

光和温度对红富士苹果茎尖培养的影响

张巨祥 汪婉芳

(河北省科学院生物研究所, 石家庄)

摘 要

长富2号和短枝富士两种红富士苹果成年树茎尖离体培养中, 增殖和生根两个不同阶段所要求的最适温度和光照强度不同。

日温29℃、夜温20℃比试验的其它温度更利于不定芽的分化和生长, 而生根最适温度为日温25℃、夜温18℃, 低于芽分化和生长所需的最适温度。

1500—2500勒克司、每日照光10小时, 芽分化与生长最好; 1500勒克司连续光照, 虽然有利于芽的分化, 但节间过短、茎变紫、不能形成有效苗。

光抑制茎产生根。在600—2500勒克司范围内, 光越强, 抑制生根作用越强。暗培养虽然生根率最高(90%), 但苗细弱。可以先进行暗培养, 诱导生根之后再转到光下培养, 达到壮苗、提高移栽成活率的目的。1500勒克司连续光照诱导生根率高于相同强度的间断光照, 但根短粗、不伸长, 根尖和茎变紫, 节间短。将这种苗移到间断光照下继续培养, 十几天后, 苗可恢复正常。

关键词: 苹果、茎尖离体培养、温度、光照

植物组织培养成功与否, 受多种内外因素的影响。尽管近年来已有一些作者对光和温度在植物组织培养中的作用进行了研究和评述, 但是在众多的研究中, 往往侧重于改进培养基成份, 尤其是把主要注意力集中在细胞分裂素和生长素之间比例关系上, 忽视了培养环境中温度与光的因素, 而把增殖培养和生根培养放在同一温度和光照条件下进行。因此, 虽然在培养基成份上做了大量工作, 但某些作物的离体培养仍不能取得满意的效果。

根据我们对多种作物茎尖培养的初步观察, 温度和光对器官分化及生长的影响很大, 尤其是不定芽和不定根的形态建成需要不同的温度和光照。为了进一步了解温度和光在红富士苹果成年树茎尖离体培养中的作用, 找出不同培养阶段的最适温度和光照条件, 我们进行了本项试验。

材料与方法

春季,待芽萌动后,取健壮无病的长富2号和短枝富士两种红富士苹果成年树营养枝条,用自来水冲洗干净,剪成带有1—2个芽的茎段,用解剖刀将芽的鳞片剥去1—2层,然后用0.1%氯化汞液消毒10分钟,无菌水冲洗4—5次,按常规无菌操作方法切取芽接种到增殖培养基($MS+6-BA1.0\text{ ppm}+IAA0.3\text{ ppm}+CH300\text{ ppm}+$ 蔗糖4%)上。先在弱光(约300勒克司)下培养十多天,然后把没有污染的芽转到同种新鲜培养基上,置于暗中培养。约1个多月后,接种的芽即可形成丛生黄化芽。此时,将丛生芽切分成单个芽及其1—2个节的幼嫩茎段,再转到同种新鲜培养基上进行继代培养。以后每隔50—60天,用同样方法转接一次,周而复始,可进行若干代。由外植体开始,最初几代全是暗培养,待苗繁殖到一定数量后,开始改为照光培养(约1500勒克司,白日照光10小时),经2—3代照光培养所得无菌绿苗即可用于光照和温度试验。若要生根,则切取1 cm以上绿苗转到生根培养基($\frac{1}{2}MS+IBA1.5\text{ ppm}+$ 蔗糖2%)上培养,十几天后即可见到白色小根。

结果与分析

一、温度试验

选取健壮、整齐一致的长富2号和短枝富士继代培养的无菌绿苗,按常规方法,同时接种到增殖培养基和生根培养基上,置于不同日温和夜温的条件下培养。光照强度均为1500勒克司。分别于接种后40天和27天观察温度对芽分化、芽生长及生根的影响。结果列于表1和表2。

从表1可以看出,在试验温度下培养,长富2号和短枝富士平均每株分化数、最高分化数以及有效苗数,都是先随温度的上升而增加,当日温 29°C 、夜温 20°C 时,都达到最高值,以后随温度的升高而下降。品种之间差异不明显。因此认为,供试的两个品种,在试验温度范围内,有利于芽分化和生长的最适温度为白日 29°C 、夜间 20°C 。

从表2可以看出,在试验温度下培养,两个品种的生根率都是先随温度的上升而增加,当日温 25°C 、夜温 18°C 时都达到最高值,以后随温度的升高而下降。说明两个品种生根对温度的要求是一致的,但是短枝富士似乎较长富2号更容易诱导生根。如果将长富2号无根幼苗分别在低温(日温 16°C 、夜温 11°C)和高温(日温 33°C 、夜温 21°C)条件下先培养20天,然后将未生根苗转移到适宜温度(日温 25°C 、夜温 18°C)下培养,10天后,前者20株中有17株生了根,而后者20株中没有一个生根。

比较表1和表2可以看出,两个苹果品种增殖(芽的分化和生长)和生根对培养温度的要求都是不一样的,增殖要求较高的温度,而生根要求的最适温度较低。

二、光照试验

选取正常生长的长富2号和短枝富士继代培养的无菌绿苗,按常规方法分别接种到相同增殖培养基和生根培养基上,置于不同光照强度下培养。除连续光照处理以外,其余均为白日照光10小时,夜间黑暗。培养温度均为白日 $31\pm 2^{\circ}\text{C}$,夜间 $19\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。分别于接种后32天和27

表 1 温度对红富士苹果芽分化和生长的影响

| 品 种 | 白 日 温 度 (°C) | 夜 间 温 度 (°C) | 昼 夜 温 度 | 接 种 株 数 | 总 分 化 芽 数 | 平 均 分 化 芽 数 / 株 | 平 均 最 高 分 化 数 / 株 | 平 均 有 效 苗 数 / 株 | 平 均 最 高 株 高 (Cm) | 备 注 |
|---------|-----------------|-----------------|---------|---------|-----------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|------------|
| 长 富 2 号 | 16 | 11 | 5 | 24 | 28 | 1.2 | 1.8 | 0 | 0.5 | 个别老叶变褐苗生长慢 |
| | 21 | 15 | 6 | 24 | 32 | 1.3 | 2.0 | 0 | 0.7-0.8 | 同 上 |
| | 25 | 18 | 7 | 24 | 95 | 4.0 | 5.5 | 2.4 | 1.5 | 苗壮节间短 |
| | 29 | 20 | 9 | 24 | 140 | 5.8 | 7.8 | 4.0 | 2.5 | 苗壮节间短 |
| | 33 | 21 | 12 | 24 | 121 | 5.0 | 6.5 | 3.3 | 2.3 | 有部分黄叶 |
| 短 枝 富 士 | 16 | 11 | 5 | 24 | 24 | 1.0 | 1.0 | 0 | 0.5 | 个别老叶变褐苗生长慢 |
| | 21 | 15 | 6 | 24 | 33 | 1.4 | 2.0 | 0 | 0.7-0.8 | 同 上 |
| | 25 | 18 | 7 | 24 | 98 | 4.1 | 5.5 | 2.5 | 1.5 | 苗壮节间短 |
| | 29 | 20 | 9 | 24 | 126 | 5.3 | 6.8 | 3.6 | 2.4 | 苗壮节间短 |
| | 33 | 21 | 12 | 24 | 120 | 5.0 | 6.5 | 3.2 | 2.3 | 有部分黄叶 |

注: 1、各处理接种6瓶, 每瓶4株, 共24株。

2、平均最高分化数/株, 表示在同一处理中, 每瓶分化芽数最高的那株芽数的平均值。

3、平均最高株高, 表示在同一处理中, 每瓶最高株的株高平均值。

表 2 温度对红富士苹果生根的影响

| 品 种 | 白 日 温 度 (°C) | 夜 间 温 度 (°C) | 昼 夜 温 差 (°C) | 接 种 株 数 | 生 根 株 数 | 生 根 率 (%) | 一 般 根 数 / 株 | 一 般 根 长 (Cm) | 愈 伤 组 织 | 备 注 |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|---------|---------|--------------|----------------|-----------------|---------|------------|
| 长 富 2 号 | 16 | 11 | 5 | 50 | 20 | 40 | — | 刚露白 | + | 基部很多叶变褐根不长 |
| | 21 | 15 | 6 | 50 | 32 | 64 | 3-6 | 0.5-1 | + | 有少量黄叶 |
| | 25 | 18 | 7 | 40 | 35 | 88 | 3-6 | 1-2 | +- | 无 黄 叶 |
| | 29 | 20 | 9 | 50 | 29 | 58 | 1-5 | 2-3 | +- | 无 黄 叶 |
| | 33 | 21 | 12 | 50 | 22 | 44 | 1-4 | 2-3 | +- | 无 黄 叶 |
| 短 枝 富 士 | 16 | 11 | 5 | 50 | 23 | 46 | — | 刚露白 | + | 基部很多叶变褐根不长 |
| | 21 | 15 | 6 | 50 | 40 | 80 | 3-6 | 0.5 | + | 有少量黄叶 |
| | 25 | 18 | 7 | 50 | 49 | 98 | 3-6 | 1-2 | +- | 无 黄 叶 |
| | 29 | 20 | 9 | 50 | 29 | 58 | 1-5 | 2-3 | 0 | 无 黄 叶 |
| | 33 | 21 | 12 | 50 | 23 | 46 | 1-4 | 2-3 | +- | 无 黄 叶 |

*愈伤组织+表示量少, +-表示有的苗有愈伤组织, 有的苗没有。

天, 对增殖培养和生根培养进行调查, 结果列于表 3 表 4 和。

表 3 光强对红富士苹果芽分化和生长的影响

| 品种 | 光强 (lux) | 接种株数 | 总分化芽数 | 平均分化芽数/株 | 平均最高分化数/株 | 平均有效苗数/株 | 平均最高株高 (cm) | 叶展开 | 叶色 | 备注 |
|--------|-------------|------|-------|----------|-----------|----------|----------------|-----|------|-----------|
| 长富 2 号 | 0 | 24 | 79 | 3.3 | 4.8 | 1.7 | 2.5 | 不好 | 黄绿 | 节间伸长快 |
| | 600 | 24 | 99 | 4.1 | 5.5 | 1.4 | 2.6 | 中等 | 绿 浅绿 | 少数叶尖变褐 |
| | 1500 | 24 | 129 | 5.4 | 7.0 | 1.7 | 2.1 | 中上 | 绿 | 个别叶发黄但没褐化 |
| | 2500 | 24 | 136 | 5.7 | 8.3 | 2.9 | 3.0 | 最好 | 深绿 | 无黄叶茎粗壮 |
| | 1500连续 | 24 | 129 | 5.4 | 6.3 | 0 | 0.7 | 最好 | 深绿 | 茎变紫节间短 |
| 短枝富士 | 0 | 24 | 60 | 2.5 | 4.3 | 1.6 | 2.0 | 不好 | 黄绿 | 节间伸长快 |
| | 600 | 24 | 81 | 3.3 | 4.3 | 1.7 | 2.1 | 中等 | 绿 | 少数叶尖变褐 |
| | 1500 | 24 | 87 | 3.6 | 5.3 | 1.9 | 2.8 | 中上 | 绿 | 个别叶发黄但没褐化 |
| | 2500 | 24 | 85 | 3.5 | 6.3 | 2.0 | 2.5 | 最好 | 深绿 | 无黄叶茎粗壮 |
| | 1500连续 | 24 | 92 | 3.8 | 5.5 | 0 | 0.7 | 最好 | 深绿 | 茎变紫叶肥厚节间短 |

表 4 光强对长富 2 号苹果生根的影响

| 光强 (lux) | 接种株数 | 生根株数 | 生根率 (%) | 一般根数/株 | 一般根长 (cm) | 愈伤组织 | 叶色 | 备注 |
|-------------|------|------|------------|--------|--------------|------|----|------------|
| 0 | 50 | 45 | 90 | 4-6 | 2-3 | +++ | 黄绿 | 苗弱少部分叶变褐 |
| 600 | 50 | 42 | 84 | 4-5 | 2-3 | + | 绿 | 无黄叶 |
| 1500 | 50 | 30 | 60 | 2-5 | 2-3 | 0 | 绿 | 无黄叶 |
| 2500 | 50 | 10 | 20 | 1-3 | 4-5 | 0 | 深绿 | 无黄叶、根和茎粗壮 |
| 1500连续 | 40 | 31 | 78 | 4-7 | 1-2 | 0 | 深绿 | 茎紫节间短, 根短粗 |

愈伤组织+++表示很多, +表示有少量, 0表示没有

从表 3 可以看出, 长富 2 号和短枝富士, 在试验光强范围内培养, 都能不同程度地诱导

芽分化和生长。平均每株分化数,以1500、2500勒克斯和1500勒克司连续光照三种处理的较高,而平均每株最高分化数、有效苗数、最高株高以及叶展开、叶色、茎粗等都以2500勒克司光照效果最好。

1500勒克司连续光照,虽然也有利于芽的分化,但节间过短,茎变紫,所分化的小芽呈丛生状态,不易伸长,最终得不到有效苗。如果把这种有丛生芽的培养瓶移到相同光强但夜间黑暗下进行培养,大约经过十多天,丛生小芽开始伸长,茎转成淡绿色,生长恢复正常。

黑暗和弱光(600勒克司)条件下培养,平均每株分化数及其他指标都较差,弱光培养好于暗培养,说明继代培养的绿苗进行扩大繁殖时,照光是必要的。

两个品种互相比,在5个光强处理中,平均每株分化数都是长富2号高于短枝富士,说明长富2号在试验条件下比短枝富士更容易分化。

从表4可以看出,5个光强处理都能不同程度地诱导长富2号苹果生根,其生根率和每株根条数,随光照强度的增加而减少,暗培养生根率达90%,效果最好。而茎粗、一般根长、叶色都随光照强度的增加而改善,也就是说,在试验光强范围内,光照越强,生根率越低,但是根、茎、叶越健壮。

1500勒克司连续照光培养,生根率虽然低于暗培养和弱光培养,但却高于1500勒克司间断光照,更高于2500勒克司的强光照。而且幼苗叶片肥厚、叶片深绿、节间短、十分健壮。但根粗壮,根尖及茎变为紫色。如果将这种苗转移到同样光强的间断照光条件下培养十多天,根变为白色,茎转为淡绿色,小苗恢复正常生长。

比较表3和表4可以看出,增殖和生根培养所要求的光照强度是不同的,在试验范围内,间断强光照有利于培养物芽分化和生长,其中以2500勒克司的光照强度为最好。暗培养和弱光培养有利于小苗生根,但苗细弱,影响移栽成活率。如果先在弱光(600勒克司)培养十四天,待苗基部刚分化出小根,立即移到强光(2500勒克司)下继续培养,不仅可诱导出较多的根,且可使幼苗较为健壮,利于移栽成活。

讨 论

一、红富士苹果成年树茎尖离体培养,不仅能大大加快繁殖速度,而且还可以结合热处理等方法,得到无病毒苗木。本试验结果不仅明确了红富士苹果分化和生长以及生根的最适温度和光强,而且指出了在茎尖培养的不同阶段对温度和光强的要求是不同的。对改进红富士苹果茎尖培养技术有重要意义,对于分化和生根较难的植物种的培养也有一定意义。可望在培养的不同阶段,通过改变培养温度和光照条件而得到比较满意的效果。

二、在培养中光照对产生绿色幼苗是必需的^[1]。但是,组织培养对光照的要求与整株植物有所区别。在一些植物(如烟草、荷蓝芹等)的组织培养中,已表明其器官的形成并不需要光,但仍需光来调节一些形态发生过程^[1]。一些研究已表明光在苗的形成、根的发生、叶状体的分化以及胚状体的形成过程中有重要作用^[1]。光在红富士苹果不定芽分化中起什么作用呢?从试验结果看,黑暗中可诱导继代培养的红富士苹果绿苗不定芽的形成,也就是说,不定芽的分化可以不需要光的诱导。但是在试验条件下,光越强越利于不定芽的分化。

这一结果与我们以前用黄化苗做的试验^[2]结果不同。在以前的试验中，对连续几代暗培养的红富士苹果黄化苗，继续暗培养有利于不定芽的分化，如果转入光下培养，则分化不定芽的能力有所下降。两个试验结果不同的原因，可能是光在红富士苹果黄化苗和绿苗不定芽分化过程中所起的作用不同所致。

三、光在根的形态发生中是否必需？现在还没有一致的意见。通常认为光抑制茎产生根^[1]。但是 Gautherd 用菊芋块茎组织做的试验表明：根的形成受光的调节和控制^[1]。本试验中，红富士苹果绿苗生根不需要光的诱导，而且光抑制生根的程度随光强的增加而增加。有些试验表明，光、温等外界因素是通过调节内源激素水平而起作用的；生长素促进根生长^[1]。因此认为光抑制生根可能是由于生长素在光下受到破坏造成的。

那么是否可以断言红富士苹果根的形态发生与光毫无关系呢？还不能这样说。因为做生根试验以前，绿苗经受过相当长时间的照光，在照光期间是否可能产生了某种物质，在以后的生根过程中起作用呢？Bouillenné 认为叶子在光下形成了成根素（rhizocaline），其性质是可移动。这个假说虽然有待进一步证实，但说明绿苗中根的形态发生与光的关系十分复杂，还有待深入研究。

参 考 文 献

- 【1】中国科学院上海植物生理研究所细胞室：植物组织和细胞培养。上海科学技术出版社，1978，178—200
- 【2】张巨祥、汪婉芳：红富士苹果组织培养快速繁殖研究。山东农业科学，1986（4）28—30
- 【3】Karen W Hughes: Cloning Agricultural plants via in vitro techniques. Editor B. V. conger. ph D. CRC press Ins. 16—18

THE EFFECT OF LIGHT AND TEMPERATURE ON CULTURE OF SHOOT TIPS OF RED FUJIYAMA APPLE

Zhang Juxiang Wang Wanfang

(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang)

ABSTRACT

In the *in vitro* culture of the shoot tips from adult tree of two kinds of the Red Fujiyama apple, Changfu No. 2 and the Short-branch Fujiyama, the optimum temperature and light intensity for multiplication and rooting are different.

As compared with other tested temperatures, 29°C day temp. and 20°C night temp. are more favorable for the adventitious bud differentiation and growth. The optimum rooting temperature is 25°C day temp. and 18°C night temp. but the optimum temperature for differentiation and growth of shoots is lower than them.

When the light intensity is 1500 — 2500 lux and the photoperiod is 10 hrs of light, the differentiation and growth of the shoots are the best. Although a continuous illumination of 1500 lux is beneficial to differentiation and growth of the shoots, but the internodes are too short, the stems become purple and the effective shoots can't be formed.

Light inhibits the rooting of shoots. The inhibitory degree is proportional to light intensity from 600 — 2500 lux. Although the rooting rate is highest (90%) in dark culture the shoots are thin and weak. So the dark culture induced rooting is order to strengthen shoots and improve the survival rate in transplantation.

The rooting rate with continuous illumination is higher than with discontinuous illumination of the same light intensity, but the roots are short and thin, root tips and stem become purple, internodes are short. The shoots can recover to normal after 10 day if they are transferred to discontinuous light culture.

Key words: Apple; shoot tip *in vitro* culture; Temperature; Light intensity.