

王 夏,孙菲菲,邴月红,等. 不结球白菜同源四倍体种质创建及特性研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):173-175.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.050

不结球白菜同源四倍体种质创建及特性研究

王 夏,孙菲菲,邴月红,王 强,孙雪花,刘庆叶

(南京市蔬菜科学研究所,江苏南京 210042)

摘要:利用优良二倍体不结球白菜华凤为试验材料,采用秋水仙素活体诱导其生长点,旨在创建同源四倍体种质。通过形态学比较、流式细胞仪测定遗传物质含量等方法鉴定了变异植株倍性,从中筛选获得了同源四倍体。在此基础上,选取3个优异同源四倍体自交系为研究对象,发现四倍体的营养品质提高,花期延长约10 d,结实率达到了应用的水平。研究表明,不结球白菜同源四倍体种质具有良好的应用前景。

关键词:不结球白菜;同源四倍体;秋水仙素;种质创新

中图分类号: S634.302 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0173-03

不结球白菜别称青菜、小白菜,是我国广泛种植的蔬菜种类,如今正逐渐成为世界性蔬菜。不结球白菜营养丰富、适应性强、生长快速、易种植,特别适合作为稳定蔬菜价格的“扛杆”类蔬菜种植。因此选育耐热耐抽薹的不结球白菜新品种具有促进不结球白菜生产的意义,而多倍体独特的基因剂量效应促使多倍体在抗逆性上具有更强的优势,目前在不结球白菜新品种选育中已经有所应用,四倍体矮脚黄、热优2号等品种已经走向市场^[1]。四倍体不结球白菜通常具有植株个体增大、营养价值提高、抗逆性增强等优点,但是具有多倍体常见的育性下降、制种产量低等不足,如1个成熟的四倍体往往需要经过6~7代的驯化,才能基本达到生产应用的水平^[2]。因此,我们认为将四倍体作为新的种质资源,利用多倍体在基因突变、远缘杂交、固定杂种优势等方面的特点更加有效。本研究利用已有的技术手段,通过综合应用,将为不结球白菜异源四倍体种质创新构建高效的方法。

收稿日期:2015-01-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201634);江苏省自然科学基金(编号:BK2012074);江苏省南京市科技计划(编号:2013403S)。
作者简介:王 夏(1985—),男,江苏南京人,硕士,农艺师,主要从事萝卜、小白菜育种研究。E-mail:woshixia2008@126.com。
通信作者:孙菲菲,博士,高级农艺师,主要从事小白菜、萝卜育种研究。E-mail:ffsun_2044@163.com。

响更为敏感,而欧美杂交种葡萄的镉污染耐受性更强,需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] 邵小杰,杨洪强. 氯化镉胁迫下葡萄根系生理反应的品种差异[J]. 中国农业科学,2010,43(12):2485-2490.
- [2] 李小红,陶建敏,陈剑东,等. 镉胁迫对不同砧穗组合葡萄植株镉吸收规律和果实品质的影响[J]. 生态环境学报,2010,19(5):1082-1086.
- [3] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为二倍体青梗菜品种华凤,由广州农鑫农业科技有限公司销售。四倍体矮脚黄由南京农业大学提供。试验于2012年9月20日至2014年5月26日在南京市蔬菜科学研究所横溪蔬菜科技园进行。

1.2 四倍体诱导

2012年9月20日穴盘育苗200株,出苗后间苗、齐苗。待子叶展开,尚未破心之前用0.2%秋水仙素溶液点滴生长点,每次20 μ L,每天上、下午各处理1次,处理2 d^[3]。

1.3 四倍体鉴定筛选方法

1.3.1 形态学鉴定 形态学鉴定的原则是肉眼可见,主要包括叶形、叶色、花器官、角果、种子等。在形态学鉴定筛选过程中,将可疑株一律拔除。

1.3.2 群体筛选 2013年9月25日,将一代自交种子按单株播种,调查群体的一致性。嵌合体在加倍过程中普遍存在,虽然通过形态学鉴定之后,部分被淘汰,但不一定完全。因此,在群体调查过程中,淘汰具有明显分离现象的群体。

1.3.3 流式细胞仪倍性分析 流式细胞仪分析法可迅速测定细胞核内DNA的含量和细胞核的大小,是大范围鉴定倍性快速有效的方法。测定由南京农业大学协助完成,方法参考文献[4]。每个群体随机抽取5株进行测定,以二倍体为

- [4] 蔡 冲. 植物生物学实验[M]. 北京:北京师范大学出版社,2013.
- [5] 蔡 冲,陈昆松,贾惠娟,等. 乙酰水杨酸对采后玉露桃果实成熟衰老进程和乙烯生物合成的影响[J]. 果树学报,2004,21(1):1-4.
- [6] Cutraro J, Goldstein N. Cleaning up contaminants with plants [J]. Biocycle, 2005, 46: 30-32.
- [7] 张 微,吕金印,柳 玲,等. 不同基因型番茄幼苗对镉胁迫的生理响应及镉吸收差异[J]. 农业环境科学学报,2010,29(6):1065-1071.
- [8] Kim Y Y, Yang Y Y, Lee Y S. Pb and Cd uptake in rice roots [J]. Physiology Plant Arum, 2002, 116: 368-372.

对照。

1.4 四倍体留种

对鉴定为四倍体的诱变植株 M_0 代,进行严格的单株蕾期人工授粉。2013 年 5 月单株收种 M_1 代并统计结实率,同年 9 月选择结实性高的单株播种,每株系自成小区。从叶柄宽、厚,叶色亮绿、束腰紧凑的株系中筛选优质单株严格自交留种,统计单株结实率(结实率 = 结籽数/角果数)。2013 年 9 月重复上述步骤,收获 M_2 代自交种。 M_1 、 M_2 代小区试验面积 $3\text{ m} \times 2\text{ m}$,定植数量 80 棵,10 月下旬定植,12 月中下旬采收。

1.5 四倍体营养品质调查

2013 年 11 月 5 日选取标准棵菜进行测定,叶片和叶柄 2 个部位分开进行,3 次重复,测定样品选取部位一致。营养品质测定的指标有可溶性蛋白质含量、可溶性糖含量、硝态氮含量、维生素 C 含量、粗纤维含量。考马斯亮蓝 G-250 染色法测蛋白质含量;蒽酮-硫酸比色法测定可溶性糖含量;水杨酸比色法测定硝态氮含量;液相色谱法测定维生素 C 含量^[5-8];粗纤维含量测定参考康琪等的方法^[9]。数据使用 Excel 分析。

1.6 四倍体育性调查

2014 年春季观察四倍体花期情况并单株套袋自交留种,以四倍体矮脚黄为对照。

2 结果与分析

2.1 多重筛选的效果

受低温影响,200 株处理植株中 15% 死亡,30% 的植株受冻害影响严重,生长缓慢,营养生长积累不足,但对照生长正常。形态学鉴定过程中淘汰 30% 植株,主要是疑似嵌合体 and 畸形体。套袋自交之后,结籽单株 44 株,占总处理的 22%,其中种子数量超过 25 粒的 28 株,占总处理的 14%;种子数量超过 50 粒的 16 株,占总处理的 8%;种子数量超过 100 粒的 3 株,占总处理的 1.5%。将种子量达到 50 粒的播种育苗定植,其中无分离群体 10 个,挑选了其中 3 个群体进行抽样调查,进行形态学比较和流式细胞仪分析。

2.2 二倍体、四倍体形态学比较

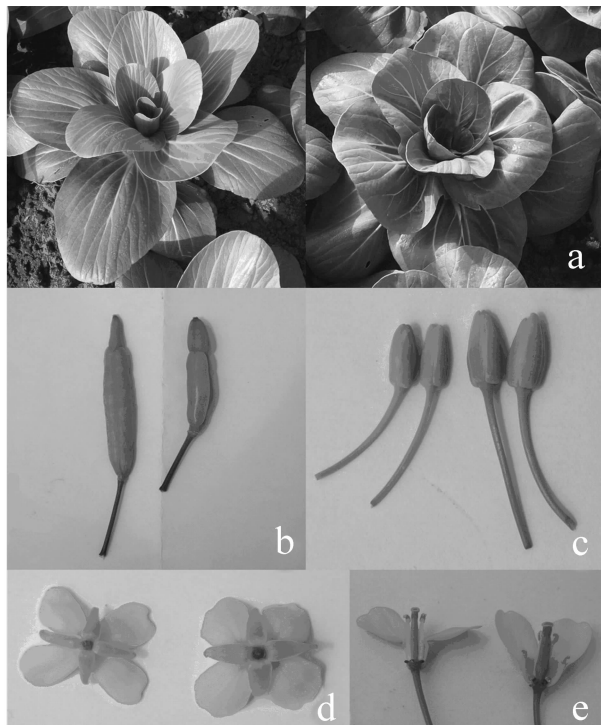
四倍体在不同生长时期形态上的变化很多,特征典型,这也是四倍体筛选的重要一步。相对于二倍体,四倍体的叶片肥厚、色泽加深、花朵变大、果荚变小、种子增大(图 1)。

2.3 流体细胞仪倍性分析

在多重筛选的基础之上,流式细胞仪分析结果显示来自 3 个群体的 15 株植株都是四倍体。图 2 中纵坐标 Count 值代表测定细胞数的相对值,横坐标 FL3 值代表荧光的通道值,峰值的位置反映的是测试样品的倍性。杂合二倍体 DNA 相对含量在 80 和 180 附近,疑似株 DNA 相对含量在 160 和 360 附近,约是对照的 2 倍,表明是四倍体。因此,通过对杂交小白菜品种华凤的加倍,成功创建了新的异源四倍体种质,命名 4X。

2.4 二倍体、四倍体品质调查

四倍体不结球白菜品质优于二倍体,其中四倍体叶柄部分比二倍体叶柄部分的可溶性糖含量增加 11.35%,差异极显著;维生素 C 含量增加 28.57%,差异不显著;硝酸盐含量



a—二倍体(左)和四倍体(右)植株; b—二倍体(左)和四倍体(右)角果; c,d,e—二倍体(左)和四倍体(右)花器官

图1 二倍体与四倍体不结球白菜形态学比较

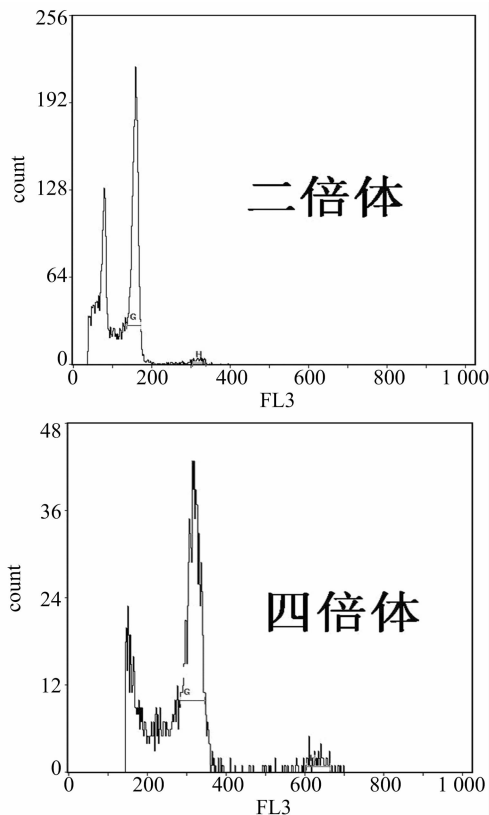


图2 不结球白菜叶片的 DNA 相对含量曲线

降低 11.64%,差异不显著;可溶性蛋白质含量增加 75%,差异极显著;粗纤维含量降低 31%,差异显著。四倍体叶片部分比二倍体叶片部分的可溶性糖含量增加 40.74%,差异显著;维生素 C 含量增加 53.15%,差异显著;硝酸盐含量降低

10.16%,差异不显著;可溶性蛋白质含量增加 27.48%,差异显著;粗纤维含量降低 27.31%,差异极显著(表 1),这与邓

云等的研究结果^[10]相似。

表 1 二倍体、四倍体不结球白菜品质指标测定结果

器官	试验材料	可溶性糖含量 (mg/g)	维生素 C 含量 (mg/g)	硝酸盐含量 (mg/g)	可溶性蛋白质含量 (mg/g)	粗纤维含量 (mg/g)
叶柄	华凤	0.65	0.14	2.97	0.60	19.50
	4X	0.73**	0.18	2.62	1.05**	13.45*
叶片	华凤	0.27	1.11	2.84	19.41	25.15
	4X	0.38*	1.70*	2.56	24.75*	18.28**

注: * 表示 *t* 检验在 0.05 水平上差异显著; ** 表示 *t* 检验在 0.01 水平上差异显著。

2.5 异源四倍体花期与结实率调查

田间观察比较发现,四倍体与二倍体 F₁ 的始花期基本一致,但四倍体 3 个姊妹系的花期比二倍体长 10 d 左右。四倍体不同单株之间结实率有差异,但与四倍体矮脚黄对比,结粒情况相似。

3 讨论

蔬菜多倍体育种是蔬菜育种的一条重要途径。多倍体育种在不结球白菜品种选育中取得了巨大的成果,但已报道的不结球白菜加倍处理多利用自交系材料,本研究中利用 F₁ 杂合体进行加倍,形成同源四倍体是一种新的尝试。采用杂合体进行加倍,能够快速聚集亲本的优良性状,保证了四倍体种质价值的同时缩短了时间。另外, F₁ 杂合体比多世代自交系具有更强的生长势,实际生长中的一致性更容易体现,对材料中的二倍体杂株和异常株的剔除相对更加容易,但是高纯度的 F₁ 杂合体种子的获取难度相对较大,尤其是手工配制产生的 F₁ 材料,需要高纯度的自交系亲本和人工剥蕾杂交,收集的种子除了加倍试验,还需要考虑多代的对照材料问题。

加倍之后的四倍体鉴定筛选是四倍体种质创新的关键,通常包括形态学比较、染色体计数、流式细胞仪分析等^[11]。二倍体加倍之后,由于基因剂量效应,植株器官发生变化,抗逆性能增强,而形态学比较及逆境胁迫筛选是在此基础之上的合理运用,如在西瓜四倍体鉴定中,温度胁迫筛选的方法鉴定的倍性符合度超过 80%^[12]。通过比较自然低温条件下不结球白菜二倍体与四倍体可溶性糖、可溶性蛋白质的变化规律,发现四倍体比二倍体更加耐寒^[3],这一研究结果也表明温度筛选不结球白菜也是可能的,只是目前不结球白菜低温胁迫与四倍体筛选的方法尚不完备,还需进一步研究。

不结球白菜四倍体的育性一般低于二倍体,这是因为在染色体加倍的过程中,由于基因重复,基因重组与变异大量发生,使原有的基因表达调控机制产生了暂时的紊乱,而四倍体经过多代的驯化,育性往往又能够进一步恢复^[13]。同时每个植株在加倍过程中产生的基因重组与变异是不同的,因此我们认为在创建四倍体种质的过程中,首先需要筛选的是具有

较好育性的材料,对四倍体初代开始通过套袋自交、辅助传粉的处理手段,在一种苛刻的选择条件下筛选适合的育种材料,既减少了工作量,也有助于得到育性较好的个体,为四倍体种质资源的利用打下基础。在此研究中得到的四倍体材料具有营养品质提高、花期延长、结实率较高等特点,作为育种材料将具有良好的应用前景。

参考文献:

[1]刘惠吉,王 华,肖守华. 四倍体不结球白菜热优 2 号的选育[J]. 南京农业大学学报,1992,15(2):39-44.

[2]刘惠吉. 蔬菜作物多倍体研究及应用[J]. 长江蔬菜,1995(3):3-5.

[3]张振超. 耐寒、晚抽薹四倍体不结球白菜的创制及生物学特性研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.

[4]张振超,张蜀宁,张 伟,等. 四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定[J]. 西北植物学报,2007,27(1):28-32.

[5]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.

[6]孔祥生,易现峰. 植物生理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2008:160-177.

[7]张治安,陈展宇. 植物生理学实验技术[M]. 长春:吉林大学出版社,2008:100-125.

[8]李 玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009:48-58.

[9]康 琪,朱若华. 膳食纤维的测定原理和方法[J]. 现代仪器,2007(6):1-5.

[10]邓 云,张蜀宁,孙敏红,等. 采用秋水仙碱创制优质、抗热同源四倍体不结球白菜[J]. 武汉植物学研究,2006,24(2):159-162.

[11]王惠利,赵晓明. 二倍体与四倍体金银花减数分裂观察[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):211-214.

[12]刘文革,王 鸣. 西瓜甜瓜育种中的染色体倍性操作及倍性鉴定[J]. 果树学报,2002,19(2):132-135.

[13]尚瑛男,杨鹏鸣. 园林植物同源四倍体的遗传特性[J]. 现代农业科技,2010(15):234-235.