

# 苹果矮化砧木 M9T337 组培快繁技术研究

王艳芳<sup>1</sup>, 樊霞<sup>2</sup>

(1. 天水市蔬菜产业开发办公室, 甘肃 天水 741000;

2. 天水市果树研究所, 甘肃 天水 741000)

**摘要:** 矮化栽培是苹果栽培现代化发展的趋势, 应用矮化砧木是实现苹果矮化栽培、标准化管理的主要途径。为完善和优化苹果矮化砧木组培繁殖再生体系, 以苹果矮化砧木 M9T337 为试验材料, 分别用 75% 酒精和 1 g/kg 升汞进行消毒处理, 以筛选外植体最佳消毒方案; 以 M9T337 单芽茎段为材料, 研究不同培养基配方组合对组培苗污染率、增殖系数、株高、长势、生根个数和生根率等指标的影响。结果表明, 最适合外植体消毒的方法为 75% 酒精 30 s + 1 g/kg 升汞 9 min, 最佳 M9T337 初代培养基、继代培养基和生根培养基配方分别为 MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 0.4 mg/L、MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 和 1/3MS + IBA 0.1 mg/L。本试验建立了苹果矮化砧木 M9T337 高效离体快繁技术体系, 筛选出了适宜于 M9T337 最佳扩繁、生根培养基。

**关键词:** 组织培养; 矮化砧木; M9T337; 苹果

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2024)02-0163-04

doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2024.02.012

## Study on Tissue Culture and Rapid Propagation Techniques of Apple Dwarf Rootstock M9T337

WANG Yanfang<sup>1</sup>, FAN Xia<sup>2</sup>

(1. Tianshui Vegetable Industry Development Office, Tianshui Gansu 741000, China; 2. Tianshui

Fruit Tree Research Institute, Tianshui Gansu 741000, China)

**Abstract:** Dwarfing cultivation is the developmental trend of modern apple production. Promotion and application of dwarfing rootstock is the main way to realize apple dwarfing cultivation, standardized management for apple production. To improve and optimize the tissue culture and regeneration system of apple dwarf rootstocks, in this study, apple dwarfing rootstock M9T337 was used to screen the best disinfection plan for explants using 75% ethanol and 1 g/kg mercuric chloride, respectively. M9T337 stem-segment with single bud was used to study the effects of different culture-medium combinations on the pollution rate, multiplication coefficient, plant height, growth, rooting number, and rooting rate of tissue culture seedlings. The results showed that 75% ethanol for 30 s + 1 g/kg mercuric chloride for 9 min had the best disinfection effect. The optimal formulations of primary medium, secondary medium and rooting medium were MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.4 mg/L, MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and 1/3MS+IBA 0.1 mg/L, respectively. In this experiment, the efficient in vitro rapid propagation technology system of apple dwarf rootstock M9T337 was established, and the best propagation and rooting medium suitable for M9T337 were selected as well.

**Key words:** Tissue culture; Dwarfing rootstock; M9T337; Apple

乔砧苹果园普遍存在管理效率低、投入高、果实产量低品质差等问题, 矮化栽培是提高苹果园管理水平和促进高产优质的重要途径, 因地制宜地选择矮砧类型对发展矮密苹果栽培非常重要。苹果矮化砧的特点是树体矮小, 宜密植, 根系发达, 繁殖快, 具有高产优质和管理方便等特点, 易于机械化作业。M9T337 是由荷兰木本植物苗圃检测服务中心选育的无病毒 M9 选拔系, 比 M9 矮化程度高

20%, 意大利、法国及荷兰等欧美国家已用 M9T337 繁育的大苗来建园, 并成功获得高纺锤树形。该砧木根系发达、须根多、压条易繁殖, 新生苗木生长整齐, 具有良好的苗圃性状, 丰产, 早果, 易于推广。

目前 M9T337 主要采用组培快繁和压条繁殖的无性繁殖方式, 但是压条繁殖苗木的机体得不到有效更新, 植株生长势弱<sup>[1]</sup>, 成苗率低, 易受季

收稿日期: 2023-09-19; 修订日期: 2023-12-19

基金项目: 国家现代苹果产业技术体系(CARS-27)。

作者简介: 王艳芳(1981—), 女, 甘肃清水人, 助理研究员, 主要从事植物学、蔬菜栽培学与生理等研究工作。Email: 277154828@qq.com。

节和母体数量的限制<sup>[2]</sup>,不能大量生产。与传统的繁殖方法相比,组织培养苗木摆脱了季节的限制,能在人工控制条件下达到周年生产,可在较短时间内获得大量的组培苗<sup>[3]</sup>,大大简化了传统育苗(如扦插、嫁接等)的烦琐步骤,且能在较小的面积内大规模生产<sup>[4-5]</sup>,可有效降低生产成本。组织培养的苗木根系发达,栽植成活率高、树体健壮、抗病性强、早果丰产,且能够保持遗传性状的稳定性,组织培养育苗在现代农业生产中得到了广泛应用<sup>[6]</sup>,产生了巨大的经济效益和社会效益。2015年,我们从陕西华圣公司引进 M9T337,定植于天水市果树研究所苹果种质资源圃,并于2020年建立 M9T337 无菌系,同时进行了扩繁继代、生根培养研究,以期 M9T337 规模化生产及遗传转化体系构建奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为天水市果树研究所苹果种质资源 M9T337(2015 年从陕西华圣公司引进定植),树龄 6 a, 树体生长健壮,新梢发育良好。2020 年 4 月下旬晴天上午取生长健壮、发育良好的幼嫩新梢,切取顶端 3~4 节作为外植体及时送实验室处理。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒与初代培养 将外植体置于 1 000 倍洗洁精液中浸泡 30 min,然后用流水冲洗 10 min。用 75%酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 5 次,升汞溶液 1 g/kg 分别浸泡 8、9、10 min,再用无菌水冲洗 5 次。将经消毒处理的外植体置于无菌滤纸上,吸取多余的水分,切去受伤截面,取 1.5~2.0 cm 单芽茎段作为外植体接入启动分化培养基(灭菌后在培养室静置 3 d 以上)<sup>[7]</sup>。试验共设 3 个处理,分别为 I: MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.4 mg/L; II: MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.4 mg/L; III: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L。每瓶(培养基)2 个芽,接种 10 瓶,3 次重复,转入温度为 18~22℃、湿度为 55%~75%、光照强度为 500~1 500 Lx 的培养室中培养。每 3 d 观察 1 次,对褐化的外植体及时更换培养基。40 d 后调查外植体生长情况。

$$\text{污染率}=(\text{污染数}/\text{接种数})\times 100\%$$

$$\text{褐化率}=(\text{褐化数}/\text{接种数})\times 100\%$$

$$\text{成活率}=(\text{成活数}/\text{接种数})\times 100\%$$

1.2.2 继代扩繁培养基筛选 以初代培养所获长势健壮的组培苗为材料,选取 2~4 cm 长的茎段,切取约 1.3~1.7 cm 的带芽茎段进行继代培养扩繁<sup>[8-9]</sup>,继代培养基 6-BA、NAA 浓度组合见表 1<sup>[10-11]</sup>。

基于筛选出的最佳扩繁继代培养基,设置 4 个不同浓度 CH(水解酪蛋白)处理,即 0.2、0.3、0.4、0.5 g/L,每组处理接种 10 瓶,每瓶接种 4 个外植体,重复 3 次。40 d 后调查外植体的扩繁数和幼苗高度及长势。

表 1 继代培养 6-BA、NAA 浓度组合

NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)
0	0
0.5	0.6
0.5	0.8
0.5	1.0
0.5	1.2
1.0	0.6
1.0	0.8
1.0	1.0
1.0	1.2

1.2.3 生根培养基筛选 选取长势健壮、叶色浓绿的组培苗,截取长约 2.0 cm 的带芽茎段接入含有不同浓度 IBA (0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/L)的 1/3MS 基本培养基中进行生根培养<sup>[12]</sup>。培养室温度 22~26℃、湿度 55%~75%、光照强度 1 800~2 400 Lx。每组处理接种 10 瓶,每瓶接种 4 个外植体,重复 3 次,40 d 后调查外植体的生根数和增殖倍数。

$$\text{生根率}=(\text{生根的芽苗数}/\text{接种的芽苗总数})\times 100\%$$

$$\text{生根单株数}=\text{生根总条数}/\text{生根株数}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒时间对 M9T337 外植体消毒效果的影响

M9T337 外植体经过消毒灭菌后接种到初代培养基 5 d 后出现不同程度的污染。如表 2 所示,75%酒精浸泡 30 s 后,用 1 g/kg 升汞活液消毒 9 min 和 10 min 处理用的外植体污染率均显著低于消毒 8 min 处理,成活率显著高于消毒 8 min 处理。褐化率随着消毒时间的延长逐渐上升。从污染率、褐化率、成活率等 3 个指标看,75%酒精浸泡 30 s+1 g/kg 升汞消毒 9 min 效果最佳,且最佳初代培养基为 MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.4 mg/L。

## 2.2 不同浓度激素对比对 M9T337 生长增殖的影响

选取初代培养里长势健壮的植株进行继代培养,将其接种于不同激素组合的培养基中<sup>[13]</sup>,结果发现获得的新生茎尖数均显著高于不加激素的对照处理(表3)。其中,在6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L处理中,M9T337新生株的株高最高,为1.87 cm,增殖系数为5.18,且增殖芽生长良好,说明适宜于M9T337的最佳继代培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

## 2.3 不同浓度 CH 对 M9T337 生长增殖的影响

在1 L MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基中分别加入不同浓度的CH<sup>[14]</sup>,结果发现0.4 g/L CH处理的增殖系数显著高于0.2、0.3 g/L CH处理,其芽长势好、叶色浓绿、健壮(表4)。但CH

浓度增大至0.5 g/L时,培养基出现不凝固现象,试管苗的株高显著低于0.4 g/L CH处理,并且出现生长迟缓、长势下降、污染加重的现象。

## 2.4 不同浓度 IBA 对 M9T337 生根的影响

在1/3MS培养基中分别加入不同浓度IBA,生根培养结果如表5所示。当IBA浓度为0.10 mg/L时,瓶苗生根率为89.5%,显著高于其他处理,且根洁白、粗壮、整齐;当IBA浓度为0.04 mg/L时,生根率为59.6%,显著低于其他处理,侧根细且较少,根较短。IBA浓度为0.08、0.10 mg/L处理平均生根数分别为5.52、5.86条/株,显著高于其他处理,但0.8 mg/L处理的根茎部诱发出愈伤组织,且根的发育呈现畸形,不利于根及茎尖正常生长,不利于移栽成活。可见,IBA浓度

表2 不同消毒时间与培养基对 M9T337 外植体生长的影响

75%酒精 消毒时间 /s	1 g/kg升汞 消毒时间 /min	MS+6-BA 0.6 mg/L+ NAA 0.4 mg/L			MS+6-BA 0.8 mg/L+ NAA 0.4 mg/L			MS+6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.4 mg/L		
		污染率 /%	褐化率 /%	成活率 /%	污染率 /%	褐化率 /%	成活率 /%	污染率 /%	褐化率 /%	成活率 /%
30	8	30.5 a	22.4 b	32.6 b	33.2 a	18.5 c	38.3 c	35.6 a	24.3 a	24.5 b
30	9	19.8 b	22.5 b	50.6 a	12.3 b	24.7 b	62.8 a	14.7 b	28.9 a	53.8 a
30	10	13.2 b	31.3 a	44.7 a	9.4 b	30.6 a	53.2 b	9.1 b	33.8 a	42.5 a

①表内同列字母不同表示5%水平差异显著,下同。

表3 不同浓度激素对比对 M9T337 生长增殖的影响

NAA浓度 /(mg/L)	6-BA浓度 /(mg/L)	株高 /cm	增殖系数	长势
0	0	0.94 c	1.53 e	生长势弱
0.5	0.6	1.68 ab	2.86 d	苗健壮,正常
0.5	0.8	1.74 ab	4.22 b	苗健壮,正常
0.5	1.0	1.87 ab	5.18 a	苗健壮,长势良好
0.5	1.2	1.79 ab	4.75 ab	生长势弱,有少量玻璃化
1.0	0.6	1.90 a	3.23 d	苗健壮,正常
1.0	0.8	1.83 ab	4.31 b	苗健壮,正常
1.0	1.0	1.76 ab	4.82 ab	苗健壮,正常
1.0	1.2	1.57 b	3.93 c	生长势弱,有少量玻璃化

表4 不同浓度 CH(水解酪蛋白)对 M9T337 扩繁的影响

CH浓度 /(g/L)	株高 /cm	增殖系数	长势
0.2	2.01 ab	3.98 c	增殖生长和增高生长好,叶色绿
0.3	1.96 ab	5.23 b	增殖生长和增高生长好,叶色绿
0.4	2.23 a	6.01 a	增殖生长和增高生长良好,叶色浓绿
0.5	1.87 b	5.76 ab	增殖生长和增高生长较差,污染严重

表5 不同浓度 IBA 对瓶苗生根的影响

IBA浓度 /(mg/L)	接种数 /个	生根率 /%	平均生根数 /(条/株)	有无 愈伤组织	生长状况
0.04	40	59.6 d	3.28 c	无	侧根细且较少,根较短
0.06	40	64.7 c	4.35 b	少量	侧根较多,根较长
0.08	40	78.3 b	5.52 a	有	侧根较多,根较长
0.10	40	89.5 a	5.86 a	无	有大量侧根,根长
0.12	40	75.2 b	4.23 b	少量	侧根较多,少量根尖发黑

0.10 mg/L 的 1/3MS 培养基有利于 M9T337 的生根和生长。

### 3 讨论与结论

植物离体培养的关键在于外植体的建立, 而外植体的采集时间和消毒时长等因素影响无菌系的建立。在试管苗的组培快繁中, 升汞常用于外植体的消毒, 杀菌时间太短达不到消毒效果, 时间太长会引起植物中毒死亡或者褐化严重。本研究发现, 对于苹果砧木 M9T337 而言, 外植体的消毒方式以 75%酒精浸泡 30 s 加 1 g/kg 升汞消毒 9 min 效果最好, 最佳初代培养基为 MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.4 mg/L。试验过程中发现, 在外植体采集时, 天气情况可影响初代培养的成活率, 晴天采集成活率较高, 其原因有待进一步研究。基本培养基组成成分和植物生长调节物质对植物试管苗增殖快繁具有重要影响。本研究中, 不同配比细胞分裂素 6-BA 和 NAA 对 M9T337 试管苗增殖有显著影响。在继代扩繁培养中, 当 6-BA 与 NAA 浓度在一定范围内, 茎段的增殖系数随着 2 种激素浓度的增加而增加。其中, 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 处理的株高较高, 且叶片较大, 枝条更为粗壮, 新生茎尖数最多。但是当激素浓度超过一定范围时, 组培苗生长被抑制, 生长量和有效茎尖数下降, 玻璃苗增多, 试管苗生长出现异常<sup>[15]</sup>。

本研究发现, CH 对 M9T337 试管苗增殖有重要影响。当培养基中加入 0.4 g/L 的 CH 时, 能有效促进 M9T337 芽的分化增殖生长, 且芽叶色浓绿、生长健壮, 增殖系数高<sup>[16-17]</sup>。随着 CH 浓度进一步增加, 虽然芽的增殖系数提高, 但试管苗污染也显著增加, 提示高浓度 CH 在促进试管苗增殖的同时可能也会利于细菌的繁殖。为了得到较高的增殖倍数, 同时将细菌污染率控制在阈值之内, 适宜的 CH 浓度或其他药剂代替 CH 还需进一步研究。生根培养是离体快繁的关键, 直接影响工厂化繁育的成败。王淑华等<sup>[18]</sup>研究表明, ‘嘎啦’苹果试管苗生根培养时 IAA 表现优于 IBA 和 NAA; 而吴玉霞等<sup>[19]</sup>在 ‘粉红佳人’试管苗生根培养时发现, IBA 比 IAA 明显提高生根率。本研究发现, 在 1/3MS 基本培养基中加入 0.1 mg/LIBA 时, 试管苗生根效果最好, 与前人的研究基本一致。

### 参考文献:

- [1] 韩秀清, 徐世彦, 成思琼, 等. 苹果矮化砧 M9-T337 组培繁殖技术[J]. 西北农业学报, 2019(3): 18-19.
- [2] 成思琼, 颜盟, 梁彬, 等. 苹果砧木 M26 和 M9-T337 组培快繁体系的建立[J]. 陕西农林科学, 2020, 66(4): 31-35.
- [3] 孙清荣, 关秋竹, 何平, 等. 苹果半矮化砧木 G.935 的离体快繁体系建立[J]. 山东农业科学, 2011, 53(11): 16-20.
- [4] 张庆田. 几种苹果砧木组培技术的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [5] 赵亮明, 王飞, 韩明玉, 等. 苹果砧木组织培养与快繁技术研究[J]. 西北农业学报, 2011(7): 118-122.
- [6] 余亮. 苹果砧木 M9 和 M26 快繁体系的建立及移栽生理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [7] 周莉. 苹果矮化砧木离体培养和快繁体系建立与优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [8] 张欣. 苹果砧木 G.41 再生和遗传转化体系的建立与优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [9] 付为国, 韦晨, 王醒. 苹果属植物组织培养的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1320-1325.
- [10] 尹明华, 曹振光. KT 和 NAA 对黄芪带芽茎段增殖、愈伤诱导和生根的影响[J]. 亚热带植物科学, 2011, 40(1): 41-44.
- [11] 尹明华, 王艾平, 罗朝晖, 等. KT、24-D 和 NAA 对黄独组培苗带芽茎段生长发育的影响[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(2): 29-31.
- [12] 尹明华. KT 和 NAA 对知母试管苗生长发育的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(3): 607-608; 612.
- [13] 张翔宇, 杜亚填, 龚雪元. 南方红豆杉试管微芽诱导培养及其紫杉醇类化合物的积累[J]. 植物生理学, 2012, 48(9): 864-868.
- [14] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [15] 邹恩强, 杜希华, 李成刚, 等. 影响苹果砧木 M9 组培苗玻璃化的因素与改善措施[J]. 山东林业科技, 2010(5): 27-30.
- [16] 王作江, 刘元勤, 李升恩. 发展矮砧苹果的意义及矮砧选择[J]. 落叶果树, 2002(6): 14-15.
- [17] 王作江, 刘元勤, 李升恩. 发展 M9 无毒自银砧矮化苹果及经济意义[J]. 河北果树, 2003(2): 12-13.
- [18] 王淑华, 董媛, 王延秀, 等. ‘嘎啦’苹果试管苗生根培养基的筛选及 SA 对试管苗移栽的生理效应[J]. 中国农学通报, 2016, 32(13): 71-78.
- [19] 吴玉霞, 常永义, 张有富, 等. 两种生长素对 ‘粉红佳人’苹果脱毒试管苗生根的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(6): 77-80.