

DOI:10.13332/j.1000-1522.20190230

茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究

郭 烨¹ 崔艳红² 孔德仓³ 曹 明³ 庞晓明¹ 李颖岳¹

(1. 林木育种国家工程实验室, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

2. 北京林业大学期刊编辑部, 北京 100083; 3. 河北省沧县国家枣树良种基地, 河北 沧州 071001)

摘要:【目的】离体多倍体育种是枣树育种的重要方法, 对其关键技术研究有利于建立和完善枣树离体多倍体育种体系, 加快枣树多倍体种质的创制。【方法】以茶壶枣无菌叶片为材料, 将预培养不同天数(7~20 d)的叶片固定后制成石蜡切片, 进行细胞学观察以确定适宜的预培养时间。在此基础上, 将叶片不定芽再生技术与秋水仙素染色体加倍技术相结合, 在叶片预培养 8、9、10、11 d 后, 分别用 70 和 90 mg/L 的秋水仙素处理 48 和 72 h, 并对处理后得到的不定芽进行流式细胞术倍性检测。【结果】通过对叶片最佳预培养时间的细胞学研究可以得出, 茶壶枣无菌叶片在预培养 8~9 d 时, 分生细胞的分裂能力最强, 且未出现分化现象, 在此时期用秋水仙素对叶片进行处理, 可大大提高诱导率, 并且可以有效避免嵌合体 and 混倍体的出现。染色体加倍试验发现, 在预培养 8 d 后, 用 70 mg/L 的秋水仙素处理 72 h, 其诱导率最高, 达 4.11%, 并成功获得 8 株多倍体植株。通过流式细胞术确定这 8 株多倍体均为纯合四倍体。【结论】本研究探索出了将茶壶枣叶片不定芽再生体系与秋水仙素染色体加倍技术相结合, 人工诱导茶壶枣多倍体的技术方法。

关键词: 茶壶枣; 细胞学观察; 染色体加倍; 四倍体

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2019)07-0049-08

引文格式: 郭烨, 崔艳红, 孔德仓, 等. 茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(7):49-56.
Guo Ye, Cui Yanhong, Kong Decang, et al. Study on key techniques of polyploid induction in *Ziziphus jujuba* Mill. cv. 'Teapot' [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(7): 49-56.

Study on key techniques of polyploid induction in *Ziziphus jujuba* Mill. cv. 'Teapot'

Guo Ye¹ Cui Yanhong² Kong Decang³ Cao Ming³ Pang Xiaoming¹ Li Yingyue¹

(1. National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Journal Editorial Department of Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

3. National Foundation for Improved Cultivars of Chinese Jujube, Cangzhou 071001, Hebei, China)

Abstract: [Objective] In vitro polyploid breeding is an important method for jujube breeding. The study of its key technologies is conducive to the establishment and improvement of polyploid breeding system and the creation of polyploid germplasm of jujube. [Method] In this study, the leaves of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. 'Teapot' were used as materials, and the leaves of different days (7-20 day) were fixed and then made into paraffin sections for cytological observation. On this basis, the leaf adventitious bud regeneration technology was combined with the colchicine chromosome doubling technique. After the leaves were pre-cultured for 8, 9, 10 and 11 days, they were treated with 70 mg/L and 90 mg/L colchicine for 48 and 72 hours, and the flow cytometry ploidy test was performed on the adventitious buds obtained after treatment. [Result] Through the cytological study on the optimal pre-culture time of the leaves, it can be concluded that the meristematic cells have the strongest division ability and no differentiation during the pre-culture of

收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-06-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000607)。

第一作者: 郭烨。主要研究方向: 经济林木良种繁育。Email: guoye1630@163.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物学院。

责任作者: 李颖岳, 博士, 教授。主要研究方向: 经济林木良种繁育。Email: yingyueli@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

8–9 days. During this period, treatment of leaves with colchicine can greatly increase the induction rate and effectively avoid the appearance of chimeras and mixoploids. The chromosome doubling test found that after 8 days of pre-culture, the induction rate was up to 4.11% after treatment with 70 mg/L colchicine for 72 hours, and 8 polyploid plants were successfully obtained. It was confirmed by flow cytometry that these 8 polyploids were pure tetraploids. [Conclusion] This study explores the technical method of artificially inducing polyploidy of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. ‘Teapot’ by adventitious bud regeneration technology and colchicine chromosome doubling technique.

Key words: *Ziziphus jujuba* Mill. cv. ‘Teapot’; cytological observation; chromosome doubling; tetraploid

枣 (*Ziziphus jujuba*) 为鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属 (*Ziziphus*) 植物, 是我国重要的经济树种^[1]。枣果素以营养丰富著称, 是传统中药和滋补保健佳品。研究发现, 枣果内不仅含有丰富的糖类、脂肪、蛋白质等物质, 还含有人体不可缺少的多种微量元素和维生素^[2]。此外, 食用枣果还具有免疫调节^[3]、抗癌^[4]以及平喘^[5]等功效。杂交育种是果树育种的主要途径, 但是大量实践表明, 由于枣树花小, 去雄和人工授粉操作非常困难, 加之枣花量大而坐果率低, 存在胚败育现象, 难以得到杂种后代, 枣树杂交育种非常困难^[6–7]。目前, 尚未有通过人工杂交获得枣树新品种的报道。

多倍体现象在植物界中普遍存在, 尤其在有花植物中最为普遍^[8]。多倍体在很多方面显示出了优越性, 其果实较二倍体大, 营养成分的含量也显著提高^[9]。在枣树人工倍性育种中, 石荫坪等^[10]最早利用胚乳作为材料, 成功获得了金丝小枣、圆铃和长红枣的胚乳三倍体植株。自此, 枣树离体加倍技术日渐成熟, 已成功利用枣树的茎段^[11]、丛生芽^[12]、茎尖^[13]等材料获得了各品种的多倍体植株。但通过以上材料得到的多倍体多会产生嵌合体 and 混倍体, 其后续的纯化过程十分困难^[14]。研究表明, 在离体多倍体诱导中采用叶片作为材料, 在外植体叶芽原基发生前施加秋水仙素进行处理, 然后通过再生体系获得的植株则多为纯合体^[15]。Cui 等^[16]利用叶片不定芽再生技术, 用秋水仙素对酸枣无菌叶片进行处理, 成功得到了纯合四倍体植株。

此外, 大量研究表明, 利用秋水仙素进行离体加倍诱导过程中的预培养时间非常关键。秋水仙素的主要作用是使得待处理的外植体有丝分裂同步化, 从而改善药剂的作用效果^[17]。在有丝分裂过程中, 秋水仙素与微管亚基相结合, 阻碍了纺锤丝的正常形成, 纺锤丝形成的失败使得染色单体不能正常的向两极移动, 从而形成了多倍体^[18–19]。因此, 通过细胞学观察, 研究预培养时间与细胞分裂时期的对应关系, 准确找到细胞的旺盛分裂期, 这对于提高诱导率具有十分关键的作用。

本研究通过石蜡切片技术对叶片不定芽再生进行细胞学观察, 以确定合适的预培养时间。在此基础上设计试验, 探索茶壶枣离体加倍处理中秋水仙素浓度、处理时间、预培养时间等关键因素。拟建立茶壶枣离体加倍体系, 为枣树的多倍体育种技术的完善和枣树多倍体种质创制提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茶壶枣因果形酷似茶壶而得名, 是兼具食用价值和观赏价值的枣树品种^[20]。本文的供试材料茶壶枣组培苗来自本实验室于 2014 年建立的茶壶枣组培体系^[21]。将幼嫩芽苗进行继代培养, 30 d 后, 选取长势良好、叶片嫩绿, 生长势相对一致的茶壶枣组培苗作为试验材料。

1.2 叶片最佳预培养时间的细胞学研究

以茶壶枣无菌叶片为材料, 在芽启动培养基 I (WPM + TDZ 1.0 mg/L + IBA 0.3 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L) 中进行预培养, 自叶片预培养第 7 d 起, 每天取样, 直至第 20 d 为止。将预培养不同天数的叶片置于 FAA 固定液 (38% 甲醛:冰醋酸:30% 乙醇 = 1:1:8) 中固定 36 h 后, 采用常规石蜡切片技术^[22], 利用 Olympus-BX 51 型光学显微镜, 观察茶壶枣叶片在预培养不同天数后叶片内部的细胞学形态, 并拍照记录。

1.3 秋水仙素诱导离体加倍的处理

选取组培苗形态学自上而下第 3~5 枚叶片作为试验材料, 沿叶片中脉垂直方向横切 2 个伤口, 切断主脉但不切断叶片, 采用两步培养法进行不定芽直接再生。叶片以近轴端接触培养基方式, 接种于不定芽启动培养基 I 上。根据叶片最佳预培养时间的细胞学研究, 在避光条件下, 将刻伤叶片在芽启动培养基 I 上分别预培养 8、9、10、11 d 后, 将叶片转至含秋水仙素的液体培养基 (不含琼脂的不定芽启动培养基 I) 中分别诱导处理 48 和 72 h。处理结束后, 用无菌水清洗叶片 4 遍, 再用无菌滤纸吸干叶片表面液体, 继续置于不定芽启动培养基 I 上进行暗培养, 共暗培养 21 d 后转至不定芽伸长培养

基 II (WPM + IAA 0.1 mg/L + GA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6 g/L) 中, 置于温度为 25 ℃、光照强度 2 000 Lx、14 h 光/10 h 暗的光周期条件下进行培养。

试验采用完全随机区组试验设计, 秋水仙素浓度设为 70 和 90 mg/L 两个梯度, 处理时间为 48 和 72 h, 预培养的时间为 8、9、10、11 d。共设 16 个处理组合(表 1), 每个处理组合接种 3 个培养皿, 每个皿转接 10 枚叶片, 共 3 次重复。

1.4 流式细胞仪倍性检测

待叶片再生的不定芽长到 1 cm 后转入继代培养基(MS + 6-BA 1 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.8 g/L)中伸长生长, 每 30 d 继代一次。待不定芽长到 5 cm 高时, 转入生根培养基(1/2MS + IBA 0.7 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.8 g/L)中诱导生根, 40 d 后, 剪取幼嫩叶片用流式细胞仪检测再生植株的倍性。选用二倍体茶壶枣叶片作为对照, 荧光通道值设置为 50。纵坐标代表检测样品的相对细胞数, 横坐标代表荧光通道值, 通过峰值的位置可以判定检测样品的倍性。荧光通道值在 50 左右为二倍体, 荧光通道值在 100 左右为四倍体。

1.5 数据分析

采用 Excel 2013 录入和整理数据, 并用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 多重比较采用 Duncan 氏新复极差法。文中涉及百分比数据需反正弦转换后再进行分析。

四倍体诱导率 = 四倍体株数/不定芽再生数 × 100%

叶片存活率 = 存活叶片数/处理株数 × 100%

表 1 秋水仙素处理茶壶枣组培苗叶片诱导多倍体处理设计表

Tab. 1 Design table of ‘Teapot’ jujube leaves with colchicine treatments

处理 Treatment	预培养时间 Pre-culture time/d	秋水仙素浓度 Colchicine concentration/ (mg·L ⁻¹)	秋水仙素处理时间 Colchicine treatment time/h
1	8	70	48
2	8	70	72
3	8	90	48
4	8	90	72
5	9	70	48
6	9	70	72
7	9	90	48
8	9	90	72
9	10	70	48
10	10	70	72
11	10	90	48
12	10	90	72
13	11	70	48
14	11	70	72
15	11	90	48
16	11	90	72

2 结果与分析

2.1 叶片离体再生不定芽的形态学观察

通过试验可以发现, 当叶片预培养至第 7 d 时, 由于长时间处于无光照条件下, 叶片颜色逐渐从翠绿色转变为黄绿色, 而叶片刻伤处未发生明显变化(图 1a、b)。直到预培养至第 11 d 时, 叶片开始呈现



a. 预培养 7 d; b. 预培养 9 d; c. 预培养 11 d; d. 预培养 13 d; e. 预培养 15 d; f. 预培养 20 d。a, 7 days pre-culture time; b, 9 days pre-culture time; c, 11 days pre-culture time; d, 13 days pre-culture; e, 15 days pre-culture; f, 20 days pre-culture.

图 1 茶壶枣离体多倍体诱导过程中不同预培养时间的叶片

Fig. 1 Leaves of different pre-cultivation time during in vitro polyploid induction of ‘Teapot’ jujube

扭曲的状态,切口过主脉处呈现膨大增厚的现象(图 1c、d)。当进行到第 15 d 时,切口过主脉处的膨大现象更加明显,并且出现白色的小突起(图 1e)。培养至 20 d 后,切口过主脉处的白色突起达到 1 mm,而切口过侧脉处也开始出现白色的突起(图 1f)。

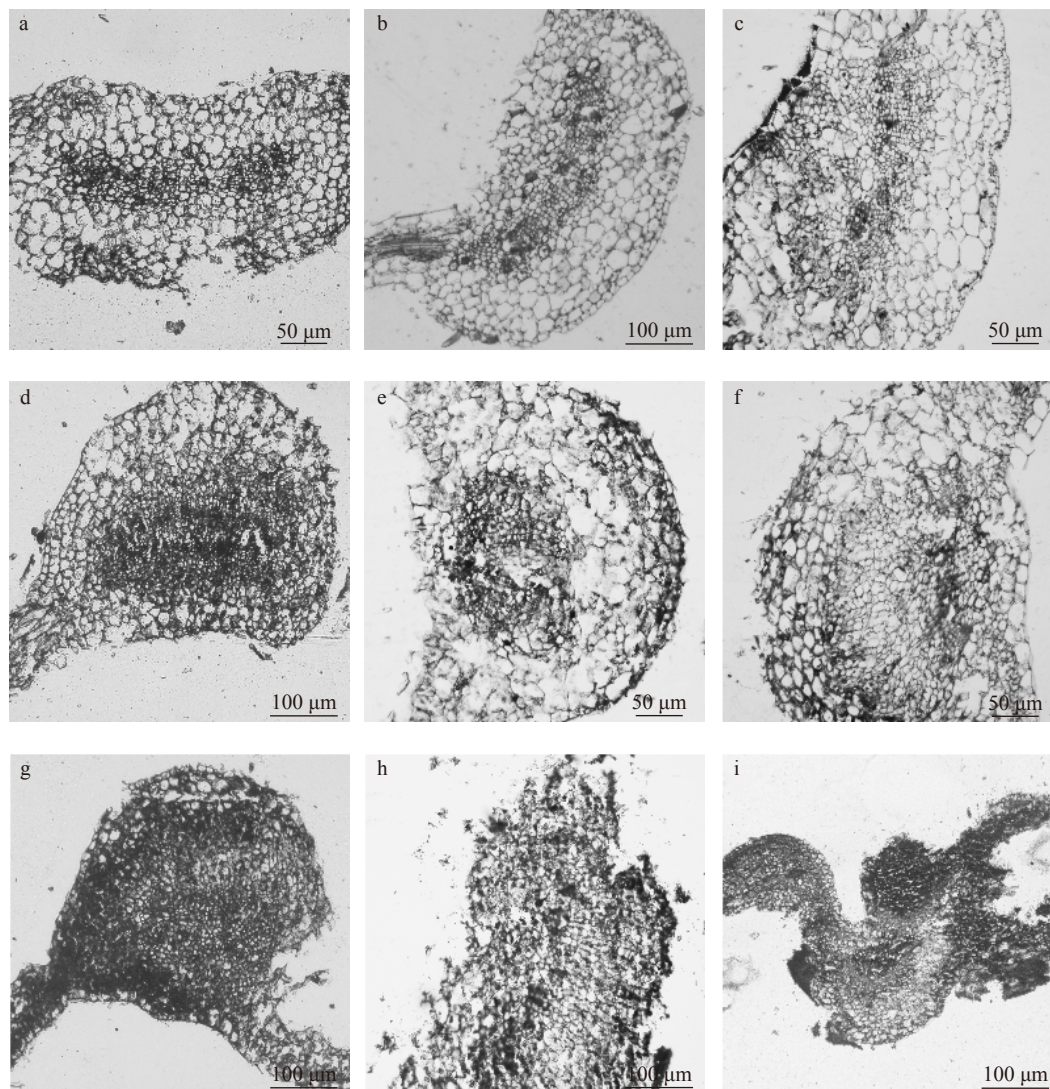
2.2 叶片离体再生不定芽的细胞学观察

枣叶片主要由叶表皮、亚表皮、维管束及维管束周围大量的薄壁细胞组成^[23]。当叶片在不定芽启动培养基 I 中预培养至 7 d 时,维管束周围薄壁细胞的细胞核明显,细胞质变浓厚,细胞整体呈变大的趋势,而离维管束较远的薄壁细胞,其状态仍然呈细胞核不明显,细胞质稀疏的状态,这与维管束周围的薄壁细胞已开始进行分裂有关,此外,在维管束的周围开始有少量成团的分生细胞出现(图 2a)。当叶片预培养至 8~9 d 时,靠近维管束的薄壁细胞继续进行

旺盛分裂,而与维管束距离较远的薄壁细胞也开始出现细胞分裂现象(图 2b、c)。当预培养时间更长,达到 10 d 以上时,分生细胞的分裂速度急剧增加,并且聚集在一起形成分生组织,逐渐开始分化。从图中可以观察到,构成分生组织的细胞与周围的细胞明显不同,其细胞体积更小,排列更加紧密(图 2d、e、f)。预培养至 13~14 d 时,薄壁细胞继续迅速分裂,分生组织体积变大,并向四周扩展,急速扩张突破外植体,出现芽原基和叶原基。由于叶片表皮细胞和叶肉细胞不具有分裂能力,而逐渐破损脱落(图 2g、h)。当预培养时间更长,达到 20 d 时,可从外部观察到,叶片上形成单个或丛生的不定芽(图 2i)。

2.3 秋水仙素处理对外植体存活率及叶片不定芽再生的影响

不同浓度的秋水仙素和不同的处理时间对外植



a. 预培养 7 d; b、c. 预培养 8、9 d; d、e、f. 预培养 10、11、12 d; g、h. 预培养 13、14 d; i. 预培养 20 d。a, 7 days pre-culture time; b, c, 8, 9 days pre-culture time, respectively; d, e, f, 10, 11, 12 days pre-culture time; g, h, 13, 14 days pre-culture time; i, 20 days pre-culture time.

图2 茶壶枣叶片不同预培养时间的组织学观察

Fig. 2 Histological observation on different pre-culture time of 'Teapot' jujube leaves

体的存活率及不定芽的再生率具有不同程度的影响(表 2)。

总体来看,随着秋水仙素浓度的增加和处理时间的延长,毒害作用加深,使得外植体的存活率和不定芽再生率均呈降低的趋势。

对外植体存活率的数据进行方差分析(表 3)。秋水仙素浓度和处理时间对外植体的存活率和不定芽再生有着极显著的影响($P < 0.01$),而预培养时间对外植体的存活率和不定芽再生均没有显著影响。使用浓度为 70 mg/L 的秋水仙素处理外植体,其存活率极显著高于浓度为 90 mg/L 的秋水仙素处理结果;而秋水仙素处理 48 h 外植体后的存活率极显著高于处理 72 h 后的外植体存活率(图 3)。由此,可以得出,随着秋水仙素浓度的增加和处理时间的延长,对外植体的毒害作用逐渐加深,从而造成了外植体存活率的降低。

对不定芽再生数的数据进行方差分析(表 4)。秋水仙素浓度和处理时间同样对不定芽再生数有极显著影响($P < 0.01$)。秋水仙素浓度越大,处理时间越长,不定芽再生数越少。但在试验过程中对叶片外植体进行观察,发现秋水仙素处理后可存活的外植体均可分化出不定芽。使用浓度为 70 mg/L 的秋水仙素处理外植体,其不定芽再生数极显著高于浓度为 90 mg/L 的秋水仙素处理后结果;秋水仙素处理 48 h 后外植体的不定芽再生数极显著高于处

理 72 h 后的外植体不定芽再生数(图 4)。此结果,同样与秋水仙素毒害作用的累加有关。

表 2 秋水仙素处理对茶壶枣叶片存活率、再生芽数以及四倍体诱导率的影响

Tab. 2 Effects of colchicine treatment on leaf survival rate, number of regenerated buds and tetraploid induction rate in ‘Teapot’ jujube

处理 Treatment	外植体存活率 Explant survival rate/%	再生芽数 Regenerated buds	四倍体诱导率 Tetraploid induction rate/%
1	83.33 ± 1.25a	8.40 ± 0.41df	0
2	69.33 ± 1.46ab	5.60 ± 0.48bcd	4.11
3	62.33 ± 1.79bc	6.30 ± 0.31df	0
4	52.00 ± 2.14cde	5.10 ± 0.53a	0
5	80.60 ± 2.31a	7.98 ± 0.21df	0
6	62.67 ± 3.21bc	6.21 ± 0.55cdf	1.37
7	56.67 ± 7.27bcde	6.10 ± 0.54cdf	0
8	40.67 ± 6.26e	5.40 ± 0.32a	0
9	70.67 ± 3.73ab	8.40 ± 0.31f	0
10	59 ± 11.88cdef	6.50 ± 0.81df	0
11	55.33 ± 4.945bcd	6.30 ± 0.67df	0
12	45.00 ± 0.91de	5.50 ± 0.62ab	0
13	79.40 ± 1.57a	7.88 ± 0.29df	0
14	65.33 ± 7.83bcd	6.45 ± 0.24df	0
15	60.33 ± 5.51bcd	6.70 ± 0.33df	0
16	45.23 ± 2.61de	5.70 ± 0.3abc	0

注:不同的小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。下同。Notes: different lowercase letters indicate a significant difference at $P < 0.05$ level. The same below.

表 3 秋水仙素处理茶壶枣叶片外植体存活率的方差分析

Tab. 3 Variance analysis of explant survival rate on colchicines treatment of ‘Teapot’ jujube

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom (df)	均方 Mean square (MS)	<i>F</i>
预处理时间 Pre-culture time	3	102.702	2.498
秋水仙素浓度 Colchicine concentration	1	2 238.692	54.443**
秋水仙素处理时间 Colchicine treatment time	1	1 279.600	31.119**
随机误差 Random error	31	41.120	
总计 Total	36		

注: **表示达到极显著差异, $P < 0.01$ 。下同。Notes: ** indicates extremely significant difference at $P < 0.01$ level. The same below.

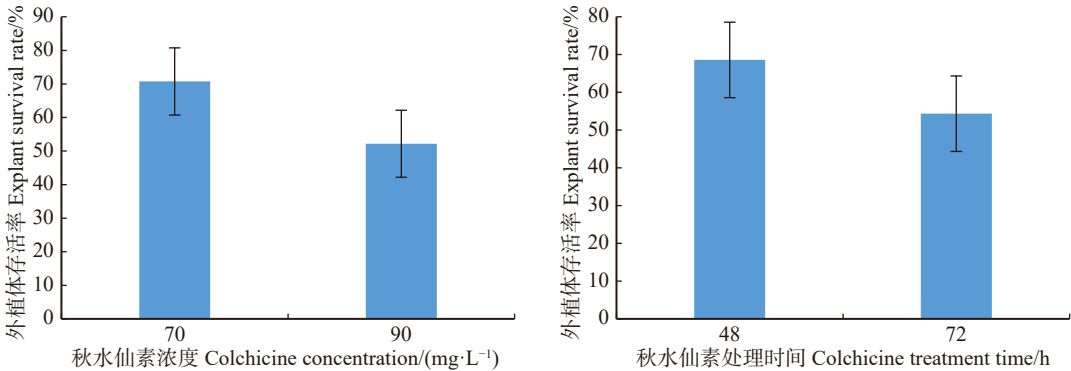


图 3 秋水仙素浓度及处理时间对外植体存活率的影响

Fig. 3 Effects of colchicine concentration and colchicine treatment time on the explant survival rate

表 4 秋水仙素处理茶壶枣叶片外植体再生芽数的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of explant survival rate on colchicine treatment of ‘Teapot’ jujube

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom (df)	均方 Mean square (MS)	F
预处理时期 Pre-culture time	3	0.318	0.527
秋水仙素浓度 Colchicine concentration	1	20.358	20.358**
秋水仙素处理时间 Colchicine treatment time	1	24.225	40.111**
随机误差 Random error	32	0.645	
总计 Total	37		

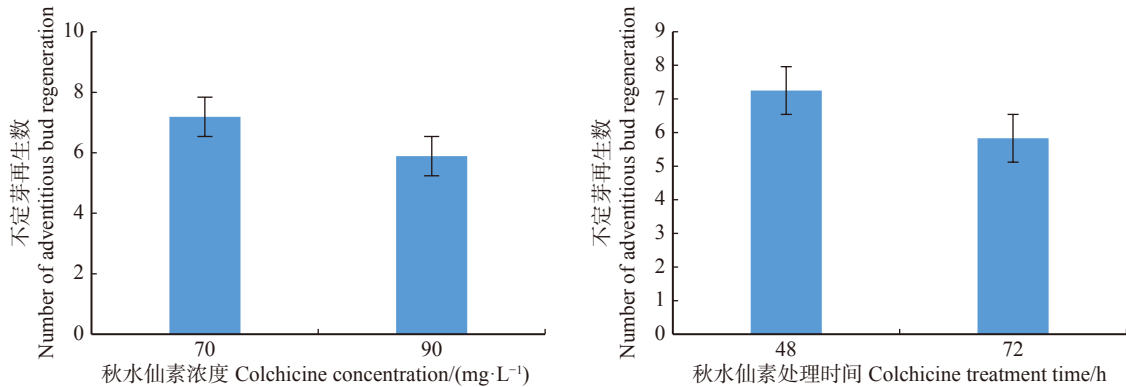


图 4 秋水仙素浓度及处理时间对不定芽再生数的影响

Fig. 4 Effects of colchicine concentration and colchicine treatment time on the number of adventitious bud regeneration

2.4 倍性检测

从叶片外植体上剪取长度在 1 cm 左右的不定芽,将其转接到茶壶枣继代培养基中,培养 30 d 后,对其进行生根培养,共获得健壮的再生植株 146 棵。取生根后的再生植株的叶片进行流式细胞仪检

测。通过检测,共测得四倍体茶壶枣 8 株,未发现嵌合体和混倍体,其余均为二倍体(图 5)。四倍体分别出现在 2 号和 6 号处理中,即将茶壶枣离体叶片先进行 8 d 或 9 d 预培养,再用浓度为 70 mg/L 的秋水仙素进行诱导处理,处理时间为 72 h。

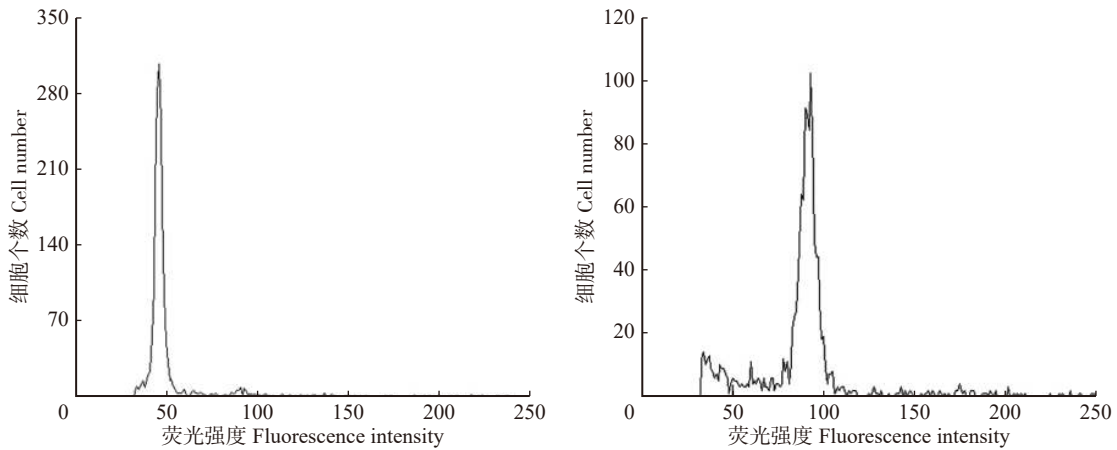


图 5 流式细胞仪倍性分析图

Fig. 5 Analysis diagram of ploidy by FCM

3 结论与讨论

3.1 预培养时间的确定

对外植体进行预培养的目的是使诱导材料处于同一分裂期^[17]。由于秋水仙素只对处于分裂期的细胞有作用,因此找到适宜的处理时期是提高多倍体诱导率,降低或避免嵌合体和混倍体出现的关

键^[24]。Ma 等^[25]通过组织学研究发现,在灰枣不定芽再生过程中,暗培养进行至一半时,细胞核开始启动分裂,由此推测此时可能为秋水仙素处理的最佳时期。此外,研究发现,不同枣品种、不同外植体所需要的预培养时间不同。王娜^[12]研究发现以冬枣、酸枣的茎段和丛生芽为外植体进行诱导时,最佳预培养时间为 4 d;宁强^[14]以冬枣和辣椒枣的叶片为外植

体进行离体诱导的最佳预培养时间为 10 d。在本研究中, 为了确定最佳处理时期, 对茶壶枣不同预培养时间的叶片进行了细胞学研究。研究发现, 预培养 8~9 d 时维管束附近的薄壁细胞已经启动分化, 且一部分已经分化形成分生组织, 此时处于分裂期的细胞最多, 且分生组织还未分化形成芽原基和不定芽。这一发育过程与 Ma 等^[25] 对灰枣不定芽再生的研究结果一致。在此时期对叶片进行秋水仙素处理, 其诱导率最高。预培养时间越短, 薄壁细胞分裂形成的分生细胞越少, 秋水仙素处理后得到的多倍体细胞较少, 发育成完整植株的可能性越低, 诱导率随之降低; 若预培养时间过长, 分生组织开始分化形成芽原基和不定芽, 此时细胞分裂虽然也很旺盛, 但容易形成嵌合体和混合体, 造成后期纯化困难^[26]。同时, 在本研究中, 经过秋水仙素诱导得到多倍体的处理也都是在预培养 8~9 d 的条件下获得的, 与组织切片研究的结果一致。

3.2 秋水仙素浓度与处理时间

在枣树离体加倍过程中, 秋水仙素浓度和处理时间都直接影响外植体的再生率和多倍体的诱导率^[27-28]。秋水仙素对诱导材料有毒害作用, 一般来说秋水仙素浓度越高, 对外植体的毒害越大, 死亡率越高, 再生率越低, 但多倍体的诱导率会相应提高; 相反, 秋水仙素浓度低, 外植体的死亡率降低, 再生率提高, 但诱导率会下降^[29-30]。研究发现, 不同的枣树品种、不同的处理材料适宜的秋水仙素浓度和处理时间均不同^[31-32]。Gu 等^[13] 研究发现沾化冬枣芽尖的最适秋水仙素浓度为 90 mg/L, 处理时间为 48 h; 枣组培苗茎段的最适浓度和处理时间分别为 50 mg/L, 处理 72 h 和 100 mg/L, 处理 48 h; 枣愈伤组织的最适浓度为 50 mg/L, 处理 24 h。王岩^[33] 经研究发现, 酸枣叶片的最适秋水仙素浓度为 60~80 mg/L, 处理时间为 48~72 h。而本文经研究得出, 茶壶枣的最适秋水仙素浓度为 70 mg/L, 处理时间为 72 h。

本试验以茶壶枣无菌叶片为材料, 借助石蜡切片技术确定最佳预培养时间, 将叶片不定芽再生技术与秋水仙素染色体加倍技术相结合, 成功得到茶壶枣纯合四倍体植株, 为枣树的多倍体育种技术体系的建立和完善以及枣树多倍体种质的大量创制奠定了基础, 同时也为枣树遗传转化研究提供了坚实的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 郭裕新, 单公华. 中国枣[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010.
Guo Y X, Shan G H. The Chinese jujube[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2010.
- [2] Jin X. Jujuba: *Ziziphus jujuba*[M]. Ceará: Exotic Fruits, 2018: 263-269.
- [3] Zou M, Chen Y L, Sun-Waterhouse D X, et al. Immunomodulatory acidic polysaccharides from *Ziziphus jujube* cv. Huizao: insights into their chemical characteristics and modes of action[J]. Food Chemistry, 2018, 258(30): 35-42.
- [4] Shin M, Lee B M, Kim O, et al. Triterpenoids from *Ziziphus jujuba* induce apoptotic cell death in human cancer cells through mitochondrial reactive oxygen species production[J]. Food Function, 2018, 9(7): 3895-3905.
- [5] Ninave P B, Patil S D. Antiasthmatic potential of *Ziziphus jujuba* Mill. and Jujuboside B: possible role in the treatment of asthma[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2019, 260: 28-36.
- [6] 刘孟军, 王玖瑞, 刘平, 等. 枣树免去雄杂交育种的设计与实践[J]. 园艺学报, 2014, 41(7): 1495-1502.
Liu M J, Wang J R, Liu P, et al. Design and practice of emasculation-free cross breeding in Chinese jujube[J]. Horticultural Plant Journal, 2014, 41(7): 1495-1502.
- [7] Wang J R, Cui X M, Dai L, et al. Hybridization using a new male-sterile germplasm as the female parents in Chinese jujube[J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 2015, 33(3): 396-402.
- [8] 常月梅. 果树多倍体鉴定进展[J]. 山西林业科技, 2000, 3(1): 1-4.
Chang Y M. The advances in identification of fruit tree polyploidy[J]. Shanxi Forestry Science and Technology, 2000, 3(1): 1-4.
- [9] 康向阳. 林木多倍体育种研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(4): 70-74.
Kang X Y. Advances in researches on polyploid breeding of forest trees[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2003, 25(4): 70-74.
- [10] 石荫坪, 王强生, 贾元淑, 等. 枣胚乳三倍体的细胞学: 中国果树资源细胞学研究之六[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 390-395.
Shi Y P, Wang Q S, Jia Y S, et al. Cytology of endosperm-triploid in *Ziziphus sativa*[J]. Wuhan Botanical Research, 1985, 3(4): 390-395.
- [11] 严仁玲, 王震星, 杨恩芹, 等. 金丝小枣花药离体培养再生植株研究[J]. 河北果树, 1996, 3(3): 9-10.
Yan R L, Wang Z X, Yang E Q, et al. Study on in vitro cultured regenerated plants of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. Jinsixiaozao[J]. Hebei Fruit Tree, 1996, 3(3): 9-10.
- [12] 王娜, 刘孟军, 代丽, 等. 秋水仙碱离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1008-1012.
Wang N, Liu M J, Dai L, et al. In vitro tetraploid induction of *Ziziphus jujuba* 'Dongzao' and *Z. acido jujuba* (*Z. spinosa* Hu) with colchicine[J]. Horticultural Plant Journal, 2005, 32(6): 1008-1012.
- [13] Gu X F, Yang A F, Meng H, et al. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Ziziphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua[J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(11): 671-676.

- [14] 宁强, 刘晓光, 刘孟军. 枣多倍体育种研究进展 [J]. 河北林果研究, 2009, 24(3): 305–308.
- Ning Q, Liu X G, Liu M J. Research progress in polyploid breeding of *Ziziphus jujuba* [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 2009, 24(3): 305–308.
- [15] 张源源. 橡胶树座果规律及三倍体诱导研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- Zhang Y Y. Disciplines of fruit-set success and triploid induction of *Hevea brasiliensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013.
- [16] Cui Y H, Hou L, Li X, et al. In vitro induction of tetraploid *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* plants from leaf explants [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 131(1): 175–182.
- [17] Chauvin J E, Label A, Kermarrec M P. In vitro chromosome-doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2005, 80(6): 693–698.
- [18] Ade R, Rai M K. Review: colchicine, current advances and future prospects [J]. *Nusantara Bioscience*, 2010, 2(2): 90–96.
- [19] Eng W H, Ho W S. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review [J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 246: 604–617.
- [20] 马光跃, 陈红玉, 申仲妹, 等. 茶壶枣果形多样性形态学观察 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(2): 9–12.
- Ma G Y, Chen H Y, Shen Z M, et al. Morphological observation of diversity fruit shape in ‘Chahuzao’ variety of Chinese jujube [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2009, 37(2): 9–12.
- [21] 金琪. 枣树再生体系的建立及离体加倍的初步研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- Jin Q. Preliminary study on the system of regeneration and doubling in vitro of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.
- [22] 李和平. 植物显微技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- Li H P. Plant microscopy [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [23] 马春华. 枣叶片再生途径的组织学研究及影响遗传转化因素的分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- Ma C H. Histological studies of leaf regeneration and factors influencing the efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation in *Ziziphus jujube* Mill. [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011.
- [24] Ye Y M, Tong J, Shi X P, et al. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 124(1): 95–101.
- [25] Ma C, Ye X, Chen Y, et al. Anatomical observations of adventitious bud regeneration from leaf explants of *Ziziphus jujuba* Mill. ‘Huizao’ [J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2012, 53(4): 316–319.
- [26] Cai X, Kang X Y. In vitro tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(9): 1771–1778.
- [27] Głowacka K, Jeżowski S, Kaczmarek Z. In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species [J]. *Industrial Crops & Products*, 2010, 32(2): 88–96.
- [28] Zhang Z, Dai H Y, Xiao M, et al. In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. [J]. *Euphytica*, 2008, 159(1–2): 59–65.
- [29] Väinölä A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids [J]. *Euphytica*, 2000, 112(3): 239–244.
- [30] Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 104(3): 359–373.
- [31] Kermani M J, Sarasan V, Roberts A V, et al. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(7): 1195–1200.
- [32] Petersen K K, Hagberg P, Kristiansen K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73(2): 137–146.
- [33] 王岩. 酸枣和茶壶枣不定芽再生体系的建立及多倍体诱导技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2015.
- Wang Y. Optimization of high efficient shoot regeneration system and polyploidy induction in *Ziziphus jujuba* Mill. [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2015.

(责任编辑 冯秀兰
责任编辑 康向阳)