

苹果砧木 M₉ 快繁技术的建立及试管苗生根进程解剖研究

余 亮,王 飞*

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:通过对苹果砧木 M₉ 离体培养,筛选该砧木的初代、继代培养、生根培养基,并解剖分析生根进程。结果表明:1)以 M₉ 的离体新梢进行初代培养,75%酒精 30 s+0.1%升汞 8 min 消毒效果较佳,较适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹。成活率为 18.9%。2)M₉ 的适合增殖培养基 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹,有效新梢数达到 6.4 个·株⁻¹。3)较适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹。暗培养 5 d 后,光培养 35 d,生根率达到 85.5%。4)M₉ 试管苗不定根的发育过程可分为 3 个时期:形成层细胞分裂期,不定根原基形成期,不定根的分化形成期。

关键词:苹果矮化砧木 M₉;离体新梢;合适培养基;快繁体系;不定根

中图分类号:S722.37

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2013)04-0106-05

Anatomical Study on Rooting Process and Rapid Propagation of Apple Rootstock M₉

YU Liang, WANG Fei*

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: An anatomical observation was conducted on rooting process by *in vitro* culture of apple rootstock M₉. Related factors concerning the culture were examined. 1) Satisfactory disinfection effects could be achieved with 75% alcohol for 30 s and 0.1% mercuric chloride for 8 min during the primary culture, and cultured with the medium of MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹. The survival rate was 18.9%. 2) For M₉, the appropriate enrichment medium was MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹ in which the efficiency shoots was 6.4 per stem. 3) The proper rooting medium for M₉ was 1/2MS+IBA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹. Its rooting rate reached 85.5% when cultured in the dark for 5 days and light culture for 35 days. 4) The process of M₉ plantlet adventitious root development could be divided into three periods: cell division of formation layer, the formation period of adventitious root primordia, differentiation stage of adventitious root.

Key words: apple dwarf rootstock M₉; *in vitro* shoot; suitable medium; rapid propagation system; adventitious root

发展矮砧苹果意义重大^[1]。国外的矮化栽培使用 M₉ 自根砧,如荷兰几乎清一色的 M₉ 自根砧,培育壮苗建园,定植后当年就有收获^[2]。此外,法国、意大利、德国、波兰以及美国,在 20 世纪 90 年代建立的果园均已 M₉ 矮化密植为主。我国从 20 世纪 80 年代就对苹果矮化砧木进行了大量研究,目

前,在苹果生产中,M₉,M₂₆,MM₁₀₆,M₇ 等许多矮化半矮化砧木都在应用,种类较为繁杂。根据各种矮砧并结合接穗的表现,M₉ 矮化效果最佳,对果品产量质量的提高也最好,目前生产中对 M₉ 苗木的需求量较大,但 M₉ 繁殖与生根困难,因此,采用组培技术建立 M₉ 快繁体系,在短时间为生产提供大量

收稿日期:2012-12-03 修回日期:2012-12-26

基金项目:国家现代苹果产业技术专项:陕西省苹果工程技术中心(2008ZDGC-0)。

作者简介:余亮,男,硕士研究生,研究方向:果树生理与生态。E-mail:jxyuliang578@163.com

* 通信作者:王飞,女,教授,博士生导师,研究方向:果树及花卉生理与生态。E-mail:xnwangfei521@126.com

的 M₉ 苗木十分必要。为此,选用 2009 年从美国购回的新一代 M₉ 苗木,对其进行快繁,同时对 M₉ 试管苗不定根的发生、发育进行解剖结构观察。旨在解决 M₉ 快繁以及生根难的问题。探讨 M₉ 试管苗不定根的发生发育规律,为 M₉ 试管苗的快繁与生根提供理论依据以及可操作技术^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2011 年 4 月进行,供试苹果砧木为 M₉,取自西北农林科技大学苹果示范基地。选择无病虫害生长健壮的母树,取 1 年生枝条为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 M₉ 外植体腋芽的诱导 将田间采回的 M₉ 健壮茎段置于 27℃ 温室内水培,用 1/8MS+5 g 蔗糖诱导分化,每 5 d 换水 1 次。待芽长到 1.5~2.0 cm 时,剪取嫩芽去掉大叶在自来水下冲洗 3~4 h^[4],75% 的酒精消毒 30 s,再用 0.1% 的氯化汞进行 7、8、9 min 的消毒处理,最后用无菌水反复冲洗 4~5 次,洗涤后用无菌纸吸干其上水分。将处理好的茎尖接种于附加不同浓度 6-BA(0.5,1.0,1.5 mg·L⁻¹)+NAA0.5 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基上^[5],每处理 15 瓶,重复 3 次,观察污染率、褐化率、成活率及生长情况。

1.2.2 继代培养基的确定 将获得的无菌外植体接种到 MS+不同激素质量浓度配比+琼脂 7 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹ 的培养基共 5 个处理和一个对照中进行继代培养,每个组合 20 瓶,每瓶 3~4 株。观察其生长情况,统计有效新梢数。继代苗生长势可用 5 种等级划分:1)茎秆细弱,叶片微黄,生长矮小而弱;2)茎秆细弱,老叶微黄,生长势较弱;3)茎秆中等,叶片淡绿,生长一般;4)茎秆粗壮,叶片淡绿,生长良好;5)茎秆粗壮,叶片浓绿,生长健壮。30 d 后统计试验结果。

1.2.3 M₉ 的生根 待苗子长到 1.5 cm 左右,将

其接种到生根培养基中,每瓶接种 4 个,每处理接种 15 瓶,各处理重复 3 次,40 d 统计生根率、生根数及生根的情况。

1.2.3.1 黑暗处理对生根的影响 将 M₉ 接到 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂培养基中,每处理 15 瓶,各处理重复 3 次。先进行 5 d 的暗处理后,再在 3 支 40 W 日光灯下进行光照培养培养,40 d 后统计其生根率和生根数。

1.2.3.2 不同蔗糖浓度对生根的影响 将生长一致,长势良好的 M₉ 接种于 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+7 g·L⁻¹ 琼脂以及不同蔗糖质量浓度(40、30、20、10、0 g·L⁻¹) 的培养基中,每处理 15 瓶。40 d 后统计生根率、生根数以及苗子的生长情况。

1.2.3.3 不同激素浓度对比对生根的影响 本处理采用二因素三水平正交试验设计,接种于附加不同激素浓度的 1/2MS 培养基中(表 4),每处理 15 瓶,各处理重复 3 次。观察统计生根情况,包括生根率,生根数和根长^[6]。

1.2.4 不定根原基形成及发育过程的解剖学观察

将从继代培养基上剪取带有生长点的茎段接种到生根培养基上,从接入后第 5 天随机抽取材料的 5 个嫩梢,此后每隔 2 d 至 15 d 止,切下基部 0.5 cm 左右材料,用 FAA 固定液固定。将固定好的材料按常规石蜡制片法进行切片,切片厚度为 11 mm,采用番红-固绿染色,然后进行显微观察^[7]。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间与培养基对苹果 M₉ 外植体的影响

M₉ 随着 0.1% 升汞消毒时间的延长污染率和成活率呈下降趋势;褐化率则随着消毒时间的延长逐渐上升。3 种培养基当 6-BA 质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 时,外植体的成活率最高。综合消毒与初代培养结果可知,75% 酒精 30 s+0.1% 升汞 8 min 消毒效果较佳,且初代培养基为 MS+ 6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹ 效果最好(表 1)。

表 1 不同消毒时间与培养基对 M₉ 外植体的影响

Table 1 Effects of different disinfection time and media on explants of apple rootstock M₉ %

75%酒精 消毒时间	0.1%升汞 消毒时间	MS+ 6-BA 0.5 mg·L ⁻¹			MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹			MS+ 6-BA 1.5 mg·L ⁻¹		
		+NAA 0.5 mg·L ⁻¹			+NAA 0.5 mg·L ⁻¹			+NAA 0.5 mg·L ⁻¹		
		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
/s	/s									
30	7	37.5	20.6	2.8	33.4	21.2	8.2	22.5	38.3	3.0
	8	29.3	20.5	3.8	26.4	20.3	18.9	14.3	33.9	0.0
	9	13.2	31.4	1.5	13.8	35.3	4.2	11.1	38.8	0.0

注:污染率=污染数/接种数×100%;褐化率=褐化数/接种数×100%;成活率=成活数/接种数×100%。

2.2 不同激素对比对苹果砧木的继代培养

将初代培养的 M₉ 进行继代培养基筛选。用不

同激素处理的继代培养组合,获得的有效新梢数(个·株⁻¹)均高于不加激素处理的对照(C0),且差异

均显著 ($p<0.05$) (表 2)。M₉ 在 5 种不同激素组合的培养基培养下,有效新梢数最高为 6.4 个·株⁻¹,且增殖芽生长良好(图 2-7),通过继代培养基筛选,M₉ 的最佳继代培养基配方为 C4(即 MS+6-BA1.0mg·L⁻¹+IBA0.1mg·L⁻¹)。

表 2 不同激素对比对苹果砧木 M ₉ 继代培养的影响				
Table 2 Effects of different hormone combinations on apple rootstock M ₉ subculture				
处理	激素及其质量浓度/(mg·L ⁻¹)		有效新梢数 (个·株 ⁻¹)	M ₉ 生长状况
	6-BA	IBA		
对照(C0)	0	0	1.2 e	1
C1	0.5	0.5	2.5 d	3
C2	1.0	0.5	3.4 c	3
C3	1.5	0.5	4.8 b	4
C4	1.0	0.1	6.4 a	5
C5	1.0	0.3	4.7 b	4

注:同列内不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

2.3 暗处理、糖处理以及激素对 M₉ 不定根诱导的影响

2.3.1 暗处理对 M₉ 不定根诱导的影响 将继代培养的试管苗接种后置于黑暗条件下连续培养 5 d,再在光下培养 35 d 生根率可达 85.5%,单株生根数为 5.8 条;而接种后直接置于光下培养,生根率只有 45.5%,单株生根数为 3.2 条。试验证明,M₉ 新梢接种暗培养 5 d 后,可显著提高生根率,又不至于由于长期不见光,使组培苗徒长,细弱,影响移栽成活。

2.3.2 糖处理对 M₉ 不定根诱导的影响 以 1/2MS 和 0.5 mg·L⁻¹ IBA 为基本培养基,附加不同浓度的

蔗糖。从表 3 可看出,蔗糖质量浓度在 10、20、30 g·L⁻¹时无显著性差异,20 g·L⁻¹处理时生根率达到最大值。但是对于生根数,除了不加蔗糖,其他 4 个处理的差别不明显。在 2 个极值 0 g·L⁻¹和 40 g·L⁻¹处理下,生根率和生根数都出现了下降,从苗的生长与生根综合考虑,M₉ 不定根诱导的蔗糖浓度应在 20 g·L⁻¹为最佳。

表 3 不同蔗糖浓度对 M ₉ 生根的影响			
Table 3 Effects of different sucrose concentrations on M ₉ rooting			
蔗糖质量浓度 /(g·L ⁻¹)	生根率 /%	生根数 /(条·株 ⁻¹)	生长情况
40	13.85bcBC	2.67	叶发黄,植株弱
30	33.41abABC	3.00	生长正常,部分根尖发黑
20	43.33aA	3.03	生长正常,侧根多,根较长
10	39.41aAB	3.48	根部分变黑褐色,根数较少
0	8.08cC	1.50	叶发黄,植株弱

2.3.3 IBA 和 NAA 不同对比对 M₉ 不定根诱导的影响 以 1/2MS 为基本培养基配置了 6 种生根培养基,经过筛选,不同浓度对比对 M₉ 生根率的影响如表 4 图 1 所示,当 IBA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹时,生根率达到 85.5%,平均单株生根数达 5.8 条,且无愈伤组织,移栽成活率高(图 2-9);而平均根长的最大值出现在 IBA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹的处理中(图 2-8),根长为 10.58 cm,但该种培养基培养的苗根部有少量的愈伤组织,移栽时会降低成活率。

表 4 不同激素浓度对比对 M ₉ 生根的影响									
Table 4 Result of different auxin concentrations on M ₉ rooting									
处理号	激素浓度		接种数/个	生根率/%	生根最多数 /(条·株 ⁻¹)	生根最少数 /(条·株 ⁻¹)	平均生根数 /(条·株 ⁻¹)	平均根长 /cm	有无愈伤组织
	IBA	NAA							
	/(mg·L ⁻¹)	/(mg·L ⁻¹)							
1	0.3	0.05	50	20.5	8	1	2.57	7.53	无
2	0.5	0.05	50	50.4	17	1	4.70	10.58	少量
3	1.0	0.05	50	44.4	5	1	3.05	7.56	有
4	0.3	0.10	50	85.5	11	1	5.80	9.80	无
5	0.5	0.10	50	50.8	13	1	3.50	7.01	少量
6	1.0	0.10	50	0.0	0	0	0.00	0.00	有

注:生根率=生根的芽苗数/接种芽苗总数×100%;生根数(条·株⁻¹)=生根总条数/生根株数;根长(cm·根⁻¹)=∑每条根长度/根条数。

2.4 不定根发生过程中外部形态观察

在茎段转接后的前 4 d,茎段表面未发生明显变化。第 6 天无根苗茎基部局部膨大,试验中发现无根苗茎基部形态变化有 2 种,一是有部分茎段在接种后 7 d 左右,在基部会产生白色点状突起,即根原基,根原基突破茎的表皮,迅速形成不定根,一般每个茎段可形成不定根 2~6 条不等,1 月后根长最长可达 10 cm 左右,并有少量侧生根,同时上部抽生新叶。二是有些茎段则不产生根。

2.5 不定根发生发育的解剖结构观察

2.5.1 形成层细胞分裂期 苹果无根苗在 IBA 与 NAA 诱导 5 d 后,维管形成层细胞被诱导启动开始旺盛活动,连续平周分裂产生数层薄壁细胞、形成层外部细胞,在外源激素作用下伸长、变大,整体形成一个由壁薄、质浓、分生能力强的细胞组成的一个环带状区域(图 2-1,2)。

2.5.2 不定根原基形成期 试管苗转接后的第 7 天开始,苹果无根苗就有不定根的根原基细胞陆续出现(图 2-3,4)。在原形成层与髓射线交接处的某

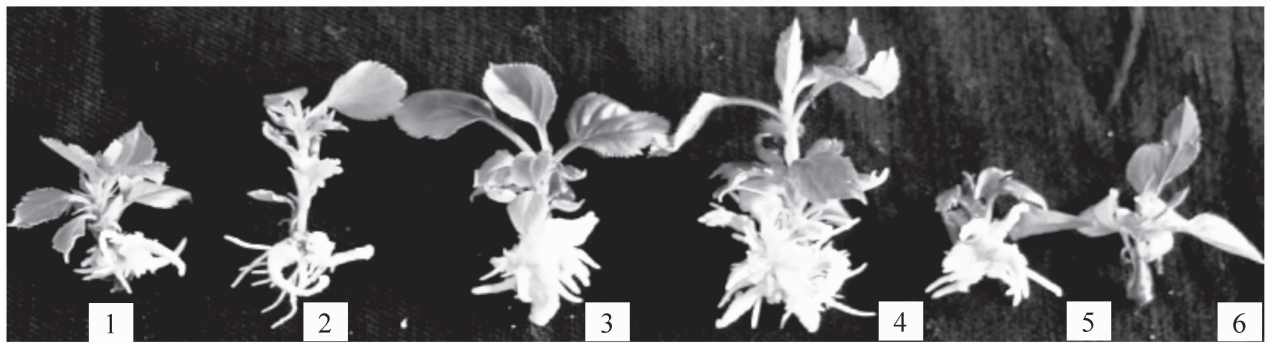
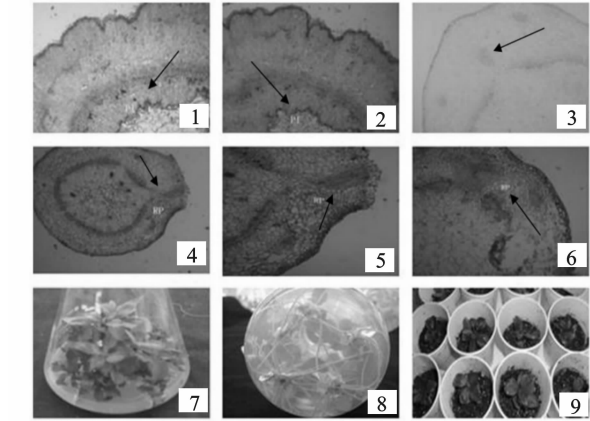


图 1 IBA 和 NAA 不同组合对 M₉ 生根的影响

Fig. 1 Effects of different combinations of IBA and NAA on M₉ rooting

些部位细胞开始活动。随着形成层细胞的旺盛分裂活动,其内部细胞发生了明显的变化,部分细胞的体积、细胞核及核仁进一步增大,经过 5、6 次垂周和平周分裂之后,这团细胞进行多方面的细胞分裂形成类似球形并向韧皮部凸起的根原基轮廓。这一时期茎的横切面观察清楚表明,苹果试管苗不定根起源于茎维管形成层细胞(图 2-3,4)。

2.5.3 不定根的分化形成期 根原基不断分裂,导致原有的细胞团凸起向外继续生长(图 2-5),根原基逐渐开始组织分化。逐渐形成生长点和根冠,位于根原基下部的细胞也开始分化形成维管组织(图 2-6)。由于生长点的细胞继续分裂、增大和分化,所产生的机械压力和根冠分泌物的作用,使不定根顺利地穿越各组织而露出茎外。



注:1. 幼茎横切面(接种前)(×60);2. 接种 5 d 形成层细胞旺盛分裂(×60);3. 接种 7 d 根原基形成(×40);4. 接种 9 d 根原基形成(×40);5. 不定根向外伸长(×60);6. 不定根维管组织与茎沟通(×60);7. M₉ 继代培养;8. M₉ 生根;9. M₉ 移栽。

图 2 苹果砧木 M₉ 不定根形成过程的解剖结构

Fig. 2 Anatomical structure of the formation of apple rootstock M₉ adventitious root

3 结论与讨论

通过对苹果砧木 M₉ 离体培养,得出该砧木的初代、继代培养、生根培养基。结果表明,以 M₉ 的

离体新梢进行初代培养,最佳培养基均为 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 0.5 mg · L⁻¹。在苹果砧木 M₉ 试管苗继代培养过程中,适宜质量浓度的生长素与细胞分裂素可促进茎尖的生长与分化,本试验得出 M₉ 的最佳继代培养基配方为 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+IBA0.1mg · L⁻¹,在此培养条件下,它们的有效新梢数可达 6.4(个 · 株⁻¹)。

在苹果 M₉ 快繁体系研究中,M₉ 组培苗的生根面临着诸多问题^[8]。外源激素的利用可显著提高苹果组培苗不定根的发生率^[9]。本试验利用不同激素浓度配比的 IBA 和 NAA 来诱导生根,获得了大量的生根苗^[10],说明利用 IBA 与 NAA 等外源激素诱导 M₉ 生根是可行的,这和 O. P. Jones^[11] 等的研究结果一致。

不定根的形成过程可分为 2 个阶段,即根原基诱导阶段和根露出阶段。生长素仅对第 1 阶段有效,而第 2 阶段不需要生长素甚至生长素可起抑制作用^[12]。利用 IBA 与 NAA 作为苹果的诱导生根剂,暗处理是极其重要的因素之一。本研究发现暗处理与光下处理在生根率方面差异较大(暗与光结合培养 40 d 生根率可达 85.45%,而接种后直接置于光下培养,生根率只有 45.50%)显然,暗处理有利于提高 M₉ 组培苗的生根率,验证了暗处理是组培苗生根的关键因素^[13]。

糖是植物离体培养中碳素来源和能量物质,为细胞合成新化合物提供碳骨架以及呼吸代谢提供底物与能源,同时对保持培养基渗透压也有重要作用。从表 3 中可以看出,只有在 2 个极端浓度下(0 g · L⁻¹和 40 g · L⁻¹)不利 M₉ 生根。当蔗糖质量浓度达到 20 g · L⁻¹时,单株生根数最大,说明在此浓度下,更多的细胞参与到激素的应激反应中^[14]。当蔗糖浓度达到最大 40 g · L⁻¹时,由于渗透压过大影响细胞的正常代谢;而不添加蔗糖时,M₉ 生根被抑制,其原因一方面蔗糖可促进乙烯的合成,而乙烯又可以促进细胞对激素的敏感性,从而促进生根,另一

方面,生根对于植物体来说是一个消耗能量的过程,不添加蔗糖,组培苗没有了能量来源,又如何生根^[15]。

目前,关于根的起源在组织培养中有 2 种不同的看法,第 1 种认为不定根是由愈伤组织中具单向极性生长的分生组织结节分化而成;第 2 种认为是苗基部茎上某一组织部位的细胞恢复分裂能力,不断进行细胞分裂、增大和分化而成。本试验观察结果表明,M₉ 苹果砧木的不定根的起源属于第 2 种,根原基发生于维管形成层。与刘捷平^[16]认为苹果不定根原基首先是在形成层和射线的交叉处发生是一致的。不定根发育的最初阶段的特征是加强了形成层的活动,形成层向外分生的细胞分化形成根冠和分生区,继而发育为伸长区和具有输导组织系统的成熟区。本试验在苹果 M₉ 砧木接种第 5 天开始就能观察到形成层的外围部分细胞,包括相当于原初生韧皮部部位的细胞和形成层以外的髓射线细胞开始脱分化成为分生组织,中柱外薄壁细胞组织逐渐膨大,使原来规则的排列变得疏松,因此本试验认为 M₉ 苹果砧木试管苗的不定根起源于维管形成层与射线交接处。

通过对苹果砧木 M₉ 试管苗不定根发生发育过程的解剖学观察阐明了其在生根的外部形态和内部组织变化过程,指出了 M₉ 不定根的生根类型以及根的发生规律。为以后 M₉ 砧木的快繁以及提高 M₉ 砧木生根提供了重要的理论依据,同时为难以生根的果树提供了参考资料。

参考文献:

[1] 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.

[2] 王作江,刘元勤,李升恩. 发展 M₉ 无毒自根砧矮化苹果及经济意义[J]. 河北果树,2003 (2):12-13.

[3] 辛蓓,徐继忠,邵建柱,等. 苹果砧木 M26 试管苗不定根发育过程中蛋白质的变化[J]. 河北农业大学学报,2006(9):16-20. XIN B,XU J Z,SHAO JZ,*et al.* The changes of proteins during adventitious root development of M26 *in vitro*[J]. Journal of Agriculture University of Hebei,2006(9):16-20. (in Chinese)

[4] 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.

ZHAO L M,WANG F,HAN M Y,*et al.* Studies on tissue culture and rapid propagation of applestocks[J]. Acta Agriculturae BoreaLi-occidentalis Sinica,2011(7):118-122. (in Chinese)

[5] 李俊红,张焕玲,李周岐,等. 杜仲组织培养再生体系的优化[J]. 西北林学院学报,2008,23(4):97-100. LI J H,ZHANG H L,LI Z Q,*et al.* Optimization of tissue culture regeneration system of *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(4):97-100. (in Chinese)

[6] 彭丽萍,董丽芬. 樟子松组织培养不定根诱导的研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(1):100-103. PENG L P,DONG L F. Root regeneration from adventitious buds in *Pinus sylvestris* var. *mongolica*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(1):100-103. (in Chinese)

[7] 陈子萱,田福平,陈玉梁. 扁桃砧木试管苗不定根发生发育的解剖学观察[J]. 甘肃农业大学学报,2007,45(2):87-90. CHEN Z X,TIAN F P,CHEN Y L. Anatomical observation of originated development on adventitious roots in rootstock of almond *in vitro* [J]. Journal of Gansu Agricultural University,2007,45(2):87-90. (in Chinese)

[8] JUDIT D,JAIME A. Teixeira da silva. micropropagation of apple — a review;biotechnology advances[J]. Hortic. Sci. ,2010,4:462-488.

[9] RAFAEL A,SCOTT N,ELLEN G. S. Relationship of IBA and adventitious r-ooting in M26 shoots cultured *in vitro*[J]. Plant Growth Regulation,1989,8:263-272.

[10] ELI K,RAHAN M L,ISRAEL. An enginnering vee to micropropagation and generation of true to type and pathogen-free plants[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2012,6:229-241.

[11] JONES O P,HOPPGOOD. propagation *in vitro* of M26 apple rootstock[J]. Hortic. Sci. ,1997,52:235-238.

[12] JAMES D J,THURNBON I J. Rapid *in vitro* rooting of apple rootstock M₉[J]. Hortic. Sci. ,1979,56:15-20.

[13] ANDERS S,MARGARETA W,PETER O, *et al.* Involvement of the ARRO-1 gene in adventitious root formation in apple[J]. Hortic. Sci. ,2009,6:710-715.

[14] ANA C,GEERT-JAN D K . Effect on sucrose on adventitious root regeneration in apple[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2002,70:207-212.

[15] SEL IMA N,NADHRA E. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM106 cultured *in vitro*[J]. Hortic. Sci. ,2008,7:518-525.

[16] 刘捷平. 植物形态解剖学[M]. 北京:北京师范大学出版社,1991.