

苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’的组织培养及其离体叶片不定梢再生

孙清荣*, 关秋竹, 孙洪雁, 李林光, 陶吉寒, 王海波, 何平

山东省果树研究所, 山东泰安27100

摘要: 本文以苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’为试材, 研究基本培养基及植物生长调节物质对无菌苗增殖和生根的影响; 并以无菌苗离体叶片为外植体, 研究基本培养基、植物生长调节物质及碳源对叶片不定梢再生的影响。结果表明, 无菌苗的适宜增殖培养基为 $QL+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}$, 增殖系数为5.1。适宜的生根培养基为 $1/4MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}+20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}$, 生根率为77.9%, 平均每株根数为3.5。离体叶片不定梢再生的最佳培养基为改良MS (NM)+ $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ D-山梨醇}$, 再生率为85.6%。

关键词: 苹果砧木; 增殖; 生根; 离体叶片; 不定梢再生

果树作物的繁殖通常是把接穗嫁接在一个特定的砧木上, 这种嫁接繁殖方式一方面可保持接穗品种的优良特性及树体的一致性(D’Yakov等2014), 另一方面利用了砧木对接穗品种的生长影响, 如砧木可有效地影响树体的大小、果实的质量和产量及对不良环境条件的抵抗能力(如抗寒)(Wildung等2000; Talaie等2004; Perry等2004)等。在苹果上应用最多的是矮化或半矮化砧木。矮化砧木适用于生长势强的接穗品种, 半矮化砧木适用于生长势中庸或较弱的接穗品种, 目的都是使接穗品种树体矮化。矮化可提高种植密度, 提高单产, 方便管理, 矮化密植是现代化果园种植的方向。越冬伤害是北方苹果种植区时常发生的问题, 因此, 抗寒砧木的培育与应用也是北方苹果栽培的关键技术之一。

正是由于砧木对接穗品种的重要作用, 各国在重视接穗品种选育的同时, 同样重视砧木的培育。不断有实验室和育种机构研发出优良的砧木新品种。苹果砧木‘54-118’由俄罗斯俄瓦维洛夫植物遗传资源研究所赠送山东省果树研究所。资料显示该砧木是适用于生长势中庸或较弱接穗品种的一个抗寒半矮化砧木(Dyadchenko 1990)。由于赠与枝条数量较少, 不能满足快速用苗的需求。组织培养方法是实现快速育苗的重要技术手段, 短期内可实现苗木的大量繁殖。组培苗还具有防止病害扩散、保持母本优良特性、实现无病毒苗繁育等特点。因此很多砧木品种都成功建立了组培快繁技术体系(Dalal等2006; Yaseen等2009; 孙洪雁等2014; 孙清荣等2014; 杨艳敏等2016)。但砧木‘54-118’的组织培养和离体叶片不定梢再生研究在国内外未见报道。本文的目的是建立抗寒半矮化

砧木‘54-118’的组织培养快速繁殖技术体系, 为尽快试验其在我国的适应性及观察其综合性状表现提供足够试材。建立离体叶片高效不定梢再生技术体系, 为利用生物技术手段改良此砧木品种的某些性状提供技术支撑。

材料与方法

1 材料

嫁接生长在山东省果树研究所天平湖基地果园的砧木品种(*Malus* sp.) ‘54-118’。

2 方法

2.1 试管苗建立

4月中下旬, 取半木质化的新生长的绿梢, 剪掉叶片, 把枝条带回实验室。在实验室内把枝条剪成一芽一段的芽段, 放洗衣粉水中刷洗, 然后用自来水流水冲洗30 min。把材料拿到超净工作台上, 放入无菌烧杯内, 先加70%酒精摇动杀菌1 min, 倒掉酒精加次氯酸钠溶液(有效氯为5%)杀菌10 min, 期间摇动3~5次, 倒掉次氯酸钠溶液加无菌水洗3~5次。取出材料, 用无菌吸水纸吸去表面水分, 把芽段接种到芽启动培养基($1/2MS+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 蔗糖}$)。接种后放在光照周期为 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照强度为 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 的培养条件下培养。在启动培养基上培养4周, 腋芽萌发生长形成无根绿梢, 转移到增殖培养基进行继代增殖。

收稿 2017-06-15 修定 2017-10-20

资助 山东省农业良种工程项目(鲁科字[2014]96)和山东省重点研发计划项目(2016GNC113008)。

* 通讯作者(E-mail: sdipss@163.com)。

2.2 试管苗继代增殖

增殖培养基设为QL和MS培养基,分别添加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。每一种培养基接种5瓶,每瓶6个外植体。每一继代培养周期为4周,继代培养3次,分别记录每个继代周期增殖系数,继代3次增殖系数的平均值记为每种培养基的增殖系数。

2.3 试管苗生根

切取在增殖培养基上生长高度 $\geq 1.5\text{ cm}$ 的健壮绿梢,转移到生根培养基诱导生根。生根培养基为分别添加 0.1 、 0.3 、 0.5 和 $0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的1/4MS培养基,组成4个处理,每个处理添加 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。转接后先在黑暗条件下培养5 d,然后转移到光照周期为 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 条件下培养。生根培养4周,观察计数生根梢数和每株生根数。计算生根率和平均每株根数。生根率=生根梢数/接种总梢数 $\times 100\%$,平均生根数=总生根数/生根株数。

2.4 叶片再生不定梢诱导

摘取增殖生长3~4周绿梢顶端刚展开嫩叶,用无菌刀片垂直于叶片中脉横切伤,依据叶片大小切3~5个伤口,至少一边的叶片边缘不切断,使叶片是一个带有伤口的完整叶片。把切好的叶片接种到装有叶片不定芽诱导培养基的三角瓶内,每瓶接种10个叶片,每个处理接种3瓶。叶片接种后先暗培养3周,然后转移到同2.1的光照条件下培养。培养7周时统计叶片不定芽再生率。实验重复2次。

不定芽诱导培养基的基本培养基为MS和改良MS(NM)。MS上分别添加不同浓度的TDZ(0.5 、 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和6-BA(3.0 、 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),共构成4个处理,每个处理加 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA和 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖培养基(表2编号1~4)。

NM基本培养基为对MS大量元素进行改良,其大量元素营养成分组成如下(单位 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): $800\text{ NH}_4\text{NO}_3$ 、 950 KNO_3 、 $270\text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $360\text{ Mg}\cdot\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $600\text{ Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。NM上添加植物生长调节物质TDZ、6-BA及IBA,碳源为蔗糖和D-山梨醇,共构成12个处理(表2编号5~10)。

3 数据统计分析

实验结果采用DPS v3.01软件进行统计分析,不同处理平均值用Turkey法进行差异比较分析。

实验结果

1 苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’试管苗的建立

半木质化芽段在芽启动培养基上培养14 d,腋芽开始萌发(图1-A);培养40 d,腋芽伸长生长形成无菌绿芽梢(图1-B),腋芽萌发率为70%。

2 苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’试管苗的增殖

绿芽在增殖培养基QL上生长表现最佳,既有较高的增殖系数,又有良好的伸长生长(图1-C),增殖系数为4.2;而在MS培养基上虽然增殖较好,增殖系数为5.1,但伸长生长很差(图1-D),表现为新增殖芽不伸长,转接时的母梢顶端叶不展或顶梢叶黄,不是继代增殖的最适培养基。

3 苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’试管苗生根诱导

IBA对‘54-118’试管苗的生根率和平均生根数都有显著影响(表1,图1-E和F)。IBA浓度从 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,生根率和平均生根数也随之增加。而当IBA浓度提高到 $0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其生根率和平均生根数反而下降。因此,‘54-118’试管苗适宜的生根培养基为1/4MS+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA+ $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖,生根率为77.9%。但生根率较高的IBA浓度($0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)使茎基部产生较多愈伤组织(图1-E和F),但不影响根的伸长生长,表现为根长、细并呈现红色。

4 苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’叶片不定梢诱导

4.1 基本培养基组成对叶片不定梢再生的影响

表2显示,以MS为基本培养基添加 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ处理获得的不定梢再生率最高,其次为 $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA,最低为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ(培养基1~4)。这四种不同培养基的再生率差异不显著,再生率都在50%以下。

以NM为基本培养基,蔗糖为碳源时,细胞分裂素6-BA比TDZ更有利于提高叶片不定梢再生率(表2)。不同浓度6-BA的不定梢再生率高于不同浓度TDZ的不定梢再生率。2或 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA处理的不定梢再生率显著高于TDZ 3个浓度的再生率。不同TDZ浓度间的再生率差异不显著。以添加 $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA处理的再生率最高,为71.3%。

在蔗糖为碳源条件下,细胞分裂素物质为TDZ,MS培养基上的再生率稍高于NM;细胞分裂素为6-BA,则NM培养基上的再生率高于MS; $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA处理的NM再生率显著高于MS。表明基本培养基NM比MS更有效。

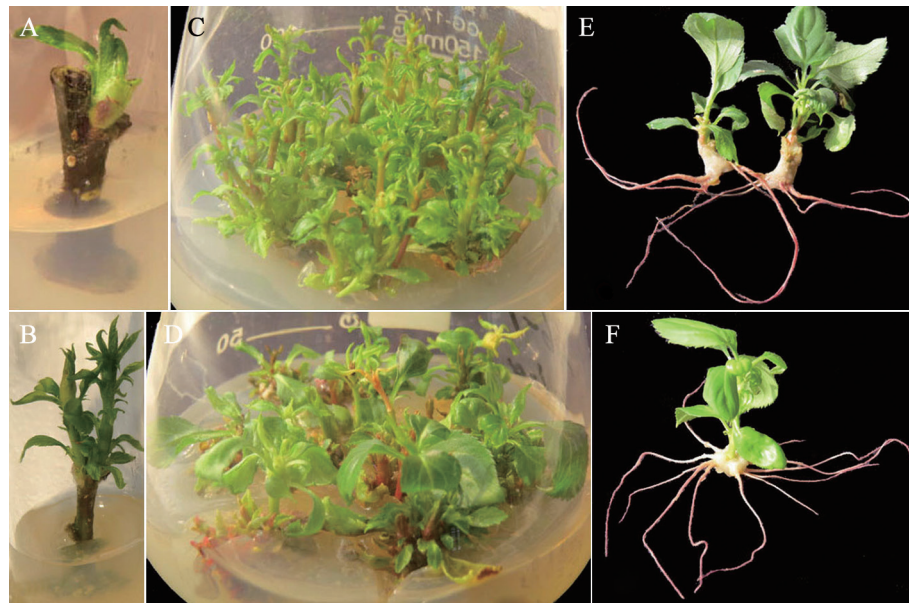


图1 苹果砧木‘54-118’试管苗建立、增殖和生根

Fig.1 Establishment, proliferation, rooting of *in vitro* shoots of apple rootstock ‘54-118’

A: 腋芽萌发; B: 腋芽伸长生长; C和D: 分别在QL和MS培养基上增殖培养; E和F: 分别在IBA为0.5和0.3 mg·L⁻¹培养基上生根培养。

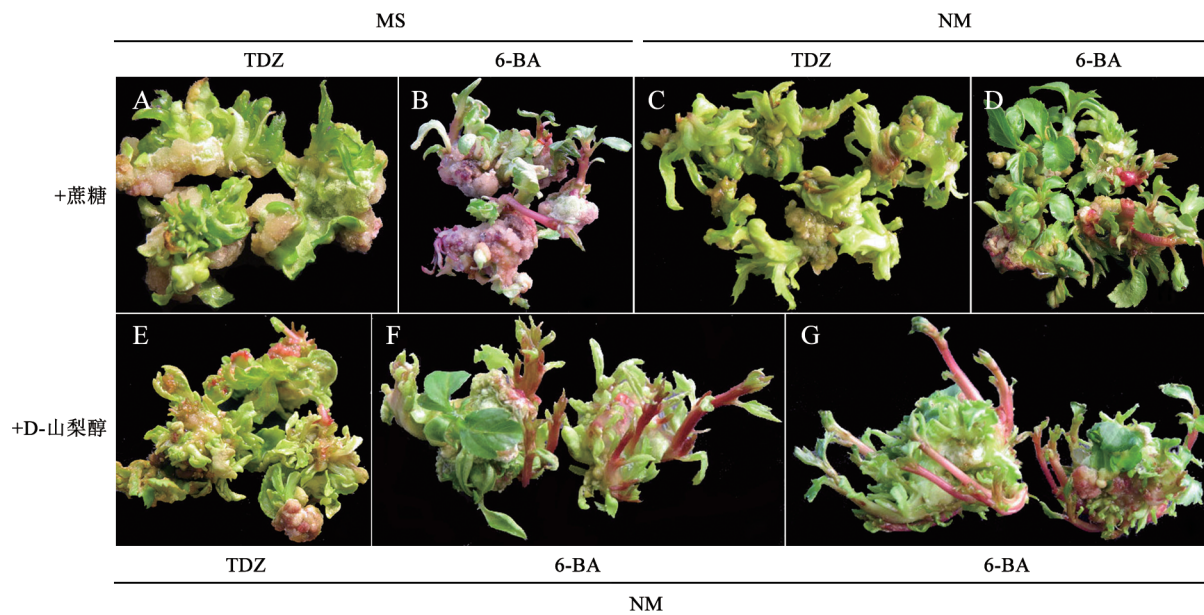


图2 苹果砧木‘54-118’离体叶片不定梢再生

Fig.2 Shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock ‘54-118’

培养基编号参照表2。A: 培养基1; B: 培养基3; C: 培养基6 (蔗糖); D: 培养基9 (蔗糖); E: 培养基6 (D-山梨醇); F: 培养基9 (D-山梨醇); G: 培养基10 (D-山梨醇)。

4.2 细胞分裂素物质对不定梢再生的影响

以MS为基本培养基时, 6-BA和TDZ对不定梢再生率的影响表现差异不显著(表2, 培养基1~4)。以NM为基本培养基, 不管碳源是蔗糖还是D-山梨

醇, 6-BA处理的平均再生率明显高于TDZ的。这表明6-BA比TDZ更有利于提高‘54-118’离体叶片的不定梢再生率。

TDZ和6-BA诱导产生的不定芽生长不同, 不

表1 不同IBA浓度对‘54-118’试管苗生根的影响

Table 1 Effects of different IBA concentrations on *in vitro* rooting of ‘54-118’

IBA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	平均生根数/条·株 ⁻¹
0.1	19.8±4.3 ^c	1.3±0.2 ^c
0.3	43.5±9.0 ^b	2.8±0.3 ^b
0.5	77.9±7.0 ^a	3.5±0.3 ^a
0.7	42.6±4.4 ^b	2.9±0.2 ^b

同一列中的不同小写字母表示差异显著($P \leq 0.05$)。

依赖于基本培养基和碳源。在不更换培养基时, TDZ诱导的不定芽不能形成伸长生长的不定梢(图2-A、C、E), 但转移到不加TDZ的伸长培养基上, 可形成伸长生长的不定梢(资料未列出)。6-BA诱导的不定芽, 不需要更换培养基就可产生伸长生长的不定梢(图2-B、D、F和G)。在MS上, TDZ产生的不定芽具有较高的玻璃化率(图2-A), 而在NM上没有玻璃化芽产生(图2-C和E)。不依赖于基本

表2 不同培养基组成对‘54-118’离体叶片不定梢再生的影响

Table 2 Effects of different medium compositions on shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of ‘54-118’

编号	基本培养基	细胞分裂素浓度/mg·L ⁻¹	不定梢再生率/%		
			蔗糖	D-山梨醇	
1	MS	TDZ	0.5	36.5±6.3 ^{cd}	—
2		TDZ	1.0	49.9±6.0 ^{bc}	—
3		6-BA	3.0	39.2±3.1 ^{bcd}	—
4		6-BA	4.0	45.7±11.5 ^{bcd}	—
5	NM	TDZ	0.3	19.8±8.2 ^{df}	18.5±2.9 ^{cf}
6		TDZ	0.5	33.2±8.9 ^{cdDEF}	25.7±6.0 ^{ceF}
7		TDZ	1.0	33.9±9.1 ^{cdDEF}	59.0±5.9 ^{bBC}
8		6-BA	2.0	66.0±3.2 ^{aABC}	69.4±11.2 ^{abABC}
9		6-BA	3.0	71.3±10.2 ^{aABC}	85.6±4.9 ^{aA}
10		6-BA	4.0	48.8±5.2 ^{bcDE}	71.9±0.7 ^{abAB}

同一列中的不同小写字母表示不同细胞分裂素浓度之间差异显著($P \leq 0.05$); 同一行中的不同大写字母表示不同碳源之间差异显著($P \leq 0.05$)。

培养基和碳源, 6-BA诱导产生的不定梢, 茎为红色(图2-B、D、F和G), 表现了该品种红色特征; 而TDZ诱导产生的不定芽或绿色(图2-A和C)或红色(图2-E)。

4.3 碳源对不定梢再生的影响

以NM为基本培养基, 比较了碳源蔗糖和D-山梨醇对不定梢再生的影响。当6-BA浓度确定时, 都表现D-山梨醇比蔗糖有效(表2, 培养基5~10)。添加较低浓度(0.3和0.5 mg·L⁻¹) TDZ时, 蔗糖的不定梢再生率稍高于D-山梨醇。添加较高浓度(1.0 mg·L⁻¹) TDZ和较高浓度(4 mg·L⁻¹) 6-BA时, D-山梨醇显著高于蔗糖。这一结果表明, ‘54-118’离体叶片不定梢再生的有效碳源是D-山梨醇, 最高再生率达85.6%。

根据以上结果分析可以得出, ‘54-118’离体叶片不定梢再生的最佳培养基为NM+3 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹ D-山梨醇。

讨 论

利用组织培养技术, 使腋芽快速增殖实现优良砧木的无性快繁已在很多砧木品种上获得了成功(Briand和Hicks 1989; Dalal等2006; Sun等2014; 孙洪雁等2014; 孙清荣等2014; Rustasee等2007)。但组培快繁成功的大多数砧木品种是英国东茂林试验站选育的M系和MM系。本文研究的对象‘54-118’是属于前苏联B系的抗寒砧木, 是茎、叶都表现红色的品种。用常规的MS培养基进行继代增殖时, 生长表现效果不佳, 表现为伸长生长较差, 而且不表现该品种固有的红色特征。而用QL培养基, 不但有良好的增殖和伸长生长, 而且表现出该品种的红色特征。这一结果与B系砧木‘Budagovsky 71-3-150’和‘IIB’的适宜快繁培养基是QL的研究结果相一致(Sun等2016)。

‘54-118’虽然是B系砧木, 但相比我们实验室研究报道的其他B系砧木‘Budagovsky 71-3-150’、

‘60-160’和‘IIB’, 具有生根困难、生根率低的问题, 生根培养基也不同(Sun等2014), 进一步提高‘54-118’试管苗的生根率是我们继续研究的问题。

叶片不定梢高效再生是利用现代生物技术进行品种改良和种质创新的基础。苹果砧木离体叶片不定梢再生研究已有较多报道(Sun等2016; 孙洪雁等2014; Zhang等2014)。叶片不定梢再生研究用的最多的细胞分裂素物质是TDZ和6-BA。在砧木‘G41’(Zhang等2014)、“Budagovsky 71-3-150”和圆叶海棠‘Y’(Sun等2016)的叶片不定梢再生研究中都表现出TDZ的高效性。而我国选育的抗寒砧木‘GM256’的叶片不定梢再生中, TDZ和6-BA没有表现显著差异(Sun等2016)。本研究中的‘54-118’和‘Budagovsky 71-3-150’都是B系砧木, 但诱导再生的有效分裂素物质是不同的, 前者是6-BA, 后者是TDZ。这一差异的原因可能是由于‘Budagovsky 71-3-150’是一个绿色品种, 而‘54-118’是一个红色品种, 红色品种对不同细胞分裂素物质的反应不同。‘54-118’虽然是一个红色品种, 在添加蔗糖的诱导培养基上, TDZ诱导叶片产生的不定芽表现为绿色, 而6-BA诱导的不定梢是红色; 在添加D-山梨醇的培养基上, TDZ诱导叶片产生的不定芽既有红色也有绿色。细胞分裂素物质及碳源对产生的不定芽梢颜色的影响, 这在其他品种上未见有类似报道。对于砧木‘54-118’离体叶片的不定梢再生, 6-BA比TDZ有效, 这一结果与砧木‘M.9/T337’叶片再生中所表现的TDZ虽然比6-BA再生率高, 但TDZ诱导的玻璃化率高, 6-BA优于TDZ的研究结果相一致(Hohnle和Weber 2010)。

培养基中的碳源影响苹果砧木离体叶片不定梢的再生, 蔗糖作为最常用的碳源, 成功诱导很多苹果砧木品种的离体叶片再生不定梢(Rustae等2007; Sun等2016; Zhang等2014)。但本研究中, ‘54-118’适宜的碳源是山梨醇而不是蔗糖, 这和B系砧木‘Budagovsky 71-3-150’、‘60-160’和‘IIB’适宜再生的碳源不同, 但和M系‘M.9/T337’适宜的再生培养基所用碳源是山梨醇的结果相一致(Hohnle和Weber 2010)。

本研究针对新引入苹果抗寒半矮化砧木‘54-118’建立的组培快繁技术体系和离体叶片不定梢再生技术体系, 为该砧木的试验观察研究和改良研究奠定了技术基础。

参考文献

- Briand CH, Hicks GS (1989). Micropropagation of the cold-hardy apple rootstock KSC-3: a morphological analysis. *Can J Plant Sci*, 69: 555–564
- Dalal MA, Das B, Sharma AK (2006). *In vitro* cloning of apple (*Malus domestica* Borkh) employing forced shoot tip cultures of M9 rootstock. *Indian J Biotech*, 5: 543–550
- D’Yakov AB, Dragavtseva IA, Efimova IL, Domozhirova VV (2014). The models for estimation of a combining ability of varieties and rootstocks to forecast yielding apple trees. *Sel’Skokhozyaistvennaya Biologiya [Agric Biol]*, 5: 55–65
- Dyadchenko OK (1990). Cultivar-rootstock combinations of apple trees for intensive orchards. *Sadovodstvo I Vinogradarstvo*, (8): 23–25
- Hohnle MK, Weber G (2010). Efficient adventitious shoot formation of leaf segments of *in vitro* propagated shoots of the apple rootstock M.9/T337. *Europ J Hort Sci*, 75 (3): 128–131
- Perry RL, Stefanelli D, Byler G (2004). Ten year performance of ‘Gala’ on 18 dwarf apple rootstocks in Michigan. *HortScience*, 39 (4): 799
- Rustae M, Nazeri S, Ghadimzadeh M, Malboobi MA (2007). Optimizing *in vitro* regeneration from Iranian native dwarf rootstock of apple (*Malus domestica* Borkh). *Int J Agri Biol*, 9 (5): 775–778
- Sicurani M, Piccioni E, Standardi A (2001). Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock 1: attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 66: 207–216
- Sun QR, Sun MJ, Bell RL, Li LG, Tao JH (2016). Comparative organogenic response of six clonal apple rootstock cultivars. *HortScience*, 51 (3): 272–278
- Sun QR, Sun HY, Bell RL, Li LG, Xin L, Tao JH, Li Q (2014). Optimisation of the media for *in vitro* shoot proliferation and root induction in three new cold-hardy and dwarfing or semi-dwarfing clonal apple rootstocks. *J Horti Sci Biotech*, 89 (4): 381–388
- Sun HY, Sun Q, Li GT, Zhang Q, LiQ (2014). Tissue culture and shoot regeneration from *in vitro* leaf explants of apple dwarfing rootstock cultivar ‘JM7’. *Plant Physiol J*, 50 (6): 779–784 (in Chinese with English abstract) [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]
- Sun QR, Sun HY, Li LG, Li Q, Tao JH (2014). Establishment of high efficient proliferation technological system of apple dwarf rootstock ‘GM256’ (*Malus domestica* Borkh). *Chin Agric Bull*, 30 (7): 95–99 (in Chinese with English abstract) [孙清荣, 孙洪雁, 李林光, 李芹, 陶吉寒(2014). 苹果矮化砧GM256 (*Malus domestica* Borkh)高效快繁技术体系的建立. *中国农学通报*, 30 (7): 95–99]
- Talaie A, Gharaghani A, Mohammad AS (2004). The effects of four clonal rootstocks on growth indices, yield, fruit quality, and quantity of ‘Golden smoothee’ apple in Iran’s climate conditions. *HortScience*, 39 (4): 798
- Wildung DK, Weiser CJ, Pellett HM (1973). Cold hardiness of

- mallings clonal apple rootstocks under different conditions of winter soil cover. *Can J Plant Sci*, 53: 323–329
- Yang YM, Wei YX, Liu C, Zhang D, Wang XD, Liu YC (2016). Tissue culture and virus elimination technique for apple dwarf rootstock. *Northern Hortic*, (4): 107–112 (in Chinese with English abstract) [杨艳敏, 魏永祥, 刘成, 张舵, 王兴东, 刘友春 (2016). 苹果矮化砧木组织培养及脱病毒技术. *北方园艺*, (4): 107–112]
- Yaseen M, Ahmed T, Abbasi NA, Hafiz IA (2009). *In vitro* shoot proliferation competence of apple rootstock M.9 and M.26 on different carbon sources. *Pak J Bot*, 41 (4): 1781–795
- Zhang X, Qin Y, Liang D, Zou YJ, Ma FW (2014). Enhancement of *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock G.41. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 50: 263–270

Tissue culture and shoot regeneration from leaf explants of cold-hardy and semi-dwarf apple rootstock ‘54-118’

SUN Qing-Rong^{*}, GUAN Qiu-Zhu, SUN Hong-Yan, LI Lin-Guang, TAO Ji-Han, WANG Hai-Bo, HE Ping
Shandong Institute of Pomology, Taian, Shandong 271000, China

Abstract: Cold-hardy and semi-dwarf apple rootstock ‘54-118’ was selected as material, the effects of basal medium composition and plant growth regulators on proliferation and rooting of *in vitro* shoots were examined. *In vitro* leaves were selected as explants, the effects of basal medium composition, plant growth regulators and carbon sources on shoot regeneration were investigated. The results showed that the optimal proliferation medium was QL+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ sucrose, multiplication rate was 5.1. The optimal rooting medium was 1/4MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+20 g·L⁻¹ sucrose, rooting rate was 77.9%, average root number was 3.5. The optimal shoot regeneration medium was modified MS (NM)+3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ D-sorbitol, regeneration frequency reached 85.6%.

Key words: apple rootstock; proliferation; *in vitro* rooting; *in vitro* leaves; shoot regeneration

Received 2017-06-15 Accepted 2017-10-21

This work was supported by Improved Variety Program of Shandong Province of China (Grant No. [2014]96) and the Key Research and Development of Shandong Province of China (Grant No. 2016GNC113008).

*Corresponding author (E-mail: sdipss@163.com).