

研究报告

Research Report

苹果耐重茬砧木优系多倍体诱导及鉴定

宿夏菲¹ 柴姗姗² 毛云飞¹ 张璐璐¹ 尹伊君¹ 刘业萍¹ 庞会灵¹ 胡艳丽^{1*}

1 山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 泰安, 271018; 2 石家庄理工职业学院, 石家庄, 050200

* 通信作者, ylhu8612@sohu.com

摘要 为了探讨适宜的苹果耐重茬砧木多倍体诱导技术体系, 本研究以前期筛选出耐重茬砧木株系 12-2 的组培苗为主要供试材料, 通过秋水仙碱浸渍和混培法、不同配置培养基及不同培养材料, 进行多倍体诱导, 比较不同方法组合后代的诱变率和存活率, 并以流式细胞仪鉴定方法进行鉴定。结果表明: 秋水仙碱浸渍法处理茎段过程中发现浓度在 30 mg/L 处理 24 h 时的存活率最高, 达 74.3%, 但未获得变异材料, 在 50 mg/L 处理 48 h 时获得 1 株变异材料, 诱变率达 2.9%; 利用混培法处理茎段时发现, 50 mg/L 处理获得 2 株多倍体材料, 1 株为纯合四倍体, 1 株为嵌合体, 诱导率为 5.8%, 70 mg/L 处理也获得 1 株嵌合体材料; 30 g/L 的蔗糖处理诱导后的不定芽数最多, 不定芽再生率最高达 68.6%, 也明显高于其他碳源山梨醇和葡萄糖的处理结果, 并获得 2 株变异株; MS 培养基的不定芽再生率达 68.6%, 变异株 2 株, 变异率为 2.9%, 在不同培养基处理中效果最佳; 三种生长素 IAA、NAA、IBA 均获得变异株, 其中 IAA 和 NAA 处理分别获得 1 株变异株, IBA 处理获得 2 株; N1 在四种培养材料(12-2, 31, N1, N2)中诱导结果最为突出, 获得 2 株变异材料。最终共获得 17 株变异材料, 其中 1 株为纯合四倍体, 其余均为嵌合体, 本研究为苹果耐重茬砧木多倍体诱导技术体系提供了理论支撑。

关键词 苹果砧木; 多倍体诱导; 秋水仙碱; 组织培养

Polyploid Induction and Identification of Apple Rootstocks with Tolerance to Continuous Cropping

Su Xiafei¹ Chai Shanshan² Mao Yunfei¹ Zhang Lulu¹ Yin Yijun¹ Liu Yeping¹ Pang Huiling¹ Hu Yanli^{1*}

1 College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, Taian, 271018; 2 Shijiazhuang Polytechnic College, Shijiazhuang, 050200

* Corresponding author, ylhu8612@sohu.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0026

Abstract In order to explore the suitable polyploid induction technology system of apple continuous cropping rootstock, the tissue culture seedlings of 12-2, which was selected as the main test material, were induced by colchicine immersion and mixed culture, different media and different culture materials. The mutation rate and survival rate of different combinations were compared and analyzed by flow cytometry. The method was used for identification. The results showed that: In the process of colchicine soaking treatment of stem segments, the highest survival rate was 74.3% when the concentration of colchicine was 30 mg/L for 24 h, but no mutant material was

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 5 月 21 日; 接受日期: 2021 年 5 月 21 日; 发表日期: 2021 年 5 月 28 日

引用格式: 宿夏菲, 柴姗姗, 毛云飞, 张璐璐, 尹伊君, 刘业萍, 庞会灵, 胡艳丽, 2021, 苹果耐重茬砧木优系多倍体诱导及鉴定, 分子植物育种(网络版) 19(26): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0026) (Su X.F., Chai S.S., Mao Y.F., Zhang L.L., Yin Y.J., Liu Y.P., Pang H.L., and Hu Y.L., 2021, Polyploid Induction and Identification of Apple Rootstocks with Tolerance to Continuous Cropping, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online))*, 19(26): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0026))

obtained, one mutant material was obtained when the concentration of colchicine was 50 mg/L for 48 h, and the mutation rate was 2.9%; In the process of colchicine soaking treatment of stem segments, it was found that two polyploid materials were obtained when the concentration of colchicine was 50 mg/L, one was homozygous tetraploid, one was chimeric, and the induction rate was 1% The results showed that the highest number of adventitious buds and the highest regeneration rate of adventitious buds was 68.6% in 30 g/L sucrose treatment, which was also significantly higher than that in other carbon sources such as sorbitol and glucose treatment, and two mutants were obtained; The regeneration rate of adventitious buds in MS medium was 68.6% and two mutants were 2.9%, which was the best in different medium treatments; Mutant strains were obtained from IAA, NAA and IBA, one mutant strain was obtained from IAA and NAA treatment respectively, and two strains were obtained from IBA treatment; N1 was the most prominent among the four culture materials (12-2, 31, N1, N2), and two mutant strains were obtained. Finally, a total of 17 mutant materials were obtained, one of which was homozygous tetraploid, and the others were chimeric. This study provided theoretical support for the polyploid induction technology system of apple rootstocks with continuous cropping tolerance.

Keywords Apple Rootstock; Polyploidy induction; Colchicine; Tissue culture

苹果(*Malus domestica*)是蔷薇科(Rosaceae)苹果属(*Malus*)落叶乔木果树,其果实具有耐储藏、营养价值高、风味佳和生态适应性强等特点,深受人们的喜爱,为世界四大水果之一,位居中国水果产量之首,面积、产量均占世界总量的50%以上,年产值达2 000余亿元(胡学飞等, 2018),在发展农业、农村经济、出口创汇,农民致富增收等方面均发挥着积极的作用(庞桂娟, 2018)。但随着苹果产业的快速发展,苹果的重茬障碍也成为一个世界性的难题。

根据研究表明,中国每年约有 $2\sim 3.3\times 10^4$ hm²的苹果园面临更新再植,极大地损耗了人力、物力以及财力,苹果抗重茬成为果园更新换代的主要阻碍原因之一(毛云飞等, 2017)。有研究认为,出现重茬障碍的原因主要有土壤结构和土壤生物群落的变化、土壤养分失衡、土壤积毒等(Yu et al., 2000; 陈小翠等, 2018)。在国内外报道中治理苹果重茬障碍问题主要通过栽培管理(王建斌等, 2014; 王金政等, 2017)、土壤改良(Wilson et al., 2004)、抗性砧木的选育(王志强等, 2016)等方式。

在中国将海棠(*Malus* spp.)作为苹果砧木的研究报道有很多(宗鹏鹏等, 2013),如,八棱海棠、平顶海棠、西府海棠等都广泛作为苹果砧木进行应用,但大部分都致力于耐盐碱、抗病以及其他生理胁迫的研究(张志晓等, 2017),对于耐重茬方面尚未见报道。多倍体材料往往具有更高抗性,通过多倍体诱导的方法对耐重茬砧木进行组织培养,将染色体加倍突变,使得种质资源更为丰富,同时也填补了耐重茬砧木育种的研究空白。多倍体诱导在蔬菜、花卉以及果树等各植物均取得了不错的成效。Sinski等(2014)在葡

萄的研究中也得到了验证。因此,研究苹果耐重茬砧木优系多倍体诱导,为苹果耐重茬砧木的筛选及种质创建提供了理论支撑与技术支持。

1 结果与分析

1.1 秋水仙碱浸渍法诱导多倍体

茎段再生存活数及存活率随着秋水仙碱的浓度升高而降低,当秋水仙碱浓度为30 mg/L,处理时间为24 h时,虽存活数及存活率低于对照但存活率在三个处理浓度中最高为74.3%。浓度为50 mg/L,处理时间为48 h时,存活率高于同时间段的其他两个浓度处理,为54.3%,存活数达19个(表1)。

在对茎尖的处理中,后代存活率与秋水仙碱浓度增加及处理时间的延长成反比。其中,当秋水仙碱浓度在30 mg/L和50 mg/L处理时间为24 h的处理,后代存活率分别为62.9%和60%,处理间没有显著差异。处理时间为48 h时,后代存活率差异较为明显处理浓度30 mg/L>50 mg/L>70 mg/L为40%、34.3%和28.6%。但在秋水仙碱浓度为70 mg/L处理时间为72 h的处理中后代存活数为0,抑制茎尖再生,不利于植株生长。

对比可知,材料部位之间处理存在着明显的差异,茎段各个浓度与时间段处理的存活率均高于茎尖处理,因此,以下试验均选以生长状况一致的带腋芽茎段。

1.2 秋水仙碱混培法诱导多倍体

利用秋水仙碱混培法处理茎断对多倍体诱导效

表 1 茎段, 茎尖在秋水仙碱浸渍法下的成活情况

Table 1 Survival of stem segment and shoot tip in colchicine impregnation

材料	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理时间(h)	处理数(per)	存活数(per)	存活率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
Material science	Colchicine concentration (mg/L)	Processing time (h)	Processing number (per)	Survival numbe (per)	Survival rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
茎段 Stem break	0	0	35	33	94.2	0	0
		24	35	26	74.3	0	0
		48	35	18	51.4	0	0
	30	72	35	3	8.6	0	0
		24	35	25	71.4	0	0
		48	35	19	54.3	1	2.9
	50	72	35	0	0	0	0
		24	35	20	57.1	0	0
		48	35	15	42.9	0	0
	70	72	35	0	0	0	0
		24	35	20	57.1	0	0
		48	35	15	42.9	0	0
茎尖 Shoot tip	0	0	35	32	91.4	0	0
		24	35	22	62.9	0	0
		48	35	14	40	0	0
	30	72	35	5	14.3	0	0
		24	35	21	60	0	0
		48	35	12	34.3	0	0
	50	72	35	2	5.7	0	0
		24	35	21	60	0	0
		48	35	12	34.3	0	0
	70	72	35	2	5.7	0	0
		24	35	18	51.4	0	0
		48	35	10	28.6	0	0
		72	35	0	0	0	0

果显著(表 2), 其中浓度为 30 mg/L 的秋水仙碱诱导的不定芽数与再生率虽小于对照处理, 但显著高于 50 mg/L、70 mg/L 的处理, 不定芽数均值最高可达 21 株, 再生率为 60%。虽然不定芽数与再生率随着秋水仙碱的浓度升高而降低, 但在 50 mg/L、70 mg/L 的处理中均获得变异株, 诱变率分别为 5.7% 和 2.9%。通过秋水仙碱浸渍法和混培法两种处理茎段方式的比较可知, 浓度为 50 mg/L 的混培处理诱导效果较好, 以下试验处理均为 50 mg/L 的混培法处理。

1.3 不同配置培养基的混培法诱导多倍体

1.3.1 不同碳源对多倍体诱导的影响

当碳源为蔗糖处理时, 蔗糖浓度为 30 g/L 的处理中获得变异株 2 株, 诱变率为 5.7% 且不定芽数与再生率均高于蔗糖浓度为 20 g/L 和 40 g/L 的处理, 20 g/L 的处理与 30 g/L 和 40 g/L 的处理存在显著差异, 在三个浓度处理中效果最差。在碳源为山梨醇的处理中, 当质量浓度为 30 g/L 时, 产生的不定芽数与再生率在三个浓度中最高, 不定芽数达 17 株, 再生率为 48.57%, 并获得 1 株变异株, 诱变率为 2.9%。而葡萄糖处理中, 三个浓度处理的差异并不明显(表 3)。

在同一浓度不同碳源的比较中, 蔗糖各个浓度处理的不定芽数与再生率均高于其余两种碳源。在质量浓度为 30 g/L 的处理中, 蔗糖的处理效果最佳, 产生的不定芽数最多达 24 株, 再生率为 68.57%, 对茎段的再生起着促进作用。

1.3.2 不同生长激素对多倍体诱导的影响

三种生长素处理对于茎段再生植株多倍体诱导效果差异并不显著(表 4)。其中生长素为 IBA 处理的培养基产生的不定芽数在三种激素处理中最多, 后代再生率达 67.62%, 并获得 2 株变异株, 诱变率达 5.7%。IAA 和 NBA 处理分别各自获得变异株 1 株, 诱变率均为 2.9%。由此可知, 生长素为 IBA 处理的培养基对茎段诱导效果最佳, 对植株的再生起到促进作用。

1.3.3 不同培养基对多倍体诱导的影响

三种不同培养基的处理中, 产生的不定芽数和再生率差异极为显著(表 5)。其中三种处理的不定芽数和再生率的大小依次为 MS>WPM>B5。MS 培养基对茎段的增殖起着促进作用不定芽再生率达 68.6%, 并获得 1 株变异株, 诱变率为 2.9%。而 B5 培养基产生的不定芽数在三种处理中最低, 不利于本

表 2 秋水仙碱混培法对茎段再生植株多倍体诱导的影响

Table 2 Effect of colchicine mixed culture on polyploid induction of stem regeneration plants

培养方法	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理数(per)	不定芽数(per)	不定芽再生率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
Cultivation method	Colchicine concentration (mg/L)	Processing number (per)	Number of proliferating buds (per)	Multiplication rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
混培法	0	35	22±0.58 ^a	62.86±0.02 ^a	0	0
Mixed culture method	30	35	21±0.58 ^a	60.00±0.02 ^{ab}	0	0
	50	35	18±0.33 ^b	52.38±0.01 ^{ab}	2	5.7
	70	35	17±0.67 ^b	47.62±0.02 ^b	1	2.9

注: 同列小写字母间表示差异显著性($P \leq 0.05$)

Note: Significant difference between lower-case letters in the same column ($P \leq 0.05$)

表 3 不同碳源对茎段再生植株多倍体诱导的影响

Table 3 Effects of different carbon sources on polyploid induction of stem regeneration plants

碳源	质量浓度(g/L)	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理数(per)	不定芽数(per)	不定芽再生率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
carbon source	Mass concentration (g/L)	Colchicine concentration (mg/L)	Processing number (per)	Number of proliferating buds (per)	Multiplication rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
蔗糖	20	50	35	15±3.06 ^{bc}	42.86±0.09 ^{bc}	0	0
sucrose	30		35	24±1.15 ^a	68.57±0.03 ^a	2	5.7
	40		35	22±1.15 ^a	62.86±0.03 ^a	0	0
山梨醇	20	50	35	12±1.67 ^{bc}	35.24±0.02 ^{bc}	0	0
Sorbitol	30		35	17±1.01 ^b	48.57±0.03 ^b	1	2.9
	40		35	14±1.88 ^{bc}	40.95±0.03 ^{bc}	0	0
葡萄糖	20	50	35	10±2.08 ^c	28.57±0.06 ^c	0	0
Glucose	30		35	13±2.08 ^{bc}	37.14±0.06 ^{bc}	0	0
	40		35	12±1.53 ^{bc}	34.29±0.04 ^{bc}	0	0

注: 同列小写字母间表示差异显著性($P \leq 0.05$)

Note: Significant difference between lower-case letters in the same column ($P \leq 0.05$)

表 4 不同生长素对茎段再生植株多倍体诱导的影响

Table 4 Effects of different auxin on polyploid induction of stem regeneration plants

细胞分裂素	生长素(mg/L)	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理数(per)	不定芽数(per)	不定芽再生率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
(mg/L)	Auxin (mg/L)	Colchicine concentration (mg/L)	Processing number (per)	Number of proliferating buds (per)	Multiplication rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
0.2 6-BA	IAA 0.3	50	35	22±1.76 ^{ab}	64.76±0.05 ^{ab}	1	2.9
	IBA 0.3	50	35	23±1.20 ^a	67.62±0.03 ^a	2	5.7
	NAA 0.3	50	35	18±1.15 ^b	53.33±0.02 ^b	1	2.9

注: 同列小写字母间表示差异显著性($P \leq 0.05$)

Note: Significant difference between lower-case letters in the same column ($P \leq 0.05$)

材料增殖培养。

1.4 不同材料对多倍体诱导的影响

本研究比较了四种材料茎段进行秋水仙碱混培法诱导效果,发现茎段增殖数没有明显差异(表 6)。其中,12-2 和 31 的不定芽再生率趋于一致为 65.7%,变异株均为 1 株,诱变率为 2.9%。N2 的不定

芽再生率在四种材料中最高为 72.38%,并获得 1 株变异株,诱变率为 2.9%。N1 的茎断增殖数与再生率虽不及 N2,但诱变率达 5.8%并获得 2 株变异株。综合来看诱导材料 N1 的诱导效果最好。

1.5 流式细胞仪的鉴定

通过流式细胞仪的鉴定,分别出现四种峰值

表 5 不同培养基对茎段再生植株多倍体诱导的影响

Table 5 Effects of different media on polyploid induction of stem regeneration plants

培养基	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理数(per)	不定芽数(per)	不定芽再生率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
Culture medium	Colchicine concentration (mg/L)	Processing number (per)	Number of proliferating buds (per)	Multiplication rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
MS	50	35	24±0.58 ^a	68.57±0.02 ^a	1	2.9
WPM	50	35	10±1.15 ^b	28.57±0.03 ^b	0	0
B5	50	35	1±0.58 ^c	2.86±0.02 ^c	0	0

注: 同列小写字母间表示差异显著性($P \leq 0.05$)

Note: Significant difference between lower-case letters in the same column ($P \leq 0.05$)

表 6 不同材料对多倍体诱导的影响

Table 6 Effects of different materials on polyploid induction of stem regeneration plants

材料	秋水仙碱浓度(mg/L)	处理数(per)	不定芽数(per)	不定芽再生率(%)	变异数(per)	诱变率(%)
Material science	Colchicine concentration (mg/L)	Processing number (per)	Number of proliferating buds (per)	Multiplication rate (%)	Variation quantity (per)	Mutagenic rate (%)
12—2	0	35	23±1.88 ^a	67.62±0.03 ^a	1	2.9
31	30	35	23±1.53 ^a	65.71±0.04 ^a	1	2.9
N1	50	35	24±2.31 ^a	68.57±0.07 ^a	2	5.8
N2	70	35	25±1.33 ^a	72.38±0.01 ^a	1	2.9

注: 同列小写字母间表示差异显著性($P \leq 0.05$)

Note: Significant difference between lower-case letters in the same column ($P \leq 0.05$)

(图 1)。通过峰值所在位置可判断植株的倍性。

2 讨论

在高等植物细胞内植物多倍体是染色体进化的一种较为显著的特征, 在多倍体植物的细胞内一般存在 3 个或 3 个以上的染色体组(黄群策和孙敬三, 1997)。在首次提出高等植物多倍体概念的同时, 前人也证实了人工诱导植物多倍体存在的可能性(遗愚, 贵州人民出版社, 1984, 12)。目前生产上应用的苹果砧木二倍体和三倍体居多, 多倍体作为砧木可以提高植株抗逆性(马荣群等, 2020), 而抗重砧木多倍体的培育尚未见报道, 因此耐重砧木的筛选存在积极意义。在多倍体的诱导过程中选择合适的方法和剂量是成功的前提。在人工诱导植物多倍体时, 秋水仙碱是常用诱导药剂, 在细胞有丝分裂期间对纺锤丝的形成起到抑制作用从而达到染色体数目加倍的目的 (Dhooge et al., 2011)。近年来, 在苹果 (*Malus domestica*)、萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 和文心兰 (*Oncidium hybridum*) 等果树、蔬菜及花卉上(马荣群等, 2020; 吴照云, 2017; 崔广荣, 2010) 广泛使用秋水仙碱与组织培养技术相结合的诱导方法诱导多倍体的产生。但在研究过程中发现, 不同的诱导材料、

秋水仙碱的浓度、处理时间以及方法等因素均会影响多倍体诱导的成功率。

秋水仙碱浸渍法成功在火龙果(程志号, 2020)多倍体诱导得到应用, 李晓艳等(2010)研究发现, 用浓度为 0.1%秋水仙碱溶液浸渍越橘‘达柔’试管苗茎段, 24 h 处理的诱变效果最好, 存活率 28.90%, 变异率 22.6%。何建等(2008)研究发现, 将长穗桑无菌试管苗茎尖在浓度为 0.2%的秋水仙碱中浸泡茎段 72 h 诱导率最高为 16.70%。本试验研究秋水仙碱浸渍法对茎尖和茎段存活率的影响中发现, 随着秋水仙碱浓度增加和浸泡处理时间的延长, 其存活率在逐渐降低, 30 mg/L 秋水仙碱处理茎尖、茎段 24 h 时, 存活率均为最高分别为 62.9%、74.3%。但 50 mg/L 秋水仙碱处理茎段 48 h 时获得 1 株变异株, 变异率为 2.9%。当秋水仙碱浓度为 70 mg/L 浸泡时间达到 72 h 时, 致死率达到 100, 存活率为 0, 可能浓度过高时间过长造成植株无法正常生长发育。本研究的研究结果与前人的研究结果有所不同, 至于茎尖和茎断存活的差异性, 后期值得讨论。

魏卓等(2020)在黄心猕猴桃的研究中发现浓度为 0.15%的秋水仙碱混培法处理 180 h, 诱导率最高为 20.00%。邱芬等(2017) 100 mg/L 秋水仙碱混培法

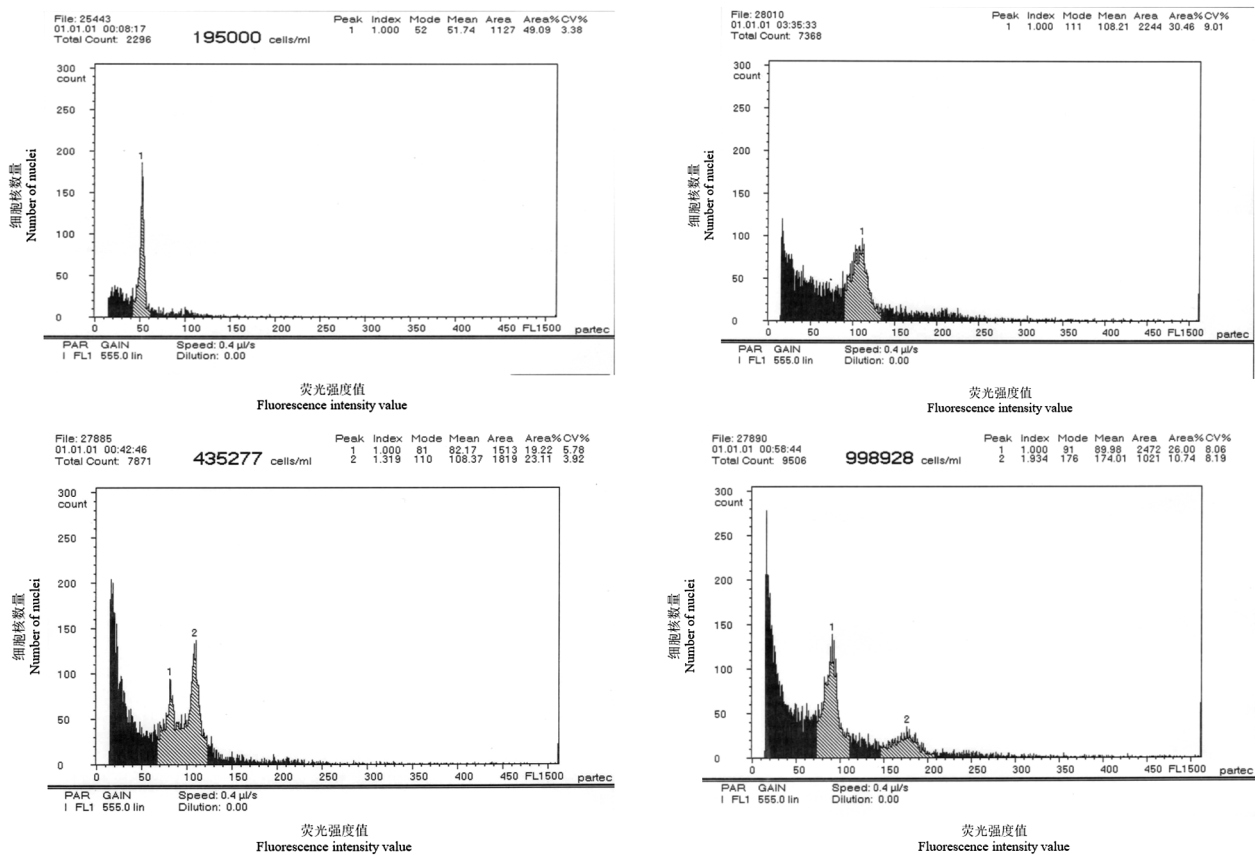


图1 流式细胞仪峰值图

注: A: 二倍体; B: 四倍体; C: 嵌合体; D: 混倍体

Figure 1 Peak value of flow cytometry

Note: A: Diploid; B: Tetraploid; C: Chimera; D: Octoploid

处理无籽刺梨, 变异率为 7.8%。武江等(2018)认为秋水仙碱浓度在 0.02%混培法处理愈伤组织 15 h 诱导率最高, 为 41.67%。本试验在研究秋水仙碱混培法处理茎段的结果表明, 随着秋水仙碱的浓度升高不定芽再生率也随之降低。但 50 mg/L 的处理获得 2 株多倍体材料, 其中 1 株为嵌合体材料, 1 株为纯合四倍体, 诱变率为 5.7%, 与前人得出的试验结果相似。

在组织培养的过程中, 碳源的种类(杨宇晨, 2013)、生长调节剂种类(于亚军, 2002)、培养基的类型以及培养材料的不同均不同程度的影响茎段的生成与分化。本试验在研究蔗糖、山梨醇和葡萄糖三种碳源对植株再生诱导的影响中发现, 蔗糖浓度为 30 g/L 的处理, 诱变率最高, 获得 2 株嵌合体材料。相同浓度的山梨醇处理获得 1 株嵌合体, 而葡萄糖处理中不定芽再生率较低, 为获得变异材料, 抑制茎段增殖生长, 综合来看, 蔗糖效果最为突出。

有研究表明, 培养基作为组培苗生长和发育的基床, 其在诱导阶段对组培苗的影响至关重要, 因为其成分包括了植物组织生命过程中对各种营养元素

的需求(林兵, 2018)。在朱宏(2014)的研究结果中发现, 五种基本培养基(MS, B5, N6, Miller 和 White)比较中, MS 培养基最适合无菌芽增殖。陈峰等(2013)研究 N6、B5、WPM、MS、1/2MS 培养基对臭椿茎段再生诱导影响中发现, 培养结果存在着显著差异, 其中 N6 的诱导效果最佳。本试验利用 MS、WPM 和 B5 三种培养基对茎段进行诱导过程发现, MS 培养基的诱导率高于其他两种, 最适合本材料的茎段再生培养, 并获得 1 株变异材料。由此可知, 培养基的选择可能与培养材料有关。

本试验生长素处理, 添加 IBA 的培养基, 不定芽再生率达 67.62%, 获得 2 株嵌合体材料, 而 NAA 和 2,4D 处理稍逊于 IBA, 均获得 1 株嵌合体材料。但与王军辉等(2011)的研究结果不同, 研究表明 IAA 对楸树不定芽诱导的效果最为理想。

龙雪雁(2019)在对毛酸浆的研究中发现‘铁把青’品种的诱导结果要优于‘大黄菇娘果’和‘粒粒甜小菇娘’品种。同样, 本试验的不同材料中, N1、N2 的茎段不定芽再生率要高于 12-2 和 31 的茎段不定芽

再生率,其中 N1 的诱导率达 5%。说明不同材料诱导效果不同,多倍体材料抗性有待进一步研究。

3 材料与方 法

3.1 试验材料

供试材料于 2012 年春,在烟台莱州市大沙岭村 20 年重茬果园中采用原位抗性育种法,筛选出海棠杂交株系(郭小静, 2015)。本试验将 12-2 作为前期主要筛选材料,通过秋水仙碱、培养基和激素种类等方法分析各处理的植株后代增殖状况和诱导率。

3.2 试验设计

3.2.1 秋水仙碱浸渍法对组培苗茎段多倍体诱导

以 12-2 为材料,在无菌条件下将组培苗切成小于 2 cm 的茎段(茎段至少保留一个叶腋),并置于组培室温度为 25 ± 2 °C,浓度分别为 30、50、70 mg/L 的秋水仙碱+MS+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 的培养基中培养 24、48、72 h,对照组为未经处理的组培苗。将处理过后的组培材料用双蒸馏水冲洗 3~5 次,无菌纸吸干茎段上的水分后转接到分化培养基中继续培养,每瓶 5 株,30 d 后调查统计各处理植株的成活率,成活的植株继续转接到分化培养基中进行继代培养进行大量繁殖,3 个月对植株进行倍性测定。

3.2.2 以秋水仙碱混培法诱导组培苗茎段多倍体

以 12-2 为供试材料,在无菌条件下将组培苗切成小于 2 cm 的茎段(茎段至少保留一个叶腋),在分化培养基中预培养 5 d 后,置于组培温度以及浓度和成分与浸渍法相同条件培养基中进行培养直至新的腋芽长出,后接入分化培养基中继续培养。每瓶 5 株,30 d 后统计各处理植株的成活率,3 个月对植株进行倍性测定。

3.2.3 不同配置培养基对组培苗茎段多倍体的诱导

以 12-2 为供试材料,用 50mg/L 秋水仙碱混培法,改变 秋水仙碱+MS+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 中碳源(蔗糖,山梨醇和葡萄糖)、生长素种类(IAA, IBA 和 NAA)以及培养基种类(MS, WPM 和 B5)任意一个变量,控制好其他变量。每瓶 5 株,30d 后调查统计各处理植株的成活率,成活的植株继续转接到分化培养基中进行继代培养大量繁殖,3 个月对植株进行倍性测定。

处理组合如下:

秋水仙碱+MS+30 g/L (蔗糖,山梨醇,葡萄糖)+6.5 g/L 琼脂+ 0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA

秋水仙碱+MS+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L (IAA, IBA, NAA)

秋水仙碱+(MS, WPM, B5)+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA

3.2.4 不同组培材料对多倍体诱导影响

将供试材料为 12-2、31、N1、N2 四种生长状况一致的茎段,用 50 mg/L 秋水仙碱混培法,接种于秋水仙碱+MS+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂+0.2 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 的培养基中,组培条件不变。每瓶接种 5 株,30 d 后调查统计各组培材料的存活数及存活率,对成活的植株进行继代培养(至少 2 次),3 个月对植株进行倍性统计。

3.3 试验方法

3.3.1 流式细胞仪鉴定再生植株倍性

利用 FACS Via- 流式细胞仪(赛默医疗,上海,中国),以已知二倍体材料为对照,将待测植株幼嫩叶片组织切取 1 cm² 放入培养皿中,加入 200 μL 的细胞裂解液并用刀片迅速将叶片切碎,加入 800 μL 的 DNA 染色液,将培养皿中的液体用 30 μm 的滤网过滤至样品管 2/3 处,将样品管插入分析仪中进行测定,样品倍性根据分析所得的 DNA 含量峰值图来判断。用已知的二倍体材料作为对照调整放大倍数,使二倍体的 DNA 峰值的荧光强度处于 50 附近,则认定所测样品为二倍体,荧光强度处于 100 附近的为四倍体,以此类推。荧光强度处于 50~100 之间的为嵌合体。由此,根据细胞 DNA 含量峰值图所处的荧光强度可以确定出细胞倍性。

3.3.2 统计方法

存活率(%)=(存活株数/接种总株数)×100%

不定芽再生率 (%)=(产生不定芽株数/接种总株数)×100%

诱变率(%)=(变异株数/接种总株数)×100%

3.4 数据分析

利用 Microsoft Excel 2007 进行数据整理。采用 IBM SPSS statistics 19 数据分析软件对所测数据进行统计分析。

作者贡献

宿夏菲和柴姗姗是本研究的实验设计者和实验研究的执行人;宿夏菲、柴姗姗和毛云飞完成数据分析以及论文初稿的写作;张璐璐、尹伊君、刘业萍和庞会灵参与实验设计和试验结果分析;胡艳丽指导

实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(32072520)、山东省重点研发计划(2018GNC113019)、山东省良种产业化项目(2019LZGC007)、山东省自然科学基金(ZR2020-MC132)和山东省水果创新团队项目(SDAIT-06-07)共同资助。

参考文献

- Chen F., Wang G.B., You Q.F., Zhang X., and Huang G.Y., 2013, Effects of medium and regulator on axillary bud induction of *Ailanthus altissima* stem segment, *Linye Keji Kaifa* (Development of forestry science and technology), 27 (2): 54-58. (陈峰, 汪贵斌, 游庆方, 章霞, 黄广远, 2013, 培养基和调节剂对臭椿茎段腋芽诱导的影响, 林业科技开发, 27(2): 54-58.)
- Chen X.C., Zhang X.W., Tan C., Tang X.Q., Zhong Y.X., Qiu H.R., Liu Y.L., and Luo X.R., 2018, Research progress on the cause of continuous cropping obstacle and green control of pepper, *Gengzuo Yu Zaipei* (Tillage and Cultivation), (6): 63-66+62. (陈小翠, 张小微, 覃成, 唐相群, 钟永先, 邱化荣, 刘远伦, 罗希榕, 2018, 辣椒连作障碍发生原因与绿色防控研究进展, 耕作与栽培, (6): 63-66+62.)
- Cheng Z.H., Sun C.J., Sun P.G., Guo S.X., and Wu Q., 2020, Optimization of polyploid induction system of Pitaya, *Guoshu Xuebao* (Journal of fruit trees), 37(7): 1089-1097. (程志号, 孙长君, 孙佩光, 郭素霞, 吴琼, 2020, 火龙果多倍体诱导体系的优化, 果树学报, 37(7): 1089-1097.)
- Cui G.R., Zhang Z.X., Zhang C.Y., Hu N.B., Sui Y.H., and Li J.Q., 2010, Polyploid induction and identification of *Oncidium*, *Caoye Xuebao* (Journal of prataculture), 19(1): 184-190. (崔广荣, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 隋益虎, 李杰勤, 2010, 文心兰多倍体诱导及其鉴定, 草业学报, 19(1): 184-190.)
- Dhooge E., Van L.K., Eeckhaut T., Leus L., and Van H.J., 2011, Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(3): 359-373.
- Guo X.J., 2015, Study on the effect of three techniques to overcome the obstacles of Apple continuous cropping, Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Shen X., pp.9. (郭小静, 2015, 三种克服苹果连作障碍技术效果研究, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 沈向, pp.9.)
- He J., Feng Y., Wang J.H., Chen K.L., and Liang G.L., 2008, Tissue culture and tetraploid germplasm induction of *Morus alba*, *Xinan Nongye Xuebao* (Journal of southwest agriculture), (1): 142-146. (何建, 冯焱, 王建辉, 陈克玲, 梁国鲁, 2008, 长穗桑组织培养和四倍体新种质诱导, 西南农业学报, (1): 142-146.)
- Hu X.F., Zhang M.X., Chi F., and Wang F.Q., 2018, Cultivation and management techniques of apple trees, *Nongye Yu Jishu* (Agriculture and technology), 38(22): 209. (胡学飞, 张梦醒, 迟菲, 王富芹, 2018, 苹果树的栽培技术及管理技术, 农业与技术, 38(22): 209.)
- Huang Q.C., and Sun J.S., 1997, Prospect of plant polyploidy in crop breeding, *Keji Daobao* (Science and technology guide), (7):53-55+50. (黄群策, 孙敬三, 1997, 植物多倍性在作物育种中的展望, 科技导报, (7):53-55+50.)
- Li X.Y., Zhang Z.D., Li Y.D., Wu L., and Liu H.G., 2010, Study on colchicine induced in vitro culture of blueberry polyploid, *Dongbei Nongye Daxue Xuebao* (Journal of North-east Agricultural University), 41 (1): 38-42. (李晓艳, 张志东, 李亚东, 吴林, 刘海广, 2010, 秋水仙素诱导离体培养越橘多倍体研究, 东北农业大学学报, 41(1): 38-42.)
- Lin B., Chen Y.Q., Fan R.H., Wu J.S., and Ye X.X., 2018, Selection of medium for *Anoectochilus roxburghii* in vitro, *Fujian Nongye Xuebao* (Journal of Fujian Agriculture), 33 (12): 1275-1279. (林兵, 陈艺荃, 樊荣辉, 吴建设, 叶秀仙, 2018, 花叶金线莲试管花卉培养基配方筛选, 福建农业学报, 33 (12): 1275-1279.)
- Long X.Y., 2019, Polyploid induction and identification of *Physalis pubescens*, Thesis for M.S., Yunnan University, Supervisor: Wang X.Z., and Wu Q., pp. 21-32. (龙雪雁, 2019, 毛酸浆多倍体诱导及鉴定, 硕士学位论文, 云南大学, 导师: 王贤智, 吴琼, pp.21-32.)
- Ma R.Q., Zhang R.F., Song Z.X., Wan S.W., Sha G.L., and Ge H.J., 2020, Study on polyploid induction of red flesh apple 'hongcuijian', *Guoshu Xuebao* (Journal of fruit trees), 37 (10): 1499-1505. (马荣群, 张蕊芬, 宋正旭, 万述伟, 沙广利, 葛红娟, 2020, 红果肉苹果‘红脆甜’多倍体诱导研究, 果树学报, 37(10): 1499-1505.)
- Mao Y.F., Guo X.J., Wang Z.H., Gao F.F., Zhang J.T., Yang H.F., Chen X.S., Mao Z.Q., and Shen X., 2017, Effects of maltose and other sugars on continuous cropping soil improvement and Apple Rootstock growth, *Shuitu Bachi Xuebao* (Journal of soil and water conservation), 31(5): 298-304. (毛云飞, 郭小静, 王增辉, 高付凤, 张佳腾, 杨恒峰, 陈学森, 毛志泉, 沈向, 2017, 麦芽糖等糖类对重茬土壤改良和苹果砧木生长的影响, 水土保持学报, 31(5): 298-304.)
- Pang G.J., Zhang F.H., and Song X.L., 2018, Transformation and upgrading path and countermeasures of apple industry in China, *Hezuo Jingji Yu Keji* (Cooperative economy and science and technology), (23): 22-25. (庞桂娟, 张复宏, 宋晓丽, 2018, 我国苹果产业转型升级路径与对策, 合作经济与科技, (23): 22-25)
- Qiu F., Lin Y., Xin P.Y., Li B., Xin Y.L., and Tang J.R., 2017,

- Polyploid induction and identification of *Rosa roxburghii* Tratt, *Zhongguo Nanfang Guoshu* (Fruit trees in South China), 46(4): 121-124+128. (邱芬, 林源, 辛培尧, 李斌, 辛亚龙, 唐军荣, 2017, 无籽刺梨多倍体诱导及鉴定, 中国南方果树, 46(4): 121-124+128.)
- Sinski I., Bosco D.D., Pierozzi N.I., Maia J.D.G., and Ritschel P. S., 2014, Improving in vitro induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars, *Euphytica*, 196 (2): 299-311.
- Wang J.B., Meng Y.P., and Cao Q.F., 2014, Cultivation experiment of early fruit, high yield and good quality in apple orchard with continuous cropping, *Zhongguo Guoshu* (China Fruits), (5): 17-19. (王建斌, 孟玉萍, 曹秋芬, 2014, 重茬苹果园早果丰产优质栽培试验, 中国果树, (5): 17-19.)
- Wang J.H., Wu L.H., and Lin J., 2011, Effects of auxin on adventitious bud induction and proliferation of *Catalpa bungei*, *Linye Keji*(Forestry science and technology), 36(1): 1-4. (王军辉, 吴丽华, 林娟, 2011, 生长素对楸树不定芽的诱导和增殖培养影响的研究, 林业科技, 36(1): 1-4.)
- Wang J.Z., 2017, Cultivation history, production status and development trend of apple in Shandong province, *Luoye Guoshu* (Deciduous fruit tree), 49(2): 1-3. (王金政, 2017, 山东省苹果的栽培历史, 生产现状及发展趋势, 落叶果树, 49(2): 1-3.)
- Wang Z.Q., Niu L., Lu Z.H., Cui G.C., Zeng W.F., Pan L., and Zong X.P., 2016, Breeding of a new peach rootstock variety 'zhongtaozhen 1' with resistance to continuous cropping, *Guoshu Xuebao* (Journal of fruit trees), 33(4): 504-508. (王志强, 牛良, 鲁振华, 崔国朝, 曾文芳, 潘磊, 宗学普, 2016, 抗重茬桃砧木新品种‘中桃砧1号’的选育, 果树学报, 33(4): 504-508.)
- Wei Z., Zhang X.A., Zhang Y., Liu X.Z., Ye Q.X., Li Y.P., Zhang H.Y., 2020, Polyploid induction and identification of *Actinidia chinensis*, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular plant breeding), 18 (12): 4036-4040. (魏卓, 张先昂, 张越, 刘小珍, 叶琴霞, 李贻沛, 张汉尧, 2020, 黄心中华猕猴桃多倍体诱导及鉴定, 分子植物育种, 18(12): 4036-4040.)
- Wilson S., Andrews P., and Nair T.S., 2004, Non-fumigant management of apple replant disease, *Scientia Horticulturae*, 102 (2): 221-231.
- Wu j., Li L., Cao D.M., Zuo L.X., and Wang Y.S., 2018, Polyploid induction and identification of *Hemerocallis fulva*, *Shanxi Nongye Kexue* (Shanxi Agricultural Science), 46(5): 687-691+700. (武江, 李丽, 曹冬梅, 左力翔, 王云山, 2018, 萱草多倍体诱导及其鉴定, 山西农业科学, 46(5): 687-691+700.)
- Wu Z.Y., Chen F.B., Yao Q.L., Fang P., and Liu Y., 2017, Study on polyploid induction of fuling rouge radish, *Zhongzi* (seed), 36(3): 38-41. (吴照云, 陈发波, 姚启伦, 方平, 刘毅, 2017, 涪陵胭脂萝卜多倍体诱导研究, 种子, 36(3): 38-41.)
- Yang Y.C., Chen Z.Y., Jiang J.X., Liu Q.B., and Yi Z.L., 2013, Advances in polyploid induction techniques of *Miscanthus*, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese agronomy Bulletin), 29(12): 13-16. (杨宇晨, 陈智勇, 蒋建雄, 刘清波, 易自力, 2013, 芒属植物多倍体诱导技术的研究进展, 中国农学通报, 29(12): 13-16.)
- Yu J.Q., Shou S.Y., Qian Y.R., Zhu Z.J., and Hu W.H., 2000, Autotoxic potential of cucurbit crops, *Plant and Soil*, 223 (1-2): 149-153.
- Yu Y.J., Dai H.P., and Li B.J., 2002, Application of plant hormones and growth regulators in tissue culture of fruit trees, *Beifang Yuanyi* (Northern Horticulture), (6): 68-70. (于亚军, 代汉萍, 李宝江, 2002, 植物激素和生长调节剂在果树组织培养中的应用, 北方园艺, (6): 68-70.)
- Zhang Z.X., Zeng L.R., Zhao J.L., Guo B.X., Wang Y., Luo J.X., Zheng X., and Tian X., 2017, Response of growth and physiological characteristics of five apple rootstocks to salt stress, *Beifang Yuanyi* (Northern Horticulture), (3): 19-25. (张志晓, 曾丽蓉, 赵嘉菱, 郭冰鑫, 王燕, 骆建霞, 郑鑫, 田雪, 2017, 五种苹果砧木的生长及生理特性对盐胁迫的响应, 北方园艺, (3): 19-25.)
- Zhu h., 2014, In vitro culture and polyploid induction of mulberry, Thesis for M.S., Guangxi University, Supervisor: Wei P. X., pp. 38-39. (朱宏, 2014, 桑树离体培养与多倍体诱导研究, 硕士学位论文, 广西大学, 导师: 韦鹏霄, pp. 38-39.)
- Zong P.P., Qu Y.H., Chai P., Zhu L.X., and Jia K.G., 2013, Evaluation of salt and alkaline tolerance of *Malus Robusta*, *Zhongguo Daxue Xuebao* (Journal of China Agricultural University), 18(3): 96-100. (宗鹏鹏, 曲艳华, 柴朋, 朱立新, 贾克功, 八棱海棠耐盐碱性评价, 中国农业大学学报, 18(3): 96-100.)