

苹果砧木铁高效基因型筛选

张凌云, 翟 衡, 张宪法, 李 佳

(山东农业大学园艺系, 泰安 271018)

摘要:以国内重要的 11 种苹果砧木为试材, 研究了其对缺铁胁迫的适应性反应及其中 9 种砧木根系对铁的吸收特性, 确定砧木对 Fe 的吸收动力学、根际酸化能力、根系还原能力作为评价铁高效苹果砧木的指标。筛选出 Luo 2、小金海棠、Luo 1 为铁高效基因型苹果砧木; 八棱海棠、茶果为中抗性砧木; 珠眉海棠、黄海棠、青州花红、六蜜海棠、平邑甜茶、山定子为铁低效型砧木。

关键词:苹果砧木; 缺铁胁迫; 抗性; 筛选

Screening of Fe-efficient Apple Rootstock Genotypes

ZHANG Ling-yun, ZHAI Heng, ZHANG Xian-fa, LI Jia

(Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: The adaptability of rootstocks to iron deficiency was investigated with 11 important apple rootstocks, and Fe absorption rate and characteristics of absorption kinetics of 9 apple rootstocks were studied. The iron absorption kinetics parameters, rhizosphere acidification capacity and iron reduction capacity of root were initially selected as the indexes to evaluate Fe-sufficient apple genotypes. Cluster analysis of 11 apple rootstocks according to above-mentioned indexes revealed that Luo2, Luo1, and *M. xiaojinensis* were highly chlorosis-resistant; *M. prunifolia* Borkh, and *M. micromalus* Makino were resistant; *M. robusta*, *M. hupehensis* Rehd, *M. zumi* Rehd, *M. baccata* Borkh were sensitive to chlorosis.

Key words: Apple rootstock; Iron stress; Resistance; Screening

苹果是世界上栽培面积最大的果树树种, 在石灰性土壤以及盐碱地上经常表现缺铁黄化, 严重影响树体正常生长发育及经济产量^[1,2]。在现行经济条件下还难以通过大面积的土壤改良或施肥进行缺铁矫正。自 20 世纪 70 年代以来, 筛选铁吸收利用能力强的基因型已成为研究解决铁营养失调问题的根本途径^[3,4]。本文在前人研究的基础上搜集了几种高抗逆型苹果砧木和几种生产上常用砧木, 进行铁高效基因型砧木筛选, 研究了根系对铁的吸收速率及其对缺铁的适应性反应, 同时对比分析了苹果砧木铁高效基因型的筛选指标。

1 材料与方 法

1.1 材 料

缺铁适应性反应所用试材为 11 种苹果属砧木, 编号为 No. 1: Luo 1, No. 2: Luo 2 (Luo 1、Luo 2,

Malus .-spp, 系山东农业大学罗新书教授培育, 其杂交亲本未公开), No. 3: 小金海棠 (*M. xiaojinensis* Cheng et Jiang), No. 4: 八棱海棠 (*M. micromalus* Makino), No. 5: 茶果 (*M. prunifolia* Borkh), No. 6: 珠眉海棠 (*M. zumi* Rehd), No. 7: 平邑甜茶 (*M. hupehensis* Rehd), No. 8: 黄海棠 (*M. robusta*), No. 9: 青州花红 (*M. asiatica* Nakai), No. 10: 六蜜海棠 (*M. micromalus-spp*), No. 11: 山定子 (*M. baccata* Borkh)。铁吸收动力学试验材料为 No. 1、2、3、4、5、6、7、8、10。

1.2 方 法

1.2.1 苹果砧木铁吸收动力学特性 试验于 1997 年 7 月在山东农业大学进行。取各砧木离体根 1.00g, 用蒸馏水冲净, 以吸水纸擦去根表面的水分, 迅速放入 25ml 吸收液中。在暗中吸收 2h, 其间不时轻轻摇动。采用常规耗减法^[5]进行吸收测定, 吸

收稿日期: 2000-11-15

作者简介: 张凌云 (1973-), 女, 河北易县人, 中国农业大学在读博士生。翟衡为本文联系人, Tel: 0538-8241335; E-mail: heng z @ sdau. edu. cn

收液中的铁源为 Fe-EDTA,铁浓度梯度为:0,0.04,0.05,0.07,0.09,0.11,0.13,0.14mmol/L,其它离子浓度与完全营养液相同,完全营养液配方^[3]采用 Fe-EDTA,浓度为 1.0×10^{-4} mmol/L。利用动力学模型 $I = I_{\max} \cdot C / (K_m + C)$,求出动力学参数 I_{\max} 、 K_m 。每处理重复 3 次。采用原子吸收分光光度法测定溶液中剩余铁含量。

1.2.2 不同苹果砧木的缺铁反应 溶液预培养:将长有 4 片真叶的苹果砧木幼苗从播种苗床中取出,洗净并用蒸馏水冲洗,用吸水纸擦净,置于 100ml 的三角瓶中,加 60ml 完全营养液培养 14d,7d 换一次营养液,充气泵充气。三角瓶用黑色油光纸包裹遮光。

处理:对试材进行完全营养液(+FeEDTA)和缺铁处理 32d,用 0.1mol/L NaOH 调整溶液初始 pH 值为 6.3。每瓶 1 株苗,每处理重复 3 次。在处理 7d 后更换一次营养液,开始生理指标的测定。处理期间每隔 1d 添加蒸馏水,以弥补因蒸发失去的水

分。采用 PHS-3C 数字酸度计,5d 测一次根际 pH 值。试验结束时进行根细胞原生质膜还原力的测定^[6]。

2 结果与分析

2.1 苹果砧木的铁吸收动力学特性

试验证明,9 种砧木的铁吸收速率基本符合 Michaelis-Menten 动力学模式(图 1)。在一定外液浓度内,不同砧木根系的铁吸收速率变化趋势基本一致,即随着外液浓度的提高对铁的吸收速率增大。但吸收能力存在种间差异,以 Luo 2 吸收速率最高,小金海棠、Luo 1 次之,六蜜海棠最低。当溶液中低铁浓度为 0.04 mmol/L 时,Luo 2 吸收速率为 130.8 nmol/(g·s),六蜜海棠仅为 56.9;在高铁浓度(0.14)下,Luo 2 吸收速率是八棱海棠的 1.27 倍,是六蜜海棠的 1.63 倍,说明在铁胁迫下 Luo 2 比其它供试砧木具有较强的吸收能力。

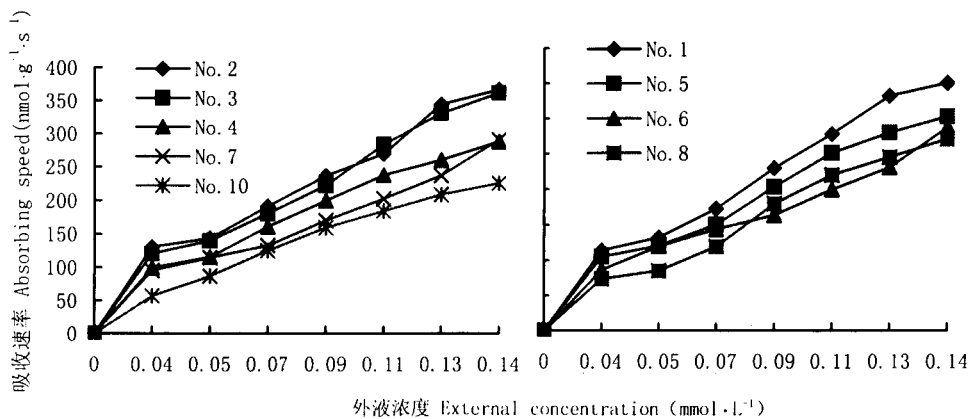


图 1 9 种苹果砧木的铁吸收动力学曲线

Fig.1 The iron absorbing kinetic curve of 9 apple rootstocks

根据动力学模型求出动力学参数(表 1) I_{\max} 、 K_m ,进而求出根系吸收能力 α , $\alpha = I_{\max}/K_m$, α 值越大,表示根系的吸收能力越强。从表 1 数据可以看出,Luo 2 的 α 值显著高于 Luo 1 和小金海棠($P < 0.05$),与其它几种供试砧木的差异达到极显著水平($P < 0.01$)。八棱海棠和茶果的 α 值分别为 Luo 2 的 61.9% 和 57.9%,其余几种砧木的根系吸收能力更差,仅为 Luo 2 的 21.4% ~ 30.6%。该结果说明 Luo 2 根系具有较强的铁吸收能力。

根据 α 值对 9 种砧木进行聚类分析,可将其分成 3 类:第一类 Luo 2,根系吸收能力最强;第二类 Luo 1、小金海棠、八棱海棠、茶果,根系吸收能力中等;第三类为六蜜海棠、平邑甜茶、黄海棠、珠眉海

棠,根系吸收能力较差。

2.2 苹果砧木根际 pH 值的分析

缺铁处理初期各砧木幼苗介质 pH 值变化较小。随着处理时间的延长反应速度和响应能力表现出基因型的差异。Luo 2 在第 10 天溶液 pH 值即表现急剧下降,第 25 天时较初始 pH 值下降 2.32 个单位,与其它砧木相比差异显著(表 2);Luo 1、小金海棠在缺铁处理第 15d 时介质 pH 值急剧下降,第 25 天的下降值分别超过 1.66 和 1.62 个单位;八棱海棠和茶果在缺铁处理后期(20 天)pH 值才明显下降,第 25 天较初始 pH 值下降约 0.7 个单位,但叶片开始黄化。同以上几种砧木相比,6~10 号砧木在缺铁处理期间 pH 值下降极少,在缺铁培养 15d

时开始出现叶片黄化。而 11 号山定子根际酸化能力最弱,第 10 天叶片即开始黄化。

表 1 不同苹果砧木的铁吸收动力学参数比较¹⁾

Table 1 Kinetic parameters of iron absorption of different apple rootstocks

砧木编号 Rootstock No.	最大吸收速率 I _{max} [$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{s})$]	表观米氏 常数 Km ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	吸收力 α
1	2.539	2.188	1.617aA
2	3.424	2.914	1.176cA
3	3.328	2.545	1.307bA
4	3.106	3.102	1.001dB
5	2.963	3.541	0.836dB
6	2.539	5.125	0.496cC
7	2.712	8.126	0.337fC
8	2.428	6.598	0.367fC
10	2.846	8.039	0.354fC

¹⁾大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 显著不同。下同
Capital letters and small letters indicate significance at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. The same as below

2.3 不同砧木根系还原力的测定

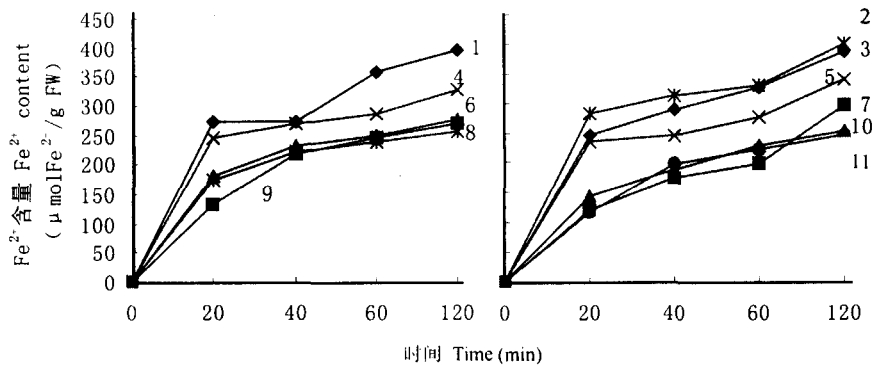
在完全营养液即不缺铁的培养条件下,各砧木根系 Fe^{3+} 还原能力相差不大,均在 $100\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{gFW}$ 左右。缺铁培养 20min, Luo 2、小金海棠、Luo 1、八棱海棠、茶果等根的还原能力即急剧升高(图 2),其中 Luo 2 最高,达 $282.15\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{gFW}$,说明这几种砧

木对缺铁胁迫的应激能力较强,根系 Fe^{3+} 还原能力较高;而平邑甜茶、珠眉海棠、六蜜海棠、青州花红对缺铁胁迫的响应较平缓,以山定子增加幅度最小。随着缺铁胁迫时间的延长,各砧木的还原能力持续增加,以 1、2、3 号增加幅度较大,其他砧木变化和缓。至 120min 时各砧木 Fe^{3+} 还原力达到最大值,其中 Luo 2 最大,为 $400\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{gFW}$,其次为小金海棠和 Luo 1,山定子还原能力最低,仅为 Luo 2 的 61.5%,说明山定子在缺铁胁迫下根系还原能力最弱。

表 2 苹果砧木根际酸化能力比较

Table 2 Comparison of rhizosphere acidification between 11 rootstocks

砧木编号 Rootstock No.	根际 pH 值 Rhizosphere pH			
	10d	15d	20d	25d
1	6.19b	5.76ab	5.41b	4.64b
2	6.01a	5.68a	5.23a	3.98a
3	6.16b	5.70ab	5.32c	4.68b
4	6.25bc	6.16c	5.90d	5.62bc
5	6.23bc	6.17c	5.98d	5.56bc
6	6.27bc	6.22c	6.19e	5.98c
7	6.32c	6.29cd	6.24e	6.14cd
8	6.32c	6.3cd	6.27ef	6.19cd
9	6.30c	6.25c	6.15e	6.04c
10	6.26bc	6.23c	6.16e	6.11cd
11	6.35c	6.28cd	6.26ef	6.24d



1-Luo1, 2-Luo2, 3-小金海棠 Xiaojinhaitang, 4-八棱海棠 Balinghaitang, 5-茶果 Chaguo, 6-珠眉海棠 Zhumeihaitang, 7-平邑甜茶 Pingyitiancha, 8-黄海棠 Huanghaitang, 9-青州花红 Qingzhouhuahong, 10-六蜜海棠 Liumihaitang, 11-山定子 Shandingzi

图 2 不同苹果砧木根系对铁的还原能力

Fig.2 Fe^{2+} reduction capacity for different apple rootstocks

根据根系酸化能力和根系 Fe^{3+} 还原能力对 11 种砧木进行聚类分析,可将其分成 3 类, I 类: Luo 2、Luo 1 和小金海棠,为铁高效基因型砧木; II 类: 茶果和八棱海棠为中抗型砧木;其余属于第 III 类,为铁低效基因型砧木,其中山定子、六蜜海棠抗缺铁能

力最差。

3 讨论

诸多学者对铁高效基因型植物的筛选指标进行了研究^[3,5-7]。由于植物体内影响铁生理代谢的因

素多而复杂,不同树种吸收铁的遗传机制不完全相同,因此,难以用某一个指标来确定铁高效基因型筛选。本试验证实,不同苹果砧木对铁的吸收速率存在基因型上的差异,铁离子吸收动力学参数能反映不同砧木抗缺铁能力大小。苹果铁高效型砧木在缺铁胁迫下能显著降低根际 pH 值,其根系对铁还原酶活性成倍提高,从而提高了对铁的利用率。从试验结果看,以上 3 个指标均适合对苹果砧木铁高效基因型的早期筛选。相比较而言,养分离子吸收动力学采用离体法测定,快速、准确,能客观地反映出不同基因型的铁效率差异,应用也比较广泛;根际酸化能力测定经济、准确,但需要测定时间较长;根系 Fe^{3+} 还原能力测定所用试剂较为昂贵,作为苹果、葡萄铁高效基因型筛选指标目前尚无异议,但能否作为其它双子叶植物铁高效基因型早期筛选指标还需要验证^[7]。已有的研究证明, Fe^{2+} 是植物吸收的主要形态,铁从根向地上部运输的主要途径是木质部运输。铁首先运输进入生长活跃的部位。长期以来,由于对植物基因型潜力认识不足及研究手段的限制,认为铁在植物体内的移动性较差,甚至不能移动^[10]。Mengel 和 Edding 等认为,植物体内铁移动性受植物基因型的差异影响^[11]。本实验也印证了这一点。铁高效基因型 Luo 2 在整个缺铁处理期间叶片未发生黄化,其铁的供应可能来源于根部的积累,即当介质中无可利用的铁时,这些积累的铁能活化运输到正在生长的叶片,维持其正常生理代谢;而铁低效基因型砧木山定子缺铁处理前期叶片即出现黄化,并一直未转绿,说明铁低效基因型植物体内铁的可利用度较低,移动性较差。据罗新书在盐碱地成龄苹果园观察,Luo 2、Luo 1 早春初生叶上很少发生缺铁失绿症,5~6 月份开始发生轻微失绿,但能自动恢复,对树体生长没有影响。因此,铁元素是否也同 C、N 元素相似有贮藏作用,值得研究。

目前生产上常用的砧木如八棱海棠、平邑甜茶等抗缺铁能力中等,不适宜继续在明显缺铁的地区推广使用;山定子抗缺铁能力极差,缺铁黄化严重,不能在缺铁地区使用;小金海棠是近年筛选出的较抗缺铁失绿的砧木,加之其有矮化趋势,是偏石灰质土壤果园推荐使用的砧木^[2,3],但其盆栽幼树表现对白粉病敏感。Luo 2、Luo 1 是罗新书教授历经十余年从山东省丰富的地方苹果砧木资源中选拔培育

出来的砧木新品系,经过在黄河三角洲盐碱地多年的田间对比试验观察到,其抗缺铁黄化能力明显优于对照八棱海棠,用其嫁接的富士和嘎拉苹果品种生长健壮,丰产。经本实验室连续盆栽和室内测定,证明该类砧木抗逆性较强,抗盐^[8]、抗缺铁,其中 Luo 2 抗缺铁及抗盐能力强于小金海棠,是目前国内外报道的砧木中抗性最好的一种,适合在中度盐碱地及缺铁地区推广使用。其他抗性,如抗旱性正在测试之中。

References:

- [1] Chen Y, et al. Iron nutrition plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* 1982,35:217-240.
- [2] Han Z H, et al. Current situation and foreground of Fe-efficient Gene-type fruit tree. *Annu. Rev. Horti. Sci. Beijing: Science Press*, 1995; 11-16. (in chinese)
韩振海,等. 不同铁效率果树基因型研究的现状和前景. 园艺学年评. 北京:科学出版社,1995:11-16.
- [3] Han Z H, et al. Iron absorption kinetics for Fe-efficient vs. -inefficient species in *Malus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995,22(4):313-317. (in Chinese)
韩振海,等. 铁高效及低效苹果基因型的铁离子吸收动力学研究. 园艺学报,1995,22(4):313-317.
- [4] Zhai H, et al. Screening of Fe-efficient grapevine rootstocks and identification index. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999,32(6):34-39. (in Chinese)
翟衡,等. 抗缺铁葡萄砧木的鉴定及指标筛选. 中国农业科学,1999,32(6):34-39.
- [5] Ni J S, et al. Kinetic analysis of NH_4^+ and K^+ uptake in seeding of hybrid rice. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1984,10(4):381-390. (in Chinese)
倪晋山,等. 三系杂交稻幼苗 NH_4^+ 、 K^+ 吸收的动力学分析. 植物生理学报,1984,10(4):381-390.
- [6] Chaney R L. Obligatory reduction of ferric chalets in iron uptake in maize root segments. *Plant Physiol.* 1972,50:208-213.
- [7] Hagstrom G R. Current management practice for correcting iron deficiency in plants with emphasis on soil management. *J. Plant Nutri.* 1984,7:23-46.
- [8] Jolley V D, et al. Root iron-induction capacity for genotypic evaluation of iron efficiency in soybean. *J. Plant Nutri.* 1992,5:1679-1690.
- [9] Zhai H, et al. Identification of apple rootstock sail tolerance. *J. Shandong Agriculture University*, 1999, 30(3):296. (in Chinese)
翟衡,等. 苹果砧木耐盐性鉴定. 山东农业大学学报,1999,30(3):296.
- [10] Zhang F S. *Environment Stress and Plant Nutrition*. Chinese Agriculture University Press, 1998,151. (in Chinese)
张福锁. 环境胁迫与植物根际营养. 北京:中国农业大学出版社,1998:151.
- [11] Mengel K, et al. Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis. *J. of Plant Nutri.* 1986,9(3-7):161-173.