

秋水仙素诱导樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ 获得六倍体再生植株

刘庆忠^{1, 2}, 马怀宇², 魏海蓉², 艾呈祥², 张力思², 赵彦³, 罗伯特·戴维斯³, 韩振海^{1*}

(¹中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094; ²山东省果树研究所, 山东省果树生物技术育种重点实验室, 山东泰安 271000; ³美国农业部植物分子病理学实验室, 美国 马里兰州 贝茨威尔 20705)

摘要: 以三倍体樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ (*Prunus cerasus* × *P. canescens*) 的离体叶片为外植体, 采用秋水仙素诱导处理再生出六倍体植株。将外植体首先在加有秋水仙素 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、生长素 (BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和细胞分裂素 (BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的改良 WPM 液体培养基中培养 5 d, 再转移到不含秋水仙素 (其它成分相同) 的固体培养基上继续培养 56 d, 再生出形态变异明显的新梢。采用流式细胞仪鉴定染色体倍性, 确定其为六倍体新梢。六倍体植株与三倍体的 ‘吉塞拉 6号’ 植株形态学上有明显差异。六倍体的试管苗已在大田移栽成活, 并已成功高接在甜樱桃大树上。

关键词: 樱桃; 矮化; 砧木; 秋水仙素; 多倍体; 六倍体; 再生植株

中图分类号: S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 02-0285-04

Regeneration of Hexaploid Plants of Cherry Dwarf Rootstock ‘Gisela 6’ from in Vitro Leaves Treated with Colchicine

LU Qing-zhong^{1, 2}, MA Huai-yu², WEI Hai-rong², AI Cheng-xiang², ZHANG Li-si², ZHAO Yan³, Robert E. Davis³, and HAN Zhen-hai^{1*}

(¹ Institute of Horticulture Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² Shandong Institute of Pomology, Key Laboratory for Fruit Biotechnology Breeding of Shandong, Tai'an, Shandong 271000, China; ³ USDA/ARS Molecular Plant Pathology Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA)

Abstract: An *in vitro* shoot regeneration technique combined with colchicine application has been employed to produce hexaploid plants from leaf segments of the triploid cherry rootstock ‘Gisela 6’ (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). Leaf segments were treated firstly with colchicine ($0 - 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) in the liquid modified WPM medium supplemented with auxin (BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and cytokinin (BA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for five days and then transferred on the same regeneration solid medium with no colchicine for 56 days. In this case, putative hexaploid shoots were only regenerated from the leaf explants in the treatment of $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ colchicine after 8 weeks on the regeneration medium. Flow cytometry was used for ploidy determination. The hexaploid plants were distinguishable from the triploid on morphological characters. All plants were successfully transplanted into field and topworked on the sweet cherry trees to evaluate its agronomic traits.

Key words: cherry; dwarf; rootstock; colchicine; polyploid; hexaploid; regeneration

吉塞拉 (Gisela) 是酸樱桃 (*Prunus cerasus*, $2n = 4x = 32$) 和灰毛叶樱桃 (*P. canescens*, $2n = 2x = 16$) 杂交育成的三倍体种质 ($2n = 3x = 24$) (Webster & Looney, 1996)。用 ‘吉塞拉 6号’

收稿日期: 2007 - 08 - 01; 修回日期: 2007 - 11 - 16

基金项目: 国家 ‘863’ 计划项目 (2006AA100108-4-12-9); 山东省农业良种工程项目 (2002-3013); 山东省农业科学院自主创新基金项目 (2006YCX016)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: rschan@cau.edu.cn)

(*Prunus cerasus* × *P. canescens*) 做砧木嫁接的甜樱桃, 其树体仅相当于 ‘马扎德’ 砧木的 70%, 而且结果早, 果实大, 丰产性强, 抗细菌性溃疡病 (*Pseudomonas syringae*)、洋李矮缩病毒病 (PDV) 和樱桃环斑坏死病毒病 (PNRSV), 抗寒性强, 固地性好, 对土壤适应范围广 (刘庆忠 等, 2001a)。由于其自身为三倍体种质, 高度不育, 采用常规杂交技术难以进一步改良。作者采用染色体组加倍技术创造 ‘吉塞拉 6号’ 的同源六倍体新种质, 以提高其可育性。

1 材料与方法

将 ‘吉塞拉 6号’ 的离体新梢保存在增殖培养基上, 每 4 周取 1 cm 新梢作为外植体, 将其接种在增殖培养基 (MS无机盐添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 肌醇、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸硫胺素、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄基嘌呤、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.6) 上进行扩繁。培养室温度 25°C , 光照强度 2000 lx , 光周期为 16 h 光照和 8 h 暗处理。

外植体在增殖培养基上生长 3~4 周后, 取 1~2 cm 新梢转移到 $1/2 \text{ MS}$ 添加 BA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生根培养基上进行生根培养。黑暗处理 10 d 后, 再转移到光下培养 4 周。

从诱导生根培养基上取生长 3 周的小植株顶部展叶 2~3 片, 去掉叶柄和叶尖端 $1/3$, 在中脉处横切两刀, 切口向上接种于附加不同浓度 ($0 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 秋水仙素的不定芽再生培养基中。再生培养基成分为改良的 WPM 液体培养基 (刘庆忠 等, 2001a)。

叶片外植体先在含秋水仙素的液体再生培养基中培养 5 d 后取出, 用无菌水冲洗两次, 然后转到不含秋水仙素 (其它成分相同) 的固体再生培养基上继续进行不定芽诱导。外植体接种后先黑暗处理 10 d, 然后在光下培养 (条件同上), 每 2 周更换 1 次培养基, 8 周后统计再生不定芽数和愈伤组织数, 计算再生率。

将再生的不定芽转移到新梢增殖培养基上进行继代培养。在此期间根据目测将有形态变异的新梢单独取出进行增殖。如此反复筛选增殖 1 年后, 选取新梢顶端叶片外植体进行不定芽诱导再生, 以求所获得的变异体达到最大程度的纯合。

取 10 mg 离体新梢叶片加 0.5 mL 的 Partec HR-A 溶液 (分离细胞核的柠檬酸缓冲液) 研磨。将样品通过 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Partec Celltrics TM 微孔膜过滤到测试管中, 加 0.5 mL Partec HR-B 溶液 (DA-P 溶液) 于样品中, 将样品上样于 Partec 倍体分析仪 (德国, Münster), 测定样品单个细胞核的 DNA 总量。测定结果由仪器直接绘出 DNA 曲线图 (刘庆忠 等, 2001b, Meng & Chad, 2002)。

将经倍体分析仪测定为六倍体的材料置于新梢增殖培养基上进行扩大繁殖, 在 $1/2 \text{ MS}$ 附加 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的培养基上生根, 于温室条件下炼苗 4 周, 最后移栽于大田。

2 结果与分析

2.1 六倍体材料的获得

从表 1 可看出, ‘吉塞拉 6号’ 试管苗的离体叶片外植体置于附加不同浓度秋水仙素的培养基上, 均能诱导出愈伤组织。随着秋水仙素浓度的提高, 愈伤组织和不定芽的再生率降低, 当浓度分别为 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 再生率分别为 65% 和 40%。仅在附加秋水仙素浓度 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上获得了六倍体新梢, 有 10% 的外植体形成了六倍体新梢。高浓度的秋水仙素 ($100 \sim$

表 1 秋水仙素对樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ 六倍体新梢形成的诱导

Table 1 Effect of colchicine on shoot regeneration and hexaploid formation of cherry dwarf rootstock ‘Giseh 6’

秋水仙素 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Colchicine	愈伤组织 Calli	不定芽 / % Shoot	六倍体新梢 / % Hexaploid shoot
0	100	85.0	0
50	100	65.0	10
100	70	40.0	0
200	20	0	0

注: 每个处理至少接种 30 个外植体。

Note: The number of inoculated leaf explant was at least 30.

200 mg · L⁻¹) 处理抑制外植体愈伤组织的诱导和不定芽再生, 最终导致死亡。

从秋水仙素诱导形成的不定芽丛中选出形态变异大的新梢, 在增殖培养基上扩大繁殖, 然后取其顶部叶片进一步诱导不定芽和纯化变异体, 用于进行倍性鉴定和诱导生根形成纯合的六倍体植株。

2.2 倍性鉴定

将对照和测试样品的细胞悬浮液分别在倍体分析仪上测试初始结果, 然后将两个样品混合再次在倍体分析仪上测试分析, 其结果见图 1。图 1 显示的前两个峰是所测定的三倍体对照 (峰 1) 和六倍体材料 (峰 2) 细胞核内 DNA 相对荧光分布。变异材料 DNA 相对荧光峰中值 (162.45) 大于对照 (81.61) 近一倍, 这也就证明了所测定的变异材料比对照细胞核 DNA 含量和染色体数高出一倍, 说明来自峰 2 的材料即为六倍体。峰 3 相对荧光中值 (322.08) 是峰 2 (162.45) 的近两倍, 峰的高度矮面积小, 细胞积累少, 为来自六倍体材料中处于有丝分裂的间期和前期状态的细胞, 这些细胞 DNA 含量加倍。峰 3 出现是倍体分析仪一种常见干扰现象 (图 1)。

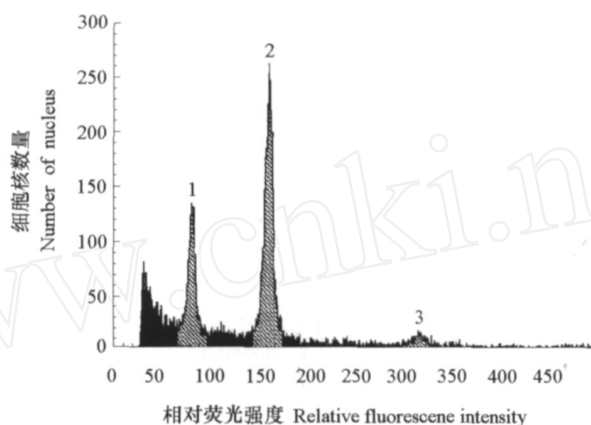


图 1 Partec 倍体分析仪测出的三倍体与六倍体樱桃矮化砧木‘吉塞拉 6号’的细胞 DNA 含量分布图

Fig 1 The cell DNA distribution histogram of putative hexaploid and triploid cherry dwarf rootstock 'Giseh 6' analyzed by Partec ploidy analyzer

本试验中秋水仙素存在于叶片不定芽原基形成的全过程中, 这最大程度地减少或去除了嵌合体形成的可能性, 这是因为叶片外植体不定梢多为单细胞起源 (Litz & Gray, 1992)。要完全确定材料是否为纯合体, 需等 2~3 年开花之后, 观察配子体组织的减数分裂, 通过比较花粉粒的大小来确定 L2 层的倍性水平。

2.3 营养生长性状比较

六倍体的‘吉塞拉 6号’与三倍体相比, 离体新梢的生根率、生根数量和根长度均表现出很大的不同 (表 2, 图 2), 六倍体试管苗根系粗而短, 发根数少; 六倍体试管苗新梢节间也短而粗。六倍体试管苗移栽于苗盘, 表现出植株矮, 茎粗壮, 叶片浓绿, 叶缘锯齿深, 叶片圆、叶片长宽比显著小于对照 (表 3), 在田间也表现健壮, 节间短, 叶片圆而厚, 叶柄短而粗 (图 3)。

表 2 六倍体与三倍体的樱桃矮化砧木‘吉塞拉 6号’离体新梢根系的诱导

Table 2 Comparison of root induction and root growing length between triploid and hexaploid cherry dwarf rootstock 'Giseh 6'

品系 Strain	接种新梢数 Number of inoculation	生根新梢数 Number of rooting	生根率 / % Rate of rooting	根数 / 株 Root number/plant	根长 / cm Root length
六倍体 Hexaploid	50	30	60	1.83	2.0
三倍体 Triploid	50	44	88	2.45	5.1

表 3 六倍体樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ 自根试管苗在苗盘内生长 6 周的形态表现

Table 3 Phenotypic characteristics of hexaploid cherry dwarf rootstock ‘Giseh 6’ grown in the seedling plant tray for 6 weeks

株系 Lines	高度 /cm Height	粗度 /mm Stem diameter	叶片长宽比 Leaf length/breadth ratio
三倍体对照 Triploid wild type	6.75a	1.51a	1.97a
GH-1	4.51b	2.20b	1.76b
GH-2	4.24b	2.11b	1.70b
GH-3	3.76b	1.93b	1.73b

注: *LSD* 法检验, 不同字母表示三倍体与六倍体之间差异显著 ($P=0.05$)。

Note: Different letters indicate significance between triploid and hexaploid at $P=0.05$ by *LSD* test



图 2 六倍体 (左) 和三倍体 (右) 樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ 试管苗形态特征

Fig. 2 Morphological character of *in vitro* plants of hexaploid (left) and triploid (right) cherry dwarf rootstock ‘Giseh 6’



图 3 六倍体 (左) 和三倍体 (右) 樱桃矮化砧木 ‘吉塞拉 6号’ 自根试管苗在田间生长 2 个月的形态特征

Fig. 3 Appearance of the hexaploid and triploid sweet dwarf rootstock ‘Giseh 6’ grown in field for 2 months

References

- Liu Qing-zhong, Zhao Hong-jun, Li Zhi-qiang. 2001a. Plant regeneration from *in vitro* leaves of cherry dwarf rootstocks. *Journal of Fruit Science*, 18 (5): 255 - 257. (in Chinese)
- 刘庆忠, 赵红军, 李志强. 2001a. 甜樱桃矮化砧木吉塞拉 (Giseh 6) 的离体叶片再生植株研究. *果树学报*, 18 (5): 255 - 257.
- Liu Qing-zhong, Zhao Hong-jun, Liu Peng, Mong Rengong, Hammerschlag F A. 2001b. Regeneration of tetraploid plants with cecropin *MB₃₉* gene from ‘Royal Gala’ apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (5): 392 - 398. (in Chinese)
- 刘庆忠, 赵红军, 刘 鹏, Mong Rengong, Hammerschlag F A. 2001b. 抗菌肽 *MB₃₉* 基因导入皇家嘎拉苹果及其四倍体植株的培育. *园艺学报*, 28 (5): 392 - 398.
- Litz R E, Gray D J. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. Hammerschlag F A, Litz R E. *Biotechnology of perennial fruit crops*. Oxfordshire: CAB International: 33 - 34.
- Meng Rengong, Chad Finn. 2002. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. *J Amer Soc Hort Sci*, 127 (5): 767 - 775.
- Webster A D, Looney N E. 1996. *Cherries: Crop physiology, production and users*. Oxfordshire: CAB International: 513.