

万何平,何冰冰,陈敬东,等.一种高通量鉴定甘蓝型油菜耐低氮种质的方法及其应用[J].江苏农业科学,2021,49(19):78-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.19.013

一种高通量鉴定甘蓝型油菜耐低氮种质的方法及其应用

万何平,何冰冰,陈敬东,戴强强,曾长立

(湖北省江汉流域特色生物资源保护开发与利用工程技术研究中心/江汉大学生命科学学院,湖北武汉 430056)

摘要:构建了一套高通量的油菜水培平台,以 104 份甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)种质为研究材料,采用该水培平台研究测定不同油菜品种(系)苗期在高氮(10 mmol/L)和低氮(0.6 mmol/L)供应水平下的生长情况,并对 104 份甘蓝型油菜品种(系)的耐低氮胁迫能力进行分级。结果显示,与高氮水平相比,低氮环境能够显著抑制甘蓝型油菜的生长,且不同基因型材料间的抑制程度存在广泛遗传变异。通过叶片数比值、地上部分长度比值和地上鲜质量比值进行聚类分析,共将 104 份油菜品种(系)分为低氮耐受型、低氮敏感型和中间型 3 个等级,其中 7 个低氮耐受型品种,65 个低氮敏感型品种,剩下 32 个为中间型,为油菜低氮耐受能力的遗传改良提供了理论基础和种质资源。

关键词:甘蓝型油菜;氮高效;低氮胁迫;聚类分析

中图分类号:S634.303

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2021)19-0078-06

氮是植物生长所必需的大量元素之一,它对植物代谢、产量和品质的形成具有重要作用。据估计,全球谷物增长的将近 1/2 归因于氮肥的施用^[1]。农作物只能吸收约 1/2 的农业氮肥,土壤中残留的大量氮会导致严重的生态问题,如土壤酸化、水富营养化等^[2-3]。油菜是我国重要的油料作物之一,种植面积约 670 万 hm²/年,产菜籽油约 500 万 t/年,约占自产植物油总量的 45% 以上^[4-5]。与其他农作物相比,油菜生长期间需要大量投入肥料,尤其是氮肥,然而油菜的氮利用效率却很低^[6-7]。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是 3 种油菜(白菜型油菜、芥菜型油菜、甘蓝型油菜)中种植范围最广的种类型,是我国重要的油料作物^[5]。近年来,为了适应经济发展的需求,油菜的用途已从油用为主,逐渐发展为蔬菜、观赏、饲料等多功能用途^[8]。其中,依托油菜花海打造农业观光旅游正成为各大投资商关注的新热点,目前已经打造的有江西婺源、陕西汉中、江苏兴化、湖北荆门、云南罗平、重庆潼南和青海门源等 15 个油菜观赏基地^[9-10]。随着美丽乡

村建设的推进,全国各地还涌现出一大批以油菜花为主题的景观。在此大的背景下,急需筛选出适应性广、耐低氮的油菜品种(系),以降低油菜花海景观的种植成本。

目前,对于不同作物的氮高效种质的筛选研究主要包括苗期筛选和全生育期筛选。但全生育期筛选由于周期长、易受到环境因子的影响,难以真正全面地反映出作物对低氮的耐受能力。因此,更多的研究是在苗期对作物进行初筛,再用全生育期加以验证^[11]。近年来,关于油菜氮高效基因型种质和高效机理的研究已取得了一些研究进展^[12-14]。洪娟利用土培的方法对 100 份油菜种质在低氮和氮正常条件下地上部干质量、叶片数、叶片叶绿素含量、含氮量和氮累积量进行考察,初步筛选出氮高效和氮低效油菜种质各 3 份,认为生物量积累和氮素积累量是评价油菜苗期氮高效的可靠指标,叶片数可作为参考指标^[15]。顾焱明等利用营养液培养的方法考察了 162 份油菜种质在低氮和氮正常条件下的生物量、主根长、侧根长、根冠比、氮累积量及氮吸收和利用效率,初步将 162 份油菜种质按氮效率分成了 3 类,其中双高效型 23 份、双低效型 28 份、中间型 111 份,同样认为生物量积累是评价油菜苗期氮高效的可靠指标^[16]。究其原因,生物量积累是油菜生长发育最终结果的体现,能综合反映出植株在低氮环境下的生长情况^[12]。

目前,筛选鉴定油菜氮高效的栽培方式主要为水培和土培,其中水培技术由于其能够精准控制营

收稿日期:2021-04-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0100202-25);湖北省江汉流域特色生物资源保护开发与利用工程技术研究中心开放基金(编号:06450003);江汉大学博士启动基金(编号:06450002)。

作者简介:万何平(1988—),男,湖北武汉人,博士,讲师,主要从事油菜遗传研究。E-mail:362057164@qq.com。

通信作者:曾长立,博士,教授,主要从事油菜种质资源鉴定与利用。

E-mail:973345988@qq.com。

营养成分的含量,已被成功应用于油菜肥料利用效率的研究上^[14,17]。但是,目前的油菜水培技术还存在规模小、通量低、控制成本高等不足,无法满足对大规模油菜种质资源的筛选鉴定要求。为此,本研究建立了一套高通量的油菜水培系统,利用该平台对 104 份甘蓝型油菜种质进行耐低氮能力的筛选鉴定,在此基础上筛选获得耐低氮的油菜品种(系),为油菜氮高效遗传改良提供了理论基础和种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验供试材料包括 104 份甘蓝型油菜核心种

质,由中国农业科学院油料作物研究所伍晓明研究员提供,主要来自我国各油菜主产区的地方品种(系)、育种材料和栽培品种(系),油菜种质适应性强,具有广泛的遗传多样性。

1.2 试验设计及表型鉴定

为了尽可能减少栽培环境对试验结果的影响,本试验建立了一套同时可容纳超过 3 000 株油菜幼苗的精准化控制水培系统(培养池的长、宽、高分别为 12.5、0.8、0.4 m),主要包括营养液补充系统、营养液循环系统、空气泵和补光系统等(图 1),并利用该系统对 104 份甘蓝型油菜进行种植。本试验于江汉大学湖北省汉江流域生物资源与利用工程中心的油菜水培实验室内进行。

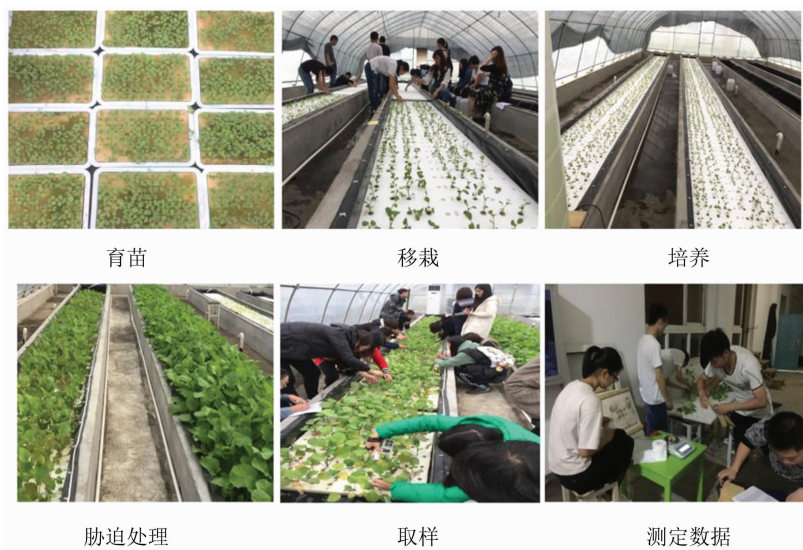


图1 甘蓝型油菜水培法鉴定流程

甘蓝型油菜水培法的具体步骤如下。

(1)播种。用干净的尼龙绳将长、宽、高分别为 60、40、12 cm 的蓝色盆子分成 60 格,并在最上面铺上 1 层无菌纱布。向苗床内加满纯水保证纱布浸湿,将 104 份甘蓝型油菜材料均匀播撒到对应的小格中并记下编号,每个材料播种约 50 粒。

(2)制作培养板。将 2 cm 的高密度泡沫板制成 60 cm × 100 cm 规格的培养板,培养板上用打孔器均匀打出 140 个直径约为 2 cm 的圆形小孔。将厚度约为 2 cm 的海绵剪成边长约为 2.5 cm 的方块,并将海绵方块沿 1 条对角线剪开 1 个小口用来固定幼苗。

(3)移苗和营养管理。配制经改良的适合甘蓝型油菜水培的营养液^[18]。播种 7 d 后将甘蓝型油菜幼苗从纱布上取出,用海绵方块夹住下胚轴基

部,然后移植至培养板上的小孔中并贴上标签,每个材料取 48 株生长一致的幼苗,分别移栽至 6 个培养板中,每个培养板移栽 8 株,其中高氮处理 3 板、低氮处理 3 板。最后将固定有幼苗的培养板放置在 2 个装有 1/4 全营养液的培养池(营养液总体积为 1 000 L)中进行培养。1 周后更换 1/2 全营养液,再过 1 周后更换全营养液。

(4)不同氮浓度胁迫处理。幼苗移栽 21 d 后进行不同氮水平处理,设置高氮(10 mmol/L)和低氮(0.6 mmol/L)2 个处理,具体营养液浓度见表 1。

(5)表型考察与数据分析。不同氮处理 21 d 后测定甘蓝型油菜苗的叶片数(NL)、地上长度(SL)、地上部分鲜质量(SFW)。为了消除不同甘蓝型油菜的基因型背景差异,计算 3 个性状的低氮耐受指数(LNT - NL、LNT - SL和LNT - SFW,其为低氮条

表 1 不同氮处理营养液浓度

化学试剂名称	浓度 (mg/L)	
	高氮处理	低氮处理
KNO ₃	1 010.0	60.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	490	490
KH ₂ PO ₄	140	140
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0	0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	13.995	13.995
EDTA - 2Na	18.61	18.61
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.905	0.905
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.11	0.11
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.04	0.04
H ₃ BO ₃	1.43	1.43
Na ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	0.045	0.045
KCl	0	354.85
CaCl ₂	1 180	1 180

注:营养成分中除 KNO₃ 和 Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 的用量减少为 NO₃⁻ 浓度为 10 mmol/L 和 0.6 mmol/L 外,其他同高氮处理,为保证试验的准确性,减量的钾和钙以 KCl 和 CaCl₂ 的形式补充。

件下的性状值与对照条件下性状值的比值^[14,19])。所有数据用 SPSS 22.0 进行分析处理,图片使用 Origin 8.0 和 R 软件制作。

2 结果与分析

2.1 不同氮水平条件下甘蓝型油菜品种(系)表型分析

如表 2 所示,在低氮处理条件下,甘蓝型油菜幼

表 2 104 份甘蓝型油菜品种(系)在不同氮水平下 3 个性状的描述性统计

性状	极差	最小值	最大值	平均值	标准差	变异系数 (%)
低氮叶片数(张)	6.55	3.20	9.75	4.93 **	0.93	18.78
高氮叶片数(张)	7.33	5.00	12.33	6.94	1.15	16.51
叶片数耐受指数	0.39	0.55	0.93	0.71	0.08	11.01
低氮地上长度(cm)	11.92	10.38	22.30	15.98 **	2.27	14.21
高氮地上长度(cm)	13.08	14.46	27.53	21.94	3.18	14.48
地上长度耐受指数	0.35	0.61	0.89	0.73	0.07	9.43
低氮地上鲜质量(g)	10.68	1.79	12.47	4.26 **	1.28	29.98
高氮地上鲜质量(g)	21.04	5.61	26.65	10.91	3.31	30.36
地上鲜质量耐受指数	0.80	0.21	0.73	0.41	0.13	31.57

注: ** 表示差异达 1% 水平显著。

2.2 甘蓝型油菜品种(系)各性状间的相关性分析

如图 3 所示,LNT - NL 与低氮叶片数、低氮地上鲜质量和 LNT - SFW 呈极显著正相关;LNT - SL 与低氮叶片数、低氮地上长度、低氮地上鲜质量以

苗的 NL 的平均值为 4.93 张,变化范围为 3.20 ~ 9.75 张,变异系数为 18.78%;SL 的平均值为 15.98 cm,变化范围为 10.38 ~ 22.30 cm,变异系数为 14.21%;SFW 的平均值为 4.26 g,变化范围为 1.79 ~ 12.47 g,变异系数为 29.98%。在高氮条件下,甘蓝型油菜幼苗的 NL 的平均值为 6.94 张,变化范围为 5.00 ~ 12.33 张,变异系数为 16.51%;SL 的平均值为 21.94 cm,变化范围为 14.46 ~ 27.53 cm,变异系数为 14.48%;SFW 的平均值为 10.91 g,变化范围为 5.61 ~ 26.65 g,变异系数为 30.36%;各性状在低氮环境下的表型值均极显著低于高氮环境下的表型值。在 2 种氮营养水平下,NL、SL 和 SFW 都呈现连续性分布(图 2),说明这些性状都符合数量性状特征。

3 个低氮胁迫耐受指数(LNT - NL、LNT - SL 和 LNT - SFW)呈现出较大的遗传变异,LNT - NL 的平均值为 0.71,变化范围为 0.55 ~ 0.93,变异系数为 11.01%;LNT - SL 的平均值为 0.73,变化范围为 0.61 ~ 0.89,变异系数为 9.43%;LNT - SFW 的平均值为 0.41,变化范围为 0.21 ~ 0.73,变异系数为 31.57%。结果表明,低氮胁迫环境对不同甘蓝型油菜品种叶片数、地上长度和地上鲜质量的抑制效果存在显著差异,其中地上鲜质量受影响最大。此外,3 个耐低氮指数性状均符合连续型正态分布的特征(图 2),说明油菜耐低氮性状符合数量性状的遗传特征。

及 LNT - SFW 呈显著正相关,LNT - SL 与高氮地上长度呈显著负相关;LNT - SFW 与低氮叶片数、LNT - NL、LNT - SL 以及低氮地上鲜质量呈显著正相关性,与高氮地上长度和高氮地上鲜质量呈显著

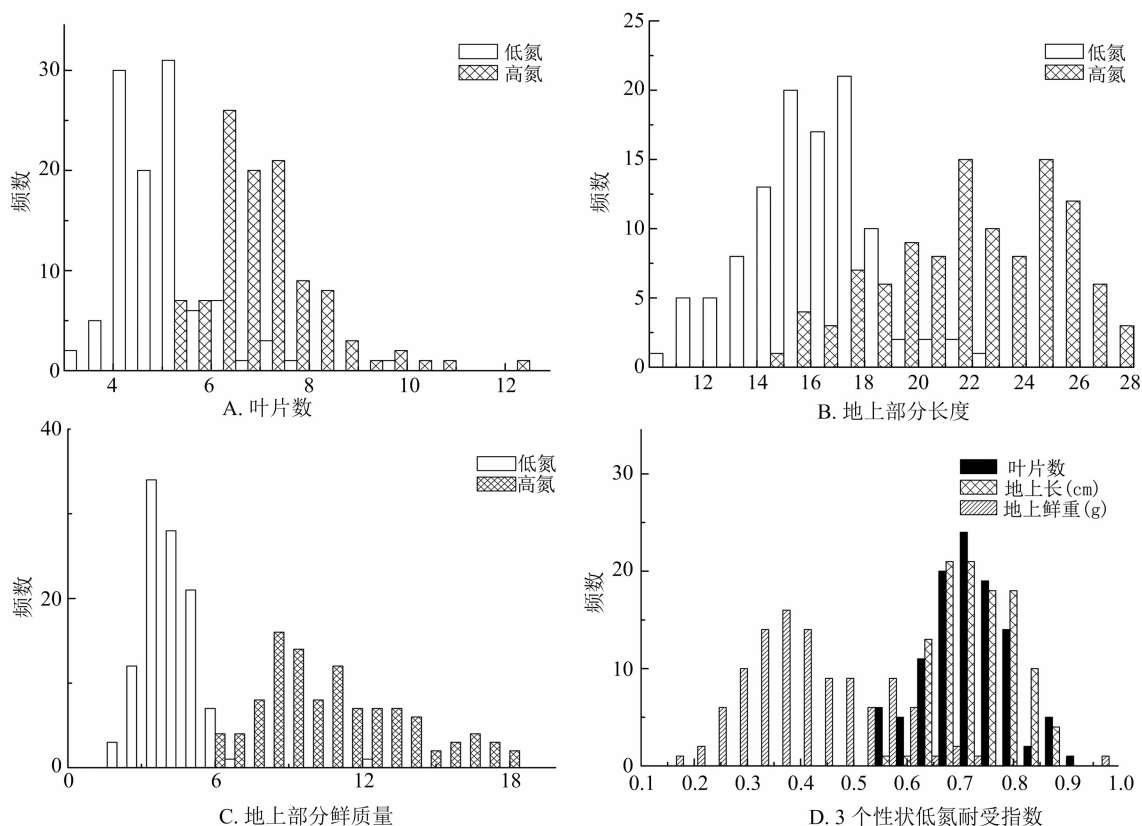
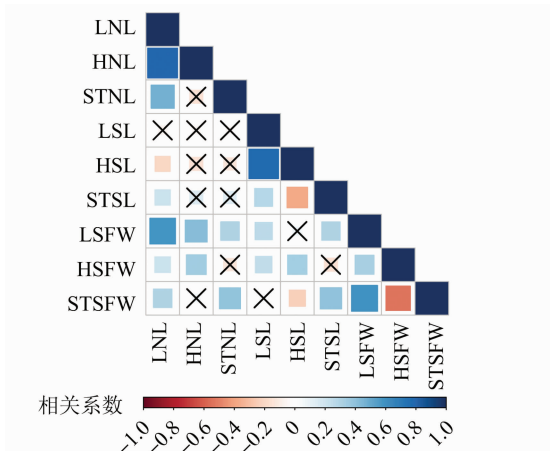


图2 104 份甘蓝型油菜品种在低氮和高氮条件下 3 个性状的频数分布直方图



LNL—低氮叶片数; HNL—高氮叶片数; LSL—低氮地上长度; HSL—高氮地上长度; LSWF—低氮地上鲜质量; HSWF—高氮地上鲜质量; LNT—低氮耐受指数; 方形的大小及颜色深浅代表相关系数的大小, 方形越大颜色越深则相关系数的绝对值越大; 方形的颜色代表相关性的正负情况, 其中蓝色表示正相关, 红色表示负相关; ×表示在 0.05 水平不显著

图3 不同氮处理条件下甘蓝型油菜各性状的相关性分析

2.4 甘蓝型油菜低氮胁迫耐受能力的初步分级

根据 LNT - NL、LNT - SL 和 LNT - SFW 性状对 104 份甘蓝型油菜进行聚类分析, 结果如图 4 所示, 104 份材料被分成了三大类, 其中 7 个材料划分为低氮耐受型品种(系)(表 3), 其 $LNT - NL \geq 0.8$, $LNT - SL \geq 0.68$, 且 $LNT - SFW \geq 0.41$; 65 个材料被划分为低氮敏感型品种(系), 这些材料的 LNT - NL 和 LNT - SL 普遍在 0.7 以下, 且 LNT - SFW 普遍在 0.4 左右, 表现为对低氮敏感。剩下 32 个材料则被划分为中间型材料。

3 讨论与结论

作物耐低氮性状是由多基因调控的数量性状, 基因与环境之间存在着明显的相互作用, 易受非遗传因素的影响^[20-21]。因此, 选择正确的评价方法是获得准确表型的关键。目前, 甘蓝型油菜耐低氮种质的筛选方法主要有田间试验法和盆栽模拟试验法^[22-23]。盆栽模拟试验按生长介质的不同可分为土培试验法和水培试验法。其中, 土培盆栽试验更接近实际生产, 是筛选耐低氮基因型最直接、最可靠的方法, 但难以进行根系形态和生理生化特性的研究^[24]。

负相关; LNT - NL 和 LNT - SFW 间呈显著正相关; LNT - SL 和 LNT - SFW 间呈显著正相关, 而 LNT - NL 和 LNT - SL 之间不存在相关性。

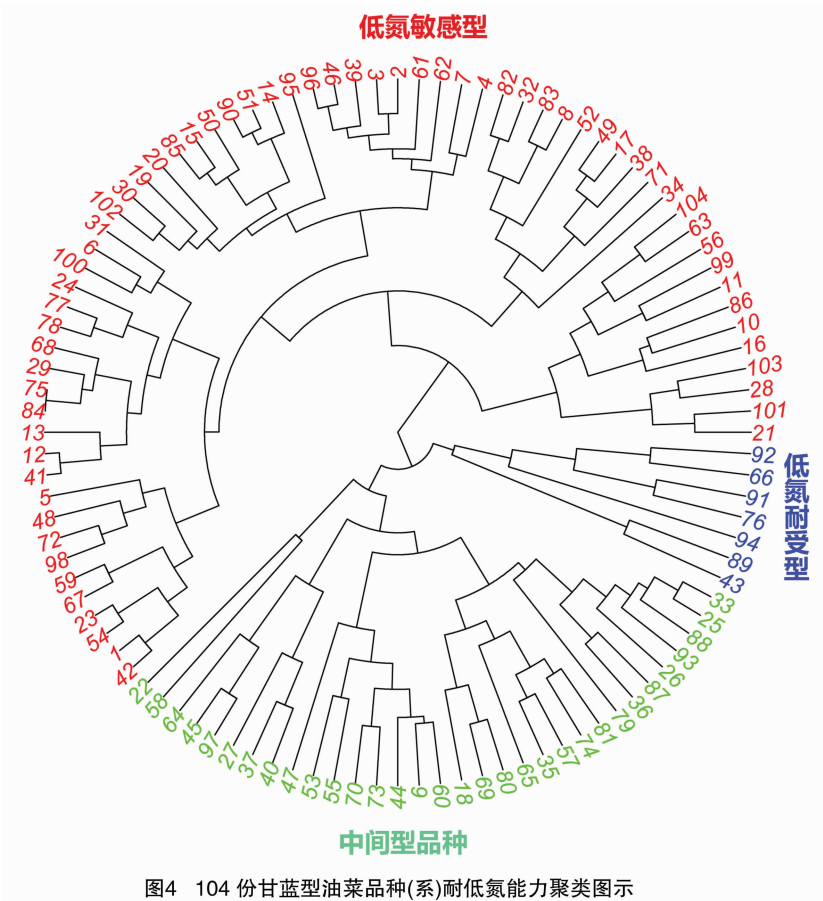


图4 104 份甘蓝型油菜品种(系)耐低氮能力聚类图示

表 3 低氮耐受型甘蓝型油菜品种

材料编号	叶片耐受指数	地上长度耐受指数	地上鲜质量耐受指数	甘蓝型油菜品种(系)
92	0.88	0.78	0.45	96628
66	0.85	0.83	0.41	H25
91	0.86	0.80	0.57	96786
76	0.86	0.76	0.52	中双 1 号
94	0.93	0.68	0.58	I - Y - 14 油菜
89	0.84	0.81	0.73	940171
43	0.86	0.77	0.67	AB448

近年来,水培技术已成功地应用于养分吸收的研究^[9,17,25]中。在水培试验中,营养液中各种营养素的浓度、类型和供给时间都可精确控制,营养素分布相对均匀,因此十分适合用来筛选大量的耐低氮作物遗传资源^[26]。尽管如此,目前普遍采用的油菜水培系统还存在以下 2 点不足:第一,传统油菜水培通常采用小规格的塑料方盒作为栽培容器,不同材料间会存在营养竞争关系,因此,小规格的水培容器不利于维持养分的均匀和稳定。第二,由于油菜根系长期浸入营养液中,会影响根系的正常呼吸作用,进一步影响根系对营养离子的吸收与转运。

以上问题极大地限制了油菜水培的规模和表型鉴定的精准性。为此,本研究通过不断的摸索实践,建立了可容纳 3 000 余株油菜幼苗的水培体系,包括营养液补充系统、营养液循环系统、空气泵和补光系统。对 104 份甘蓝型油菜种质进行表型鉴定,结果显示,该水培体系能满足甘蓝型油菜的正常生长,是鉴定营养吸收相关表型的理想方法。

油菜是小麦、水稻和大麦轮作的一种非常适宜的作物,对后续谷物的产量产生了积极的影响^[27-29]。然而,油菜比其他作物需要更多的氮肥^[7]。尽管油菜可以从土壤中吸收大量的氮,但它一直被认为是一种氮肥利用率低、单位施氮种子产量低的作物,约为谷类作物的 1/2^[30]。此外,油菜不同时期需氮量差别很大,其中氮素苗期占全生育期 40% 以上^[31]。因此,苗期是油菜对氮胁迫相对敏感的时期。本研究选择对甘蓝型油菜苗期的耐低氮能力进行鉴定和评价,结果显示,低氮胁迫能显著地抑制甘蓝型油菜幼苗的生长发育,主要体现在叶片数的减少、生物量积累的受限等方面。通过计算各个性状的耐低氮指数,发现在 104 份不同遗传背景的甘蓝型油菜种质中,其耐低氮能力存在广

泛的遗传变异。通过对 3 个耐低氮指数进行聚类分析,筛选得到 7 个低氮耐受型油菜品种(系),为进一步提升现有优质油菜品种的氮利用效率提供了遗传基础。目前,虽然关于低氮胁迫对油菜的苗期和成熟期的研究相对较多,然而对种子萌发期和开花期等生长发育关键时期的研究还十分少见。因此,后期有必要继续开展这方面的研究,筛选得到全生育期耐低氮能力强的油菜资源。

参考文献:

- [1] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, et al. Agricultural sustainability and intensive production practices[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 671–677.
- [2] McAllister C H, Beatty P H, Good A G. Engineering nitrogen use efficient crop plants: The current status [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(9): 1011–1025.
- [3] Liu X J, Zhang Y, Han W X, et al. Enhanced nitrogen deposition over China[J]. *Nature*, 2013, 494(7438): 459–462.
- [4] 王汉中. 我国油菜产需形势分析及产业发展对策[J]. *中国油料作物学报*, 2007, 29(1): 101–105.
- [5] 沈金雄, 傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(1): 1–8.
- [6] Aufhammer W, Kuebler E, Bury M. Nitrogen uptake and nitrogen residuals of winter oil – seed rape and fallow rape[J]. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 1994, 172(4): 255–264.
- [7] Rathke G W, Christen O, Diepenbrock W. Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations [J]. *Field Crops Research*, 2005, 94(2/3): 103–113.
- [8] 王汉中. 以新需求为导向的油菜产业发展战略[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(5): 613–617.
- [9] 朱培贤, 王周玉, 宋文亮. 关中西部观赏油菜品种利用[J]. *种子世界*, 2017(12): 45–47.
- [10] 田 飞, 张星星, 程尚明, 等. 观赏油菜选育与油菜景观构建 [J]. *种子*, 2019, 38(3): 116–119.
- [11] 张 宁, 郭荣发. 水稻氮高效种质资源筛选及其耐低氮胁迫机理研究进展[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(5): 66–70.
- [12] Bouchet A S, Laperche A, Bissuel – Belaygue C, et al. Nitrogen use efficiency in rapeseed: a review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2016, 36(2): 38.
- [13] 丁广大, 王改丽, 叶祥盛, 等. 甘蓝型油菜氮高效的生理与分子遗传基础研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(2): 130–139.
- [14] Zeng C L, Wan H P, Wu X M, et al. Genome – wide association study of low nitrogen tolerance traits at the seedling stage of rapeseed [J]. *Biologia Plantarum*, 2021, 65: 10–18.
- [15] 洪 娟. 油菜氮高效种质的筛选及其生理机制的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 57–59.
- [16] 顾炽明, 韩配配, 胡 琼, 等. 甘蓝型油菜苗期氮效率评价及基

- 因型差异[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(6): 851–860.
- [17] Wang J, Dun X L, Shi J Q, et al. Genetic dissection of root morphological traits related to nitrogen use efficiency in *Brassica napus* L. under two contrasting nitrogen conditions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1709.
- [18] 万何平, 李 群, 高云雷, 等. 一种基于水培技术的高效低成本油菜小孢子继代培养方法[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(5): 588–591.
- [19] Lian X M, Xing Y Z, Yan H, et al. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 112(1): 85–96.
- [20] Kant S, Bi Y M, Rothstein S J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(4): 1499–1509.
- [21] Gao K, Chen F J, Yuan L X, et al. A comprehensive analysis of root morphological changes and nitrogen allocation in maize in response to low nitrogen stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(4): 740–750.
- [22] Prester T, Seitz G, Landbeck M, et al. Improving nitrogen – use efficiency in European maize [J]. *Crop Science*, 2003, 43(4): 1259–1265.
- [23] Barraclough P B, Howarth J R, Jones J, et al. Nitrogen efficiency of wheat: Genotypic and environmental variation and prospects for improvement[J]. *European Journal of Agronomy*, 2010, 33(1): 1–11.
- [24] Bouchet A S, Nesi N, Bissuel C, et al. Genetic control of yield and yield components in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under nitrogen limitation[J]. *Euphytica*, 2014, 199(1): 183–205.
- [25] Huang G, Yi K K, Wu Y R, et al. QTLs for nitrate induced elongation and initiation of lateral roots in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant and Soil*, 2004, 263: 229–237.
- [26] Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, et al. A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biology*, 2003, 3: 2.
- [27] Christen O, Sieling K. The effect of different preceding crops on the development, growth and yield of winter barley [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1993, 171: 114–123.
- [28] Christen O, Sieling K, Hanus H. The effect of different preceding crops on the development, growth and yield of winter wheat [J]. *European Journal of Agronomy*, 1992, 1(1): 21–28.
- [29] 马 鹏, 张宇杰, 林 郇, 等. 油—稻轮作下前茬氮肥投入与稻季氮肥运筹对稻田土壤养分、碳库及作物产量的影响[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(4): 896–904.
- [30] Sylvester – Bradley R, Kindred D R. Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(7): 1939–1951.
- [31] 刘后利, 王兆木. 实用油菜栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 236–237.