

PEG 胁迫方法评价棉花幼苗耐旱性研究

张雪妍, 刘传亮, 王俊娟, 李付广*, 叶武威

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南安阳 455004)

摘要:分别选用 8 个陆地棉、2 个海岛棉、2 个亚洲棉品种作为材料进行耐旱水平试验, 以 PEG6000 作为水分胁迫剂, 对棉花种子萌发期、芽期、子叶期和真叶期材料分别进行处理, 得出了耐旱水平变化曲线, 结果验证棉花耐旱性鉴定关键时期应在 3~6 片真叶幼苗。用不同浓度 PEG6000 对具有 3~6 片真叶的棉花幼苗进行 12 h 连续处理后, 统计其成活率。研究表明: PEG6000 溶液浓度为 17% (W/V) 时, 棉花幼苗的成活率与田间旱棚鉴定结果有较高的一致性。此方法简单、快速, 易操作, 基本可用于棉花品种的耐旱性评价与鉴定工作, 并将为棉花耐旱分子生物学研究奠定基础。

关键词: 棉花; PEG 胁迫; 耐旱性; 成活率

中图分类号: S562.01 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)03-0205-05

Evaluation to the Drought Tolerance of Cotton by PEG Water-stress

ZHANG Xue-yan, LIU Chuan-liang, WANG Jun-juan, LI Fu-guang*, YE Wu-wei

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455004, China)

Abstract: This experiment was conducted with eight cultivars of upland cotton, two of island cotton and three of Asian cotton as types of different levels in drought tolerance. Cotton materials during germination, bud-stage, cotyledon-stage and real-leaf stage were exposed to osmotic adjustments of PEG6000 for 12 hours in order to imitate the drought circumstance. After the 12-hours osmotic menace, calculated the survival ratio of various materials, then through statistical method, curves of the mutative level of drought tolerance were obtained, proving that the 3~6-leaf stage is the key stage on drought tolerance of cotton seedlings. With different PEG6000 concentration, the ratios which 3~6-leaf seedlings recovered were calculated to compare with the results in real drought situation. And the results revealed that: With 17% (W/V) PEG6000 treatment, the ratio which seedlings recovered corresponded with the results in drought-shed. The above results suggested that osmotic adjustments could be used to evaluate simply the drought tolerance of cotton, though the cotton after PEG-treated differed slightly in physiology with cotton after drought-treated. The method with osmotic adjustments of PEG is simple, fast and easy operated, could be used to evaluate the drought tolerance of cotton in principle, and will establish foundations for study on cotton drought-tolerance molecular biology.

Key words: cotton; PEG water-stress; drought tolerance; survival ratio

干旱是影响植物优良遗传特性充分表达的主要逆境因子之一。由于中国大部分棉花种植区域水资源紧缺, 建立稳定有效的耐旱评价及鉴定标

准, 开展棉花耐旱性研究, 选育耐旱品种对棉花生产具有重要意义。

20 世纪 80 年代以来, 人们对植物耐旱性评

收稿日期: 2006-12-25

作者简介: 张雪妍(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向棉花基因工程; * 通讯作者, aylifug@public.ayptt.ha.cn

基金项目: 国家十一五“863”项目(2006AA100105)和“948”项目(2006-G17(A))

价、鉴定指标体系的建立进行了较多探索^[1-3],研究对象主要是小麦^[4]、大麦^[5]、玉米^[6]、高粱^[7]等农作物。鉴定方法主要包括田间直接鉴定法、人工控制干旱胁迫法、生化胁迫鉴定法及自然失水胁迫鉴定法等。田间鉴定法简单可靠,但受季节限制,所需时间长、工作量大、速度慢,重复性较差;人工控制干旱胁迫法包括反复干旱法和连续干旱法两种,其缺点与田间鉴定结果雷同;鉴定法多采用聚乙二醇(PEG)胁迫处理^[8],克服了前两种方法周期长、重复性较差的缺点。1979年,首次以PEG作为诱导剂和筛选剂鉴定,筛选出耐旱的烟草细胞系^[9]之后,先后又利用PEG作为选择剂获得抗干旱的番茄细胞^[10]、耐旱高粱再生植株及种子^[11]、抗PEG胁迫的苜蓿细胞系^[12-13]等报道。

我国棉花抗旱性评价、鉴定多采用反复干旱法^[14]。使用PEG溶液进行生化鉴定的条件仍处于摸索阶段。本研究选用PEG6000作为耐旱性选择剂,以期建立一种快速有效的棉花幼苗耐旱性评价体系,为棉花耐旱资源筛选和育种提供依据,为耐旱分子生物学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试棉花品种:实验所用的8个陆地棉(晋棉26、鲁棉6、冀713、珂字310、珂字348、中棉所9号、中棉所12、中棉所27)、2个海岛棉(新海16、新海17)、3个亚洲棉(新平土棉、凤阳中棉、石系亚1号)均由中国农业科学院棉花研究所种质资源中期库提供。

实验药品:聚乙二醇(PEG6000),由AM-RESCO生产。

棉花幼苗的准备^[15]:选取整齐饱满的棉花种子,种于营养钵(基质按园土:草炭:蛭石:粗河沙=4:3:2:1的配比)。将幼苗取回实验室,用自来水小心冲洗干净,然后在MS营养液中平衡培养2d后,用吸水纸快速吸干表面水分后备用。

1.2 实验方法

1.2.1 萌发期PEG胁迫测定。种子剥壳,经0.1%的HgCl₂消毒后,分别置于有三层滤纸的培养皿中,各加入10 mL浓度为5%、10%、15%、20%、25%、30%的PEG6000,每处理150粒种子,放在有湿润滤纸的培养皿中培养;对照为自来水处理。各处理均置于26~28℃黑暗培养^[16],每24 h拍照一次,观察并记录萌发情况。

1.2.2 芽期PEG胁迫测定。将已萌发种子置于直径为150 mm底部垫有圆形滤纸的培养皿中,加入10 mL PEG6000溶液,26~28℃黑暗培养,设置0.5%、10%、15%、20% 5个梯度处理,重复6次。调查发芽率^[17]。

1.2.3 苗期PEG胁迫测定。将准备好的幼苗根冲洗干净,吸干水分后放进实验需要浓度的PEG6000溶液中,26~28℃光照培养,处理12 h后取出用纯净水清洗根部,转入MS营养液复水培养,观察记录转入MS营养液后的幼苗生长情况^[15](注意不断换水)。重复4次,记录5次各处理下的总成活株数。

1.2.4 叶片组织含水量的测定。取PEG6000溶液0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 6个小跨度梯度和5%、7.5%、10% 3个大跨度梯度处理12 h后子叶期、真叶期幼苗叶片,自来水冲洗数次,纯净水冲洗3次,吸去水分后称取鲜重(Wf)^[18],立即放入蒸馏水浸泡,每隔2 h称重量至重量不再增加即为饱和重(Wt),100~102℃杀青15 min,80℃烘干8 h左右,称重至重量不再减少即为干重(Wd)。根据公式计算叶片组织的含水量。每处理4次重复。

$$\text{相对含水量} = (Wf - Wd) / (Wt - Wd) \times 100\%$$

1.2.5 叶片细胞的质膜透性测定。参照《植物生理学实验手册》^[19];同1.2.4处理后叶片剪下清洗干净,晾干后剪碎称取0.5 g放进100 mL蒸馏水中,25℃渗透24 h后测其电阻率R₁,沸水煮沸15 min,自然冷却至室温后再次测其电阻率R₂,重复3次。根据公式得到相对电解质渗透率。

$$\text{相对电解质渗透率} = (R_1 / R_2) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 PEG对棉花生育初期不同阶段的胁迫结果

将抗旱品种石系亚1号和不耐旱品种凤阳中棉在PEG胁迫下分别测定其萌发期、芽期、子叶期和真叶期的成活率。结果表明在PEG胁迫下,不同品种、相同品种不同生育期的半致死浓度均存在着明显差别。石系亚1号各生育期的半致死浓度均高于凤阳中棉,在真叶期两者差异最明显,分别为24%、17%(图1)。该结果与反复干旱法鉴定法实验结果趋向一致:即干旱实验胁迫至土壤含水量3%再复水的反复实验,石系亚1号成活率在70%以上,为抗旱品种,而凤阳中棉成活率在50%以下,为不耐旱品种^[20]。

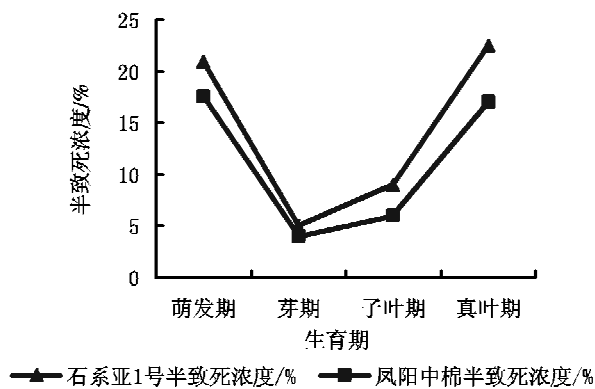


图 1 棉花不同生育期的半致死浓度(PEG6000 溶液)变化情况

Fig. 1 The Variation of medianlethal concentration (PEG6000) on cotton during different stages

棉花生育初期耐旱能力从萌发期开始下降,芽期最低,之后又逐渐上升,至真叶期趋向稳定,我国采用的反复干旱法鉴定也主要是针对真叶期以后的棉花幼苗进行处理^[20-22]。由于真叶期棉花 PEG 鉴定相对容易操作,耐旱性与田间鉴定结果一致,推断幼苗期同样为 PEG 胁迫鉴定棉花耐旱性的关键阶段,说明前人提出的评估植物耐旱性的实验应选取真叶期幼苗的观点^[4,6]也适用于棉花。

2.2 PEG6000 鉴定浓度的确定

研究表明,植物基因型的耐旱特性可以通过鉴定其幼苗阶段的耐旱特性来反映^[4,6]。根据反复干旱法鉴定多年实验结果,以反复干旱法成活率均值在 50% 的棉花品种——晋棉 26 幼苗(真叶 3~6 叶时期)为实验材料,采用 0%、5%、10%、15%、20% (w/v) PEG6000 溶液胁迫处理,测定其

成活率(图 2),根据曲线判断半致死浓度(LC50)约在 16%~17%。经进一步实验:用 17% PEG6000 溶液处理晋棉 26,其幼苗成活率为 50%,即确定该浓度为 PEG 胁迫方法评价棉花耐旱性的鉴定浓度。

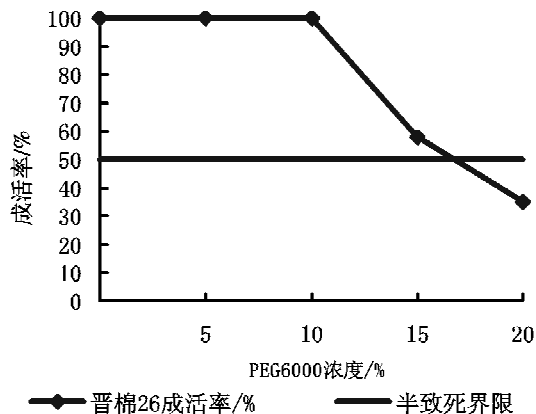


图 2 不同浓度 PEG6000 溶液对晋棉 26 幼苗成活率的影响

Fig. 2 The effect of different PEG6000 concentration on the survival ratio of Jinmian 26 during the real-leaf stage

2.3 PEG6000 鉴定评价棉花耐旱性研究

表 1 为 17% PEG6000 鉴定棉花的耐旱性试验结果。根据《中国棉花遗传资源及其形状》^[20]中划分标准:分别将成活率在 0~49%、50%~69%、70%~89%、90% 以上的品种划定为不耐旱(10% 以下为敏感型)、耐旱、抗旱与高抗品种。相应的 PEG 胁迫方法对棉花品种的耐旱性的鉴定结果与反复干旱法的鉴定结果通过一元拟合的统计方法分析:相关系数 $r = 0.9626$; 回归系数 $a = 1.1653$; 回归截距 $b = -7.8966$; 方差分析结果如表 2。

表 1 两种鉴定方法鉴定结果对比

Table 1 The Comparison on the identification results in two identification methods

品种名称	成活株 /株	实验株 /株	PEG 胁迫方法 成活率/%	PEG 胁迫方法测定的耐旱水平	反复干旱法* 成活率/%	反复干旱法鉴定的耐旱水平
晋棉 26	50	100	50.0	耐旱	50.0	耐旱
鲁棉 6 号	12	36	33.3	不耐旱	11.5	不耐旱
冀 713	57	90	63.3	耐旱	67.9	耐旱
珂字 310	71	96	74.0	抗旱	85.0	抗旱
珂字 348	60	160	37.5	不耐旱	39.4	不耐旱
中棉所 9	10	13	76.9	抗旱	92.9	高抗
中棉所 12	23	30	76.7	抗旱	76.6	抗旱
中棉所 27	2	57	3.5	敏感	0	敏感
新海 16	38	66	57.6	耐旱	68.9	耐旱
新海 17	3	40	7.5	敏感	5.8	敏感
新平土棉	16	51	31.4	不耐旱	23.2	不耐旱
凤阳中棉	46	100	46.0	不耐旱	48.0	不耐旱
石系亚 1 号**	86	100	86.0	抗旱	80.5	抗旱

*注:反复干旱法测定数据为中国农业科学院棉花所品种资源室棉花抗逆性鉴定课题组多年实验数据的均值

**注:利用两种方法,对同年同批石系亚 1 号种子进行鉴定,二者结果一致,验证了用 17% PEG6000 鉴定棉花抗旱性是可行的

表 2 对两种鉴定方法鉴定结果的统计学分析

Table 2 The statistical analysis on the identification results in two identification methods

变异原因	平方和(SS)	自由度(DF)	均方(MS)	F	F _{0.05}	F _{0.01}
回归	11256.0792	1	11256.0792	126.3293	4.9646	10.0443
离回归	891.0106	10	89.1011			
总变异	12147.0898	11				

表 2 结果显示,两种方法的鉴定结果正相关,且系数(r)很高,方差分析 F 值检验也达到显著水平,证明初步建立起的 PEG 评价棉花耐旱性的技术方法简单、快速,而且结果可靠。

2.4 PEG 处理后的生理变化

本试验选择石系亚 1 号幼苗为实验材料,用

0、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 6 个小跨度梯度和 5%、7.5%、10% 3 个大跨度梯度处理 12 h 后测定幼苗叶片相对含水量与质膜透性率,并根据 Hsiao 提出的标准,将相对含水量分别降低 8%~10%, 10%~20% 和 20% 以上定为轻度、中度和严重胁迫^[18]。

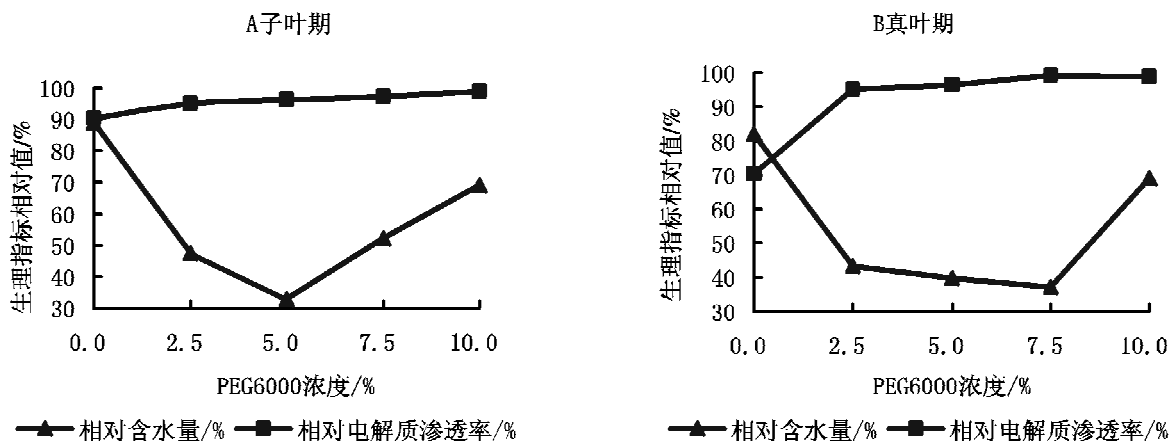


图 3 棉花幼苗 PEG 胁迫后叶片相对含水量与质膜透性变化

Fig. 3 Variation of relatively moisture and plasmalemma penetrability in leaves of seedling after PEG treating

图 3 中 A、B 分别是子叶期和真叶期幼苗用不同浓度 PEG 胁迫处理后叶片相对含水量和相对电解质渗透率的变化情况。从图 3 可以看出,随着 PEG 浓度的提高,叶片相对含水量逐渐降低,而电解率渗透率则稍有提高,子叶期幼苗在 PEG 浓度为 5% 时,叶片相对含水量降到最低,而真叶期幼苗在 PEG 浓度为 7.5% 时,叶片相对含水量才降到最低;用 5% PEG 胁迫幼苗后,子叶期幼苗叶片相对含水量降低了 23.8%,属严重胁迫,而真叶期幼苗叶片相对含水量降低了 17%,尚属于中度胁迫。此结果与 2.1 中的半致死浓度研究结果相一致,同样说明真叶期幼苗对 PEG 胁迫的耐受浓度高于子叶期,适宜在此阶段进行棉花抗旱性鉴定和评价。

3 讨论

在对棉花生育初期各个阶段进行耐旱性鉴定时,发现真叶期幼苗的耐旱能力高于子叶期幼苗。这一方面可能是因为真叶期幼苗的根系比子叶期幼苗发达,吸水能力相对较强,使叶片蒸发失水的

相对量低于子叶期幼苗,从而表现出较高的耐旱性,另一方面,可能是子叶期幼苗细胞仍在发育中,在 PEG 溶液胁迫时,子叶期幼苗细胞失水速度大于真叶期幼苗细胞,而真叶期幼苗细胞的气孔和保水结构已比较完善,并最终表现出耐旱能力的提高,但真正的原因有待进一步深入研究。

从图 3A、B 可以看出,随着 PEG 浓度的增加,子叶期幼苗和真叶期幼苗的相对含水量在达到最低后均呈现上升现象,分析可能是长时间的 PEG 胁迫致使细胞膜结构遭到破坏,从而导致水分回流引起的,但真正的原因需要进一步深入研究。

本实验建立的 PEG 胁迫评价棉花幼苗耐旱性方法重复性较好,可节约大量的人力、物力和时间,比较适合于对棉花品种抗旱性的初步鉴定和评价。但是,该方法在生产中应用,还需要与传统的反复干旱法相结合,以保证对新种质材料、引进材料及野生品种耐旱性的鉴定结果准确可靠。本方法对开展棉花耐旱分子生物学研究,快速筛选、鉴定实验材料的抗旱性具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] 陈立松,刘星辉. 作物耐旱鉴定指标的种类及其综合评价[J]. 福建农业大学学报,1997,26(1):48-55.
- [2] KARAMANOS A J. Ways of detecting adaptive responses of cultivated plants to drought[J]. Tasks for Vegetation Science, 1984; 91-101.
- [3] MAITI R K, Singh V P, Arreola E S et al. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of resistance of Phaseolus bean and other related crops to drought, high and low temperature and salinity[J]. Crop Research, 2002, 24(2): 205-241.
- [4] ISLAM M S, Srivastava P S L, Deshmukh P S. Evaluation of screening techniques for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 1998, 3(3): 197-200.
- [5] OLSOYSKA K, Brestic M. Function of hydraulic and chemical water stress signalization in evaluation of drought resistance of juvenile plants[J]. Journal of Central European Agriculture, 2001, 2(3/4): 157-164.
- [6] BOLANOS J, Edmeades G O, Martinez L. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought-adaptive physiological and morphological traits[J]. Field Crops Research, 1993, 31(3/4): 269-286.
- [7] OKONKWO C A C, Onoenyi F I. Morphological characters as indicators of drought resistance in diverse sorghum varieties in the scrub savannah Nigeria [J]. Tropical Agriculture, 1998,75(4): 440-444.
- [8] 吕小红,傅家瑞. 聚乙二醇渗透处理提高花生种子活力和抗寒性[J]. 中山大学学报,1990,29(1):63-69.
- [9] JAMES W H, Murray W N. Osmotic adjustment of tobacco cells and plants to and penetrating and non-penetrating solutes[J]. Plant Physiol Suppl, 1979, 63:77.
- [10] BRESSAN K A, Hasegawa P M, Avtar K H. Resistance of cultured high plants cells to polyethylene glycol induced water stress[J]. Plant Sci Lett,1981, 21:23.
- [11] SMITH R H, Bhaskaran S, Miller F R. Screening for drought tolerance in sorghum using cell cultures-in vitro[J]. Cell Dev Biol,1985,21:541.
- [12] 张志胜,赵世绪. 苜蓿抗性愈伤组织抗旱机理的初步研究[J]. 华南农业大学学报,1993,14(1):60-64.
- [13] 张志胜,赵世绪. 渗透胁迫下苜蓿愈伤组织的生长和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1995,31(1):21-23.
- [14] 俞希根,孙景生,肖俊夫,等. 棉花适宜土壤水分下限和干旱指标研究[J]. 棉花学报,1999,11(1):35-38.
- [15] 张常青,洪波,李建科,等. 地被菊花耐旱性快速评价方法研究[J]. 中国农业科学,2005,38:789-796.
- [16] 苏君之,孙同毅,李焕秀. 渗透调节剂 PEG 对番茄老化种子发芽率的影响[A]. 全国蔬菜遗传育种学术讨论会论文集[C],成都中国园艺学会,2002:178-179.
- [17] 王贺正,马均. 水稻种质芽期抗旱性和抗旱性鉴定指标的筛选研究[J]. 西南农业学报,2004,17(5): 594-599.
- [18] 吴志华. 两种草坪草对 PEG 胁迫的响应及 ABA 的调控[D]. 长沙:湖南农业大学,2002.
- [19] 张志良. 植物生理学实验手册[M]. 北京:科学出版社. 1978.
- [20] 刘国强,傅怀勤,刘进定,等. 中国棉花遗传资源及其性状[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [21] 张宾阳,刘祖贵,段爱旺,等. 棉花对水分胁迫及复水的生理生态响应[J]. 棉花学报,2006,18(6)398-399.
- [22] 姚满生,杨小环,郭平毅. 脱落酸与水分胁迫下棉花幼苗水分关系及保护酶活性的影响[J]. 棉花学报, 2005,17(3):141-145. ●