

## 实生成年苹果树外植体的快速微型繁殖

黄仕周 刘艾琴

(中国科学院昆明植物研究所)

**摘要** 试验结果表明:以实生成苹果树上的芽作为外植体,培养在添加1—2 mg/l 6-BA的SH或MS培养基上,在继代培养时芽的萌发率达92%以上,50天内芽数增殖5—6.8倍;同期内,液体旋转培养比琼脂静置培养芽条长度要增加3倍左右;芽条在0.2—0.4 mg/l IBA中生根率80%以上;试管苗的移栽成活率85%以上。

**关键词** 快速微型繁殖,实生成年苹果树

生产上通常用嫁接法繁殖苹果优良树种,这个繁殖速度较慢。因此,人们试图用快速微型繁殖技术来解决这个问题。苹果树的离体组织培养已有很多报道。但他们多培养苹果砧木或接穗,培养材料多取自小苗或幼树。例如,W. David Lane 的幼苗茎尖培养〔3〕,O. P. Jones等做了五个栽培品种接穗的离体繁殖〔6〕,D. J. James 和 Isobel J. Thurbon 做了矮化砧 Mg 苹果〔4、5〕,M. Welender 做了 M26 苹果的离体快速生根等试验〔7〕,R. H. Zimmerman 进行了苹果的生根研究〔8〕,陈维伦等的苹果成年树‘金冠品种’的茎尖培养〔1〕。实生成年苹果树的离体快速繁殖研究未见到报道。B. A. Mabeoba 报道了自根苹果植株的某些生物学特性〔2〕,指出自根苹果的生长势在很大程度上取决于苹果品种的基因型,……有些自根苹果在进行自根栽培时能早结实,高产,稳产;特别是有些小果型苹果,自根栽培能形成良好须根,表现越冬性强、早结实、丰产等性状。本文报道实生成年苹果树外植体微型繁殖成苗技术,为某些新杂交出来的优良苹果树种的快速繁殖提供参考方法。

### 材料和方法

**1. 材料和灭菌** 试验材料取自云南省农科院园艺研究所。品系为青苹果 (*Malus punila* Mill.), 15年生的实生树。果实成熟前,取其树干基部萌生枝上的顶芽和腋芽作为培养材料。材料和培养基灭菌均按常规法进行。灭菌后将幼枝切成节段,接种于琼脂培养基上。

#### 2. 培养基

(1) 基本培养基多为MS,附加谷胱甘肽100 mg/l、水解酪蛋白100 mg/l、6-BA

本文于1985年8月9日收到。

0.5 mg/l、蔗糖 3%。

(2) 在比较了几种基本培养基之后,芽增殖的试验采用 SH 培养基,附加成分为:水解酪蛋白100 mg/l、硫酸腺素50 mg/l、腐植质酸钠 2 mg/l,按试验要求添加不同量的 6-BA、NAA,或它们的配合。灭菌前pH调到5.8。

(3) 芽条生根试验采用大量元素减半的MS或SH培养基,蔗糖降为 2%,附加不同浓度的 IBA。

(4) 液体旋转培养试验,除无琼脂外均同固化培养基。转床转速 2 圈/分。

3. 其他环境 光照每日14小时,光强 4—6 W/m<sup>2</sup>,培养室温度 27° ± 2°C。

## 结果和讨论

### 1. 芽的增殖

图 1 是不同浓度的 6-BA 对芽增殖和生长的影响。图 1 表明,在基本培养基上附加

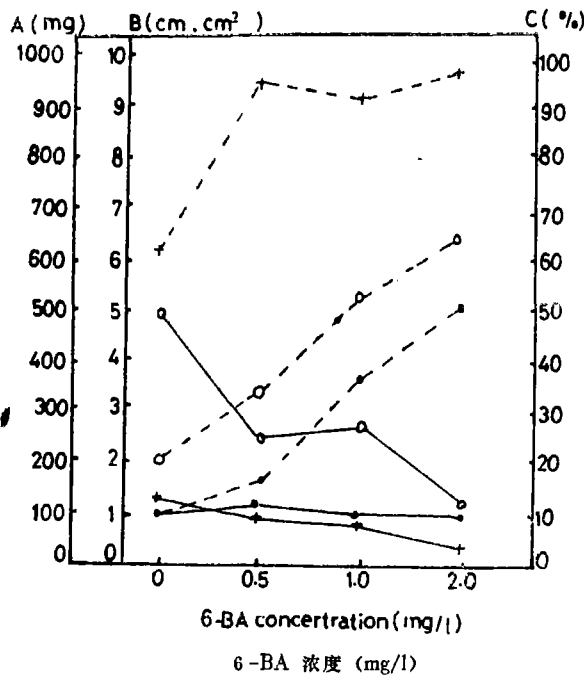


图 1. 6-BA 浓度对芽萌发、增殖、生长的影响 (接种后 50 天、观察 15 丛) 纵座标 A 示丛芽鲜重 (mg/丛); B 示芽条长度 (cm)、丛芽冠幅面积 (cm<sup>2</sup>)、最大叶片面积 (cm<sup>2</sup>); C 示芽萌发率 (%)。

●——● 芽条长度; ○——○ 丛芽冠幅面积; ×——× 最大叶片面积;  
×——× 丛芽鲜重; ○——○ 芽繁殖倍数; ×——× 芽萌发率。

Fig 1. Effect of 6-BA concentration on sprout and multiplication and growth of buds

(50 days after inoculation. Inspect 15 clusters). Ordinate A shows; Fresh weight of bud clusters (mg/cluster); B shows; Length of shoots (cm), crown range of bud clusters (cm<sup>2</sup>), Area of the maximum leaf (cm<sup>2</sup>); C shows; sprout rate of buds (%)

●——● Length of shoots; ○——○ Crown range of bud clusters;  
×——× Area of the maximum leaf; ×——× Fresh weight of bud clusters;  
○——○ Proliferation times of buds; ×——× Sprout rate of buds.

6-BA 0.5 mg/l 比对照 (不加任何激素) 明显的促进了芽的增殖, 萌发率可由对照的 60% 增到 96%, 如果浓度再提高 1—4 倍, 其萌发率仍稳定在 95% 左右。6-BA 在 0—2 mg/l 范围内, 不同浓度之间芽的伸长几乎没有多大差异, 长度约 1 厘米左右; 芽的繁殖倍数和丛芽鲜重是随浓度的增加而增大的; 最大叶片的面积和丛芽的冠幅面积几乎是随浓度的增加而减少。即是说, 6-BA 浓度增大则叶片小、单芽生长缓慢、丛芽多、鲜重大、繁殖倍数高。这对芽的快速繁殖是有益的。

表 1 是 6-BA 同 NAA 配合时芽的增殖和生长情况。由表 1 可以看出, 无论是相对低浓度还是相对高浓度下的配合, 比起单独使用 6-BA 来, 除芽的长度稍有增加外, 其他都没有显示出任何好处。相反, 芽的萌发率、叶片大小、丛芽冠幅、芽的繁殖倍数、丛芽鲜重等普遍有所降低, 以 6-BA : NAA = 2 : 2 (mg/l) 的降低最明显。这显然是 NAA 的抑制作用所致。因此在做芽的增殖试验时没有必要加入生长素 NAA, 只要加入适量的 6-BA 就可以了。

表 1. 6-BA 同 NAA 配合对芽增殖和生长的影响

(接种后 5 天的统计资料。观察 15 丛)

Table 1. The effect of 6-BA with NAA on multiplication and growth of buds  
(50 days after inoculation. Inspect 15 clusters)

激素浓度 Hormone concentration (mg/l)	芽萌发率 Sprout rate of buds(%)	丛芽冠幅面积 Crown range of cluster buds(cm <sup>2</sup> )	最大叶片面积 Area of the maximum leaf (cm <sup>2</sup> )	芽条长度 Length of shoot (cm)	丛芽鲜重 Fresh weight of cluster buds (mg /cluster)	芽增殖倍数 Multiplication times of buds	
6-BA	NAA						
0		96	2.3	1.0	1.2	164	3.4
0.5	0.05	92	2.1	1.0	1.3	230	2.5
	0.5	92	1.5	0.5	1.5	250	4.0
0		92	3.0	0.8	1.0	380	5.5
1.0	0.1	96	2.3	0.6	1.5	370	4.5
	1.0	88	2.3	0.6	2.0	317	5.0
0		100	1.0	0.2	1.0	523	6.8
2.0	0.2	92	1.0	0.2	1.2	373	5.3
	2.0	85	0.6	0.2	1.4	268	3.3

## 2. 芽的伸长

在琼脂培养基上作静置培养时, 芽条节间短, 伸长缓慢, 生长 30—50 天的芽一般只有 1 厘米左右长, 这很不利于芽条生根和小苗移栽, 为解决这个问题我们进行了液体旋转培养试验。资料列在表 2 中, 从表 2 数据可知, 在相同的培养基中 (液体培养基中无琼脂) 液体旋转培养芽条长度多数在 4 厘米以上, 比固化培养基上的芽条伸长量要大 2.5—3 倍。其情况有以下几种: 1. 在无激素的对照组中, 液体旋转培养时芽的伸长也

相当快, 芽条的生根率相对也有提高; 2. 液体基本培养基中附加 0.5 mg/l NAA, 不仅芽的伸长加快, 而且芽条的直接生根率可达57.1%; 3. 6-BA同NAA作低浓度的等量(0.2:0.2 mg/l) 配合有利于芽条伸长; 4. 只加0.5 mg/l 6-BA 的芽条长度相对较短, 几乎没有根的形成。我们还观察到, 液体旋转培养时如果移入培养基中的芽过小, 注入的培养液又较多, 芽长期浸没在液体培养基中会降低芽的萌发率。但是, 由于转动, 数个芽往往纠合在一起影响芽的增殖, 同时芽、叶的质地较脆。

表2. 液体旋转培养与琼脂静置培养芽条伸长比较 (观察15丛)

Table 2. The comparison of length of shoots between liquid rotational culture and agar-solid static culture (Inspect 15 shoots)

培养方式 Culture pattern	培养基中的激素 Hormones of medium(mg/l)		芽条长度 Length of shoots(cm)	B/A芽条长度比值 Ratio of B/A on the length of shoots	生根率 Rooting rate (%)	接种后的天数 Days after inoculation
	6-BA	NAA				
A	0	0	1.0	4.0	6.7	50
B	0	0	4.0		16.7	32
A	0.5	0	1.2	2.5	4.2	50
B	0.5	0	3.0		0	22
A	0	0.5	1.4	3.2	42.9	50
B	0	0.5	4.5		57.1	32
A	0.2	0.2	2.0	2.3	—	30
B	0.2	0.2	4.5		—	30
A	0	0.5	1.5	3.0	—	30
B	0	0.5	4.5		—	30

A: 琼脂培养基静置培养 (Agar-solid static culture)

B: 液体培养基旋转培养 (Liquid rotational culture)

### 3. 芽条生根

生根试验的结果列在图2和表3中, 从中可知, 在基本培养基中添加0.2—0.8mg/l IBA 处理15天后就可见到部分芽条生根, 25—30天大多数已生根, 生根率的高低除与IBA浓度有关外还与芽条的来源有关。来自琼脂静置培养中的芽条的生根率比液体旋转培养中的芽条的生根率低, IBA浓度在0.4 mg/l时前者的生根率为60%, 后者为90%, 浓度在0.8 mg/l时前者为58.3%, 后者为86.4%。根系的生长状况(根数、根长)亦有同一趋势, 发根速度上也有明显差别, 低浓度下有利于根的提前出现, 开始生根到生根结束所需的时间较短, 0.8 mg/l者却与之相反, 一般要长5—10天。芽条切口处愈伤

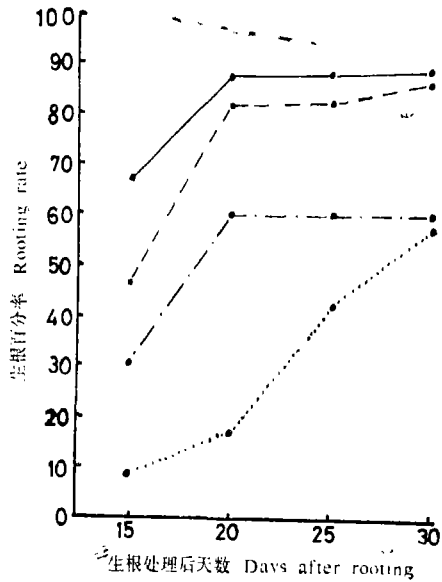


图2. 不同芽条来源和IBA浓度对生根的影响

(观察15苗)

- ——— • 芽条来自液体旋转培养, IBA 0.4 mg/l;
- - - - • 芽条来自液体旋转培养, IBA 0.8 mg/l;
- - · - · 芽条来自琼脂静置培养, IBA 0.4 mg/l;
- ······ 芽条来自琼脂静置培养, IBA 0.8 mg/l;

Fig. 2. The effect of different shoots and IBA concentration on rooting

(Inspect 15 shoots)

- ——— • Shoots from liquid rotational culture, IBA 0.4 mg/l;
- - - - • Shoots from liquid rotational culture, IBA 0.8 mg/l;
- - · - · Shoots from agar-solid static culture, IBA 0.4 mg/l;
- ······ Shoots from agar-solid static culture, IBA 0.8 mg/l.

表3. 不同芽条和 IBA 浓度下的生根比较 (接种后30天, 每处理观察10苗)

Table 3. The comparison of rooting of different shoots and IBA concentration (30 days after inoculation. Inspect 10 shoots)

芽条来源 Origin of shoots	IBA浓度 IBA concen- tration (mg/l)	平均根数 Average number of roots	平均根长 Average length of roots (cm)	最大根长 maximum length of root (cm)	苗长 length of shoots (cm)	愈伤组织状况 State of callus
液体旋转培养	0.2	4.1	0.8	2.5		+
Liquid	0.4	4.6	0.8	3.0	3—4	+
rotational	0.6	4.7	0.5	2.0		++
culture	0.8	4.9	0.5	2.0		++
琼脂静置培养	0.2	4.5	0.4	1.5		+
Agar-solid	0.4	3.7	0.2	1.0	1—1.5	+
static	0.6	2.4	0.2	1.0		++
culture	0.8	2.0	0.2	1.0		+++

示: +少、小; ++较多、较大; +++多而大。

+ Shows, Little and small; ++ Shows, More and biggest; +++ Shows, Many and biggest.

组织的出现和大小也是随IBA浓度的增高而增大的, 0.2—0.4 mg/l IBA时愈伤组织很小很少或不产生, 0.8 mg/l时愈伤组织增多增大。上述结果表明, 液体旋转培养所产生的芽条较易生根; 较适合的IBA浓度是0.2—0.4 mg/l。

#### 4. 试管苗移栽

移栽前, 将瓶塞去掉放在自然条件下数天让苗适应环境。移栽时将苗从培养瓶中轻轻拔起, 去掉琼脂, 栽入混有腐植质的土中, 浇水, 加盖塑料膜保湿数天即可成活, 其后按盆苗正常管理。据我们的试验移栽成活率达85%以上。

#### 5. 繁殖速度

从上述图1、表1的资料看出, 30—50天内一个芽在较适宜的条件下能形成5.5—6.8个芽, 这些芽在继代繁殖中大体仍以这个比例增殖。我们在试验中统计的大量数字表明繁殖倍数为6.2(表4), 与单项试验的结果大体一致。

表4. 芽的繁殖倍数(接种后50天统计, 观察1290丛芽)

Table 4. Multiplication times of buds (50 days after inoculation. Inspect 1290 clusters)

试验日期(年、月、日) Test date (year, month, day)	供试丛芽数 Tested number of cluster buds	形成的丛芽数 Forming number of cluster buds	繁殖倍数 Multiplication times
84.10.1	57	250	4.6
84.10.1	25	200	8.0
85.2.5	30	300	10.0
85.2.26	22	100	4.5
85.3.4	34	260	7.6
85.3.5	40	180	4.5
总计 Total	208	1290	6.2 (平均Average)

经过试验, 可以确定以下几个基本数字: 单芽形成丛芽的周期50天; 一个单芽每次的繁殖倍数为6; 一年内芽的繁殖次数为7; 每次单芽萌生成丛芽的萌发率为80%; 生根期30天; 生根率80%; 移栽成活率85%。据此计算, 一个单芽一年内可获得4000多棵移植成活小苗。因此, 它在能自根生长的优良苹果的繁殖方面是有意义的。至于离体繁殖的无性系苗在根系、树势、丰产性状、始果期等情况尚待进一步试验。

## 参 考 文 献

- [1] 陈维伦等, 1980: 植物学报, 22(1): 93—95。  
[2] 高本训译, 1982: 国外农学—果树 No. 2: 2—11。  
[3] David Lane, W., 1978, *Plant Science Letters*, 13 (3) :281—285。  
[4] James, D. J., and Isobel J. Thurbon, 1979: *Journal of Horticultural Science*, 54 (4) : 309—311。  
[5] James, D. J., 1983: *Physiologia Plantarum*, 57 (1) :149—153。  
[6] Jones, O. P., C. A. Pontikis and Margaret E. Hopgood, 1979: *Journal of Horticultural Science* 54 (2) :155—158。  
[7] Margaveta Welender, 1983: *Physiologia Plantarum*, 58:231—238。  
[8] Zimmerman, R. H., 1984, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3 (4) :301—311。

## RAPID MICRO-PROPAGATION OF EXPLANTS FROM ADULT SEEDLING APPLE TREES IN VITRO

Huang Shizhou and Liu Aiqin

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

**Abstract** The experimental result showed: In the medium of Murashige and Shoog (MS) or Schenk and Hidebrandt (SH) added with 6-benzylamino-purine (6-BA) at 1—2 mg/l, the sprouting rate of buds in subculture of the buds from the adult seedling apple trees were over 92%. Buds multiplied 5—6.8 time in fifty days. The length of shoots in a rotating liquid culture was about three times more than that in the culture on agar-medium. In the medium added with indole-3-butyric acid (IBA) at 0.2—0.4 mg/l, the rooting rate of shoots were over 80%. The survival rate of transplanting tubelantlets were more than 85%.

**Key words** Rapid micro-propagation; Adult seedling apple trees