

## 五倍体和同源十倍体‘怀白菊’农艺性状及耐寒性的差异分析

赵喜亭<sup>1,2,3</sup>, 范子建<sup>1</sup>, 刘露颖<sup>1</sup>, 李明军<sup>1,2,3,\*</sup>

河南师范大学<sup>1</sup>生命科学学院, <sup>2</sup>绿色药材生物技术河南省工程实验室, <sup>3</sup>河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南新乡453007

**摘要:** 以前期获得的‘怀白菊’(*Chrysanthemum morifolium* ‘Huaibai’)四个十倍体株系HB-D1、HB-D2、HB-D3、HB-D4和其对照株系HB-CK(五倍体)为试材, 进行大田种植, 观测其农艺性状, 筛选出大田表现最优的十倍体株系; 然后将筛选出的最优十倍体株系和对照株系的试管苗置于人工控制的低温胁迫(昼10°C/夜5°C)条件下7 d, 比较分析二者的耐寒性。结果表明: 在大田生长过程中, 与五倍体对照株系HB-CK相比, 同源十倍体株系中HB-D1、HB-D2、HB-D3长势更旺、冠幅增大、分蘖数增加、产量提高, 以HB-D2表现最佳, 而HB-D4表现不及对照; 在人工控制的低温胁迫条件下, 同源十倍体株系HB-D2叶片中叶绿素、可溶性蛋白及脯氨酸含量降幅及超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性的降幅均小于五倍体对照株系, 且相对电导率、丙二醛含量的增幅也小于五倍体对照株系, 说明染色体加倍后的‘怀白菊’在大田的表现并不一定都优于同源五倍体对照株系, 同源十倍体株系HB-D2的耐寒性强于其五倍体对照株系。

**关键词:** ‘怀白菊’; 五倍体; 同源十倍体; 农艺性状; 耐寒性

菊花是菊科(Asteraceae)菊属(*Chrysanthemum* L.)多年生草本植物, 作为药用植物, 以产于河南焦作(怀庆府)一带的“怀菊花”最为有名, 是著名的“四大怀药”之一。许多研究表明, 菊花具有清热解毒、抗菌等功效(Pereda-Miranda和Hernández-Carlos 2002)。近年来随着人们对天然药物的追求和开发不断增加, 怀菊花的供需矛盾越来越突出, 迫切需要高产优质的怀菊花新种质或新品种出现。多倍体育种是一种有效的育种技术, 可以创制新种质。有研究表明, 染色体加倍能够改变植物的农艺性状、生理生化特性, 提高产量(李俊星等2010; 李亚娟等2008; 晁修一等2001), 在西瓜[Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum. et Nakai] (袁建民等2009)、冬瓜[Benincasa hispida (Thunb.) Cogn.] (万正林等2014)、番茄(Lycopersicon esculentum Mill.) (吴志刚等2012)等作物上已成功应用。目前, 国内外对怀菊花多倍体新种质的创制和研究尚未见报道。此外怀菊花收获季节往往易遭受低温威胁, 导致花朵不能充分开放, 或花瓣变色, 严重影响其品相。本研究以前期获得的‘怀白菊’同源十倍体株系及其五倍体对照株系为试材, 进行了大田农艺性状的比较分析, 筛选出了高产、优质的同源十倍体株系, 并对其进行了低温胁迫耐性的研究, 旨在为高产优质‘怀白菊’同源十倍体株系的大田推广与应用提供理论依据。

### 材料与amp;方法

#### 1 实验材料

实验材料均来自绿色药材生物技术河南省工

程实验室(河南师范大学生命科学学院)。同源十倍体( $10x=90$ )的‘怀白菊’(*Chrysanthemum morifolium* ‘Huaibai’)株系HB-D1、HB-D2、HB-D3、HB-D4通过秋水仙素浸泡法并经过染色体镜检获得, 以未经秋水仙素浸泡的五倍体HB-CK ( $5x=45$ )为对照。将二者的试管苗在温度25°C、光强 $37.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照 $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的培养室(下同)中培养15 d, 之后移入营养钵中练苗45 d, 再移入大田, 进行大田生长中农艺性状的观测, 并筛选出最优的同源十倍体株系进行室内试管苗的耐寒性实验。

#### 2 测定指标与方法

##### 2.1 农艺性状相关指标的测定

在大田营养生长期(7、8、9、10月)每月中旬, 用数码相机记录各株系的形态特征, 并用钢尺测量各株系的株高和冠幅。在其生殖生长期(10月~11月初)统计分蘖数并测定其产量。

##### 2.2 耐寒性相关指标的测定

将对照株系(HB-CK)及其筛选出的‘怀白菊’同源十倍体株系(HB-D2)分别接种于生根培养基[ $1/2\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\alpha$ -萘乙酸( $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, NAA)]中, 放入培养室中培养25 d, 然后将材

收稿 2016-10-27 修订 2017-01-19

资助 国家自然科学基金(81274019和31372105)、河南省科技创新杰出人才计划(114200510013)、中医药行业科研专项子课题(201407005-08)、河南省创新型科技人才队伍建设工程(C20130037)和河南省高校科技创新团队支持计划基金(15IRTSTHN020)。

\* 通讯作者(E-mail: limingjun2002@263.net)。

料转入人工气候培养箱中进行低温处理, 条件设置为 $10^{\circ}\text{C}/5^{\circ}\text{C}$  (昼/夜), 光强 $37.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 光照 $12 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ , 在低温处理的第0、1、3、5、7 d取叶片进行以下生理指标的测定。单株样本, 重复3次。

叶绿素含量测定采用李得孝等(2005)的方法, 可溶性蛋白质含量的测定采用王林嵩(2007)的方法, 脯氨酸含量测定采用刘萍和李明军(2016)的方法, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定采用张志良和翟伟菁(2003)的方法, 相对电导率测定采用化黎玲等(2013)的方法, 超氧化物歧化酶(super-oxide dismutase, SOD)活性的测定采用氮蓝四唑(nitro-blue tetrazolium, NBT)还原法(宋萍萍2010), 过氧化物酶(peioxidase, POD)活性的测定采用愈创

木酚法(宋萍萍2010), 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定采用邵换娟(2013)的方法。

### 3 数据处理

实验数据采用Excel 2010和SPSS 13.0统计软件进行整理分析, 其中不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上达到显著差异。

## 实验结果

### 1 五倍体和同源十倍体‘怀白菊’大田生长农艺性状相关指标的差异分析

由图1和表1可以看出, 同源十倍体‘怀白菊’株系在大田生长过程中株高和冠幅整体趋势一致。在大田生长的7、8、9、10月中, HB-D1、HB-D2



图1 五倍体和同源十倍体‘怀白菊’大田生长中的形态比较

Fig.1 Morphological comparison of pentaploid and autodecaploid of *C. morifolium* ‘Huaibai’ in the field  
图中标尺代表10 cm长度。

表1 五倍体和同源十倍体‘怀白菊’大田中株高、冠幅、分蘖数和产量的比较分析  
Table 1 Comparative analysis of plant height, crown diameter, tiller and yield of pentaploid and autodecaploid of *C. morifolium* ‘Huaibai’ in the field

株系	株高/cm					冠幅/cm					分蘖数		产量	
	7月	8月	9月	10月	10月	7月	8月	9月	10月	10月	鲜重/kg·亩 <sup>-1</sup>	干重/kg·亩 <sup>-1</sup>		
HB-CK	25.00±2.35 <sup>a</sup>	41.62±0.99 <sup>c</sup>	54.12±1.31 <sup>b</sup>	65.60±0.99 <sup>c</sup>	64.00±1.30 <sup>c</sup>	24.42±1.39 <sup>b</sup>	50.12±0.89 <sup>b</sup>	55.36±0.77 <sup>b</sup>	64.00±1.30 <sup>c</sup>	13.00±2.71 <sup>b</sup>	1263.45±209.26 <sup>b</sup>	121.65±17.22 <sup>b</sup>		
HB-D1	25.80±0.84 <sup>a</sup>	46.56±0.44 <sup>b</sup>	59.96±1.18 <sup>a</sup>	73.40±0.89 <sup>a</sup>	67.74±1.08 <sup>b</sup>	25.96±0.86 <sup>ab</sup>	52.14±0.71 <sup>a</sup>	58.94±0.90 <sup>a</sup>	67.74±1.08 <sup>b</sup>	12.33±1.61 <sup>b</sup>	1186.52±328.66 <sup>b</sup>	122.56±36.02 <sup>b</sup>		
HB-D2	27.00±1.22 <sup>a</sup>	51.30±0.85 <sup>a</sup>	61.44±1.56 <sup>a</sup>	73.90±1.16 <sup>a</sup>	71.98±0.84 <sup>a</sup>	27.28±1.40 <sup>a</sup>	53.38±1.02 <sup>a</sup>	59.00±0.83 <sup>a</sup>	71.98±0.84 <sup>a</sup>	16.10±1.97 <sup>a</sup>	1755.20±372.02 <sup>a</sup>	179.90±35.65 <sup>a</sup>		
HB-D3	25.90±2.70 <sup>b</sup>	45.98±0.84 <sup>b</sup>	54.12±1.85 <sup>b</sup>	69.46±1.52 <sup>b</sup>	64.82±0.52 <sup>c</sup>	25.98±2.75 <sup>ab</sup>	51.86±0.79 <sup>a</sup>	54.96±0.76 <sup>b</sup>	64.82±0.52 <sup>c</sup>	15.50±1.43 <sup>a</sup>	1732.15±632.83 <sup>a</sup>	175.93±28.77 <sup>a</sup>		
HB-D4	24.22±1.59 <sup>a</sup>	28.20±0.41 <sup>d</sup>	39.22±1.62 <sup>c</sup>	44.00±1.37 <sup>d</sup>	35.32±1.01 <sup>d</sup>	19.64±0.74 <sup>c</sup>	25.36±1.60 <sup>c</sup>	29.24±1.08 <sup>c</sup>	35.32±1.01 <sup>d</sup>	1.29±0.49 <sup>e</sup>	16.23±7.13 <sup>e</sup>	1.52±0.67 <sup>c</sup>		

种植密度为4 000株·亩<sup>-1</sup>, 1亩≈666.7 m<sup>2</sup>。同列数据用不同小写字母标识表示差异显著( $P < 0.05$ ),  $n = 15$ 。

和HB-D3的株高、冠幅均要高于对照, 而HB-D4却明显低于对照。在同一月份中, HB-D2的株高、冠幅均要高于其他株系, 在10月时差异最为显著: HB-D2的株高和冠幅均显著高于HB-D3、HB-D4和HB-CK, 相对于HB-CK其株高增幅达12.65%, 冠幅增幅达12.67%。由表1还可以看出, HB-D2的分蘖数、鲜重亩产和干重亩产均高于其他株系, 且与HB-D3、HB-D4和HB-CK差异显著, 相对于HB-CK其鲜重亩产和干重亩产增幅分别达38.79%和47.88%。

可知, 染色体同源加倍后的‘怀白菊’在大田的表现并不一定都优于其对照株系。在4个同源十倍体‘怀白菊’株系中HB-D2表现最优, 为最佳株系。由此, 下面以HB-D2为试材分析了‘怀白菊’同源十倍体与其对照五倍体耐寒性的差异。

## 2 五倍体和同源十倍体‘怀白菊’耐寒性的差异分析

以下分别从叶绿素和渗透调节物质含量、膜脂过氧化相关指标及保护酶活性等在低温处理下的变化分析了同源十倍体‘怀白菊’HB-D2与其对照五倍体HB-CK株系耐寒性的差异。

### 2.1 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中叶绿素含量的影响

如图2所示, 与五倍体对照株系HB-CK相比, 低温下同源十倍体‘怀白菊’株系HB-D2叶片中叶绿素含量始终较高, 且达到了显著性差异, 随着低温处理时间的延长差异加大, 至第7天时差值达最大, 与未处理时相比, 此时HB-D2的叶绿素a、b和总含量的降幅分别为11.9%、24.14%和15.3%, 而HB-CK对应指标的降幅分别为17.95%、32%和22.16%。由此表明, 低温胁迫对染色体加倍植株的叶绿体结构破坏较轻。

### 2.2 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中渗透调节物质含量的影响

低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中渗透调节物质含量的影响见图3, 从图中可以看出: 在低温处理中, ‘怀白菊’试管苗叶片中可溶性蛋白质和脯氨酸含量分别表现出下降和上升的趋势。低温胁迫下同源十倍体‘怀白菊’株系HB-D2叶片中的可溶性蛋白质和脯氨酸含量始终高于五倍体对照株系HB-CK, 至第7天时, HB-D2可溶性蛋白质含量和脯氨酸含量分别比HB-CK高20.7%和53.5%。HB-D2在整个低温胁迫期间可溶性蛋白质含量和

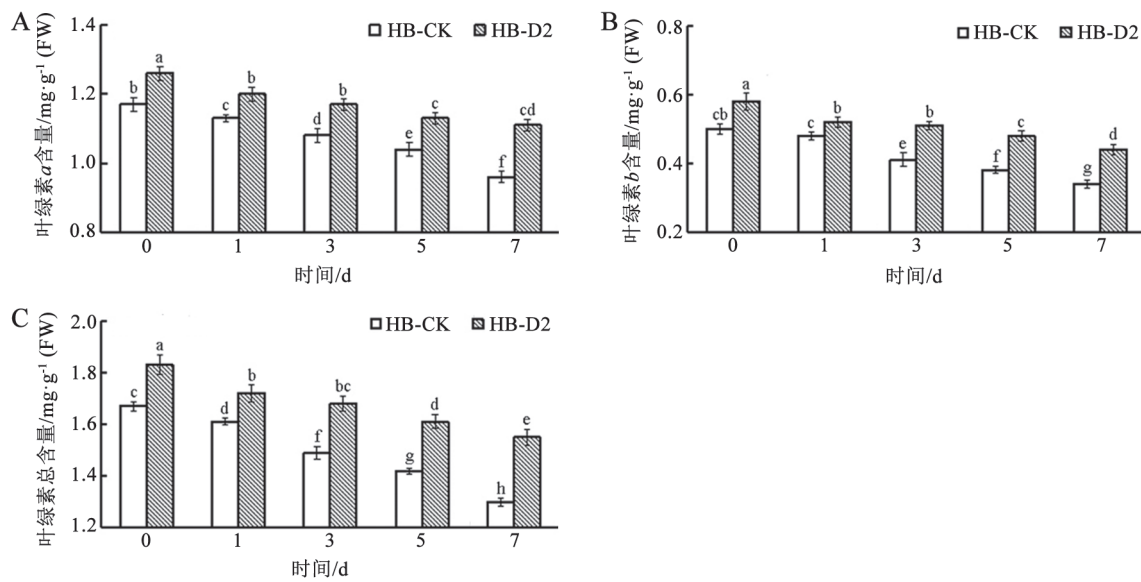


图2 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中叶绿素a、b和总含量的影响  
Fig.2 Effect of low temperature stress on chlorophylls a, b and total chlorophyll contents of leaves from HB-CK and HB-D2 test-tube plantlets

各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著( $P < 0.05$ ), 图3~5同。

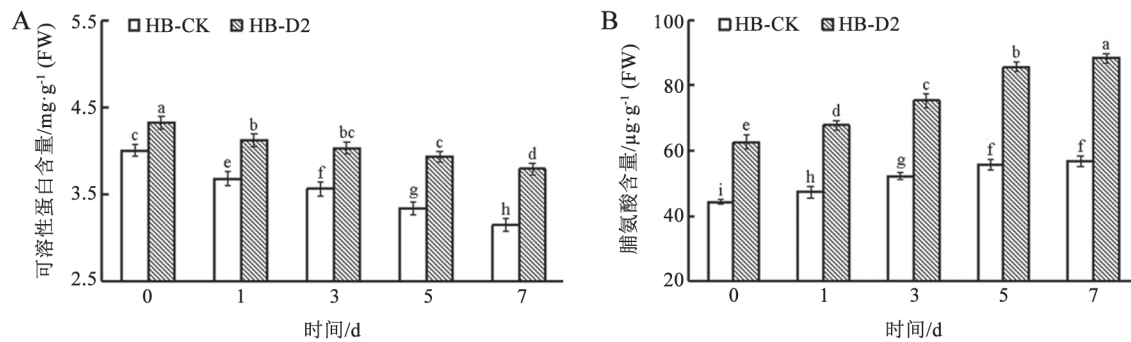


图3 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中可溶性蛋白和脯氨酸含量的影响  
Fig.3 Effect of low temperature stress on soluble protein and free proline contents of leaves from HB-CK and HB-D2 test-tube plantlets

脯氨酸含量的降幅和增幅分别为12.27%和41.21%，而HB-CK的降幅和增幅分别为21.5%和41.21%，说明染色体加倍增强了‘怀白菊’的低温协调能力。

### 2.3 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中膜脂过氧化相关指标的影响

由图4可知，‘怀白菊’试管苗叶片的相对电导率和MDA含量在低温胁迫下都表现出相同的趋势，均随低温处理天数的增加而升高。与五倍体对照株系相比，低温下同源十倍体‘怀白菊’株系HB-D2叶片中相对电导率和MDA含量一直较低，

且达到了显著性差异；随着低温处理时间的延长，差异加大，从低温胁迫处理开始至结束，HB-D2的相对电导率和MDA含量的增幅分别为113.16%和57.04%，而HB-CK的增幅分别为118.27%和80.21%，表明低温胁迫对染色体加倍株系的质膜损伤程度较低。

### 2.4 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中保护酶活性的影响

从图5中可以看出，‘怀白菊’试管苗叶片中的保护酶(SOD、POD和CAT)活性随着低温处理时

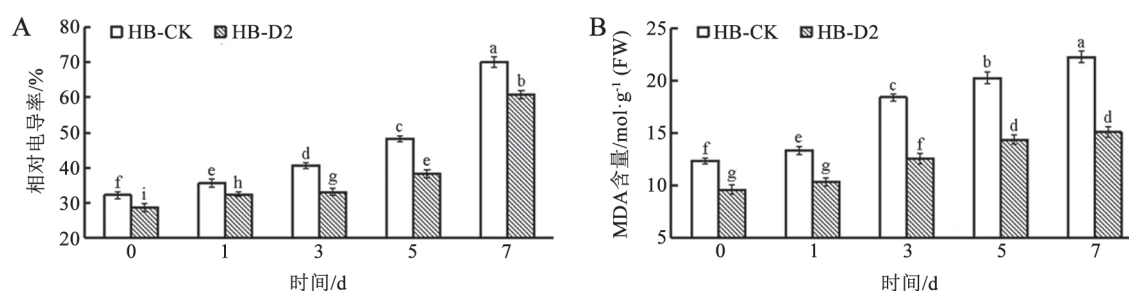


图4 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中相对电导率和MDA的影响

Fig.4 Effect of low temperature stress on relatively conductivity and MDA content of leaves from HB-CK and HB-D2 test-tube plantlets

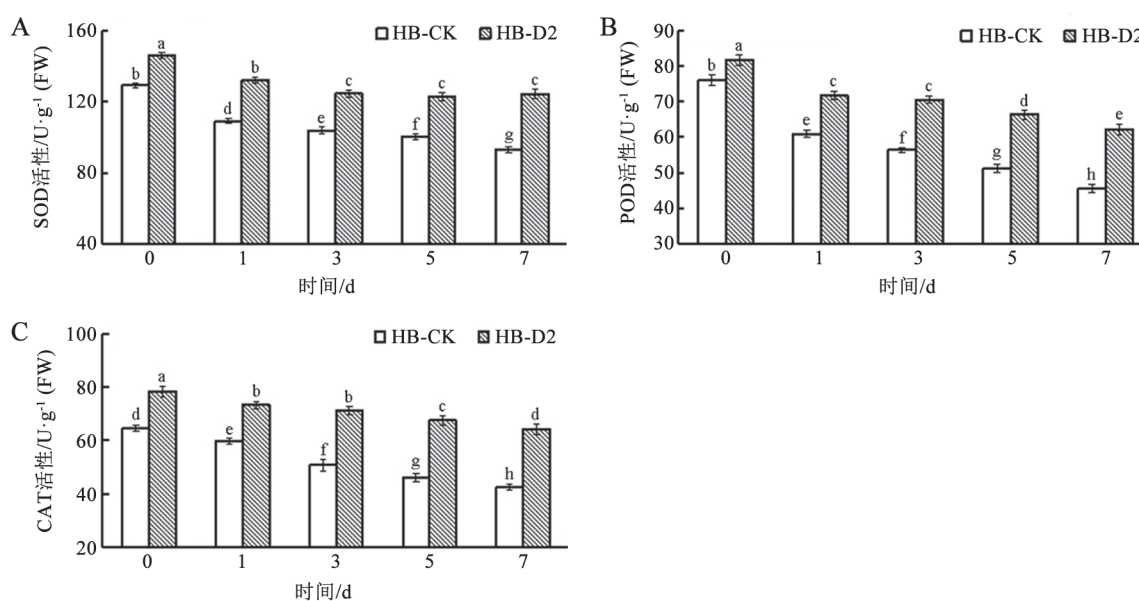


图5 低温处理对HB-CK和HB-D2试管苗叶片中SOD、POD和CAT活性的影响

Fig.5 Effect of low temperature stress on SOD, POD and CAT activities from HB-CK and HB-D2 test-tube plantlets

间的增加而下降。与对照植株相比, 同源十倍体HB-D2株系叶片中的保护酶活性在整个低温胁迫过程中始终较高, 且二者达到了显著性差异。低温胁迫处理至第7天时, 与未处理时相比, 同源十倍体HB-D2株系叶片中的POD、SOD和CAT活性的降幅分别为23.96%、14.78%和18.21%, 而对照植株HB-CK对应指标的降幅分别为40.13%、28.21%和34.4%, 说明染色体加倍从保护酶活性水平增强了‘怀白菊’低温下的保护能力。

综上所述, 染色体加倍后获得的同源十倍体HB-D2株系, 在低温下能保持较高的可溶性蛋白质和脯氨酸等渗透调节物质含量及SOD、POD、CAT等保护酶的活力, 从而抑制了叶绿素含量的下降及膜脂过氧化程度的加剧, 进而提高了抗寒性。

## 讨论

在大田生长中, 染色体加倍后的植株, 其株高、冠幅等农艺性状会发生变化。有研究报道, 在大田试验条件下, 与二倍体相比, 四倍体矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm.) 植株长势健壮, 茎粗壮, 叶片厚度增加, 叶色深绿(魏跃等2010); 四倍体的青花菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) 株高、茎粗、开展度显著高于二倍体(李俊星等2010)。本研究发现十倍体的‘怀白菊’植株在株高、冠幅、分蘖数和产量方面均高于对照株系, 但同时也发现染色体加倍的不同株系大田生长表现并不一定都优于对照株系。和其他诱变育种一样, 多倍体育种结果具有不确定性, 需要进行筛选才能获得优良性状的株系。但由于基因的剂量效应, 多倍

体株系一般会表现为营养器官巨大,产量高等特点(王涛等2015)。这也进一步说明了,获得的染色体加倍植株需种植到大田中,进行差异性比较,从而筛选出优质的染色体加倍株系,进而才能进行大田推广种植。

在一定的温度范围内植物可以正常生长,当外界温度过低时,会影响植物的生长发育,甚至会导致植物死亡(曹红星等2011)。低温逆境下,叶绿素首先受到破坏,其含量下降的幅度和速度随着低温胁迫程度的增强而加大,因此叶绿素含量可作为植株低温耐受的生理指标之一(张静和朱为民2012)。有研究表明,二倍体和四倍体杂交兰(*Cymbidium hybrid*)幼苗在低温胁迫下,叶片叶绿素含量均呈下降趋势,但四倍体下降的幅度明显低于二倍体,说明四倍体杂交兰的抗寒性高于二倍体杂交兰(王园园等2014)。本研究中,在低温胁迫处理时,同源十倍体‘怀白菊’株系HB-D2的叶绿素下降幅度低于五倍体对照株系HB-CK。染色体加倍后的‘怀白菊’HB-D2新陈代谢更强,提高了对矿质元素的吸收,促进了叶绿素的合成,因而十倍体叶绿素含量的本底水平较高。低温会降低植株的呼吸作用,从而抑制植物对N、Mg等矿质元素的吸收,进而影响叶绿素的生物合成,导致新的叶绿素合成速度较慢,而植物原有的叶绿素受到破坏,使其叶绿素含量持续下降。染色体加倍后减缓了叶绿素含量的下降速度,保持了较高的叶绿素水平。

在受逆境胁迫的植物细胞内,积累的脯氨酸除了作为植物细胞质内渗透调节物质外,还能稳定酶的空间结构及组织内的代谢过程,因而能降低凝固点,有防止细胞脱水的作用,因此在低温胁迫中,脯氨酸常被视为一种防冻剂或膜保护剂(蔡仕珍等2010)。植物在逆境胁迫下,会发生膜脂过氧化反应从而严重损害细胞膜系统(陈少裕1991)。膜脂过氧化的最终产物是MDA,其含量的高低与细胞膜受伤害的程度直接相关(Minami等2005)。有研究表明,低温胁迫下四倍体扬花萝卜(*Raphanus sativus* L. var. *radculus* Pers.)幼苗的可溶性蛋白和脯氨酸含量高于二倍体,而MDA含量低于二倍体(颜志明等2007)。高静等(2016)研究表明多倍体彩色马蹄莲(*Zantedeschia hybrida*)的抗寒性优于二倍体。本研究中:在低温处理下,十倍体怀菊花植株的渗透调节能力增强和膜脂过氧化作用降低,同

时也表明了染色体加倍后的‘怀白菊’具有更强的耐寒性。

在低温胁迫的条件下植株体内活性氧的产生和清除失去平衡,其活性氧自由基会大量地积累,进而使膜脂过氧化程度加剧,导致细胞膜的结构受到破坏(房用等2004)。SOD、POD和CAT在清除自由基、抑制膜脂过氧化和保持细胞膜系统的稳定性方面具有重要的作用(Wang等2000)。其中最先消除自由基和活性氧对细胞伤害的酶是SOD(Du等2009; Alscher等2002)。植物在逆境胁迫下,SOD能把有害的超氧化物自由基歧化为 $H_2O_2$ ,后者被CAT和POD分解为 $H_2O$ ,从而解除了对植物细胞的危害(陈圣栋2007)。研究发现染色体加倍会提高植物体内保护酶的活性,在低温胁迫下,四倍体不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)清除自由基的能力比二倍体强(王雅美等2014)。田永生和赵晓明(2007)认为,四倍体蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) SOD、POD和CAT的活性均高于二倍体蒲公英。本研究结果得出:在低温胁迫期间,同源十倍体‘怀白菊’株系HB-D2的SOD、POD和CAT活性下降幅度小于五倍体对照株系HB-CK,能够有效的清除自由基,降低细胞膜受伤害的程度,提高耐寒性。

植株的染色体加倍后,在遗传物质加倍的同时也伴随着染色体的变异,进而加大了植物的遗传多样性,控制各个酶合成的基因也相应地增加,基因表达产物的种类和量随之增多,糖类、蛋白质等营养物质都会增加,SOD、POD等保护酶活力也会增强,进而提高了对外界环境变化的适应力(王涛等2015)。

综上所述,染色体加倍后的植株在大田生长中的表现并不一定都优于对照植株,需进行筛选,从而获得高产、优质的染色体加倍植株。染色体加倍抑制了低温胁迫下‘怀白菊’叶片中的叶绿素的破坏,并保持了渗透物质含量和保护酶活性,降低了膜脂过氧化作用,增强了低温耐性。以上研究结果为获得的同源十倍体‘怀白菊’株系后期的大田推广应用提供了理论参考。

#### 参考文献

- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp*

- Bot, 53 (372): 1331–1341
- Cai SZ, Pan YZ, Chen QB, Ye C (2010). Effects of low temperatures on physiological and biochemical indexes and growth of *Asarum splendens*. Acta Pratac Sin, 19 (1): 95–102 (in Chinese with English abstract) [蔡仕珍, 潘远智, 陈其兵, 叶充(2010). 低温胁迫对花叶细辛生理生化及生长的影响. 草业学报, 19 (1): 95–102]
- Cao HX, Pan CX, Feng ML, Lei XT, Shen Y (2011). Physiological and biochemical response of low temperature stress on oil palm seedlings of Hainan. Southwest China J Agric Sci, 24 (4): 1282–1285 (in Chinese with English abstract) [曹红星, 孙程旭, 冯美利, 雷新涛, 沈雁(2011). 低温胁迫对海南本地种油棕幼苗的生理生化响应. 西南农业学报, 24 (4): 1282–1285]
- Chen S (2007). Study on the tomato tetraploid introduced and the comparison of the cold hardiness and quality between tetraploid and diploid tomato (Master's thesis). Taian: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [陈圣栋(2007). 四倍体番茄的诱导及与二倍体番茄抗冷性、品质比较的研究(硕士学位论文). 泰安: 山东农业大学]
- Chen SY (1991). Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell. Plant Physiol Comm, 27 (2): 84–90 (in Chinese) [陈少裕(1991). 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学通讯, 27 (2): 84–90]
- Du H, Wang Z, Huang B (2009). Differential responses of warm-season and cool-season turfgrass species to heat stress associated with antioxidant enzyme activity. J Am Soc Horticult Sci, 134 (4): 417–422
- Gao J, Wu J, Guo Y, Wu H (2016). The cold resistance of tetraploids colored *Zantedeschia hybrida*. Chin J Trop Agric, 36 (7): 53–57 (in Chinese with English abstract) [高静, 吴景芝, 郭彦兵, 吴红芝(2016). 多倍体彩色马蹄莲抗寒性初步研究. 热带农业科学, 36 (7): 53–57]
- Hata S, Yomo T, Fujita S (2001). Breeding of triploid plants of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) with high rebaudioside A content. Jpn J Trop Agric, 45 (4): 281–289 (in Japanese with English abstract) [畠修一, 四方恒生, 藤田智(2001). ステビア(*Stevia rebaudiana* Bertoni)のレバウディオサイドA高含量三倍体の育成. 熱帯農業, 45 (4): 281–289]
- Hua L, Hu M, Yuan J, Fang S, Zhao H, Yu H (2013). Camphor tree relative conductivity test. Shandong For Sci Technol, (1): 65, 54 (in Chinese) [化黎玲, 胡明月, 袁俊云, 房绍坤, 赵慧, 于海涛(2013). 樟树相对电导率测定试验. 山东林业科技, (1): 65, 54]
- Li D, Guo Y, Yuan H, Zhang M, Gong X, Mu F (2005). Determined methods of chlorophyll from maize. Chin Agric Sci Bull, 21 (6): 153–155 (in Chinese with English abstract) [李得孝, 郭月霞, 员海燕, 张敏, 龚小艳, 穆芳(2005). 玉米叶绿含量测定方法研究. 中国农学通报, 21 (6): 153–155]
- Li J, Zhang S, Liu H, Hou X (2010). Comparison of agronomic characteristic and nutritional quality between diploid and autotetraploid broccoli. J Jiangsu Agric Sci, 2010 (3): 175–176 (in Chinese) [李俊星, 张蜀宁, 刘惠吉, 侯喜林(2010). 青花菜同源四倍体与二倍体农艺性状及营养品质比较. 江苏农业科学, (3): 175–176]
- Li YJ, Fang SH, Lu YG, Li JQ, Chen XH, Liu XD (2008). Heterosis analysis on main agronomic traits in autotetraploid rice. J South China Agric Univ, 29 (3): 117–119 (in Chinese with English abstract) [李亚娟, 房三虎, 卢永根, 李金泉, 陈雄辉, 刘向东(2008). 同源四倍体水稻主要农艺性状杂种优势分析. 华南农业大学学报, 29 (3): 117–119]
- Liu P, Li M (2016). Plant Physiology Experiment. 2th ed. Beijing: Science Press, 215–217 (in Chinese) [刘萍, 李明军(2016). 植物生理学实验. 第2版. 北京: 科学出版社, 215–217]
- Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshiba T, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D (2005). Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. Planta, 220: 414–423
- Pang Y, Li XF, Mu ZZ, Qiao YJ, Yu LJ, Sun L, Lian JG (2004). Development of research on anti-frigidity of tea tree. Nonwood For Res, 22 (2): 69–72 (in Chinese with English abstract) [房用, 李秀芬, 慕宗昭, 乔勇进, 于连家, 孙蕾, 连建国(2004). 茶树抗寒性研究进展. 经济林研究, 22 (2): 69–72]
- Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric nilyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. Tetrahedron, 58 (16): 3145–3154
- Shao H (2013). Study on anti-membrane lipid peroxide ability and genetic stability of regeneration plant after droplet vitrification cryopreservation of Huaqing chrysanthemum (Master's thesis). Xinxiang: Henan Normal University (in Chinese with English abstract) [邵换娟(2013). 怀菊花超低温保存后再生苗的抗膜脂过氧化能力和遗传稳定性研究(硕士学位论文). 新乡: 河南师范大学]
- Song P (2010). The studies on cryopreservation of Huaqing chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) germplasm by vitrification (Master's thesis). Xinxiang: Henan Normal University (in Chinese with English abstract) [宋萍萍(2010). 怀菊花种质资源玻璃化超低温保存技术研究(硕士学位论文). 新乡: 河南师范大学]
- Tian Y, Zhao X (2007). Comparison of several physiological indexes in diploid and tetraploid plant of *T. mongolicum* Hand. Chin Agric Bull, 23 (6): 345–348 (in Chinese with English abstract) [田永生, 赵晓明(2007). 蒲公英二倍体与四倍体几个生理指标比较. 中国农学通报, 23 (6): 345–348]
- Wan ZL, Long MH, Deng JY, Wu P, Liu CA, Li LZ (2014). Comparison on agronomic characteristics in autotetraploid and diploid black wax gourd. J South Agric, 45 (9): 1621–1625 (in Chinese with English abstract) [万正林, 龙明华, 邓俭英, 武鹏, 刘朝安, 李立志(2014). 黑皮冬瓜同源四倍体与起源二倍体农艺性状比较. 南方农业学报, 45 (9): 1621–1625]
- Wang C, Zien CA, Afitlhile M, Welte R, Hildebrand DF, Wang X (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell, 12 (11): 2237–2246
- Wang L (2007). Biochemistry Experiment Technology. Beijing: Science Press, 25–26 (in Chinese) [王林嵩(2007). 生物化学实验技术. 北京: 科学出版社, 25–26]
- Wang T, Chen M, Liu L, Ning C, Cai B, Zhang Z, Qiao Y (2015).

- Changes in genome and gene expression during plant polyploidization. *Chin Bull Bot*, 50 (4): 504–515 (in Chinese with English abstract) [王涛, 陈孟龙, 刘玲, 宁传丽, 蔡斌华, 章镇, 乔玉山 (2015). 植物多倍体化中基因组和基因表达的变化. *植物学报*, 50 (4): 504–515]
- Wang Y, Ye Z, Liu R, Wang G (2014). Analysis on difference in physiological response of diploid and tetraploid of *Cymbidium* hybrid seedling to low temperature stress. *J Plant Resour Environ*, 23 (4): 68–74 (in Chinese with English abstract) [王园园, 叶志琴, 刘容, 王广东 (2014). 二倍体和四倍体杂交兰幼苗对低温胁迫的生理响应差异分析. *植物资源与环境学报*, 23 (4): 68–74]
- Wang Y, Zhang S, Zhen Y, Xu L, Hou X (2014). Expression of cold-related genes and physiological characteristics of the diploid and tetraploid non-heading Chinese cabbage. *J Nanjing Agric Univ*, 37 (5): 41–46 (in Chinese with English abstract) [王雅美, 张蜀宁, 郑于莉, 徐丽娟, 侯喜林 (2014). 二、四倍体不结球白菜抗寒基因表达及生理生长特性. *南京农业大学学报*, 37 (5): 41–46]
- Wei Y, Li ZL, Chen XY, Wang YP, Dai JP, Zhang SN (2010). Agronomic traits and heat tolerance of diploid and tetraploid petunia. *Fujian J Agric Sci*, 25 (2): 187–191 (in Chinese with English abstract) [魏跃, 李振陆, 陈啸寅, 王永平, 戴金平, 张蜀宁 (2010). 二、四倍体矮牵牛农艺性状与耐热性比较研究. *福建农业学报*, 25 (2): 187–191]
- Wu ZG, Liu DC, Song M, Ding LX (2012). Comparative Analysis of *in vitro* induction of autotetraploid of tomato and physiological characteristics. *China Veget*, (4): 67–71 (in Chinese with English abstract) [吴志刚, 刘丹赤, 宋明, 丁立孝 (2012). 番茄同源四倍体离体诱导及生理特性分析. *中国蔬菜*, (4): 67–71]
- Yan ZM, Zhang SN, Tang WH, Zhang LL, Wang KD (2007). Growth, quality and cold tolerance of diploid and tetraploid Yanghua radish. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (7): 1405–1410 (in Chinese with English abstract) [颜志明, 张蜀宁, 汤伟华, 张丽丽, 王开冻 (2007). 二倍体和四倍体扬花萝卜的品质特性及抗寒性比较研究. *西北植物学报*, 27 (7): 1405–1410]
- Yuan J, Dang X, Zhan Y (2009). Advances on polyploid breeding in watermelon. *Chin J Trop Agric*, 29 (3): 65–70 (in Chinese with English abstract) [袁建民, 党选民, 詹园凤 (2009). 西瓜多倍体育种研究进展. *热带农业科学*, 29 (3): 65–70]
- Zhang J, Zhu WM (2012). Effects of chilling stress on contents of chlorophyll and malondialdehyde in tomato seedlings. *Acta Agric Shanghai*, 28 (3): 74–77 (in Chinese with English abstract) [张静, 朱为民 (2012). 低温胁迫对番茄幼苗叶绿素和丙二醛的影响. *上海农业学报*, 28 (3): 74–77]
- Zhang Z, Qu W (2003). *Plant Physiology Experiment Guidance*. 3th ed. Beijing: Higher Education Press, 274–276 (in Chinese) [张志良, 瞿伟菁 (2003). *植物生理学实验指导*. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 274–276]



## Differential agronomic traits and cold tolerances in *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaibai’ between pentaploid and its corresponding autodecaploid

ZHAO Xi-Ting<sup>1,2,3</sup>, FAN Zi-Jian<sup>1</sup>, LIU Lu-Ying<sup>1</sup>, LI Ming-Jun<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, <sup>2</sup>Engineering Laboratory of Biotechnology for Green Medicinal Plant of Henan Province, <sup>3</sup>Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007, China

**Abstract:** Autodecaploid strains of *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaibai’, including HB-D1, HB-D2, HB-D3 and HB-D4, and their corresponding pentaploid, HB-CK, were used in this study. To identify autodecaploid strain with optimal field performance, these strains were transplanted into field and their agronomic traits were investigated. Then their tolerance to cold stress were compared at 10°C/5°C (night/day) for 7 days in an artificially controlled chamber. The results show that the HB-D1, HB-D2 and HB-D3 showed better field growth than HB-CK in terms of growth vigor, crown breadth, tiller number and yield, in which HB-D2 was the best in all strains, but the agronomic traits of HB-D4 showed no better than control. Under the artificially controlled cold stress, in leaves of HB-D2, the decreasing of total chlorophyll, soluble protein, proline contents, the activities of SOD, POD and CAT, the increasing of relative conductivity and MDA content was not as significant as the HB-CK control. It shows that chromosome doubling in ‘Huaibai’ chrysanthemum did not result in better field performance in all traits, and the autodecaploid strain HB-D2 had a higher cold tolerance than its pentaploid control.

**Key words:** *Chrysanthemum morifolium* ‘Huaibai’; pentaploid; autodecaploid; agronomic trait; cold tolerance

Received 2016-10-27 Accepted 2017-01-19

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 81274019 and 31372105), Henan Science and Technology Innovation Talent Plan (Grant No. 114200510013), Sub-topics of Special Foundation for Scientific Research of Traditional Chinese Medicine Industry (Grant No. 201407005-08), Henan Province Science and Technology Innovation Team Plan (Grant No. C20130037), and the Henan Province University Science and Technology Innovation Team Support Project (Grant No. 15IRTSTHN020).

\*Corresponding author (E-mail: limingjun2002@263.net).