

经济林木试管茎尖嫁接的研究现状及展望

郭春慧 马凤桐

(陕西省黄土高原治理研究所, 陕西杨陵 712100)

摘要 根据经济林木试管茎尖嫁接近 20 年来的研究成果, 提出了今后的重点研究领域。早期的病毒脱除和快速繁殖已由研究阶段走向应用, 在经济林木嫁接不亲和性的早期诊断和诱导发育阶段返幼方面个别树种有所突破, 不少技术与理论问题有待研究解决, 而对于发育阶段返幼的发生机理则迄今人们知之甚少。今后的工作拟集中于: ①多种经济林木的脱毒与快繁; ②通过生理、生化和组织细胞学观察, 认识不同发育阶段的内在变化, 揭示诱导发育阶段返幼的原因。

关键词 经济林木, 茎尖嫁接, 快速繁殖, 发育阶段返幼 果树

中图分类号 S660.35

病毒病及类病毒病是生物界普遍存在的问题, 极大地影响经济林木树体的生长、果品的产量与品质, 以及植株的抗逆性^[1]。美国加利福尼亚州, 一些优良柑桔品种, 曾因病毒病蔓延而在市场上消失。美国加州大学著名组培专家 Murashige, 由于建立了茎尖嫁接技术^[2], 挽救了一些濒临灭绝的柑桔品种, 而受到了美国加州政府的最高奖励^[3]。此后, 在多种果树上开展了这方面的研究, 在许多方面取得了进展。茎尖嫁接是在无菌培养条件下将生长枝的茎尖嫁接在去顶的实生苗或微型切段上, 在适宜条件下培养成为新植株的工作^[2]。茎尖嫁接的反复进行可以诱导林木发育阶段返幼^[4]。本文拟对茎尖嫁接研究的现状作一概述, 以窥其研究成果及发展趋势。

1 茎尖嫁接在经济林木科学上的应用

1.1 建立特异无病源株系

White 等(1974)研究了病毒在植物体分布的不均一性, 得出顶端分生组织几乎没有病毒的结论, 近年来在很多植物的脱毒实践中均得到证实。目前报道的果树病毒病脱除方法(热处理、弥雾繁殖、茎尖培养及茎尖嫁接)都是根据这一原理, 其中单纯用热处理或弥雾繁殖可脱除某些病毒, 但对一些顽固病毒却难以脱除(如卷叶病、栓皮病等), 无病毒材料获得率很低, 茎尖培养成苗困难^[5]。取热处理后或未经热处理的长 0.2 mm(包括两个叶原基的生长点)茎尖进行嫁接, 可以提高脱毒效果与成苗率, 这一技术集中了组织培养与嫁接的优势, 可以保持品种优良的特性, 使果树提早结果, 解决了茎尖离体培养难以成功的困难, 克服了由于热处理出现的落叶、枝条长势活力降低等缺点^[6], 是培养无病毒苗木的一种更为有效的途径。

收稿日期 1996-11-18

课题来源 陕西省自然科学基金资助项目

作者简介 郭春慧, 女, 1960年生, 副研究员, 硕士

Navarro^[7]在加州河边试验站进行了“Willosleaf”和“Temple”柑桔品种的茎尖嫁接。“Willosleaf”原受衰退病病毒和裂皮病类病毒感染,“Temple”受裂皮病和木质陷孔病类病毒感染的苗木。经茎尖嫁接后,苗木随即生长。用标准指数测定法,没有发现有关的病原。Roistacher^[8]等鉴定证明茎尖嫁接可以克服柑桔的裂皮病、衰退病等多种病毒病。我国的李耿光首先利用茎尖嫁接技术获得了柑桔植株,但未进行病毒学鉴定。接着蒋元晖^[9]、何农^[10]、赵学源^[11]、陈桐^[12]、郭志勇^[13]、区胜祥等^[14~16]先后通过微嫁技术获得了脐血橙、暗柳橙、伏令夏橙、柠檬等20多个无病毒品种,无病毒植株的获得率达78%~100%。

苹果、桃、杏、葡萄、桑等的报道多是参照柑桔茎尖嫁接的方法。现已报道鉴定证明:茎尖嫁接可以克服柑桔的裂皮病、黄龙病、衰退病、花叶病等13种病毒病,苹果的茎槽沟病毒^[17],葡萄的卷叶病、软皮病、扇叶病、桃环斑病、砂痘病、褪绿叶斑病、李矮缩病毒等果树的多种病毒和类病毒病^[18]。在美国、西班牙、日本、中国、南非和以色列等国家都已应用茎尖嫁接技术建立了柑桔的特异无病原株系或引种、检疫及种质资源保存。

1.2 建立无性系快速繁殖体系

无性系快速繁殖的工业生产是果树茎尖嫁接的重要应用方向之一。自波尔等人首次从植株的茎尖培养出完整植株以来,至今已有大量草本植物被培养成功。但是这种技术应用于木本植物则比较困难,原因在于多年生植物由幼龄进入成龄发育阶段,生根力与繁殖力随之下降和消失^[16]。然而在实践中常常需要对表现优异(如产量高、品质佳、抗性强的)成龄个体进行繁殖,特别是果树,由于长期采用嫁接繁殖而失去种苗所具备的幼龄组织,难以扦插生根。应用茎尖嫁接一方面可以将具有优良性状的茎尖嫁接于砧木苗上,通过培养得到完整植株,另一方面可诱导发育阶段返幼,提高优良品种的扦插繁殖成活率^[18]。

Piego-Alfaro 首次通过无菌茎尖嫁接,观察到成龄鳄梨茎切段生根力的恢复。Mohamed^[19]进行了海岸红杉茎尖嫁接诱导发育阶段返幼的研究,在无菌条件下以1.5 cm成龄茎尖为接穗嫁接在苗龄2周,长2 cm的种苗茎切段上,置入附加维生素的MS液体培养基,在27℃,1000 lx,光照16 h/d下培养,4~6周后当接穗芽长至2~3 cm时,切去茎尖再行嫁接。经反复继代嫁接,接穗品种的茎切段扦插生根力和生长势与幼龄种苗相同。成龄接穗逆转的幼龄特性稳定。

茎尖嫁接诱导发育阶段返幼的原因尚无定论。Mohamed^[19]发现,伴随发育阶段返幼,茎尖蛋白质成份发生变化,本来仅存在于幼龄茎尖的蛋白质,在经过嫁接的成龄茎尖中得到恢复。Jonard^[20]提出幼龄砧木组织中激素对成龄茎尖作用的假设。但Mohamed^[19]认为,诱导发育阶段返幼可能是生长抑制物被解除或含量降低的结果。

作者的研究证明,茎尖嫁接可以解决经济林木茎尖离体培养不易成功的困难^[21]。在桑树的茎尖嫁接研究中,首次获得了“707”、新一之濼、荷叶白及桐乡青等生产上主栽品种的茎尖嫁接苗,移栽至大田表现良好^[21]。从而克服了我国生产上主栽的湖桑系品种茎尖离体培养难以诱导生根和移栽成活率低的问题。用于苹果茎尖嫁接,也解决了试管苗难以生根品种的培养问题,加速了苹果无病毒母本苗的繁殖。因此,Burger指出,茎尖嫁接是植物快速繁殖的一个工具^[22]。

1.3 鉴定砧木生长型

据报道,苹果的茎尖嫁接中,不同生长型砧木对茎尖接穗的干物质累积有明显的影

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_9)和 M_{26} 最少^[22]。这一结果与田间条件下的试验结果一致,所以茎尖嫁接方法可以作为育种鉴定砧木生长型的新途径,这比田间条件下试验时间短,省材料,又不占用土地。

1.4 异质嫁接不亲和性的早期诊断

具有亲和力的接穗和砧木在嫁接时,愈合的第一步是形成愈伤组织,如果技术熟练且砧穗双方接触紧密,则嫁接成功的可能性很大。不少研究者已对试管嫁接条件下的各种砧穗之间的关系进行了研究。Jonard 已报道^[24]了在试管茎尖嫁接中异质嫁接不亲和性的研究。他们以同质嫁接为对照,发现有两种嫁接不亲和性:第一种是“局部”不亲和,即嫁接后砧木与接穗难于结合成统一的形成层,嫁接后 14 d 出现症状,60 d 无一存活(如杏/櫻桃李);第二种是“移位”不亲和,即砧木与接穗结合处有淀粉积累,形成正常的维管束,韧皮部退化,能获得完整植株,但两个月盆栽时枯死(如桃/李及桃/杏组合)。在最佳条件下,亲和的同质嫁接植株移栽于温室中可以得到 80% 的健壮植株(杏品种 Luizet/櫻桃李,柠檬品种 Villafranca/枳橙)。在常规技术嫁接时,要 5~10 年才能得到这种结果。所以茎尖嫁接可用于异质嫁接不亲和的早期诊断。

此外,某些树种特别是柑桔的健康植株表现嫁接亲和,感病毒病的植株不亲和。董绍珍等^[25]在苹果的大田嫁接研究中发现,苹果砧穗嫁接的异常现象是由于接穗带毒所诱发的一种嫁接不亲和现象,这一现象在大田需 2~8 年才能观察到。无菌条件下,10~15 d 就能观察到这一现象。因而可借以早期发现感染病毒病的材料。

2 茎尖嫁接技术的研究进展

Murashige^[2]首创的柑桔茎尖嫁接脱毒技术是采用顶接法,即将茎尖置于种苗顶端切面,成功率 5%~15%;Navarro^[7]认为倒 T 法的嫁接效果最好,即在种苗贴近顶端切面,以刀尖刻一倒 T 形,将长 0.1~0.2 mm 的接穗镶入切口,成功率为 35%~40%;马凤桐^[5]建立了高效率茎尖嫁接脱毒技术——点接法,主要特点是距砧木顶端切面 1~2 mm 处,以刀尖轻刺一小切口,然后把已切好的茎尖快速、垂直、无损地镶进小切口,其顶部和砧木表面相平或微突。克服了顶接时接穗易于干瘪,以及倒 T 法嫁接时接穗被过盛生长的愈伤组织所抑制的问题,成功率达 77%~88%。

嫁接的成功率与砧木、接穗的亲合力、砧木苗龄、接穗大小及取材时间密切相关。

三齿叶形的托罗桎枳橙与多数柑桔品种亲和性良好,被广泛用作柑桔茎尖嫁接砧木^[5]。马凤桐证明埃特格枸橼优于托罗桎枳橙,与所有供试品种嫁接成功率均在 90% 以上^[5]。蒋元晖^[9]及高原利雄^[26]等柑桔茎尖嫁接主要以粗柠檬、枳壳和枳橙作砧木。苹果砧木为金冠^[17]、加拿大山定子、 M_7 、 M_9 、 M_{26} 、 M_1 、中国山定子、圆叶海棠^[23];葡萄为米森(*Vitis vinifera* L. cv misson);桃为 GF305、杏和櫻桃李。

砧木苗龄一般为 2 周,苗高 1.5~2 cm,茎围 8~10 mm 为宜,暗培养的白化苗优于绿苗,砧木带子叶嫁接优于不带子叶^[21]。

茎尖大小与嫁接成活率呈正相关,与脱毒效率呈负相关。Navarro^[7]等报道,柑桔茎尖由 2 个叶原基(0.1~0.15 mm)增至 6 个(0.4~0.7 mm),嫁接成功率从 14.6% 增至 47.6%,对鳞皮病和裂皮病的脱毒效率由 100% 分别降低至 46% 与 83%。植物生长旺

季的新梢利于嫁接。桃树于六月份采接穗,嫁接成功率为53%,五月份仅33%;苹果从十一月至翌年三月采接穗,嫁接成功率为10%,五月高达70%,其后每月递减10%。温度高,新梢生长迅速,有利于嫁接脱毒。采自18~25℃的柑桔茎尖,脱毒效率为7%~10%,27~32℃的茎尖脱毒效率增至69%^[5]。

柑桔茎尖嫁接脱毒技术共5个步骤即:砧木种子剥去种皮播于试管培养基→茎尖嫁接→嫁接苗试管培养→转接→转接苗培养。张秋胜等^[27]将常规嫁接步骤缩减为3个,即砧木种子不剥种皮播种于培养土→茎尖嫁接→移栽。从而大大降低了脱毒苗成本,对传统的茎尖嫁接技术作了很大改进。

王际轩^[28]等将通过组织培养获得的无病毒苹果矮化砧木苗和无病毒品种,通过离体插入接、靠接、切接法,获得了26.7%~56.9%的嫁接成功率,克服了苹果品种组织培养苗生根低,又难以实现植株矮化等问题,为加速繁殖苹果无病毒苗木提供了有效的途径。

高原利雄将通过温室培养的无病毒柑桔苗茎尖^[26],在无菌条件下借助于解剖镜嫁接于播在钵钵中经黄化培养的种子苗上,用试验薄膜保护,然后反复利用嫁接成活株的茎尖嫁接,成功率达66.7%~100%,建立了柑桔快繁体系。

3 茎尖嫁接存在的问题和今后研究的领域

综上所述,茎尖嫁接技术正在世界各国进行着广泛的研究。茎尖嫁接脱毒只需非常少的材料,但要求植物微体组织和器官操作的精湛技术,而且每一种植物的茎尖嫁接都必定有其特殊的技术要求,所以目前多数树种还在试验阶段,未大量向生产者推广,这是存在问题之一。其二,茎尖嫁接技术至今还主要用于柑桔、苹果等的脱毒,其它方面还涉及较少,其实不少领域也可应用此技术进行研究,如诱导发育阶段返幼,砧木生长型鉴定,亲和性早期诊断以及生理、生化的研究等领域。应用这一技术将对果树优良无性系快速繁殖,缩短育种年限,提高产量和品质具有重要意义。而筛选与多数品种具高度亲和力的砧木,依然是不同树种茎尖嫁接的一项重要工作。通过生理、生化和组织细胞学观察,认识不同发育阶段的内在变化,揭示诱导发育阶段返幼的刺激物、遗传物质,以及了解植物激素、酚化合物、过氧化物酶和生长抑制等对不同类型茎尖嫁接的影响,将使这一研究引向深入。

参 考 文 献

- 1 于绍夫译. 病毒病对果树生产的危害, 国外农学——果树, 1991(4): 41~43
- 2 Murashige T, Bitters W P, Rangan T S et al. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *Hortscience*, 1972, 7: 118~119
- 3 Wendy B. UCR scientist gives new life to old trees. *USA Today*, 1986-10-08, B-1~B-4
- 4 Huang L C, Lius S, Huang B L. Rejuvenation of sequoia sempervirens by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro. *Plant Physiol*, 1992, 98: 166~173
- 5 马凤桐, Murashige T. 柑桔属茎尖嫁接脱毒的研究. *植物学报*, 1989, 31: 565~568
- 6 朱文勇. 第23届国际园艺大会盛况与现代表果树发展趋势. *山西果树*, 1982(1): 1~3
- 7 Navarro J, Roistacher C N, Murashige T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus free citrus. *Soc Hort Sci*, 1975, 100(5): 471~479
- 8 Roistacher C N, Kitto S L. Elimination of additional citrus virus by shoot tip grafting in vitro. *Plant Dis Repr*, 1977, 61: 594~596

- 9 蒋元晖,邱柱石,苏维芳等.利用茎尖嫁接脱毒培养无裂皮病的脐血橙.植物保护学报,1983,10(3),166~167
- 10 何农,陈邦富.柑桔茎尖嫁接及试管苗移栽技术研究初报.中国柑桔,1984(4),11~13
- 11 赵学源,蒋元晖,李世葵.我国柑桔栽培品种的裂皮病鉴定和脱除.园艺学报,1986,13(5),91~94
- 12 陈桐.在试管中茎尖嫁接脱除柑桔黄龙病病原的研究.福建省农科院学报,1987,2(1),67~71
- 13 郭志勇,Starranton A.柑桔传染性杂色花叶病的茎尖嫁接脱毒.病毒学杂志,1987(3),72~77
- 14 区胜祥.柑桔茎尖嫩芽嫁接及无病毒良种繁育.农业科技通讯,1987(2),23~24
- 15 宁瑞林.柑桔茎尖嫩芽嫁接成活率的提高及应用研究.福建省农科院学报,1990,15(1),20~26
- 16 Boxus P 著,王国平译.通过组织培养获得无病毒果树.国外农学——果树,1987(4),41~43
- 17 Huang S C, Millikan D F. In vitro micrografting of apple shoot tips. Hortscience, 1980, 15, 741~743
- 18 马凤桐,李敏侠,刘玉荣等.木本植物诱导发育阶段逆转的研究.西北农业学报,1992,1(1),53~56
- 19 Mohamed M. Phase reversal in woody perennials by grafting of adult shoot apices onto juvenile rootstocks in vitro [Ph. D]. Disaertation Univ Calif Riverside, 1985, 40~169
- 20 Jonard R. Chapter 11 micrografting and its applications to tree improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1989(1), 31~38
- 21 Ma F T, Guo C H, Liu Y R. In vitro shoot-apex grafting of mulberry. Hortscience, 1996, 31(3), 460~462
- 22 Burger D W. Micrografting a tool for the plant propagator. The International Plant Propagators Society Comnined Proceedings, 1985, 34, 244~248
- 23 李嘉瑞.苹果茎顶的显微嫁接研究.西北农业大学学报,1985(3),31~37
- 24 Jonard R. 利用离体技术早期鉴定杏和柠檬的嫁接不亲和性.中国农业文摘——园艺,1991,1(6),27
- 25 董绍珍.苹果砧木嫁接异常现象的观察.中国果树,1984(3),6~11
- 26 高原利雄.カンキツ種木の急速増殖システム.农业および园艺,1987,62(7),849~854
- 27 张秋胜,舒广平,宋瑞华.柑桔茎尖嫁接技术的改进.中国柑桔,1991,20(2),11~12
- 28 王际轩,李淑珍,隋长琴等.苹果组织培养离体嫁接的研究.园艺学报,1985,12(3),151~154

Present Research Situation and Prospects of Shoot Apex Grafting in Economic Trees

Guo Chunhui Ma Fengtong

(Institute of Loess Plateau Control, Shaanxi Provincial Academy of Agricultural Sciences, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Based on the experiment achievement of shoot apex grafting in economic trees in the last 20 years, the key field for the future research has been pointed out. The virus-freeing and high-speed propagating in the early stage has changed from research period to application period. The early diagnosis of incompatibility of graft and rejuvenation have been broken through in some species. But the techniques and theories, especially in rejuvenation, still need to be studied further, which include ①virus-free and high-speed propagation in different kinds of economic trees; ②discovery of the causes of the rejuvenation through biophysics, biochemistry and cytological observations, and through the inner change understanding during different growth periods.

Key words economic tree, shoot apex grafting, propagation, rejuvenation