

采用秋水仙碱创制优质、抗热同源四倍体不结球白菜

邓云^{1,2}, 张蜀宁^{1*}, 孙敏红^{1,3}, 张振超¹

(1. 南京农业大学园艺学院蔬菜研究所, 南京 210095; 2. 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009;

3. 中南林学院资源环境学院, 长沙 410004)

摘要: 以不同浓度秋水仙素处理二倍体不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)子叶生长点, 对变异株进行了形态解剖学、农艺学、细胞学及营养品质鉴定。结果表明: 0.1 mol/L 秋水仙素处理 6 次的效果最佳。与二倍体相比, 四倍体植株、气孔、花器官均表现巨大性; 气孔密度、结实率显著降低; 四倍体白菜蛋白质、可溶性糖和维生素 C 含量比二倍体分别增加 15.69%、71.25% 和 22.18%; 夏季高温条件下四倍体表现出良好的丰产性和抗热性。

关键词: 秋水仙素; 同源四倍体; 不结球白菜; 营养品质; 抗热性

中图分类号: Q943; S634.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)02-0159-04

Induction of Autotetraploid Non-heading Chinese Cabbage with High-quality and Heat-tolerance by Colchicine

DENG Yun^{1,2}, ZHANG Shu-Ning^{1*}, SUN Min-Hong^{1,3}, ZHANG Zhen-Chao¹

(1. Institute of Vegetable, Horticulture College of Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;

2. Zhengzhou Institute of Fruit, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China;

3. The College of Resource and Environment, South Center Forestry University, Changsha 410004, China)

Abstract: Diploid plants of non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) were induced by treating the apical portion of seedlings with different solution of colchicine. Autotetraploid plants were selected and identified based on morphological, anatomic, agronomic and cytological characters and nutritional traits. The results indicated that the treatment with 0.1 mol/L colchicine for 6 times yielded the highest doubled chromosome at highest rates. Compared with the diploid plant, the autotetraploid plants possessed gigantism in plant, stomata, flowering organs. The density of stomata and fecundity were reduced remarkably. The contents of protein, solubility sugar and vitamin C of the autotetraploid plants were increased by 15.69%, 71.25% and 22.18% than that of diploid, respectively. The autotetraploid plants performed high-fertility and heat-tolerance under high temperature in summer.

Key words: Colchicines; Autotetraploid; *Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino; Nutrition; Heat-tolerance

我国南方夏季高温、高湿等气候条件使夏季栽培不结球白菜产量低、品质差、病害重, 造成白菜周年供应中的“伏缺”淡季。刘惠吉率先选育出四倍体抗热不结球白菜“热优 2 号”在夏季高温季节以菜秧方式在白梗消费区栽培^[1]。上海青类型白菜在全国影响范围大, 但是一直缺少优质抗热的四倍体白菜品种。近年来日本、中国台湾的一些上海青类型抗热二倍体白菜占据了中国夏季白菜相当大的市场。创制选育优质、抗热、适应广大消费区的四倍体不结球白菜有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为上海青类型二倍体不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) 02CK, $2n = 2x = 20$, 由江苏正大种子公司提供。试验于 2002 年 9 月 25 日至 2004 年 5 月 26 日在南京农业大学园艺学院园艺站进行。

1.2 同源四倍体不结球白菜诱导及筛选鉴定方法

1.2.1 诱导方法 2002 年 9 月 25 日播种, 在子叶

收稿日期: 2005-07-12, 修回日期: 2005-11-24。

基金项目: 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2001321-1)资助。

作者简介: 邓云(1980-), 男, 硕士, 从事植物多倍体育种研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence). E-mail: snzhang@njau.edu.cn。

期用秋水仙素处理生长点,3个浓度处理分别为0.1 mol/L滴4次,0.1 mol/L滴6次和0.2 mol/L滴4次,每天早晚各1次,以清水处理作为对照,样本数各200株。

1.2.2 筛选鉴定方法 苗期形态学筛选鉴定指标:生长势、叶形、叶色、叶厚,统计变异植株的株数,计算变异率;解剖学筛选鉴定指标:下表皮气孔大小和密度($N=30$);花期形态学筛选鉴定指标:观察花器官及花粉粒大小,并统计角果平均种子数;细胞学筛选鉴定:参照刘大均^[2]的方法进行根尖染色体制片和染色体计数;计算存活率(存活植株数/处理植株数)、变异率(变异植株数/处理植株数)以及同源四倍体加倍率(同源四倍体植株数/处理植株数);所获数据均采用SAS软件进行t检验。于2003年9月20日播种,进行M₂(诱导二代)代驯化栽培。

1.3 二、四倍体植株营养品质比较

2004年9月12日播种M₂代种子,28 d定植,20 d后取二、四倍体同一部位的叶片进行测定。维生素C含量采用比色法^[3];可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[3];蛋白质含量采用考马斯亮蓝G-250染色法^[3];相对含水量参考Weatherley的方法^[4]。

1.4 二、四倍体农艺学性状及抗热性比较

2004年8月3日播种,9月10日采收。试验采用完全随机区组设计,3次重复,株行距20 cm×20 cm,每小区80株,采收前每小区随机取10株测定主要农艺性状,并计算热恢复力(小区成株数/小区株数)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度秋水仙素处理诱导同源四倍体不结球白菜的效果

试验结果(表1)表明:用0.1 mol/L浓度的秋

水仙素处理6次的效果最好,四倍体加倍率达到17.5%,存活率均超过90%,随着处理次数的增加,存活率下降,0.2 mol/L浓度存活率为88.8%。变异率随着处理梯度的增加而增加,0.2 mol/L浓度的变异率最高为48.8%,但四倍体加倍率下降,其原因是由于秋水仙素毒害作用的增加及多次秋水仙素分裂相增加所致。从557株秋水仙素处理成活的幼苗中筛选得到52株同源四倍体植株,编号为03 PK,四倍体植株生长明显减缓,叶片皱缩、增厚,颜色变深,花期均延后7~14 d。

表1 秋水仙素诱导同源四倍体不结球白菜的效果
Table 1 Effect of colchicine treatments on induction of autotetraploid non-heading Chinese cabbage

处理 Treatment	处理株数 Num. of treatment	存活率 (%) Livability	变异率 (%) Variation efficiency	四倍体加倍率 (%) Rates of doubled
0.1 mol/L 4 Times	200	96.0	28.5	2.5
0.1 mol/L 6 Times	200	93.5	42.5	17.5
0.2 mol/L 4 Times	200	88.5	48.5	6.0

2.2 二、四倍体不结球白菜形态解剖学比较

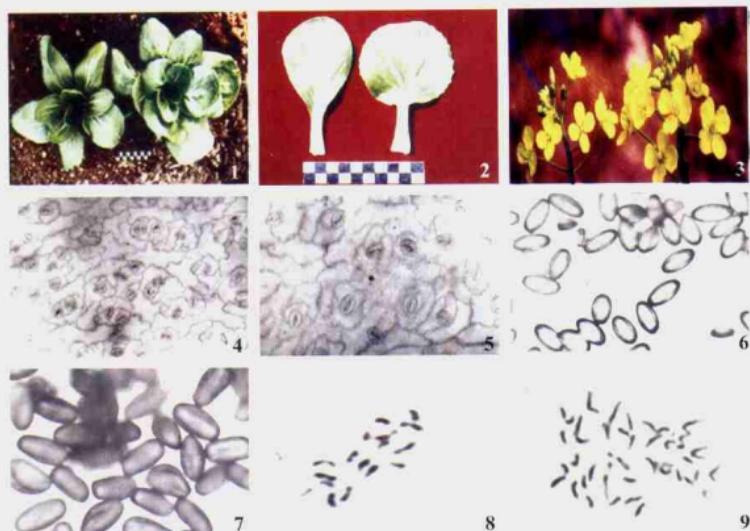
二、四倍体形态解剖学差异见表2及图1。与二倍体相比,四倍体子叶长和宽分别增加17.74%和24.38%,差异极显著,子叶厚度增加,颜色加深;四倍体叶片近圆形,而二倍体为卵圆形,与二倍体相比,叶长略为减少,差异不显著,而宽度增加34.77%,差异极显著;气孔长与宽较二倍体分别增加51.68%和37.17%,气孔密度比二倍体减少52.60%;花器官也表现巨大性,花蕾长和宽较二倍体分别增加31.25%和36.67%;花瓣变圆,颜色变深,长宽比二倍体分别增加22.62%和37.29%;畸形花粉粒增多,正常的花粉粒长宽较二倍体分别增加26.57%和26.36%;角果增大,结实率较二倍体减少77.83%,以上性状差异均达极显著水平。

表2 二、四倍体不结球白菜形态解剖学比较
Table 2 Comparison of morphological and anatomical between autotetraploid and diploid

材料 Materials	子叶(cm)(长×宽) Cotyledon (length × width)	叶片(cm)(长×宽) Leaf (length × width)	气孔密度(Num./mm ²) Stomata density	气孔(μm)(长×宽) Stomata (length × width)
4x	1.46 ** × 1.99 **	13.43 × 13.80 **	14.29 ± 0.82	38.30 ** × 26.09 **
2x	1.24 × 1.60	13.76 × 10.24	30.15 ± 0.96 **	25.25 × 19.02
(4x-2x)/2x(%)	17.74 × 24.38	-2.40 × 34.77	-52.60	51.68 × 37.17
材料 Materials	花蕾(cm)(长×宽) Bud (length × width)	花瓣(cm)(长×宽) Petal (length × width)	花粉粒(μm)(长×宽) Pollen grain (length × width)	单角果平均种子数(粒) Num. of seed per fruit
4x	0.63 ** × 0.41 **	1.03 ** × 0.81 **	49.16 ** × 25.84 **	3.49 ± 0.57
2x	0.48 × 0.30	0.84 × 0.59	38.84 × 20.45	15.74 ± 1.36 **
(4x-2x)/2x(%)	31.25 × 36.67	22.62 × 37.29	26.57 × 26.36	-77.83

** 表示t检验在0.01水平上差异显著。

** indicate significant difference in t-test of 0.01.



1. 二倍体与四倍体植株(左为二倍体,右为四倍体,2004年9月5日);2. 二倍体和四倍体叶片比较(左为二倍体,右为四倍体,2004年9月5日);3. 二倍体和四倍体花器官比较(左为二倍体,右为四倍体);4. 二倍体气孔($\times 130$);5. 四倍体气孔($\times 130$);6. 二倍体花粉粒($\times 230$);7. 四倍体花粉粒($\times 230$);8. 二倍体根尖有丝分裂中期染色体数($2n=2x=20$)($\times 350$);9. 四倍体根尖有丝分裂中期染色体数($2n=4x=40$)($\times 350$)

1. Plants of diploid and autotetraploid (left diploid, right autotetraploid; September 5, 2004); 2. Comparison of leaves between diploid and autotetraploid (left diploid, right autotetraploid; September 5, 2004); 3. Comparison of flowering organ between diploid and autotetraploid (left diploid, right autotetraploid); 4. Diploid stomata($\times 130$); 5. Autotetraploid stomata($\times 130$); 6. Diploid pollen grains($\times 230$); 7. Autotetraploid pollen grains($\times 230$); 8. Chromosomes of metaphase in mitosis of root tips of diploid ($2n=2x=20$) ($\times 350$); 9. Chromosomes of metaphase in mitosis of root tips of autotetraploid ($2n=4x=40$) ($\times 350$)

图 1 二、四倍体不结球白菜的形态解剖学特征及根尖有丝分裂染色体

Fig. 1 The morphological, anatomy character and chromosomes of root tips of diploid and autotetraploid non-heading Chinese cabbage

2.3 根尖染色体数目直接鉴定

四倍体根尖有丝分裂中期染色体数为 $2n = 4x = 40$, 二倍体为 $2n = 2x = 20$ (图 1:8,9)。经苗期形态学筛选鉴定后得到了 116 株变异株, 解剖学筛选鉴定后获得 79 株, 通过花粉粒形态与大小筛选鉴定后入选 64 株, 与染色体鉴定相关性达到 81.3%, 再经过结实率鉴定后入选 59 株, 与染色体鉴定相关

性达到 88.1%。可见:花粉粒形态及大小和结实率可作为一种快速有效的鉴定四倍体的间接方法。

2.4 二、四倍体不结球白菜营养品质性状比较

二、四倍体白菜 4 个营养品质性状见表 3。四倍体相对含水量比二倍体增加了 3.73%, 差异不显著; 蛋白质含量比二倍体增加 15.69%, 差异显著; 可溶性糖含量和维生素 C 含量比二倍体分别增加

表 3 二、四倍体不结球白菜叶片营养品质的比较

Table 3 The comparison of content of nutritional substance of diploid and autotetraploid non-heading Chinese cabbage

材料 Materials	相对含水量(%) Relative water content	蛋白质含量 (mg/100g FW) Protein content	可溶性糖含量 (mg/100g FW) Soluble sugars content	维生素 C (mg/100g FW) Vitamin C
4x	94.24 \pm 0.23	8.48 \pm 0.12	1.37 \pm 0.05	14.93 \pm 0.01
2x	90.85 \pm 0.25	7.33 \pm 0.08 *	0.80 \pm 0.01 **	12.22 \pm 0.03 **
(4x-2x)/2x (%)	3.73	15.69	71.25	22.18

* 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。

* indicates significant difference in t-test of 0.05; ** indicate significant difference in t-test of 0.01.

71.25% 和 22.18% , 差异达极显著水平。与刘惠吉的报道^[1,5]相一致。可见, 四倍体营养品质高于二倍体。

2.5 二、四倍体不结球白菜农艺性状及抗热性比较

2004年夏季田间试验期间, 田间最高温度超过35℃达20 d, 平均温度为26℃, 参试材料处于高温

胁迫环境中。试验结果(表4)表明: 四倍体叶宽和十叶厚比二倍体分别增加34.67% 和 24.44% , 差异极显著; 叶重、叶柄重、单株重和小区产量比二倍体分别增加39.94%、16.23%、25.82% 和 16.43% , 差异达到极显著水平; 株高、叶长减少, 叶数增加, 差异不显著。四倍体热恢复力为96.66%, 二倍体为88.83% , 差异极显著。可见, 四倍体表现出良好的

表4 二、四倍体白菜夏季田间主要农艺性状及抗热性
Table 4 Main agricultural characters and heat tolerance of diploid and autotetraploid non-heading Chinese cabbage in summer

材料 Materials	株高(cm) Plant height	叶数 Leaf num.	叶长(cm) Blade length	叶宽(cm) Blade width	叶重(g) Blade weight	柄重量(g) Petiole weight	单株重(g) Plant weight	小区产量(kg) Yield per plot	十叶厚(cm) Ten-leaf thick	热恢复力(%) Resumeability
4x	16.25	19.70	13.43	13.79 **	86.20 **	105.30	191.50 **	14.060 **	6.06 **	96.66 **
2x	16.85	18.70	13.76	10.24	61.60	90.60	152.20	12.076	4.87	88.83
(4x-2x)/2x (%)	-3.56	5.35	-2.40	34.67	39.94	16.23	25.82	16.43	24.44	8.81

** 表示: 检验在0.01水平上差异显著。

** indicate significant difference in *t*-test of 0.01.

丰产性和抗热性。

2.6 同源四倍体03PK的主要特征

03PK为普通直立、叶数型不结球白菜, 株高16~18 cm, 开展度为18~20 cm, 株形紧凑, 束腰, 菜头粗8~10 cm; 叶片数目为24~26, 叶片绿色近圆形, 直径12~15 cm, 宽略大于长; 叶柄绿白色、勺形, 柄长4~6 cm, 柄宽4~5 cm; 单株重180~200 g(见图1:1)。优质, 适合夏季高温栽培。

3 讨论

多倍体在植物中非常普遍, 大约一半的被子植物, 三分之二的禾本科植物, 80% 的草类, 18% 的豆类都是多倍体; 所以多倍体常被认为是一个高度动态的过程, 并在植物多倍化过程中起着重要作用。利用多倍体普遍具营养成分含量高、品质优良及抗病、高产等优点对蔬菜作物进行改良已长达半个多世纪, 不少国家的蔬菜育种家们已培育出了很多种蔬菜的多倍体新品种。由于同源多倍体更易直接与经济效益相关, 因此多倍体育种研究主要集中在同源多倍体上, 尤其是同源四倍体。

刘学岷报道用0.2 mol/L浓度的秋水仙素处理大白菜生长点24 h和48 h, 同源四倍体加倍率分别达到44.44% 和 68.75%^[6]。而本研究中四倍体加倍率相对较低, 可能是因为大白菜与小白菜基因型差异所致。张全美把茎粗、叶色、叶型指数、花果大小作为初步判定多倍体的指标^[7]。Compton和Gray发现子房直径、雄花的花瓣和花粉囊直径、叶长与叶

宽比是西瓜倍性鉴定的标志^[8]。本研究中花粉粒形态及大小和结实率高低, 可作为鉴定四倍体白菜的主要形态指标。本研究所获得的四倍体白菜结实率比二倍体降低, 但经过驯化一代后, 同源四倍体结实率增加了32.0%, 表明通过驯化栽培可以提高同源四倍体的稳定性; 刘惠吉报道了四倍体白菜通过6~7代驯化, 结实率可以达到生产应用水平^[9]。

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] 刘大均, 陈佩度. 细胞遗传学实验原理与技术 [M]. 南京: 南京农业大学细胞遗传研究室编. 南京: 南京农业大学出版社, 2000.
- [3] 李合生, 孙群, 赵世杰, 章文华. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [4] Weatherly P E. Studies in the water relations of cotton plants. I. The field measurement of water deficit in leaves [J]. *New Phytol*, 1950, 49: 81~97.
- [5] 刘惠吉, 张蜀宁, 王华. 青梗、优质、抗热同源四倍体不结球白菜杂交新品种暑优1号的选育 [J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(3): 22~26.
- [6] 刘学岷, 曹彩霞, 王玉海, 牟金贵, 王明秋, 刘晓东. 大白菜四倍体诱导方法的研究 [J]. 河北农业科学, 2004(3): 14~16.
- [7] 张全美, 张明方. 园艺植物多倍体诱导研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(4): 223~228.
- [8] Compton M E, Gray D J. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon [J]. *Hortscience*, 1994, 29(3): 211~213.
- [9] 刘惠吉. 蔬菜作物多倍体研究及其应用 [J]. 长江蔬菜, 1995, 3: 3~5.