

# 苹果属皱叶型植株实生后代倍性鉴定研究

王 颖, 周 攀, 王玉霞, 魏 鑫, 董文轩

(沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:** 利用染色体计数方法和流式细胞仪对皱叶型植株的 13 株实生后代进行了倍性鉴定。结果表明: 实生后代苗中出现皱叶和光叶 2 种类型, 2 种鉴定方法获得的结果一致。实生后代中出现二倍体、三倍体和四倍体。其中 8 株光叶型全部为三倍体, 5 株皱叶类型中 1 株二倍体, 3 株三倍体和 1 株四倍体。这为丰富苹果无融合生殖砧木的育种理论, 获得新的无融合生殖砧木提供有益的借鉴。

**关键词:** 皱叶株系; 倍性鉴定; 实生后代; 平邑甜茶; 苹果属

**中图分类号:** S 661.04<sup>+</sup>.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0043-04

苹果属(*Malus* Mill.) 属于蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科(Maloideae), 全世界约有 38 种。我国苹果属植物的种质资源十分丰富, 丰富的资源对培育新品种或砧木起着重大的作用<sup>[1]</sup>。束怀瑞<sup>[2]</sup>认为充分发掘和利用丰富的砧木资源, 选育适应不同生态条件下的各类苹果砧木已成为果树育种的一项重要内容。

平邑甜茶(*Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. var. *pingyiensis* Jiang) 为湖北海棠的一个变种, 原产于我国山东省平邑县, 具有非常高的无融合生殖能力, 其无融合生殖率在 95% 以上, 树性乔化, 耐荫、抗涝能力强, 嫁接苹果的亲和力强, 是目前苹果生产中已被广泛应用的乔化砧木<sup>[1]</sup>。扎矮山定子(*Zhaai Shandingzi* (*Malus*, *Baccata* (L.) Borkh.)) 发现于内蒙古自治区呼伦贝尔盟扎兰屯, 是普通山定子的矮生型突变; 它与普通山定子或苹果品种杂交后代中的高株与矮株比例为 1:1, 并可以保持高抗寒性<sup>[3]</sup>。董文轩等<sup>[4]</sup>以平邑甜茶为母本与扎矮山定子杂交, 共获得 100 多株有性杂交后代, 以期得到既具有矮化抗寒特性, 又具有无融合生殖特性的苹果砧木资源。

在以前工作基础上, 以平邑甜茶与扎矮山定子杂交后代中分离出来的皱叶型植株单系为试验材料, 对皱叶型株系自然授粉后代实生苗进行了倍性鉴定, 以期加深对苹果属植物进化及亲缘关系的认识, 为苹果砧木育种特别是无融合生殖型砧木育种提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

第一作者简介: 王颖(1974-), 女, 吉林延吉人, 在读博士, 主要从事果树种质资源研究工作。E-mail: lanmao1282@sina.com。

通讯作者: 董文轩。E-mail: wxdong63@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370985)。

收稿日期: 2008-07-28

平邑甜茶(母)与扎矮山定子(父)杂交后代皱叶型株系 10<sup>#</sup>(四倍体)的自然实生后代 1a 生皱叶和光叶实生苗, 生长于沈阳农业大学园艺学院苹果育种基地, 正常的田间管理。

### 1.2 植株倍性鉴定

1.2.1 细胞学鉴定 上午 10 时左右从再生植株上剪取 1 cm 长的顶梢, 用饱合对二氯苯水溶液在 18℃ 下处理 6~7 h, 在卡诺溶液固定 2~24 h 后用 70% 的乙醇保存。将样品放在 5 mol/L 盐酸溶液中解离 2 min, 用蒸馏水洗净, 取 1 mm 左右茎尖分生组织进行压片和染色, 每个材料检测分散好的分裂细胞 30 个。

1.2.2 流式细胞倍性分析 参照吴雅琴<sup>[5]</sup>报道的测定方法, 以二倍体山定子为对照, 采用美国 Beckman 公司的流式细胞仪测定 DNA 含量。试验在河北省昌黎果树研究所进行。称取 100 mg 幼叶, 在滴有 2 mL 提取缓冲液的培养皿中研碎, 500 目尼龙网过滤, 滤液用标准试管收集, 再加入 2 mL 染色缓冲液, 暗处常温下染色 30 min, 随即上机测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞学鉴定

10<sup>#</sup>皱叶型株系的自然授粉实生后代苗中出现皱叶和光叶 2 种类型, 进行茎尖染色体数目鉴定, 结果表明: 对照植株山定子茎尖染色体数目是  $2n=2x=34$ , 皱叶型株系的自然授粉实生后代植株茎尖染色体数目为:  $2n=2x=34$ ,  $2n=3x=51$ ,  $2n=4x=68$ 。其中, 染色体数目 34 条的 1 株(图 1-A), 51 条的 11 株(图 1-B), 68 条的 1 株(图 1-C)。

### 2.2 流式细胞仪倍性分析

取植株的嫩茎叶用流式细胞仪进行鉴定。结果表明: 对照山定子在 C 区均有峰值, 1 个植株在 C 区均有峰值(图 2-A)。11 个植株在 D 区均有峰值(图 2-B), 1 个

植株在 E 区有一个单峰(图 2-C)。试验获得的结果与细胞学鉴定一致。

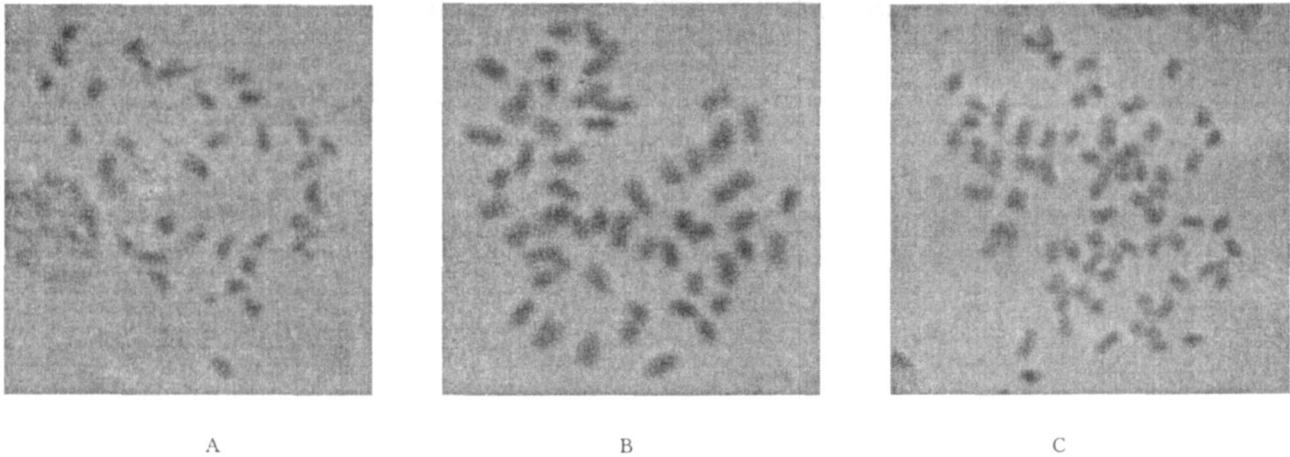


图 1 皱叶型株系 10<sup>#</sup> 自然授粉后代实生苗染色体数目  
A. 二倍体染色体数目; B. 三倍体染色体数目; C. 四倍体染色体数目

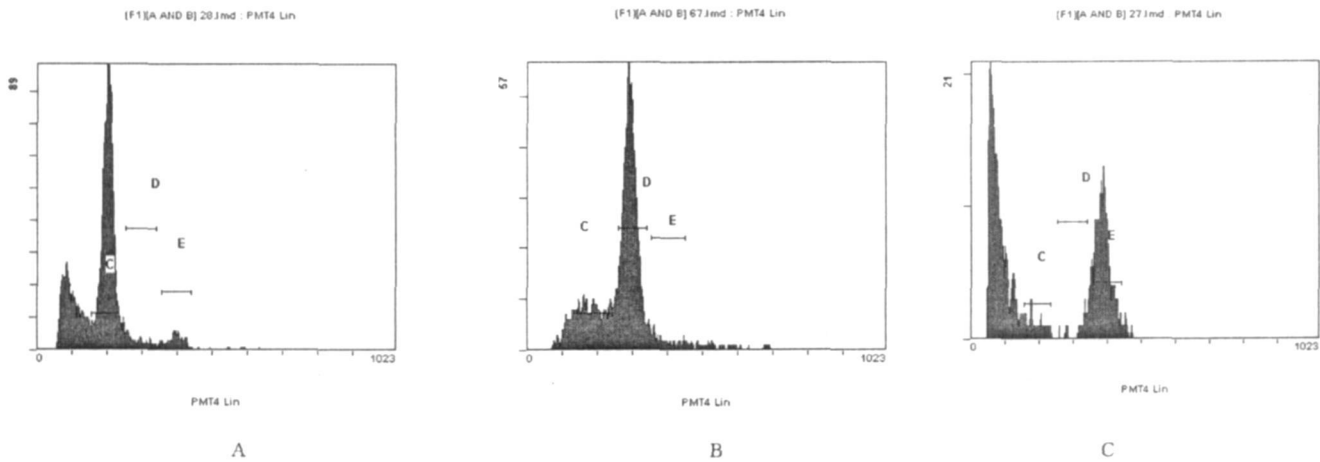


图 2 皱叶型株系 10<sup>#</sup> 自然授粉后代实生苗细胞核 DNA 含量  
A: 10-06-12-皱 (2n=2X); B: 10-06-3 (2n=3X); C: 10-06-11-皱 (2n=4X)

2.3 皱叶型植株后代倍性确定

| 表 1 皱叶型株系 10 <sup>#</sup> 自然授粉后代实生苗倍性鉴定 |    |
|---|----|
| 试材编号                                    | 倍性 |
| 10-06-2                                 | 3X |
| 10-06-3                                 | 3X |
| 10-06-4                                 | 3X |
| 10-06-5                                 | 3X |
| 10-06-6                                 | 3X |
| 10-06-7                                 | 3X |
| 10-06-8                                 | 3X |
| 10-06-9                                 | 3X |
| 10-06-10-皱                              | 3X |
| 10-06-11-皱                              | 4X |
| 10-06-12-皱                              | 2X |
| 10-06-14-皱                              | 3X |
| 10-06-15-皱                              | 3X |

通过细胞学和流式细胞仪鉴定, 2 种方式获得的结果一致, 可以确定, 四倍体 10<sup>#</sup> 皱叶型株系的自然授粉实生后代中出现二倍体、三倍体和四倍体。其中光叶型为三倍体, 皱叶类型中出现二倍体、三倍体和四倍体。二倍体为 1 株, 三倍体为 11 株, 四倍体为 1 株(表 1)。

3 讨论

倍性鉴定在植物遗传育种中具有十分重要的作用。特别是苗期倍性鉴定可以大大减少育种工作量。目前倍性鉴定方法主要有 2 种类型。直接鉴定法, 即染色体计数方法, 这是确定倍性最基本和最精确的方法<sup>[68]</sup>。间接鉴定法, 主要有流式细胞测定法、气孔大小及保卫细胞叶绿体数目。采用倍性分析仪进行鉴定, 即用流式细胞测定法迅速测定叶片单个细胞核内 DNA 含量。根据 DNA 含量

的曲线图推断细胞的倍性 从而快速鉴别植株的染色体倍性水平。流式细胞测定法的特点是制样简单, 灵敏度、分辨率及准确性较高, 数据的可重复性好, 测试速度快 并且 DNA 含量变异可在分布图上直观地看出。

马爱红等<sup>[9]</sup> 使用德国 Partec 公司的倍性分析仪, 采用流式测定法测定单个细胞核的 DNA 含量, 对葡萄进行倍性鉴定, 结果分布图上出现了不同的峰值, 有二倍体、混倍体、四倍体峰值刚好是二倍体的 2 倍。李赞等<sup>[12]</sup> 利用 FAC Scan 流式细胞光度计的研究结果表明, 虽然同一倍性内不同苹果品种细胞核 DNA 含量存在一定的差异, 倍性间细胞核 DNA 含量成倍数性差异, 这说明利用流式细胞仪测定核 DNA 含量来鉴定倍性是可行的。此研究是首次对果树诱变植株细胞核 DNA 含量进行了测定, 这些诱变植株均存在两群细胞核 DNA 含量成倍数性差异的细胞。刘庆忠等<sup>[10]</sup> 采用倍性分析仪的 DNA 含量结果分布曲线也可以清楚地看出, 所要测定的诱导材料的峰值比对照峰值高出 1 倍。蒋洪恩和刘孟军<sup>[11]</sup> 对经秋水仙碱处理过的枣的外植体采用 Partec DPAC 软件对倍性分析仪测定的 DNA 含量分布曲线的分析表明, 变异株中均存在 DNA 含量加倍的细胞, 而且第 1 峰(二倍体的峰)与第 2 峰(处理的峰)的对应值之比为 1 : 2。

迄今, 流式细胞技术在果树上已被成功地用于草莓<sup>[12]</sup>、柑橘<sup>[13]</sup>、野生葡萄<sup>[14]</sup>、李属<sup>[15]</sup> 和猕猴桃<sup>[16]</sup> 等的倍性鉴别上。与其他传统鉴定方法相比, 具有不可替代的优势, 流式细胞仪技术被认为是最有前途的倍性鉴定方法。但由于流式细胞仪不适用于粘度过高的植物材料, 因此材料状态、取材部位是需要考虑的重要问题。必须选择新鲜、幼嫩的植物材料并通过提取方法的改进来消除材料本身的粘性。总之, 随着流式细胞仪组件的不断改进, 以及应用经验的不断积累, 流式细胞仪将会越来越广泛地应用于植物的倍性鉴定中。

具有无融合生殖特性的材料, 多是多倍体野生苹果种, 如湖北海棠(*M. hupehensis*)、三叶海棠(*M. sieboldii*)、变叶海棠(*M. toringoides*)、锡金海棠(*M. sikkimensis*)、沙氏海棠(*M. sargentii*)等<sup>[1]</sup>。孟素琴<sup>[7]</sup> 通过几年观察得知, 这些种均属兼性无融合生殖种。自然或人工授粉后一般的杂种率为 5% ~ 25%, 实生后代绝大多数同于母本。

具有平邑甜茶基因的皱叶型株系自然授粉后代实生苗中, 出现二倍体、三倍体和四倍体, 其中三倍体居多, 二倍体和四倍体所占比例很小。出现二倍体和三倍

体的植株有光叶型和皱叶型 2 种, 而所有四倍体都出现在皱叶类型中。三倍体的出现可能是在自然环境下, 四倍体的皱叶型株系与田间的二倍体株系自然授粉得到的。通过倍性鉴定, 可以判断, 皱叶型株系实生后代中矮生皱叶型四倍体植株可能是由无融合生殖而来, 这一点在胚胎学观察中也能得到证明。皱叶型株系实生后代不同程度地遗传了无融合生殖能力。这为丰富无融合生殖型实生砧木的育种理论, 获得新的苹果无融合生殖型砧木提供有益的借鉴。

参考文献

[ 1 ] 李育农. 苹果属植物种质资源研究[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 208- 213.  
[ 2 ] 束怀瑞. 苹果学[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 210- 235.  
[ 3 ] 孟庆炎, 王晓红, 塔娜, 等. 苹果属矮生抗寒种质: 扎陵山定子[ J ]. 中国果树, 1997( 3 ): 13- 14.  
[ 4 ] 董文轩. 苹果实生矮砧育种途径的研究[ D ]. 沈阳农业大学博士学位论文, 1995.  
[ 5 ] 吴雅琴, 常瑞丰. 流式细胞术进行倍性分析的原理和方法[ J ]. 云南农业大学学报, 2006, 21( 4 ): 407- 409.  
[ 6 ] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 中国苹果属植物染色体数目报告[ J ]. 武汉植物学研究, 1986, 4( 4 ): 337- 342.  
[ 7 ] 梁国鲁, 李晓林. 中国苹果属植物染色体研究[ J ]. 植物分类学报, 1993, 31( 3 ): 236- 251.  
[ 8 ] 梁国鲁. 中国苹果属植物染色体观察[ J ]. 植物分类学报, 1987, 25( 6 ): 437- 441.  
[ 9 ] 马爱红, 范培格, 孙建设, 等. 四倍体葡萄诱导技术的研究[ J ]. 中国农业科学, 2005, 38( 8 ): 1645- 1651.  
[ 10 ] 刘庆忠, 赵红军, 刘鹏, 等. 秋水仙素处理离体叶片获得皇家嘎拉苹果四倍体植株[ J ]. 果树学报, 2001, 18( 1 ): 7- 10.  
[ 11 ] 蒋洪恩, 刘孟军. 秋水仙碱诱导枣多倍体的研究[ J ]. 园艺学报, 2004, 31( 5 ): 647- 650.  
[ 12 ] 李赞, 石荫萍, 束怀瑞, 等. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究[ J ]. 西北植物学报, 1998, 18( 4 ): 499- 504.  
[ 13 ] 洪柳, 刘永中, 邓秀新. 柑橘成熟种子胚培养获得四倍体植株[ J ]. 园艺学报, 2005, 32( 4 ): 688- 690.  
[ 14 ] 孙马, 王跃进. 中国野生葡萄染色体倍性研究[ J ]. 西北农业学报, 2006, 15( 6 ): 148- 152.  
[ 15 ] Vance B W, Estager A S, Wells J K. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization[ J ]. J. Amer Soc Hort Sci, 1994, 119( 6 ): 1312- 1316.  
[ 16 ] Friderique O S, Legave J M, Nicote M F, et al. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus Actinidia[ J ]. Scientia Horticulturae, 1994, 57: 303- 313.  
[ 17 ] 孟素琴, 张林杰. 平邑甜茶与二倍体苹果杂交 F<sub>1</sub> 染色体数目分离及有关性状分析[ J ]. 果树科学, 1991, 8( 3 ): 145- 150.

# 不同追肥措施对有机桃产量及品质的影响

李艳萍<sup>1,2</sup>, 贾小红<sup>2</sup>, 陈清<sup>3</sup>

(1. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832000; 2. 北京市土肥工作站, 北京 100029; 3. 中国农业大学 资源与环境学院 北京 100094)

**摘要:** 研究追施不同有机肥、生物肥和叶面肥等对有机栽培条件下 5 a 生桃(品种: 北京 24 号)产量及品质的影响。结果表明: 在每个处理基施 45 t/hm<sup>2</sup> 羊粪的基础上, 后期追施有机肥、生物肥、喷叶面肥处理均能显著增加有机桃的产量, 尤以追施有机肥并同时喷施叶面肥处理的桃产量最高; 不同施肥处理对桃果实中的总糖含量和可溶性固形物含量影响差异不显著; 追施不同肥料的处理显著地降低桃果 Vc 含量, 但对桃果硬度的影响正好相反。

**关键词:** 有机桃; 产量; 品质; 追肥

**中图分类号:** S 662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0046-03

有机果品是一项新兴的产业, 正在世界范围迅速发展<sup>[1]</sup>。有机桃就是在此过程中孕育而生的, 近几年来有机桃的发展非常迅速, 但是对于桃树有机生产, 尤其是生产中如何协调好营养生长与生殖生长过程中不使用化肥而达到桃树对营养需求方面的研究还较少, 仅有部分学者研究了有机肥<sup>[2]</sup>、生物肥<sup>[3]</sup>和叶面肥<sup>[4]</sup>对烤烟<sup>[2]</sup>、柑桔<sup>[3]</sup>和葡萄<sup>[4]</sup>等产量、品质方面的影响, 结果也不太一致, 对于桃树的有机生产没有具体的指导意义。为此, 对有机桃生产的肥料施用进行了研究, 以期在实际指导

有机桃的生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

试验于 2003 年 11 月至 2004 年 9 月在北京市平谷区进行, 试材为 5 a 生桃园, 品种为北京 24 号, 株行距 3 m×4 m。果园土壤有机质含量为 23.8 g/kg, 全氮 1.4 g/kg, 碱解氮含量 141 mg/kg, 有效磷 78.3 mg/kg, 速效钾 306 mg/kg, pH 为 7.5; 基肥于 2003 年 11 月 15 日以腐熟羊粪施入, 施用量为 45 t/hm<sup>2</sup>, 追肥按照表 1 的试验设计进行。

试验设 6 个处理 3 次重复, 每重复 5 棵树。试验设计如表 1 所示。有机肥品种由丸京创味肥料有限公司提供, 肥料由蹄角粉、鱼粉、骨粉、蚕蛹粉、大豆粕、草木灰等有机和天然原料加工制成, 全氮含量为 6.67%、全磷(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)8.36%、全钾(K<sub>2</sub>O)3.99%、有机质 51.6%、水分 7.56%、pH 值 7.9。生物肥料由北京世纪阿姆斯生物技术

**第一作者简介:** 李艳萍(1982-), 女, 陕西宝鸡人, 硕士, 研究方向为果树栽培生理。E-mail: lypmm@126.com.

**通讯作者:** 贾小红。E-mail: jiaxiaohong@china.com.

**基金项目:** 农业部 948 资助项目(2006-G30); 北京市农业技术试验示范资助项目(20060115)。

**收稿日期:** 2008-06-07

## Chromosome Ploidy Identification of the Seedling Plants from the Leaf-wrinkled and Dwarf Plants in *Malus*.

WANG Ying, ZHOU Pan, WANG Yu-xia, WEI Xin, DONG Wen-xuan

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

**Abstract:** Chromosome number and polyploidy level identification were made on 13 seedling plants of the leaf-wrinkled and dwarf plants in *Malus*, by using the general pressed method and flow cytometry. The results of the two methods both indicated that there were two types which were leaf-wrinkled type and leaf-smooth type in these seedling plants from the leaf-wrinkled and dwarf plants. 8 seedling plants in the leaf-smooth type were all triploid. In the leaf-wrinkled types, 1 seedling plants was diploid, 3 seedling plants were triploid and 1 seedling plants was tetraploid. This research enriched the breeding methods and offered some new apomictic stocks in *malus*. for the utilization in fruit production.

**Key words:** Leaf-wrinkled; Ploidy identification; Seedling plants; *Malus hupehensis*; *Malus* Mill.