

种子沙引发对转基因抗虫棉耐盐性的影响

蒋玉蓉, 孙玉强, 童旭宏, 祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院农学系, 浙江 杭州 310029)

摘要: 以转基因抗虫棉花品种中棉所 41 和浙 905 为材料, 以其遗传背景品种中棉所 23 为对照, 研究了种子沙引发处理对转基因抗虫棉品种在 0%、1.0% 和 1.5% NaCl 浓度下的萌发率、出土率和幼苗生长特性的影响。结果表明, 沙引发处理对转基因抗虫棉品种在盐胁迫下的种子萌发和幼苗生长具有明显的效果, 但对于非转基因棉品种的效果不明显。幼苗子叶、茎秆和根的超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性和丙二醛(MDA)含量测定结果表明, 沙引发处理使棉花幼苗的子叶和根部维持了较高的 SOD 与 POD 活性, 但显著减少幼苗体内 MDA 的积累, 说明沙引发有助于促进棉花在逆境下幼苗生长发育和抗逆性的提高。

关键词: 棉花; 沙引发; 盐胁迫; 种子发芽

中图分类号: S562.034 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)03-0212-05

Effect of Sand Priming on the NaCl Tolerance of Seed of Transgenic Insect Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

JIANG Yu-rong, SUN Yu-qiang, TONG Xu-hong, ZHU Shui-jin*

(Agronomy Department, College of Biotechnology and Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: The effect of seed priming with sand on the seed germination, seedling emergence, the characters of seedling growth and development of the transgenic insect resistant cotton stressed with different concentrations of NaCl was studied, using two extending transgenic insect resistant cotton cultivars, CCRI 41 and Z-905, as materials and their genetic background cultivar, CCRI 23, as check. The results indicated that it was harmful for the seed germination and field emergence of the upland cotton seeds when they were treated with different concentration of NaCl. The germination percentage and field emergence of the transgenic insect resistant cotton cultivars stressed by NaCl were much lower than those of their genetic background check. However, priming treatment with sand could alleviate the harm of the NaCl stress significantly. After the treatment of seed priming, the germination percentage and seedling emergence on the condition of NaCl stress were increased significantly, and the seed tolerance to the salt stress was enhanced greatly, especially for the transgenic insect resistant cotton cultivars. There were great differences in the effect of the seed priming treatments on the seed germination and field emergence, stressed by NaCl, between the transgenic insect resistant cotton and their genetic background one; and the formers, with weaker tolerance against NaCl stress, had a better effect than that of their genetic background one without exogenous insect resistant genes. The results of biochemical analysis showed that the activities of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) in cotyledons and roots of cotton seedling increased significantly, but decreased dramatically for the content of malondialdehyde (MDA), when they were treated by seed priming with sand, comparing with the check. This experiment indicated that sand priming for cotton seed could enhance the

收稿日期: 2007-05-13 **作者简介:** 蒋玉蓉(1974-), 女, 博士; * 通讯作者, shjzhu@zju.edu.cn

基金项目: 国家 973 计划(2004CB117305)和国家自然科学基金(30471108, 30671325)

salt tolerance of seedlings due to increasing the antioxidant enzyme activity and reducing the malondialdehyde (MDA) accumulating in the cotton seedlings, which suggested that sand priming may help to improve seedling establishment and enhance the ability of salt tolerance in cotton.

Key words: cotton; sand priming; salt stress; seed germination

土壤盐渍化是农业生产主要障碍之一。我国现有盐渍土面积约为 2700 万 hm^2 ,并以每年 0.2 万~0.4 万 hm^2 的速度扩展,土壤盐渍化已对我国的农业生产造成了巨大的经济损失^[1]。棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)是较耐盐的植物之一,但土壤盐分过高对棉花生产仍有严重为害^[2]。随着转基因抗虫棉在我国主要产棉区的迅速推广,转基因抗虫棉的耐碱问题已被广泛关注,如何提高转基因抗虫棉的耐盐能力已成为我国棉花生产的重要课题之一。由于缺乏高抗盐的种质资源等原因,棉花耐盐育种虽已取得了较大的进展,但耐盐棉花品种仍不能满足棉花生产发展的需求^[3]。因此,目前的主要措施是通过其它途径来提高棉花植株的耐盐能力。

种子引发 (Seed priming) 又称为渗透调节 (Osmo-conditioning),是一项控制种子缓慢吸水 and 逐步回干的种子处理技术。种子引发研究已有 30 多年历史,在许多植物种类如粮食作物、蔬菜作物、观赏作物、多年生草本植物和牧草植物上有所报道^[4-9]。大量研究表明,种子引发能提高种子活力,在低温、高温、干旱、盐渍或低氧等逆境条件下能加速发芽,提高发芽一致性以及出苗率和成苗率。种子引发方法有渗透引发、水引发、膜引发、滚筒引发、固体基质引发和生物引发等。沙引发是以沙子为引发基质的种子引发方法。沙子具有一定的持水能力和较好的通透性能,引发后易与种子分离,可一次性处理大批量种子,方法简便有效,在农业生产上具有推广应用潜能。大量研究表明,沙引发显著提高了直播水稻和紫花苜蓿等种子活力^[10-11]。然而,有关沙引发对棉花,特别是转基因抗虫棉耐盐性的影响还少见报道。

本研究在控制条件下研究转基因抗虫棉沙引发处理对盐胁迫的反应,研究提高转基因抗虫棉田间耐盐性的方法与措施,为盐碱地的转基因抗虫棉生产提供有益的借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验材料

参试品种为陆地棉品种中棉所 41、浙 905 和

中棉所 23。其中中棉所 41 是通过花粉管通道技术转化的双价转基因抗虫棉品种 (Bt+CpTI),由中国农业科学院棉花研究所提供;浙 905 是通过回交转育而成的单价转基因抗虫棉品种 (Bt),由浙江大学提供;中棉所 23 是采用混选-混交法育成,来源于混交组合 5658 \times 5254 \times 4067 \times 冀 8,为高产优质非转基因棉品种,是中棉所 41 和浙 905 的遗传背景亲本,本试验用作对照品种,由中国农业科学院棉花研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子引发处理。普通沙子用 $d=2.0$ mm 的筛子去除大沙粒及杂物后洗净,高温烘干。每发芽盒中置 1000 g 沙子,加水至含水量为 3.8% (V/W)。然后按 1:50 (种子:沙子)重量比将棉花种子与沙子搅拌混均。将密闭的容器置于 18 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,黑暗条件下引发 72 h (引发条件由预备实验得出)。引发结束后将种子从沙子中筛选出来,室温回干 24 h 后备用。以未引发的棉花种子作为对照。

1.2.2 种子发芽试验。引发和未引发处理的棉花种子在发芽盒 (12 cm \times 12 cm) 中进行发芽。每发芽盒置 1000 g 沙子,分别加入 200 mL 的 0%、0.5%、1.0% 和 1.5% 浓度的 NaCl 溶液,搅拌混匀后作发芽基质。每处理设 3 次重复,每重复置床 100 粒种子,密封后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 光照发芽箱中进行生长 (光照强度约 4000 lx)。每天记录发芽数,第 4 d 和第 10 d 分别统计发芽势 (GE) 和发芽率 (GP)。

1.2.3 田间出苗试验。不同引发处理的种子播于浙江杭州浙江大学实验农场人工盐池内进行田间出苗试验。试验前测定盐池土壤含盐量,再添加食用盐,调至各区土壤含盐量均匀达到 0.5%。以不施盐相邻盐池 (土壤含盐量低于 0.02%) 为对照,每处理播种子 200 粒,重复 3 次。播种后 15 d 后统计田间出苗情况和出苗率。

1.2.4 生理生化指标测定。分别取田间播种 15 d 的幼苗,每处理分别取子叶、茎、根,测定超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 的活性和丙二醛 (MDA) 的含量。SOD 活性采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原抑制法;POD 活性用愈创木酚法

测定;MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。

1.2.5 统计分析。百分比数据在分析前进行反正弦转换($y = \arcsin[\sqrt{x/100}]$),所有数据用 SAS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 NaCl 对转基因抗虫棉种子萌发和出苗的影响

尽管棉花是较耐盐的作物,但 NaCl 处理对其种子萌发具有极显著的抑制作用,表现为发芽慢且发芽率低。无盐胁迫下的清水对照,4 d 的发芽势与发芽率相同,且各品种具相同的趋势。

表 1 不同浓度 NaCl 对转基因抗虫棉种子发芽的影响

Table 1 Effects of NaCl on the germination of the transgenic cotton seeds

品种	发芽势/ %				发芽率/ %				田间出苗率/ %	
	CK	0.5%NaCl	1.0%NaCl	1.5%NaCl	CK	0.5%NaCl	1.0%NaCl	1.5%NaCl	CK	0.5%NaCl
中棉所 41	91.3±3.1a	48.7±1.2b	32.0±3.5c	11.3±5.8d	91.3±3.3a	58.7±1.2b	42.0±3.5c	11.3±5.8d	89.5±5.2a	45.5±4.3b
浙 905	84.7±1.2a	58.7±5.0b	35.3±5.8c	0.7±1.2d	87.7±1.4a	68.3±3.2b	53.3±6.4c	33.3±6.1d	83.3±5.4a	54.7±4.1b
中棉所 23	90.7±3.1a	88.7±1.2a	72.0±3.5b	11.3±5.8c	90.7±3.3a	88.7±1.2a	72.0±3.5b	11.3±5.8c	89.2±4.7a	59.0±3.5b

注:同品种不同处理间比较,字母相同者差异不显著($P \leq 0.05$, LSD),下同。

2.2 沙引发对转基因抗虫棉在盐胁迫下的发芽表现

盐胁迫对棉花种子萌发和幼苗生长具有显著的影响,在 0.5%、1.0%和 1.5%NaCl 胁迫下,各

NaCl 处理后,各材料的发芽势和发芽率显著降低(表 1)。即使在 0.5%NaCl 条件下,各品种的发芽势和发芽率均有极显著的下降。说明棉花种子在 NaCl 胁迫下的发芽率受到明显的影响。NaCl 处理对于各参试品种田间出苗也有显著的影响。与各自的对照相比,中棉所 41、浙 905 和中棉所 23 在 0.5%盐池中的出苗率分别比无盐对照下降 23.5%、38.3%和 39.8%,差异均达极显著水平。品种之间的耐盐程度有显著的差异,其中 2 个转基因抗虫棉品种的耐盐性显著差于其遗传背景材料中棉所 23。由于参试的棉花品种的遗传背景基本相同,品种间的耐盐性差异可能与外源抗虫基因的导入有一定的关系。

参试品种的发芽势、发芽率均明显低于对照。经沙引发后的种子,在不同浓度的 NaCl 处理下进行发芽试验,结果见表 2。

表 2 沙引发处理对转基因抗虫棉种子耐盐性的影响

Table 2 Effects of seed priming on germination of transgenic cotton seeds at salt stress

品种	处 理	发芽势/ %				发芽率/ %				田间出苗率/ %	
		CK	0.5%NaCl	1.0%NaCl	1.5%NaCl	CK	0.5%NaCl	1.0%NaCl	1.5%NaCl	CK	0.5%NaCl
中棉所 41	NP	91.3	48.7	32.0	11.3	91.3	58.7	42.0	11.3	89.5	45.5
	P	91.3	85.4	70.2	30.3	91.2	88.3	75.9	32.0	85.4	84.1
	D	0.0	36.7**	38.2**	19.0**	-0.1	29.6**	33.9**	20.7**	-4.1	38.6**
	NP	84.7	58.7	35.3	0.7	87.7	68.3	53.3	33.3	83.3	54.7
浙 905	P	85.5	83.2	71.1	40.1	88.2	87.1	74.6	42.2	80.3	77.1
	D	0.8	24.5**	35.8**	39.4**	0.5	18.8**	21.3**	8.9*	-3.0	22.4**
	NP	90.7	88.7	72.0	11.3	90.7	88.7	72.0	11.3	89.2	59
中棉所 23	P	91.1	87.4	75.3	22.4	90.8	89.0	74.5	23.1	87.2	86.2
	D	0.4	-1.3	3.3	11.1*	0.1	0.3	2.5	11.8*	-2.0	27.2**

注:*、** 分别表示 5%和 1%的显著水平;NP、P 分别代表未引物和引发处理,D 代表二者的差异,下同。

由表 2 可见,沙引发后,各参试品种在无 NaCl 胁迫时的发芽势与发芽率与未引发的对照无显著差异,说明沙引发未能显著提高转基因抗虫棉的发芽率。然而,在 NaCl 胁迫下,沙引发处理后的转基因抗虫棉种子的发芽势和发芽率均显著高于未引发的种子。其中中棉所 41 引发种子的发芽势较未引发种子提高了 19.0%~38.2%,

发芽率提高 20.7%~33.9%;浙 905 引发种子的发芽势较未引发种子提高了 24.5%~39.4%,发芽率提高 8.9%~21.3%,差异均达显著或极显著水平。在不同 NaCl 浓度胁迫下,中棉所 23 引发种子的发芽势和发芽率也有明显的提高,但提高程度未及转基因抗虫棉品种。由此可见,沙引发可显著地提高棉花种子在 NaCl 胁迫下的发芽

势和发芽率,显著提高耐盐能力,特别是转基因抗虫棉品种。

从不同的品种来看,尽管各材料的发芽率有一定的差异,但沙引发效果因品种的耐盐性不同而异。其中耐盐性较差的中棉所 41 的引发效果最好,浙 905 次之,而耐盐性最好的中棉所 23 沙引发的效果最差。由于参试材料间除抗虫性外,其遗传背景基本相同。因此,沙引发对于转基因抗虫棉提高其耐盐能力可能与外源基因导入有一定的关系。

田间播种试验结果表明,沙引发对于无盐胁迫的田间出苗率无显著影响,田间顶土出苗能力甚至低于未引发的对照。而在 0.5%NaCl 盐池中,沙引发的出苗率达 77.1%~86.4%,较未引发种子高 22.4%~38.6%,差异均达极显著水平。说明沙引发可显著提高棉花种子在盐胁迫下

的田间出苗率。该项技术对于盐碱地植棉具有一定的实践意义。

值得指出的是,转基因抗虫棉品种沙引发后虽然在各个不同浓度 NaCl 胁迫下均能显著地提高发芽势和发芽率,但因在高盐胁迫条件下(1.5%NaCl)的发芽水平较低,其发芽势和发芽率仍只有未胁迫条件下的 1/3 左右,生产实用价值较低。因此,对于重盐碱地来讲,沙引发处理还未能有效地解决棉花种子发芽出苗问题。

2.3 沙引发对棉苗 SOD、POD 和 MDA 含量的影响

沙引发和未引发的种子播于含 0.5%NaCl 盐池和相邻对照池中,出苗后分别取棉苗的子叶、茎秆和根进行 SOD 和 POD 活性和 MDA 含量测定,结果见表 3。

表 3 沙引发对棉苗 SOD 和 POD 活性以及 MDA 含量的影响

Table 3 Effects of priming on activities of SOD and POD,MDA content in cotton seedlings under saline stress

品 种	处 理	SOD 活性/(U · g ⁻¹ · min ⁻¹)			POD 活性/(U · g ⁻¹ · min ⁻¹)			MDA 含量/(μmol · L ⁻¹ · g ⁻¹)			
		NaCl/%	子叶	茎部	根部	子叶	茎部	根部	子叶	茎部	根部
中 棉 所 41	NP		209.56	176.87	130.08	311.56	110.93	173.82	4.32	3.95	0.32
	CK	P	211.8	199.25	136.85	316.66	108.56	195.62	3.95	3.82	0.29
	D		2.24	22.38**	6.77*	5.1*	-2.37	21.8**	-0.37**	-0.13*	-0.03
	盐 胁迫	NP	199.29	166.66	82.75	305.37	118.4	198.68	5.12	3.94	0.38
	迫	P	205.83	186.05	88.33	327.51	116.34	205.03	4.85	3.85	0.33
	D		6.54*	19.39**	5.58*	22.14**	-2.06	6.35*	-0.27**	-0.09*	-0.05
浙 905	NP		208.32	182.83	77.13	321.74	102.77	194.05	5.75	4.51	0.44
	CK	P	216.15	201.01	96.04	330.96	100.06	209.62	5.32	3.74	0.38
	D		7.83*	18.18**	18.91**	9.22*	-2.71	15.57*	-0.43**	-0.77**	-0.06
	盐 胁迫	NP	207.82	166.54	81.21	163.44	71.92	161.2	5.84	2.83	0.76
	迫	P	203.48	184.75	88.34	174.36	65.8	176	5.78	2.74	0.75
	D		-4.34	19.79**	7.13*	10.92*	-6.12	14.8*	-0.06	-0.09*	-0.01
中 棉 所 23	NP		201.73	160.60	117.13	315.29	99.56	201.79	3.32	2.10	0.69
	CK	P	211.22	172.32	129.27	330.38	96.93	210.00	2.99	2.00	0.63
	D		9.49*	11.72*	12.14*	15.09**	-2.63	8.21*	-0.33**	-0.10*	-0.06
	盐 胁迫	NP	201.17	150.5	73.38	184.30	77.43	173.4	4.86	3.59	0.74
	迫	P	209.20	161.05	100.69	188.60	70.42	190.27	4.32	2.80	0.73
	D		8.03*	10.55*	27.31**	4.30	-7.01*	16.87**	-0.54**	-0.79**	-0.01

由表 3 可见,各参试品种的 SOD 以子叶最高,茎秆次之,根部活性最低。而 POD 则于子叶最高,根部次之,茎秆最低。NaCl 胁迫和未胁迫之间,各参试品种各部位的 SOD 和 POD 活性没有显著差异,但沙引发处理与未引发对照之间,除茎秆的 POD 活性外,两种酶的活性差异达到显著或极显著水平,即引发处理可显著地提高幼苗体内的 SOD 和 POD 活性。从不同部位的两种酶活性来看,沙引发处理对于不同品种不同部位的

SOD 活提高差异甚大,其中转基因抗虫棉(中棉所 41 和浙 905)引发处理幼苗的茎秆的 SOD 活性极显著地高于未引发对照,子叶和根部相差较少;非转基因品种(中棉所 23)则于根部的 SOD 活性差异最明显。沙引发处理对于参试品种茎秆中的 POD 活性却有减少的趋势,尽管减少幅度未达显著水平,但沙引发对于子叶和根部 POD 活性的增加达到了显著或极显著水平。SOD 和 POD 是植物体内防护自由基对细胞膜系统伤害的重要

酶类^[12]。逆境中保护酶活性增强或维持较高水平能有效地清除活性氧自由基对膜系统的伤害,使膜结构和功能相对稳定,提高植株的抗逆能力。因此,沙引发处理显著提高了幼苗的 SOD 和 POD 活性,其抗逆性得到有效的提高。

丙二醛(MDA)是常用的膜脂过氧化的指标,MDA 的积累对膜和细胞造成一定的伤害。从表 3 看出,沙引发处理可有效地降低幼苗的 MDA 含量。其中子叶和茎秆中的 MDA 含量减少达到显著或极显著水平,根部中的 MDA 含量降低未达到显著水平。NaCl 胁迫与对照之间,MDA 含量差异不显著,品种间 MDA 的变化有一定的差异,但无规律可寻。

3 讨论

种子引发时间的长短视引发介质、介质浓度和温度而定。如果引发不足,种子在吸水滞留期内,细胞膜修复和发芽前代谢尚未充分进行,达不到最佳的引发效果,而引发过度会引起短时间缺氧、细胞内物质的大量外漏而降低种子活力。本研究通过预实验,设定 18℃ 引发 72 h 的引发条件。虽然,这一条件可能并非最佳条件,但本试验结果足以证明该引发条件可显著地提高棉花种子的耐盐能力,有利于棉花种子在盐胁迫下的发芽和出苗,这一技术对于盐碱地植棉具有一定的实践意义。然而,引发效应的大小除与引发处理的环境条件有关外,还受到种子本身的影响。品种间甚至种子批次间因种子的形态结构、子粒大小、原始水分和活力水平高低等不同,其引发效果不尽相同。因此,在进行大批量种子引发前,应做预备试验,选择最佳的温度和时间组合对其进行引发处理,才能达到理想的效果。

本试验中,两个转基因抗虫棉品种分别是转 Bt 单价基因和转 Bt+CpTI 双价基因的转基因抗虫棉品种,其遗传背景均是对照品种中棉所 23。研究表明,两个转基因抗虫棉品种的耐盐能力显著差异对照品种。然而,沙引发处理却能显著地提高转基因抗虫棉的耐盐性,其提高程度显著高于对照品种^[13-14]。这与以前报道的盐引发结果相一致^[15]。因此,棉花种子引发处理对于转基因棉的抗逆性改良效果可能具有一定的普遍意义,而有关种子引发与外源基因的导入和表达之间的关系却值得进行深入研究。

参考文献:

- [1] 石元容. 盐碱土改良[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [2] 陈秀兰. 提高棉花抗盐性的途径[J]. 棉花学报, 1998, 10 (2): 64-67.
- [3] 刘国强, 鲁黎明, 刘金定. 棉花品种资源耐盐性鉴定研究[J]. 作物品种资源, 1993(2): 21-22.
- [4] 颜启传. 种子学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 112-118.
- [5] 贺长征, 胡晋. 混合盐引发对水稻在逆境条件下发芽及幼苗生理特性的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 28(2): 175-178.
- [6] CARPENTER W J, Boucher J F. Priming improves high temperature germination of pansy seed [J]. HortScience, 1991, 25: 541-544.
- [7] CAYUELA E, Perez-Alfocea F, Caro M, et al. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato[J]. Plant Physiol, 1996, 96: 231-236.
- [8] PASSAM H C, Kakouriotis D. The effects of osmoconditioning on the germination, emergence and early plant growth of cucumber under saline conditions[J]. HortScience, 1994, 57: 233-240.
- [9] SIVRITEPE N, Sivritepe H O, Eris N. The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 97: 229-237.
- [10] 阮松林, 薛庆中, 王清华. 种子引发对杂交水稻幼苗耐盐性的生理效应[J]. 中国农业科学, 2003, 36(4): 463-468.
- [11] 解秀娟, 胡晋. 沙引发对紫花苜蓿种子盐逆境下发芽及幼苗生理生化变化的影响[J]. 种子, 2003 (4): 5-6.
- [12] HU J, Zhu Z Y, Song W J, et al. Effect of sand priming on the germination and the physiological changes in direct-sowing rice (*Oryza sativa* L.) [M]// In: Proceeding of the International Forum on Seed Science & Technology and Seed Industry Development, Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002: 185-191.
- [13] 叶武威, 王俊娟, 樊宝香, 等. 盐胁迫下耐盐性不同的陆地棉品种脱落规律及机理[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 159-封三.
- [14] 王俊娟, 叶武威, 周大云, 等. 盐胁迫下不同耐盐类型棉花的萌发特性[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 315-317.
- [15] 林君, 孙玉强, 吕有军, 等. 种子盐引发对转基因抗虫棉耐盐性的影响[J]. 棉花学报, 2006, 18(6): 338-341. ●