

苹果茎顶的显微嫁接研究*

李 嘉 瑞

(西北农学院园艺系)

摘 要

本研究用金帅和斯巴丹 (Spartan) 两个苹果品种的茎顶在离体条件下分别嫁接在山定子、 M_7 、 M_9 和 M_{26} 的茎或根上, 并获得成功。这种苹果显微嫁接方法尚未见报导。茎顶长度为0.2、0.4和0.7mm, 砧木长度为0.5~1.2cm。嫁接成活率因接穗大小、嫁接方式而变化, 其成活率范围在56.3%到81.3%之间。从获得无毒苗和具有较高的成活率两方面考虑, 带有二片叶原基的茎顶作接穗是适当的。

嫁接七周后接穗于重因砧木不同而表现明显差异, 矮砧上的接穗干物质积累量最少, 半矮砧次之, 乔化砧最多。作者认为, 这可以作为一种鉴定砧木生长型的新途径, 应进一步扩大砧木类型和品种的试验研究。

前 言

植物代谢方向、强度、组织构造和形态常常具有相关联系。从这种观点出发, 很多学者对砧木和接穗间的相互影响进行了研究。Beakbane比较了 M_2 、 M_7 和 M_9 苹果砧木根系的解剖构造, 证明了 M_9 木质纤维的数量较少; 而导管、木质部薄壁细胞和髓射线细胞数量较多; Beakbane与Thompson最早观察到苹果矮化砧木的根皮在根的横切面中所占比例较高, 并提出了根皮率的概念⁽¹⁶⁾。陈慧都⁽¹⁾、李嘉瑞⁽³⁾等也分别在其他苹果属砧木中进行了测定, 得到了相似的结论。

砧木枝条和叶片的解剖结构和生理特点与其生长型也存在着某些相关性, 枝条电阻、叶片电导、气孔密度都已证明与砧木的矮化性状有关⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾。气孔密度小, 枝条电阻小, 叶片电导率大的砧木往往倾向于矮化。

促进植物生长或抑制植物生长的内源激素已在苹果组织中被发现, 其中包括赤霉素⁽⁷⁾⁽⁸⁾, 细胞分裂素⁽⁸⁾和脱落酸⁽¹⁸⁾, 还有香豆素和根皮甙⁽¹¹⁾。许多学者认为, 各种内源激素的相对含量及相互间的平衡, 制约着接穗的生长势⁽¹⁷⁾。我们曾经确定, 以幼树高度为指标, 嫁接后2~3年即可预见到成年树冠的大小⁽³⁾。Schneider等人的研

*①本项研究在加拿大B.C大学 (University of British Columbia) 植物学系教授G. W. Eaton博士指导下完成, 试验过程中得到S. Leroy先生的协助; 本文在撰写过程中蒙路广明教授审阅指导, 在此一并致谢。

②本刊编辑室收到此稿时间: 1985年4月12日。

究表明,在离体条件下苹果愈伤组织相互连接时,其生长速度可能相互影响。Messer和Lavee发现MMIII的愈伤组织比M₉的生长快⁽¹⁰⁾。

苹果的显微嫁接已经多次获得成功⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾,但嫁接后砧木对接穗的影响 并没有人进行研究。这篇报告将介绍不同的显微嫁接方法、砧木长短及茎顶大小对嫁接成活的影响,同时讨论把显微嫁接应用于矮砧早期鉴定的可能性。

材料与方法

试验在加拿大B.C.大学进行。作为显微嫁接的接穗,有金冠(Golden delicious)和斯巴丹(Spartan)两个品种。3~4月在果园剪取40cm左右的一年生营养枝,用1.5%NaOCl+0.1%Tween-20混合溶液进行表面消毒10分钟,用水冲洗后插入盛有自来水的烧杯中,放于昼温30℃、夜温20℃、光照14小时、光强800 μ ES⁻¹m⁻²的生长箱中,发芽后的芽子再进行消毒和冲洗,剥出茎顶作为接穗材料。其操作步骤与我们已报导的方法相同⁽⁹⁾。

作为显微嫁接的砧木有加拿大山定子(Malus baccata(L)Borkh)、M₇、M₉和M₂₆,它们栽培于田间或温室中,材料分根、茎二类,先用毛刷在水中拭擦,冲洗干净,把芽子或须根剪除削平伤口,剪成2—3cm的小段,丢弃节或有须根部分,留下表皮光滑部分,浸泡在1.5%NaOCl+0.1%Tween-20的溶液中进行表面消毒15分钟,无菌水冲洗四次。田间材料则进行重复消毒,第一次消毒15分钟,冲洗两次后再消毒10分钟,最后冲洗四次。消毒后的根或茎!切成不同长度的小段,直立放置或剥去皮层横置于培养基上,带皮层的砧用倒T字形方法嫁接,培养基盛于直径10cm的培养皿中,每个培养皿放置6个嫁接组合,2—3个处理。处理的分配是随机的。不同砧木长度对苹果外植体影响试验的培养基放于直径为2.5cm试管中。切下的茎顶分为3组:①带有2个叶原基;②带有4个叶原基;③带有6个叶原基。茎顶和砧木都用6-苄基腺嘌呤 3.55×10^{-3} M+ 2.9×10^{-6} M的NAA溶液前处理10分钟,再嫁接在砧木上,然后在25℃的培养箱中黑暗处理2昼夜,再移到昼温27℃、夜温23℃、光照14小时、光强为800 μ ES⁻¹m⁻²的生长箱中进行培养,三周后转移到直径2.5cm的试管中单株进行培养。

我们采用的是稍加改良的MS培养基,与MS培养基同量的无机盐、丙氨酸、维生素类⁽⁹⁾,另外每升加入70mg肌醇、2mgVc、0.5mg烟酸、8g洋菜和20g蔗糖。培养基用0.5N KOH调节PH为5.7,在120℃条件下灭菌15分钟。

嫁接组合在试管中培养4周,每二周转转移培养一次。嫁接后七周茎顶即可长出4片左右的小叶,这时从嫁接处切下在60℃的条件下烘干称重,每个处理至少取8个样本进行统计分析。

结果与分析

在田间条件下我们几乎看不到苹果接穗大小对嫁接成活率的影响,但对于显微嫁接

却完全不同。试验表明,嫁接成活率与接穗大小关系极大,随着接穗带有叶原基的数目增加,其嫁接成活率也提高。在金冠/山定子嫁接组合中带有6个叶原基接穗的嫁接成活率高达81.3%,而2个叶原基的接穗只有56.3%。斯巴丹/M26也具有这种趋势,但4mm长的茎顶和7mm长的嫁接成活率差异不大,而且茎顶太大在培养过程中易被污染,这说明4个叶原基可以作为最佳成活率的下限。金冠/山定子嫁接组合成活率高一些(表1)。

表1 接穗外植体大小对显微嫁接的影响

嫁接组合	处 理	外植体大小	嫁接数量	嫁接成活数	成活率(%)
全冠/山定子 斯巴丹/M ₂₆	带有二个叶原 基茎顶	0.2mm	16	9	56.3
			10	6	60.0
全冠/山定子 斯巴丹/M ₂₆	带有四个叶原 基茎顶	0.4mm	16	12	75.0
			10	8	80.0
全冠/山定子 斯巴丹/M ₂₆	带有六个叶原 基茎顶	0.7mm	16	13	81.3
			10	8	80.0

嫁接成活率受到接穗影响的趋势大体与Huang和Milikin⁽¹⁴⁾报导相吻合,我们试验中的成活率比他们的报导略低,但他们用的是带有根系的实生苗作砧木,本实验却应用0.5cm长的幼茎,显而易见,这种砧木的吸收和传递养分的能力远不如实生苗。虽然接穗带有较多的叶原基有利于提高显微嫁接的成活率,但如果为了获得无病毒苗则应尽可能地减少叶原基数目。Murashige认为不能多于2片叶原基方能获得无病毒苗,根据Huang和Milikin的实验,不带有叶原基的生长点嫁接成活率很低,所以从成活率和获得无病毒苗木双重目的考虑,用带有2个叶原基的茎顶做接穗是可行的。进一步研究提高成活率的方法或改用无病毒接穗等研究工作乃是今后的课题。

不同的显微嫁接方式对成活率有明显的影响。用根作砧木消毒困难(易发生污染),但剥落皮层再作砧木,虽污染减少,嫁接成活率却显著降低,从68.8%下降到37.5%。茎作为砧木污染发生率低,但被剥去皮层水平放置的茎段仍然明显影响成活率。这可能是横向放置的砧木影响了培养基营养物质向接穗中扩散。藤井和仁藤认为,愈伤组织的融合是嫁接的重要因素⁽¹⁷⁾,在砧木剥皮横放条件下,穗砧接触面积较小,可能影响了愈伤组织的融合速度,从而影响了成活率(表2)。据观察,嫁接后砧木的愈伤组织首先发生,随后接穗也产生愈伤组织,两者相互愈合生长才能成活。剥去皮层的砧木愈伤组织形成较早,数量也较多,但穗砧相互愈合较迟,这样也许就推迟了穗砧间新产生的微管束连接的时期,影响了嫁接成活率,这种推测尚需进一步研究证实。

众所周知,应用矮化中间砧和自根砧一样,也能使树体矮化,其矮化效果不如自根砧。从我们的试验中得知,嫁接于不同长度茎段上的茎顶干物质累积强度并无统计学差

表2 不同嫁接方式对苹果显微嫁接成活率的影响*

砧木来源	处 理	砧木长度	嫁接数量	嫁接成活数	成活率(%)
根	剥落皮层, 横放	0.5cm	16	6	37.5
	不剥落皮层, 垂直放	0.5cm	16	11	68.8
枝	剥落皮层, 横放	0.5cm	14	7	50.0
	不剥落皮层, 垂直放	0.5cm	14	12	85.7

*嫁接组合是斯巴丹/M26, 接穗为带有4个叶原基茎顶。

异, 而同一品种若嫁接在不同长度的根段上, 其干物质的累积强度差异明显(表3)。这说明根与茎比较起来, 根对地上部的影响更为明显。

表3 不同砧木长度对苹果接穗外植体干物质积累速度的影响*

嫁接组合	砧木来源	砧木长度(Cm)	干物质重量 (mg)	
斯巴丹/M ₂₆	根	0.5	70	a
		0.8	66	ab
		1.2	58	b
斯巴丹/M ₂₆	茎	0.5	63	a
		0.8	66	a
		1.2	67	a

*接穗为带有4个叶原基的茎顶, 茎段和根段均直立放置于试管中。表中字母为邓肯氏测验, 差异显著水平为0.05。

晚近, 关于砧木的致矮作用被认为是各种内源激素平衡的结果。Luckwill提出了内源激素和新梢生长关系的假说。Schneider认为在叶或茎端生长点合成的生长物质及其衍生物可以通过筛管向下输导, 这些物质可以在根中重新活化、抑制或重装, 这种改变了的物质可再次上运到生长点对生长产生促进或抑制作用; Jones证明了类细胞分裂素主要来自根端⁽⁸⁾; Ibrahim和Dana发现金冠/M₉的树液中GA含量最低⁽⁷⁾; 这些试验报告都说明了根系在致矮中的重要作用。不同长度的矮化砧表现出不同的致矮效应, 不一定完全是由于养分输导的影响, 也可能是长度不同的砧木产生抑制性内源激素的数量并不一样, 这样也就影响了整个体内的激素平衡。在田间条件下至少要有15cm以上的矮化中间砧才有显著的矮化作用。在我们的试验中不同长度的茎段对接穗生长影响不大的原因可能是由于长度差异太小造成的。

不同生长型的砧木在组织培养条件下对茎顶的生长强度影响是显著的(图1)。供试的两个品种都表明了相同的规律性: 接穗干物质的累积速度以乔化砧山定子最大, 半乔化砧M₇次之, 矮化砧M₂₆和M₉上的接穗外植体干重最轻。

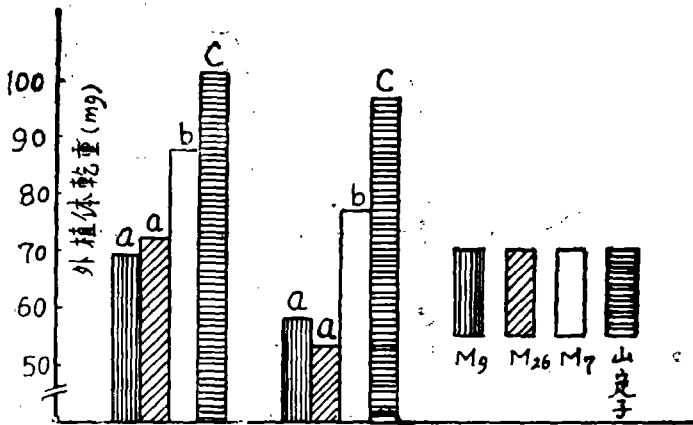


图1 不同生长型砧木对苹果茎顶干物质累积的影响

(左: 金冠 右: 斯巴丹)

说明: 砧木为0.5cm的茎段, 直立放置。a、b、c为邓肯氏测验差异显著水平为0.05。

我们的研究曾指出, 嫁接在乔化砧上的苹果树体高度远比同龄的矮化砧上的苹果为高⁽³⁾。其实这个结论与现在的实验结果都表明了相同的本质: 乔化砧就其本质来说就是在单位时间里作为枝、干的干物质累积多; 而矮化砧相对累积较少。当然砧木对接穗累积干物质的速度受到各种条件的影响(如土壤水分、各种营养元素的种类和数量等等), 在组织培养条件下克服外界条件的干扰远比田间条件容易得多, 砧木对接穗的影响也就更为明显。

从图1还可看出, 不同品种对相同砧木也有不同的反映, 在所有嫁接组合中金冠作接穗时干物质累积都比较多, 斯巴丹苹果较少。如果打算用这种方法作为鉴定砧木生长型的一种手段, 还要扩大品种的试验范围, 选出更好的指示品种。我们曾经确定对于矮砧早期鉴定来说幼树高度是一个可靠指标⁽⁶⁾, 它近似于直接验知法, 但要经过2~3年的时间, 如果应用组织培养的方法鉴定砧木生长型则只要6~8周, 而且试验材料很少, 不必占用土地。显然, 这是一个鉴定矮化砧木的新途径。

小 结

1. 我们的试验证明, 苹果在无根条件下同样可以使显微嫁接获得成功。其嫁接成活率明显地受到接穗外植体大小的影响, 从提高嫁接成活率和获得无毒苗双重目的考虑以带有二个叶原基的茎顶作接穗较为妥当。如果砧、穗都是无毒的, 则可适当增大外植体的体积, 以利成活。不同的嫁接方式对显微嫁接成活率也有一定的影响。

2. 在显微嫁接中, 试验表明根对接穗外植体的干物质累积速度影响比茎为大, 在我们的试验范围内茎的长度对接穗的干物质累积影响不大, 根影响显著。

3.不同生长型砧木对茎顶干物质的累积有明显的影响,乔化砧(山定子)上的接穗干物质累积最多,半矮砧 M_7 次之,矮化砧 M_6 和 M_8 最少。这一结果与田间条件下的试验结果是一致的。由此我们认为应用显微嫁接的方法可以鉴定砧木生长型,这比田间条件下试验时间短,材料较少又不占用土地。我们希望能进一步扩大砧木的类型和品种试验研究。

参 考 文 献

- 1.吉林农大果树教研室:苹果砧木矮化效应予先鉴定方法的研究,《果树科技资料》,1975(3),52—55。
- 2.陈慧都、郝瑞:苹果砧木矮化效应鉴定方法的研究,《果树科技资料》,1978(2),77—80。
- 3.李嘉瑞、张履道等:苹果矮化砧木早期鉴定方法的研究(I)嫁接苗幼树高度、干周和砧木根皮率与砧木生长型的关系,《青海农林科技》,1980(2),25—29。
- 4.李嘉瑞、张继澍、樊效义:气孔密度与苹果生长势的关系,《园艺学报》,1980,7(2),59—61。
- 5.刘恩荣:苹果矮化砧的选育,《果树工作通讯》,1979(2),9—12。
- 6.李嘉瑞、张继澍等:苹果矮化砧早期鉴定方法的研究,《陕西省获奖科学技术成果汇编》(农业部分),1980,148—149。
- 7.Ibrahim, I.M.,and Dana, M.N.:Gibberellin-like activity in apple rootstocks. HortScience,(6)1971, 541—542.
- 8.Jones, O.P.,and Lacy, H.J.:Gibberellin-like substances in the transpiration stream of apple and pear trees,J.Expt. Bot.(19)1968, 526—531.
- 9.Li Jia-Rui (李嘉瑞) and Eaton, G. W.:Growth and rooting of grape shoot apices in vitro,HortScience (19) 1984, 64—66.
- 10.Messer, G.,and Levee, S.:Studies in vigour and dwarfism of apple trees in an in vitro system, J. Hort. Sci. (44) 1969, 219—233.
- 11.Martin, G. C.,and Stahly, E.A.:Endogenous growth regulating factors in bark of EM IX and XVI apple trees proc.,Amer. Soc. Hort. Sci., (91) 1967, 31—38.
- 12.Miller, S.R.:Growth inhibition produced by leaf extracts from size controlling apple rootstocks, Can. J. Plant Sci. (45) 1978, 519—434.
- 13.Murashige, T.:Plant propagation through tissue cultures,Rev. Plant Physiol.,25:135—166, 1974.
- 14.Huang Shu-Ching and Millikan, D.F.:In vitro micrografting of

apple shoot tips, HortScience (15) 1980, 741—743.

15. Rogers, W.S., and Beakbane, A.B.: Stock and relations Annu. Rev. Plant Physiol., (8) 1957, 217—236.

17. Toshishige Fujii and Nobumasa Nito: Studies on the compatibility of grafting of fruit trees. I. Callus fusion between rootstock and scion. J. Japan. Hort. Sci., (41) 1972, 1—10.

18. Yadava, U.L., and Lockard, R.G.: Absciscic acid and giberellin in ungrafted apple rootstock clones, Physiol. Plant. (40) 1977, 225—229.

A Study of Micrografting of Apple Shoot Tips in Vitro

Li Jiarui

(Department of Horticultural Science,
Northwestern College of Agriculture)

Abstract

Micrografting of Golden Delicious and Spartan apples (*Malus domestica* Borkh) was achieved by placing a 0.2, 0.4 or 0.7mm shoot tip on the 0.5-1.2cm stems or roots of Siberian crab seedlings (*Malus baccata* L.), M7, M9 and M26. The percentage of successful graft unions in our study was increased from 56.3% to 81.3% with size of scions. The probability of obtaining the virus-free plantlets is inversely related to size of shoot tips and invitro micrografting desires more graft unions to develop into the plantlets. Our results showed that scion explants consisting of the dome and 2 leaf primordia were used in subsequent studies. The grafted explant unions developed into the plantlets were affected by methods of micrograft.

The dry weight of scions under in vitro conditions 7 weeks after grafting were affected by different vigor rootstocks significantly. In our study, the dry weight of apple explants on Siberian Crab (standard rootstocks) was the highest, the second was M7 (semi-dwarfing rootstocks) and that on M9 or M26 (dwarfing rootstocks) was the lowest. This method could be used for the determination of early dwarf apple rootstocks in breeding.