



荆禹铭,嵇乐乐,肖栋,等.同源四倍体菜薹新材料的创制与品质分析[J].南京农业大学学报,2024,47(4):643-652.

JING Yuming,JI Lele,XIAO Dong,et al. Creation and quality analysis of new autotetraploid materials in flowering Chinese cabbage[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):643-652.

同源四倍体菜薹新材料的创制与品质分析

荆禹铭¹,嵇乐乐¹,肖栋¹,胡春梅¹,侯喜林¹,李英¹,胡君²,刘同坤^{1*}

(1.南京农业大学作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室/园艺作物种质创新与利用教育部工程研究中心,江苏南京210095;2.无锡市惠山区洛社镇农业农村局,江苏无锡214187)

摘要:[目的]本文旨在创制优质的菜薹四倍体新材料。[方法]用 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液点滴二倍体菜薹 LCX019 幼苗的子叶生长点,通过形态学、解剖学、细胞学与流式细胞仪的方式筛选鉴定出同源四倍体植株,并对二、四倍体植株的农艺性状以及品质特性进行分析比较。[结果]形态学与解剖学结果显示,同源四倍体菜薹在株型、叶片、花、种荚、菜薹等方面表现出“巨大性”的特点;气孔孔径变大,气孔密度下降;花粉粒体积相比二倍体增大,形状呈橄榄球形或不规则形状。细胞学结果显示,四倍体菜薹根尖染色体数目为二倍体的2倍;流式细胞仪的分析结果表明,四倍体的DNA荧光强度约为二倍体的2倍。四倍体菜薹的可溶性糖、有机酸及纤维素含量显著增加76.17%、13.71%和80.34%,叶绿素含量、硝态氮含量显著下降25.01%、45.10%,可溶性蛋白含量无显著变化。通过分析二、四倍体的光响应曲线与光合特性,发现四倍体菜薹 LCX019 对弱光的利用能力强于二倍体植株。[结论]获得了具有优良品质的菜薹同源四倍体新材料,为菜薹育种提供新的种质资源。

关键词:菜薹;同源四倍体;秋水仙素;光合特性;品质鉴定

中图分类号:S634.5

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0643-10

Creation and quality analysis of new autotetraploid materials in flowering Chinese cabbage

JING Yuming¹,JI Lele¹,XIAO Dong¹,HU Chunmei¹,HOU Xilin¹,LI Ying¹,HU Jun²,LIU Tongkun^{1*}

(1.National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Creation in East China,Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Engineering Research Center for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops,Ministry of Education,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;2.Agricultural and Rural Bureau of Luoshe Town,Huishan District,Wuxi City,Wuxi 214187,China)

Abstract:[Objectives]The paper aimed to create a new autotetraploid material with good quality. [Methods]The cotyledon growth point of the diploid *Brassica campestris* LCX019 seedlings was dripped with $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ colchicine solution,the autotetraploid plants were identified by morphological,anatomical,cytological and flow cytometry methods,and the agronomic and quality characteristics of diploid and tetraploid plants were analyzed and compared. [Results]The results of morphology and anatomy showed that the plant type,leaf,flower,seed pod and bolt of the autotetraploid *campestris* showed “gigantic” characteristics,the stomatal diameter became larger and the stomatal density decreased. The size of pollen grains was larger than diploid,and the shape of pollen grains was rugby ball or irregular. The results of cytology showed that the number of chromosomes in the root tip of tetraploid was about twice that of diploid. Flow cytometry analysis showed that the DNA fluorescence intensity of tetraploid was about twice that of diploid. The contents of soluble sugar,organic acid and cellulose in tetraploid *B. campestris* significantly increased by 76.17%,13.71% and 80.34%,while the contents of chlorophyll and nitrate nitrogen significantly decreased by 25.01% and 45.10%,respectively,there was no significant change in soluble protein content. By analyzing the light response curve and photosynthetic characteristics of diploid and tetraploid plants,it was found that LCX019 had stronger ability to utilize weak light than diploid plants. [Conclusions]The new tetraploid material with high quality was obtained,which would provide new germplasm resources for the breeding of flowering Chinese cabbage.

Keywords:flowering Chinese cabbage;autotetraploid,colchicine;photosynthetic characteristics;quality identification

收稿日期:2023-08-26

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[CX(23)3023];江苏省种业揭榜挂帅项目(JBGS[2021]015);三亚市科技创新专项项目(2022KJCX80)

*通信作者:刘同坤,教授,主要从事蔬菜晚抽薹分子生物学和多倍体育种研究,E-mail:liutk@njau.edu.cn.

多倍体是指含有3套或者3套以上完整染色体组的生物体。植物中至少有1/3以上的种是多倍体,被子植物中多倍体占1/2以上,而禾本科植物多倍体占3/4以上^[1]。多倍体植物通常具有“巨大化”的特征,表现为生长迅速,营养器官巨大;新陈代谢旺盛,部分内含物含量提高;生命力强,对环境适应性增强等优点^[2],因此,多倍体育种已经成为提高蔬菜产量与品质、提高蔬菜抗逆性的重要手段。秋水仙素是诱导多倍体效果最好的药剂之一,其处理方法多样,主要分为活体诱导和离体诱导2种基本方法,而活体诱导又可以采用滴液法、涂抹法、浸渍法、包埋法及注射法等多种方法处理植物材料;除此之外,秋水仙素还具有处理操作简便、诱导率高,对染色体结构无明显影响,对于植物染色体的加倍效应广泛适用于多种植物等优点^[3-4]。

秋水仙素诱导多倍体已经广泛应用于蔬菜、果树、中药等植物,例如,董飞等^[5]利用秋水仙素处理大葱种子获得了正常生长的四倍体植株,为大葱多倍体育种提供了技术支持和材料储备;施先锋等^[6]利用 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理西瓜幼苗获得了四倍体西瓜新材料;刘茜等^[7]采用秋水仙素对荆半夏进行离体和活体的多倍体诱导,初步建立了荆半夏多倍体的化学诱变技术体系。

菜薹,别名菜心、广东菜、菜花等,属于十字花科芸薹属白菜亚种中的一个变种,在华南地区广泛栽培,菜薹主要以菜薹与叶片2种营养器官为食用部位^[8]。其生长周期短,可周年种植,营养丰富,有清热解毒、排毒、降脂等功效,深受消费者欢迎^[9]。目前市场上菜薹品种多为二倍体,如‘四九菜心’‘油青矮脚’等,鲜见四倍体品种;且现有品种已经难以满足日益多样化的生产与市场需求^[10]。在育种上,菜薹种质资源狭窄,遗传多样性程度较低,遗传变异较小^[11]。因此,本研究利用秋水仙素诱导二倍体菜薹LCX019幼苗,培育优质的同源四倍体菜薹新材料,为菜薹的高质量育种提供新的种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料为菜薹LCX019($2n=2x=20$),商品名又称甜菜心,由南京农业大学园艺学院白菜系统生物学实验室提供,其叶片长椭圆形,叶柄较为短粗;薹质柔嫩多汁,纤维较少,口感甜脆。试验于2021年9月—2023年5月在南京农业大学卫岗校区与白马教学科研基地进行。

1.2 四倍体诱导方法

参考刘美妍^[12]的方法,于穴盘中播种二倍体菜薹LCX019种子,待幼苗生长到子叶完全展开后,用 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液点滴幼苗2片子叶中间的生长点,每天早晚各处理1次,每次间隔6h,共处理5次,每次 $20\text{ }\mu\text{L}$,以点滴蒸馏水处理作为对照。

1.3 多倍体菜薹植株鉴定方法

1.3.1 形态学、解剖学鉴定 以同时期生长的二倍体菜薹LCX019植株作为对照,分别在开花期、生长期对诱变植株进行观察,比较二者株型、叶厚、叶色、花器官等差异,若诱变植株出现“巨大化”差异,则初步鉴定为四倍体植株。

花粉粒鉴定:在晴朗的上午,取同期生长的二倍体植株与诱变植株花粉,将其均匀涂抹于载玻片上,置于显微镜下观察二倍体植株与诱变植株间花粉粒形状及大小差异。**气孔鉴定:**参考陈佰鸿等^[13]的方法,在晴朗的上午分别取二倍体植株与诱变植株的同叶位平展且生长良好的叶片,避开叶脉,用镊子撕取或用胶带粘取叶片下表皮,置于载玻片上,用水冲洗并辅以刀片刮去残留的叶肉组织,在正置荧光显微镜下观察二者气孔大小、密度间的差异并拍照。

1.3.2 细胞学鉴定 参考吴婷等^[14]的方法,将经过形态学、解剖学鉴定的四倍体植株种子平铺于垫有滤纸的培养皿中,置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温环境中催芽,待根长 $1\sim 2\text{ cm}$ 时,将根部切除置于离心管中,加入 $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8-羟基喹啉于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中浸泡 $3\sim 3.5\text{ h}$,用蒸馏水重复清洗3次;加入卡诺固定液(无水乙醇与冰乙酸的体积比为3:1)固定9h,用蒸馏水洗净;向离心管中加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中解离4min,洗净。切取根尖 $1\sim 2\text{ cm}$ 处的乳白色尖端,滴加 $1\sim 2$ 滴改良苯酚复红染液染色7min,制片,用铅笔尾部敲击盖玻片,直至根尖呈雾状或透明状,置于正置荧光显微镜下观察染色体数目并拍照。

1.3.3 流式细胞仪鉴定 参考张宇等^[15]和Zhou等^[16]的方法,分别取二倍体及疑似四倍体植株 0.1 g 的新鲜幼嫩叶片,避开叶脉和叶缘,各设置3次重复,将叶片平铺在经过预冷的培养皿上,加入保存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中的解离液 $1\sim 2\text{ mL}$ [含 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO₄·7H₂O、0.25%(体积分

数) Triton-100、1% PVP, pH8.0, 于4℃冰箱保存], 用冰上预冷过的刀片快速将叶片切碎呈微小颗粒状, 将混合液过滤至50 mL离心管中, 再转移至2 mL离心管中。向离心管中加入35 μL碘化丙啶(PI)与10 μL核糖核酸酶(RNase), 充分混匀, 于冰上避光静置15 min; 用流式细胞仪测定二、四倍体DNA含量。

1.4 农艺性状统计与营养品质的鉴定

1.4.1 农艺性状测定 将初步鉴定为菜薹LCX019四倍体的植株于花期单株套袋并自交留种, 与二倍体种子同期播种定植。苗期分别随机选取10株生长健壮、长势良好、无病虫害的植株, 按照《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 不结球白菜: NY/T 2223—2012》中的标准测量其株高、开展度、叶片数、叶长、叶宽、十叶厚、叶柄长、叶柄宽、叶柄厚, 抽薹开花后测量菜薹直径与菜薹重等农艺性状。

1.4.2 营养品质测定 随机选择长势良好、生长健壮的二、四倍体植株各3株, 取同一叶位的叶片, 避开叶脉, 测定可溶性糖、有机酸、纤维素、可溶性蛋白、硝态氮和叶绿素含量等营养品质指标。可溶性糖含量使用植物可溶性糖含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定; 有机酸含量使用维生素C/抗坏血酸(AsA)含量测试盒(南京建成生物工程研究所)测定; 纤维素含量使用纤维素(CLL)含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定; 可溶性蛋白含量使用Bradford法蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定; 硝态氮含量采用植物硝态氮含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定。

叶绿素含量采用丙酮乙醇提取法测定: 将叶片洗净后称取0.1 g并剪碎, 加入配制好的提取液(丙酮、乙醇、蒸馏水体积比为4.5:4.5:1), 置于4℃避光环境中浸提24 h直至样品变白, 过滤, 取滤液在663和645 nm波长下测定吸光值, 设置3次重复。叶绿素总量 = $17.54 \times A_{645} + 7.18 \times A_{663}$ 。

1.5 光合特性分析

参考聂松青等^[17]的方法, 在光照良好的晴天上午, 用便携式光合作用测量系统(LI-6800, USA)测定菜薹LCX019的光响应曲线, 分别随机选取3株发育良好且长势相同的二倍体和四倍体植株, 每一株避开叶脉, 取相同叶位下大小、形状、厚度、叶色相似的叶片测定。测量过程中设置CO₂浓度为400 μmol·mol⁻¹, 设置光照强度梯度为0、10、30、50、70、100、150、200、400、600、800、1 200、1 600、1 800和2 000 μmol·m⁻²·s⁻¹, 分别测定其在上述光照强度下, 每个叶片单位面积的净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)以及胞间CO₂浓度(C_i)。参考蒋冬月等^[18]的非直角双曲线模型公式, 利用SPSS Statistics 25软件的非线性回归分析拟合光响应曲线, 并根据拟合结果进一步求得最大净光合速率(P_{max})、表观量子效率(AQY)、光补偿点(LCP)、光饱和点(LSP)、暗呼吸速率(R_d)等光合指标。

1.6 数据分析

采用Excel 2021软件整理所得数据, 采用SPSS Statistics 25软件处理试验数据并对其进行独立样本 t 检验以分析数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 二、四倍体菜薹的倍性鉴定

2.1.1 形态学与解剖学鉴定 由图1可知: 相较于二倍体植株, 四倍体植株株型以及开展度增加(图1-A); 叶片面积增大, 叶长、叶宽增加, 叶柄长度、宽度增加(图1-B); 幼苗期株型、株高较小, 根系长度及密度明显少于二倍体植株(图1-C); 花器官整体变大, 成簇花更加饱满, 花数量增多(图1-D), 其单个花朵整体较二倍体植株变大, 萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊均出现明显增大(图1-G); 种子直径略微变大, 种荚更加饱满、粗大(图1-E、F); 菜薹直径增大, 长度增长(图1-H、I)。

由图2可见: 二倍体植株花粉粒呈现较为规则的细长状椭圆形(图2-A), 四倍体花粉粒体积增大, 短轴增长, 呈现较为粗长的橄榄球形或不规则形状(图2-B); 对比二、四倍体植株气孔发现, 四倍体植株气孔孔径增大, 保卫细胞增大, 单位面积上气孔密度相比二倍体植株下降(图2-C、D)。

2.1.2 细胞学鉴定 将经过形态学初步鉴定为四倍体的植株单株套袋授粉留种, 选取部分种子进行催芽处理, 制成根尖染色体切片并置于显微镜下观察染色体数目。由图3可见: 对照组二倍体植株的根尖染色体数目为 $2n=2x=20$, 而诱变后疑似四倍体植株的根尖染色体数目为 $2n=2x=40$, 说明本试验成功诱导得到了菜薹LCX019的同源四倍体植株。

2.1.3 流式细胞仪鉴定 利用流式细胞仪检测二倍体与四倍体植株细胞的DNA含量, 进一步鉴定诱变植株是否为同源四倍体植株, 结果如图4所示。图中第1个峰值代表细胞分裂间期中G₁期的DNA相对含

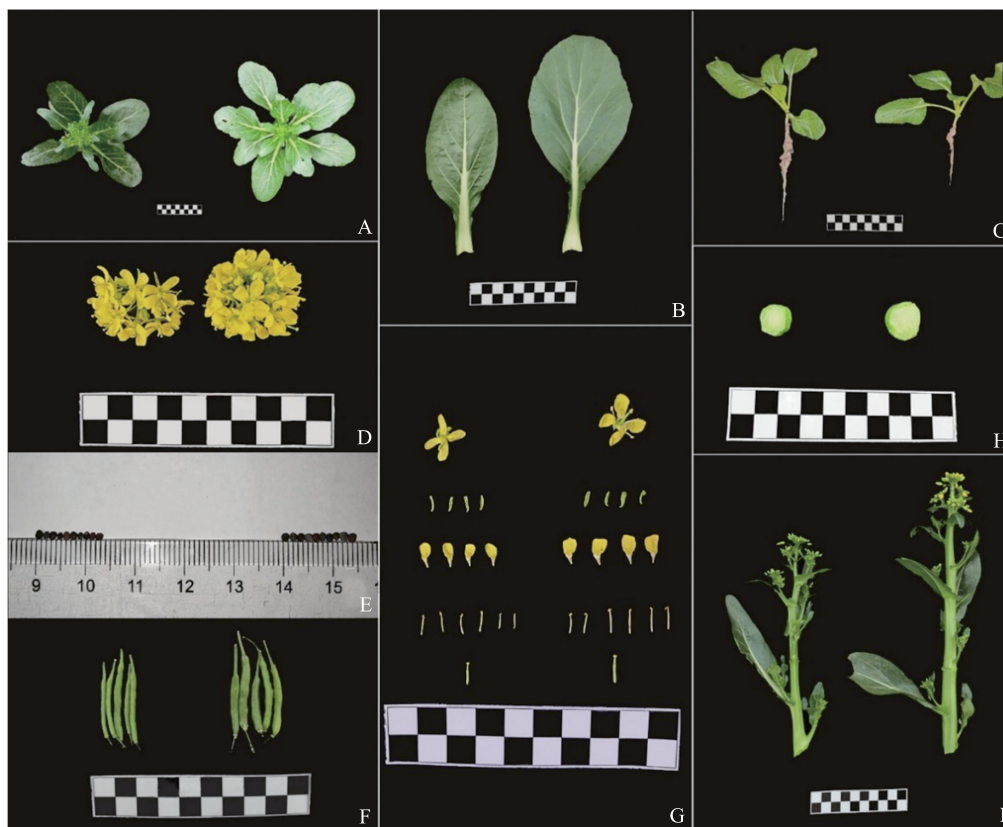


图1 二、四倍体菜薹 LCX019 形态学比较

Fig.1 Morphological comparison of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

A.植株 Plant;B.叶片 Leaf;C.幼苗 Seedling;D.花器官 Floral organ;E.种子 Seed;F.种荚 Silique;G.花 Flower;H、I. 薹 Bolt.

图中比例尺长度均为 10 cm,左侧为二倍体,右侧为四倍体。

The scale length is 10 cm, with diploid on the left and tetraploid on the right.

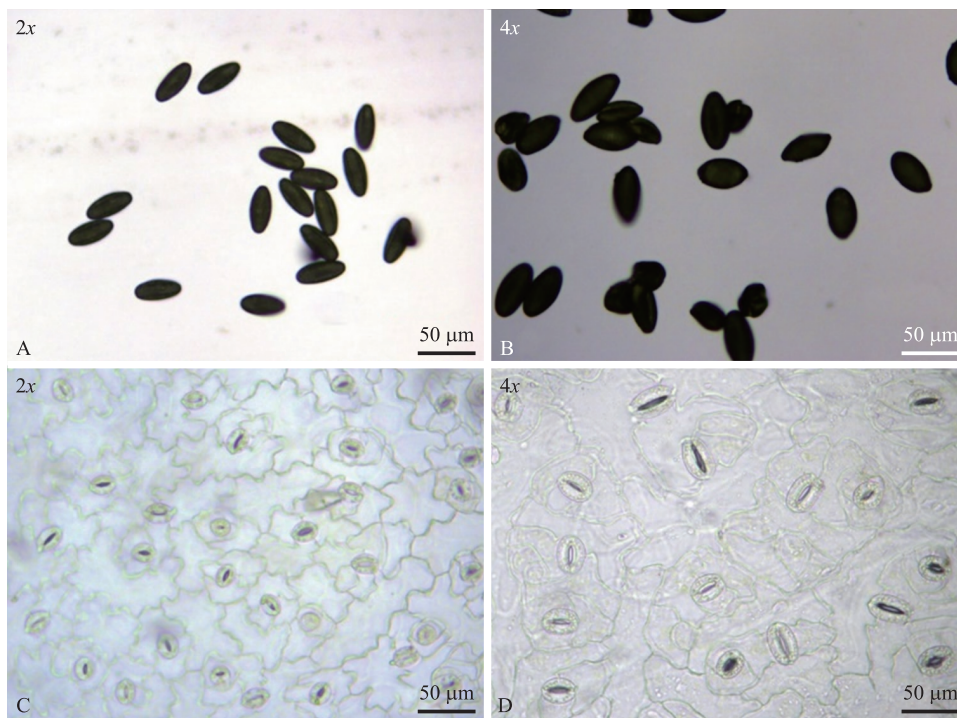


图2 二、四倍体菜薹 LCX019 解剖学比较

Fig.2 Anatomical comparison of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

A、B. 花粉 Pollen;C、D. 气孔 Stomata.

量,第2个峰值则代表了 G_2 期的DNA相对含量。左侧二倍体 G_1 期的DNA相对含量约在30处达到峰值,而右侧四倍体植株 G_1 期的DNA相对含量在60左右达到峰值,同源四倍体植株 G_1 期的DNA相对含量峰值约为二倍体的2倍,进一步证明诱导植株为同源四倍体植株。

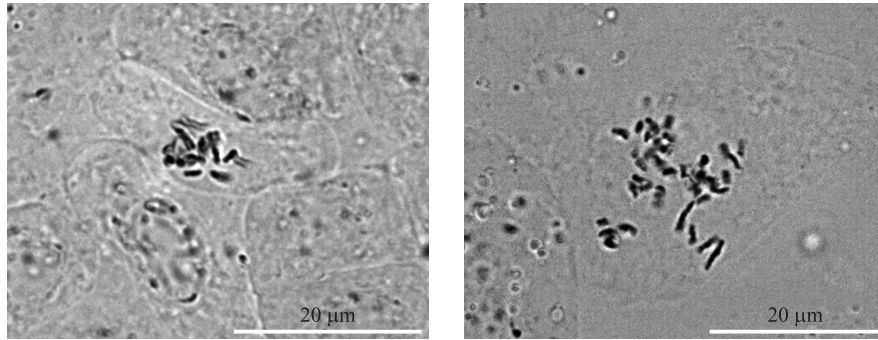


图3 二倍体(左)、四倍体(右)菜薹LCX019细胞学鉴定结果

Fig. 3 The cytological identification of diploid(left) and tetraploid(right) Chinese flowering cabbage LCX019

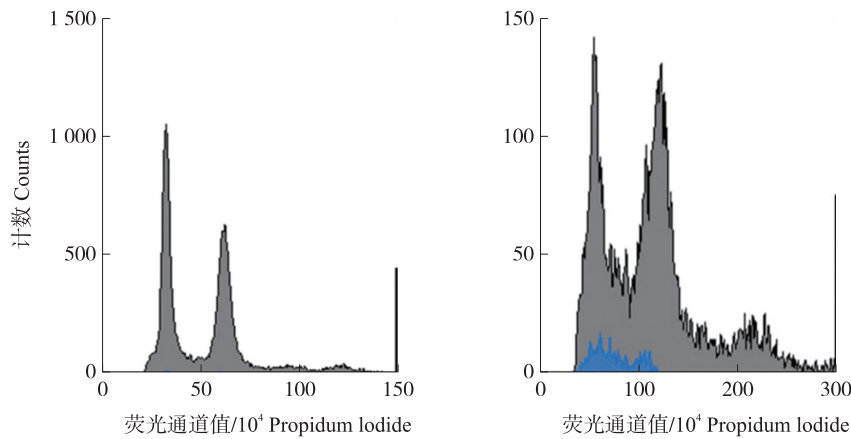


图4 二倍体(左)和四倍体(右)菜薹LCX019流式细胞仪分析结果

Fig. 4 Identification results of diploid(left) and tetraploid(right) Chinese flowering cabbage LCX019 by flow cytometry

2.2 二、四倍体菜薹主要农艺性状比较

由表1可知:与二倍体植株相比,同源四倍体植株株高下降25.20%,差异极显著;十叶厚、叶柄厚、薹重分别增加19.34%、81.01%、34.57%,差异极显著;叶长、叶宽、叶柄长、薹粗分别增加7.37%、16.97%、27.68%、26.24%,差异显著;植株开展度、叶片数、叶柄宽分别增加33.17%、10.50%、5.66%,差异不显著。

表1 二、四倍体菜薹LCX019主要农艺性状比较

Table 1 Comparison of main agronomic traits of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

农艺性状 Agronomic traits	二倍体 Diploid	四倍体 Tetraploid
株高/cm Plant height	11.41±0.86	8.50±0.65**
开展度/(cm×cm) Plant expansion	(32.05±2.78)×(26.90±1.89)	(36.11±3.11)×(32.13±2.16)
叶片数 Number of leaves	6.57±0.97	7.26±0.96
十叶厚/mm Ten-leaf thickness	6.10±0.74	7.28±0.44**
叶长/cm Leaf length	19.94±1.67	21.41±0.79*
叶宽/cm Leaf width	8.13±1.27	9.51±0.68*
叶柄长/cm Petiole length	3.54±0.92	4.52±0.56*
叶柄宽/cm Petiole width	1.59±0.15	1.68±0.06
叶柄厚/mm Petiole thickness	3.37±0.36	6.10±0.29**
薹粗/cm Bolt thickness	1.41±0.33	1.78±0.22*
薹重/g Bolt weight	18.02±3.54	24.25±4.49**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same as follows.

2.3 二、四倍体菜薹营养品质比较

由表2可知:同源四倍体植株与二倍体植株相比,可溶性糖和纤维素含量分别上升76.17%和80.34%,差

异极显著;叶绿素、硝态氮含量分别下降 25.01%、45.10%,差异均极显著;四倍体植株的有机酸含量相较于二倍体上升 13.71%,差异显著;可溶性蛋白含量上升 4.03%,差异不显著。

表 2 二、四倍体菜薹 LCX019 主要营养品质指标比较

Table 2 Comparison of nutritional substance indexes of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

材料 Material	可溶性糖含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Soluble sugar content	可溶性蛋白含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Soluble protein content	纤维素含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Fibrin content	有机酸含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Organic acid content	叶绿素含量/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Chlorophyll content	硝态氮含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Nitric nitrogen content
二倍体 Diploid	14.28±2.19	0.29±0.02	0.08±0.01	15.35±0.31	2.16±0.01	116.67±8.76
四倍体 Tetraploid	28.66±2.85**	0.30±0.02	0.15±0.02**	17.45±0.91*	1.62±0.09**	64.05±7.47**

2.4 二、四倍体菜薹光合特性分析

由图 5 可知:随光照强度的增加,二倍体与四倍体净光合速率(P_n)的变化趋势基本一致;光照强度在 0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,二、四倍体 P_n 差异不大,二者上升趋势明显;光照强度在 200~1 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,四倍体 P_n 明显大于二倍体,二者上升趋势逐渐减缓;光照强度在 1 800~2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,二者达到饱和光强, P_n 均达到最大。随着光照强度的增加,二、四倍体的胞间 CO_2 浓度(C_i)整体呈下降趋势,在光照强度小于 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,二、四倍体的 C_i 差异不大;随着光照强度的进一步升高,四倍体的 C_i 逐渐低于二倍体植株;当光照强度大于 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,二者 C_i 趋于平稳,最终表现为四倍体 C_i 略低于二倍体。

随着光照强度的增加,二、四倍体的蒸腾速率(T_r)呈现逐渐上升的趋势,且四倍体的 T_r 高于二倍体;二、四倍体的气孔导度(G_s)逐渐升高,且四倍体的 G_s 略高于二倍体,这也与 T_r 的变化趋势相一致。

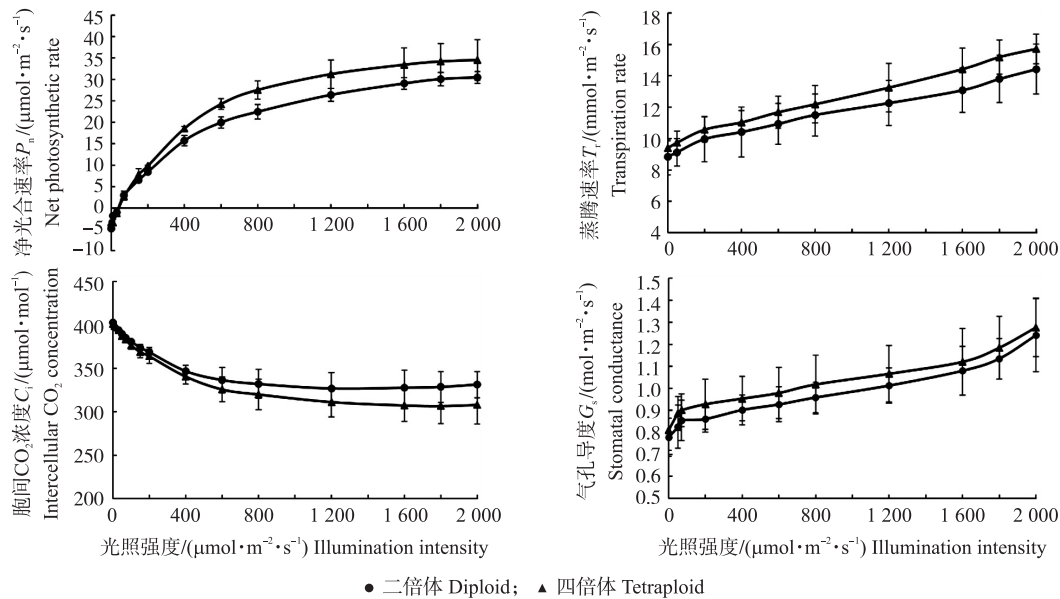


图 5 二、四倍体菜薹 LCX019 光合特性比较分析

Fig. 5 Comparison of the photosynthetic characteristics of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

由表 3 可知:相较于二倍体,四倍体的最大净光合速率(P_{\max})增加 16.99%,差异显著;暗呼吸速率(R_d)、表观量子效率(AQY)、光补偿点(LCP)、光饱和点(LSP)分别下降 20.66%、11.11%、30.39%、10.96%,无显著差异。

表 3 二、四倍体菜薹 LCX019 的光响应曲线参数比较

Table 3 Comparison of the parameters of response curves of diploid and tetraploid Chinese flowering cabbage LCX019

材料 Material	最大净光合速率/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) P_{\max}	暗呼吸速率/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) R_d	表观量子效率 AQY	光补偿点/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) LCP	光饱和点/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) LSP
二倍体 Diploid	42.16±2.46	2.71±0.21	0.09±0.03	41.29±0.98	594.13±74.18
四倍体 Tetraploid	49.32±0.68*	2.15±0.16	0.08±0.00	28.74±4.77	529.02±80.97

Note: P_{\max} : Maximum net photosynthetic rate; R_d : Dark respiration rate; AQY: Apparent quantum yield of photosynthesis; LCP: Light compensation point; LSP: Light saturation point.

3 讨论

多倍体是高等植物染色体进化的显著特征^[19]。多倍体育种具有增大作物营养器官或果实,延长浆果类作物的贮存期,利用其低育性培育无籽果实,加强植株的生态适应力和对逆境的抗性,增大花卉类作物花器官提高其观赏价值和商品价值等优点。因此,多倍体育种已经成为园艺作物育种的重要途径^[20-21]。目前,多倍体育种研究已在不结球白菜^[22]、萝卜^[23]、大蒜^[24]、黄瓜^[25]、香蕉^[26]、木薯^[27]等作物上获得成功应用。本研究采用 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素溶液处理二倍体菜薹 LCX019 幼苗的子叶生长点,经形态学、解剖学、细胞学以及流式细胞仪鉴定,确定所得植株为菜薹 LCX019 的同源四倍体植株。

本研究发现,在农艺性状方面,相较于二倍体,四倍体植株在叶长、叶宽、叶厚、叶柄长、叶柄厚、薹粗、薹重等方面都具有显著的增大趋势,其在花器官、种菜、菜薹方面的变化也符合四倍体植株所具有的“巨大化”特征,这与李孟杰等^[28]、张晨等^[29]的研究结果一致,在诱导四倍体黄瓜^[30]、猪屎豆^[31]上也观察到了相似的结果;而四倍体植株株高相较于二倍体则下降了 25.20%,与诱导不结球白菜‘五月慢’^[32]以及诱导万寿菊^[33]加倍后的结果相吻合;四倍体幼苗整体明显小于二倍体,这可能是由于秋水仙素诱导染色体数目加倍,在一个细胞周期内四倍体需要更多的能量与更长的细胞间期来复制染色体与有关蛋白质,导致四倍体发芽时间延后,生长初期发育较为缓慢,但其具体原因仍有待于进一步研究。

在营养品质方面,相较于二倍体植株,四倍体的纤维素、有机酸以及可溶性蛋白含量分别增加 80.34%、13.71%和 4.03%,而叶绿素含量、硝态氮含量分别下降 25.01%、45.10%,这与宋莹等^[34]研究中发现的营养物质含量变化的结果一致,也很好解释了二倍体菜薹叶片颜色比四倍体深的现象,这与同源多倍体矮牵牛^[35]叶绿素含量降低的变化相一致。硝酸盐含量是评定蔬菜安全品质的一个重要标准,人体摄取的硝酸盐有 81.2%来自蔬菜,过量的硝酸盐进入人体在细菌的作用下转化为有害的亚硝酸盐,进而对人体造成损伤^[36-37];同时,蔬菜中的可溶性糖含量是决定作物风味与品质的重要成分之一,其含量的高低会直接影响蔬菜鲜食的甜度、口感等特性^[38]。本研究中,同源四倍体可溶性糖含量相较于二倍体增加 76.17%,而硝态氮含量则下降 25.01%,说明四倍体菜薹 LCX019 在提高食用口感与营养品质的同时,也保证了蔬菜的安全品质,为发展绿色、有机、无公害蔬菜提供了新的思路。

光合作用是植物重要的生理过程之一,光合能力的高低对植物的生长发育具有很大影响^[39]。本研究通过对比二、四倍体的光合特征曲线,发现四倍体菜薹的 P_n 、 T_r 、 G_s 均高于二倍体,而其 C_i 则低于二倍体,这在四倍体甜叶菊^[40]、紫薇^[41]中也得到了相似的结果,而在萝卜^[42]与黑皮冬瓜^[43]的研究结果中则发现四倍体的 P_n 、 T_r 、 G_s 、 C_i 均高于二倍体,这说明秋水仙素诱导产生四倍体的光合特性并不总是高于二倍体植株。光补偿点(LCP)是植物利用弱光能力大小的重要指标,该值越小则植物利用弱光的能力越强;光饱和点(LSP)是植物利用强光能力大小的指标,该值越大则植物利用强光的能力越强^[44]。本研究中,四倍体植株的 LCP、LSP 均小于二倍体,说明四倍体菜薹 LCX019 对弱光的利用能力强于二倍体植株,而利用强光的能力则弱于二倍体。此外,四倍体菜薹的 R_d 低于二倍体, P_{max} 则高于二倍体,说明四倍体菜薹的呼吸作用可以消耗更少的有机物,因此,更有利于同化产物的积累,这也符合四倍体植株形态外观上“巨大化”的特点。综上,四倍体菜薹 LCX019 更加适应较弱光照下的生长环境,这对于光照较弱地区以及设施内的蔬菜栽培具有重要意义。

综上,本研究利用秋水仙素诱导获得了同源四倍体菜薹 LCX019,通过对比二、四倍体菜薹 LCX019 的农艺性状、营养品质、光合特性等指标,发现四倍体菜薹 LCX019 相较于二倍体植株具有多种优良性状,具体表现:农艺性状上总体呈现“巨大性”特征;营养物质含量上具有明显优势;对于弱光环境具有较强的适应能力。同源四倍体菜薹 LCX019 新材料的创制,丰富了菜薹的遗传背景,为菜薹的新品种选育提供了新材料。

参考文献 References:

- [1] 许陶瑜,田洪岭,郭淑红,等. 药用植物多倍体育种研究进展[J]. 山西农业科学,2021,49(3):392-394.
Xu T Y, Tian H L, Guo S H, et al. Research progress on polyploid breeding of medicinal plants[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(3): 392-394 (in Chinese with English abstract).
- [2] 康向阳. 林木三倍体育种研究进展及展望[J]. 中国科学:生命科学,2020,50(2):136-143.

- Kang X Y. Research progress and prospect of triploid breeding of forest trees [J]. *Scientia Sinica: Vitae*, 2020, 50(2): 136–143 (in Chinese with English abstract).
- [3] 郑永强,徐坤. 秋水仙素在植物体细胞染色体加倍中的应用研究进展[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(5): 89–91, 98.
Zheng Y Q, Xu K. Research progress on application of colchicine in plant somatic chromosome doubling [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2003, 19(5): 89–91, 98 (in Chinese).
- [4] 张美华,李慧敏,莫干辉,等. 秋水仙素在诱导我国果树多倍体的应用研究进展[J]. *农业研究与应用*, 2023, 36(1): 7–15.
Zhang M H, Li H M, Mo G H, et al. Colchicine application in polyploid induction of fruit trees in China: a review [J]. *Agricultural Research and Application*, 2023, 36(1): 7–15 (in Chinese with English abstract).
- [5] 董飞,陈运起,刘世琦,等. 秋水仙素诱导大葱多倍体的研究[J]. *园艺学报*, 2011, 38(12): 2381–2386.
Dong F, Chen Y Q, Liu S Q, et al. Colchicines induced polyploid plants and identification in welsh onion [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(12): 2381–2386 (in Chinese with English abstract).
- [6] 施先锋,彭金光,王宏太,等. 秋水仙素诱导西瓜多倍体的研究[J]. *长江蔬菜*, 2010(8): 17–19.
Shi X F, Peng J G, Wang H T, et al. Study on colchicines induced polyploid plants and identification of *Citrullus lanatus* [J]. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2010(8): 17–19 (in Chinese with English abstract).
- [7] 刘茜,余磊磊,聂倩文,等. 荆半夏多倍体新种质诱导研究[J]. *长江大学学报(自科版)*, 2018, 15(10): 28–33.
Liu Q, Yu L L, Nie Q W, et al. Study on polyploid new germplasm induction of *Pinellia ternate* [J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2018, 15(10): 28–33 (in Chinese with English abstract).
- [8] 史卫东,陈振东,农贵雄,等. 菜心种质资源的主成分与聚类分析[J]. *江西农业学报*, 2019, 31(9): 46–49.
Shi W D, Chen Z D, Nong G X, et al. Evaluation of Chinese flowering cabbage by principal component and cluster analysis [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2019, 31(9): 46–49 (in Chinese with English abstract).
- [9] 庞强强,孙晓东,周曼,等. 菜心叶片响应高温胁迫的转录组分析及转录因子筛选[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(8): 2473–2487.
Pang Q Q, Sun X D, Zhou M, et al. Transcriptome analysis of Chinese flowering cabbage leaves and transcription factor screening under heat stress [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(8): 2473–2487 (in Chinese with English abstract).
- [10] 陈汉才,吴增祥,林悦欣,等. 广东菜心、芥蓝研究现状与展望[J]. *广东农业科学*, 2021, 48(9): 62–71.
Chen H C, Wu Z X, Lin Y X, et al. Research status and prospect of flowering Chinese cabbage and Chinese kale in Guangdong [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021, 48(9): 62–71 (in Chinese with English abstract).
- [11] 史卫东, 琚茜茜, 张力, 等. 菜心种质资源遗传多样性的 SCoT 分析[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(8): 1350–1355.
Shi W D, Ju X X, Zhang L, et al. Analysis on genetic diversity of Chinese flowering cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Le) germplasm based on SCoT markers [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(8): 1350–1355 (in Chinese with English abstract).
- [12] 刘美妍,周国彦,李晓丽,等. 秋水仙素对华北型密刺黄瓜的诱变效应[J]. *中国瓜菜*, 2021, 34(11): 10–16.
Liu M Y, Zhou G Y, Li X L, et al. Mutagenesis effect of colchicine on North China cucumber with dense thorny [J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2021, 34(11): 10–16 (in Chinese with English abstract).
- [13] 陈佰鸿,李新生,曹孜义,等. 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(2): 215–218.
Chen B H, Li X S, Cao Z Y, et al. A method for observing stoma by transparent gummed tape to tear epidermis from leaf [J]. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(2): 215–218 (in Chinese with English abstract).
- [14] 吴婷,朱俊,杨佳慧,等. 秋水仙素诱导蝴蝶兰原球茎产生多倍体研究[J]. *核农学报*, 2021, 35(11): 2463–2469.
Wu T, Zhu J, Yang J H, et al. Polyploid induction of *Phalaenopsis* protocorms via colchicine treatment [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(11): 2463–2469 (in Chinese with English abstract).
- [15] 张宇,张蜀宁,韩业飞,等. 秋水仙碱创制优质青梗四倍体不结球白菜[C]//2012年园艺植物染色体倍性操作与遗传改良学术研讨会论文摘要集. 中国园艺学会, 2012: 22–29.
Zhang Y, Zhang S N, Han Y F, et al. Induction of tetraploid non-heading Chinese cabbage with high quality and green peduncle by colchicine [C]//2012 Symposium on Chromosomal Ploidy Manipulation and Genetic Improvement in Horticultural Plants, Abstract Collection. Chinese Horticultural Society, 2012: 22–29 (in Chinese).
- [16] Zhou H W, Zeng W D, Yan H B. *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety ‘Xinxuan 048’ using colchicine [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 128(3): 723–729.
- [17] 聂松青,石雪晖,田淑芬,等. 湘酿1号刺葡萄光合特性的研究[J]. *河北林业科技*, 2014(S1): 74–77.
Nie S Q, Shi X H, Tian S F, et al. Study on photosynthetic characteristics of Xiangniang No.1 thorn grape [J]. *Journal of Hebei Forestry Science and Technology*, 2014(S1): 74–77 (in Chinese).
- [18] 蒋冬月,钱永强,费英杰,等. 柳属植物光合-光响应曲线模型拟合[J]. *核农学报*, 2015, 29(1): 169–177.
Jiang D Y, Qian Y Q, Fei Y J, et al. Modeling photosynthetic light-response curve in *Salix* L. [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(1): 169–177 (in Chinese with English abstract).
- [19] 马海渊,张金凤,李志丹. 植物多倍体育种技术方法研究进展[J]. *防护林科技*, 2008(1): 43–46.
Ma H Y, Zhang J F, Li Z D. Research progress on techniques and methods of plant polyploid breeding [J]. *Protection Forest Science and Technology*, 2008(1): 43–46 (in Chinese).
- [20] 杨寅桂,庄勇,陈龙正,等. 蔬菜多倍体育种及其应用[J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28(4): 534–538.

- Yang Y G, Zhuang Y, Chen L Z, et al. Vegetable polyploid and polyploidy breeding[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(4): 534-538 (in Chinese with English abstract).
- [21] 孙敏红, 张蜀宁. 多倍体育种在园艺作物中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2004, 32(1): 68-72.
Sun M H, Zhang S N. Application of polyploid breeding in horticultural crops [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2004, 32(1): 68-72 (in Chinese).
- [22] 卢秋稳, 吕炜, 张蜀宁, 等. 优质晚抽薹四倍体不结球白菜的创制及特性[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(5): 757-763. DOI: 10.7685/j.issn.1000-2030.2015.05.009.
Hu Q W, Lü W, Zhang S N, et al. The induction and characteristics of high quality and late-bolting tetraploid non-heading Chinese cabbage [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(5): 757-763 (in Chinese with English abstract).
- [23] 吕炜, 卢秋稳, 李艳艳, 等. 优质四倍体萝卜新种质创新及鉴定[J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(1): 48-54. DOI: 10.7685/jnau.201503030.
Lü W, Hu Q W, Li Y Y, et al. High-quality new autotetraploid radish germplasm innovation and identification [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(1): 48-54 (in Chinese with English abstract).
- [24] Hailu M G, Mawcha K T, Nshimiyimana S, et al. Garlic micro-propagation and polyploidy induction *in vitro* by colchicine [J]. *Plant Breeding and Biotechnology*, 2021, 9(1): 1-19.
- [25] Zheng J S, Sun C Z, Yan L Y, et al. Development of cucumber autotetraploids and their phenotypic characterization [J]. *Cytologia*, 2019, 84(4): 359-365.
- [26] 谭平, 唐晓华, 劳世辉, 等. 秋水仙素诱导抗枯1号香蕉多倍体试验[J]. *南方农业学报*, 2012, 43(11): 1718-1722.
Tan P, Tang X H, Lao S H, et al. In vitro polyploid induction of banana Kangku 1 using colchicine [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(11): 1718-1722 (in Chinese with English abstract).
- [27] 曾文丹, 陆柳英, 施平丽, 等. 木薯品种华南12号(SC12)同源四倍体诱导及鉴定[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(6): 1114-1122.
Zeng W D, Lu L Y, Shi P L, et al. Induction and identification of autotetraploid in cassava variety SC12 *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(6): 1114-1122 (in Chinese with English abstract).
- [28] 李孟杰, 张晨, 王美云, 等. 高花青苷同源四倍体紫菜薹新材料的创制及特性分析[J]. *核农学报*, 2023, 37(5): 897-906.
Li M J, Zhang C, Wang M Y, et al. Creation and characteristic analysis of a new autotetraploid purple Cai-Tai with high anthocyanins [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(5): 897-906 (in Chinese with English abstract).
- [29] 张晨, 李孟杰, 杨晓雪, 等. 紫菜薹同源四倍体的诱导鉴定及特性研究[J]. *园艺学报*, 2023, 50(7): 1419-1428.
Zhang C, Li M J, Yang X X, et al. The creation and study on characteristics of new material of autotetraploid purple tsai-tai [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(7): 1419-1428 (in Chinese with English abstract).
- [30] 武娅歌, 赵建华, 宋晓飞, 等. 欧洲温室型黄瓜同源四倍体新种质的创制与鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(18): 141-145.
Wu Y G, Zhao J H, Song X F, et al. Creation and identification of new autotetraploid germplasm of European greenhouse cucumber [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(18): 141-145 (in Chinese).
- [31] 倪成凤, 冷青云, 虞道耿, 等. 秋水仙素对猪屎豆的诱变及同源四倍体种质创制的研究[J]. *热带作物学报*, 2022, 43(10): 2047-2056.
Ni C F, Leng Q Y, Yu D G, et al. Mutagenesis of *Crotalaria pallida* by colchicine and autotetraploid germplasm innovation [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43(10): 2047-2056 (in Chinese with English abstract).
- [32] 张咪, 宋莹, 王夏, 等. 同源四倍体不结球白菜‘五月慢’新材料的创制及其特性[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(3): 474-482. DOI: 10.7685/jnau.202108004.
Zhang M, Song Y, Wang X, et al. The creation and its characteristics of a new material of autotetraploid non-heading Chinese cabbage ‘Wuyueman’ [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(3): 474-482 (in Chinese with English abstract).
- [33] 张海楠, 陈建新, 吕晋慧. 秋水仙素对万寿菊形态及M1种子的影响[J]. *广西林业科学*, 2023, 52(1): 54-59.
Zhang H N, Chen J X, Lü J H. Effects of colchicine on morphology and M1 seeds of *Tagetes erecta* [J]. *Guangxi Forestry Science*, 2023, 52(1): 54-59 (in Chinese with English abstract).
- [34] 宋莹, 张咪, 张昌伟, 等. 高产、抗病同源四倍体不结球白菜黄心乌新材料的创制[J]. *核农学报*, 2022, 36(7): 1285-1292.
Song Y, Zhang M, Zhang C W, et al. Creation of a new material of high yield and disease resistant autotetraploid non-heading Chinese cabbage Huangxinwu [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2022, 36(7): 1285-1292 (in Chinese with English abstract).
- [35] 蒋卉, 袁欣, 冯乃馨, 等. 矮牵牛同源多倍体诱导及其初期表型差异分析[J]. *河南农业科学*, 2019, 48(9): 111-116.
Jiang H, Yuan X, Feng N X, et al. Analysis of polyploidy induction and initial phenotype difference in *Petunia axillaris* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(9): 111-116 (in Chinese with English abstract).
- [36] 吴瑕, 周浩楠, 刘德阳, 等. 有机肥与生物炭对小白菜光合作用及硝酸盐积累的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2023, 54(4): 403-412.
Wu X, Zhou H N, Liu D Y, et al. Effects of organic fertilizer and biochar on photosynthesis and nitrate accumulation in Chinese cabbage [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2023, 54(4): 403-412 (in Chinese with English abstract).
- [37] 孙磊, 汤金融, 符强, 等. 外源钙对马铃薯产量和贮藏品质的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2023, 54(7): 1-13.
Sun L, Tang J R, Fu Q, et al. Effects of exogenous calcium on potato yield and storage quality [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2023, 54(7): 1-13 (in Chinese with English abstract).
- [38] 许竹激, 雷俊, 邵晓伟, 等. 播期对鲜食春大豆衢春豆1号农艺性状和可溶性糖含量的影响[J]. *大豆科学*, 2021, 40(4): 490-496.

- Xu Z W, Lei J, Shao X W, et al. Effects of sowing date on agronomic traits and soluble sugar content of fresh spring soybean cultivar Quchundou 1[J]. *Soybean Science*, 2021, 40(4): 490-496 (in Chinese with English abstract).
- [39] 姚兴东, 王小凡, 檀卓芮, 等. 生殖生长期遮光处理对大豆叶片光合生理和衰老的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2023, 54(5): 513-521.
Yao X D, Wang X F, Tan Z R, et al. Effects of shade on photosynthetic physiology and senescence of soybean leaves during reproductive growth period[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2023, 54(5): 513-521 (in Chinese with English abstract).
- [40] 李雅婷, 王红娟, 向增旭. 甜叶菊二倍体与同源四倍体生理特征及 AFLP 分析[J]. *核农学报*, 2015, 29(11): 2103-2109.
Li Y T, Wang H J, Xiang Z X. Analysis on physiological characteristics and AFLP of diploid and autotetraploid of *Stevia rebaudiana* Bertoni[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(11): 2103-2109 (in Chinese with English abstract).
- [41] 于永畅, 王厚新, 李承秀, 等. 四倍体与二倍体紫薇光合特性研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(22): 10-14.
Yu Y C, Wang H X, Li C X, et al. Study on photosynthetic characteristics of tetraploid and diploid *Lagerstroemia indica* L. [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(22): 10-14 (in Chinese with English abstract).
- [42] 张红亮, 韩业飞, 柳李旺, 等. 二倍体和同源四倍体萝卜光合特性研究[J]. *天津农业科学*, 2012, 18(3): 1-4.
Zhang H L, Han Y F, Liu L W, et al. Study on the photosynthetic characteristics of the diploid and autotetraploid radish[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2012, 18(3): 1-4 (in Chinese with English abstract).
- [43] 万正林, 王秀明, 周艳霞, 等. 同源四倍体及其原二倍体黑皮冬瓜光合参数比较[J]. *黑龙江农业科学*, 2018(4): 18-22.
Wan Z L, Wang X M, Zhou Y X, et al. Comparison on photosynthetic parameters of autotetraploid and diploid black wax gourd[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(4): 18-22 (in Chinese with English abstract).
- [44] 孔鑫, 王爱英, 郝广友, 等. 水曲柳幼苗水力结构和光合生理对光强梯度变化的耦合响应[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2023, 47(1): 83-91.
Kong X, Wang A Y, Hao G Y, et al. Coordinated responses of hydraulic architecture and photosynthetic characteristics in *Fraxinus mandschurica* seedlings to change of light intensity irradiance[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2023, 47(1): 83-91 (in Chinese with English abstract).

责任编辑: 范雪梅