹果砧木‘JM7’不定根的发生速度变快, 并且根长和根粗都有所增加(孙洪雁等2014)。本试验在含有低浓度生长素类物质的1/2 MS培养基中提高蔗糖浓度, ‘红富士’苹果组培苗的生根数和平均根长显著增加。说明根的诱导生成需要较高的能量, 蔗糖浓度的提高有利于不定根的发生。

本文采用了水培炼苗的方法, 将组培苗闭瓶培养在改良的霍格兰德半营养液中, 炼苗2周后再用改良的霍格兰德全营养液开瓶炼苗3周, 再移栽入营养钵中。这种方法克服了常规炼苗过程中, 去封口膜后培养基干裂、霉菌过多繁殖, 以及移栽时组培苗根系去除干燥的培养基而容易受伤, 使移栽成活率下降(王鹏飞和杜俊杰2004)。炼苗时间的延长, 使叶片光合性能增强, 提高了组培苗对外界光照和温湿度变化的适应能力, 同时水培过程也锻炼了组培苗根系的吸水能力, 使移栽成活率提高。

本研究以‘红富士’苹果组培苗为试材, 剥取0.25 mm的茎尖进行组织培养, 茎尖启动培养以20 d黑暗培养利于愈伤诱导和不定芽再生, 添加IBA 1 mg·L⁻¹、蔗糖20 mg·L⁻¹的1/2 MS培养基适宜不定根诱导且在低浓度生长素类物质(IBA 0.25 mg·L⁻¹)的生根培养基中提高蔗糖浓度(30 g·L⁻¹)有利于不定根的发生, 已生根的健壮苹果组培苗采用水培炼苗法炼苗5周后移栽, 成活率高。此优化的苹果茎尖培养体系繁殖效率高, 易于生产性操作, 为苹果无病毒苗木繁育和商业化生产, 提供了技术支持。

参考文献

程玉琴, 韩振海, 徐雪峰(2003). 苹果病毒及其脱毒检测技术研究进

- 展. 中国农学通报, 19 (1): 72~74
- 崔美, 焦其庆, 陈学森, 陈晓流(2012). 苹果叶片愈伤组织的诱导培养. 山东农业科学, 44 (3): 17~20
- 董淑英, 孙静, 潘忠强, 李梅, 于秋华(2001). 苹果茎尖脱毒技术研究. 河北农业科学, 5 (2): 30~35
- 胡国君, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 任芳, 朱红娟(2014). 苹果脱毒技术研究进展. 植物保护, 40 (6): 7~12
- 孙洪雁, 孙清荣, 李国田, 张琼, 李芹(2014). 苹果矮化砧木‘JM7’的组织培养及其离体叶片不定梢再生. 植物生理学报, 50 (6): 779~784
- 王鹏飞, 杜俊杰(2004). 果树试管苗的炼苗移栽技术. 山西果树, 3: 20~22
- 王亚南, 胡同乐, 刘淑香, 赵绪生, 杨军玉, 曹克强(2010). 我国苹果病毒病的研究现状. 安徽农业科学, 38 (15): 7933~7936
- 王淼淼, 马晓月, 张学英, 徐继忠(2014). 苹果抗寒矮化砧木71-3-150茎尖培养快繁体系建立. 西部林业科学, 43 (6): 44~47
- 钟晓红, 戴思慧, 马定涓(2003). 核果类果树茎尖培养研究进展. 果树学报, 20 (5): 388~392
- 张虎平, 张志明, 张录霞, 马兵钢, 樊宪伟(2009). 抗寒苹果‘新冠’的茎尖组织培养. 北方园艺, (2): 99~101
- AL-Juboory KH, AL-Niami JH (1996). Thidiazuron and benzylamino purine stimulation of apple shoot proliferation *in Vitro*. Horticulture, 31 (4): 564~702
- Arnon DI, Hoagland DR (1944). The investigation of plant nutrition by artificial culture methods. Boil Rev, 19 (2): 55~67
- Bahmani R, Karami O, Gholami M (2009). Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. World Appl Sci J, 6 (11): 1513~1517
- Caboni E, Lauri P, D'Angeli S (2000). *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. Plant Cell Rep, 19: 755~760
- Dobrąnski J, Teixeira da Silva JA (2010). Micropropagation of apple - A review. Biotechnol Adv, 28: 462~488
- Fouad MM, Gomaa AH, El-Zaber MHA (1995). Factors influencing rooting of peach shoots cultured *in vitro*. Acta Hort, (409): 197~202
- Hosokawa M (2008). Leaf primordia-free shoot apical meristem culture: a new method for production of viroid-free plants. J Jpn Soc Hortic Sci, 77 (4): 341~349
- Hu GJ, Zhang ZP, Dong YF, Fan XD, Ren F, Zhu HJ (2015). Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. Plant Pathol, 44: 167~173
- Kaushal N, Modgil M, Thakur M, Sharma DR (2005). *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. J Exp Biol, 43: 561~565
- Muleo R, Morini S (2006). Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype in *in vitro* culture. Sci Hortic, 108: 364~370
- Muleo R, Morini S (2008). Physiological dissection of blue and red light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing *in vitro*. J Plant Physiol, 165: 1838~1846
- Welander M (1985). *In vitro* shoot and root formation in the apple cultivar Akerö. Ann Bot, 55: 249~261