

棉花植株和花粉耐盐性的鉴定*

沈法富 尹承侓 于元杰 刘凤珍 程立

(山东农业大学农学系, 山东泰安, 271018)

摘要 本研究对 8 个耐盐性不同的棉花品种(系), 利用水培的方法对其整体植株进行了耐盐性鉴定, 利用液滴培养技术对其花粉的耐盐性进行了鉴定, 并分析了棉花整体植株和花粉耐盐性的相关性, 结果表明, 在水培盐胁迫条件下, 棉花叶片总面积和叶片鲜重减少的百分数是反映棉花整体植株耐盐性的指标。在液滴培养盐胁迫条件下, 棉花花粉粒萌发的百分率是反映其耐盐性的可靠指标, 而花粉管的长度不能反映棉花的耐盐性。棉花整体植株的耐盐性和花粉的耐盐性显著相关, 相关系数达极显著水平。这说明棉花的耐盐性是在其孢子体(植株)和配子体(花粉)同时表达的一个性状。并探讨了利用花粉鉴定、选择耐盐棉花材料的优越性。

关键词 棉花; 耐盐性; 花粉鉴定

培育耐盐作物品种是盐碱地作物增产和对盐碱地改良的重要途径之一。作物耐盐碱育种成败的关键, 除亲本选配合理外, 很大程度上取决于杂交后代材料的鉴定和选择, 而亲本的选择, 也取决于对亲本耐盐性的鉴定。作物传统耐盐性的鉴定和选择, 是根据亲本和杂交后代在盐碱地上的表现进行鉴定和选择的, 这个过程复杂, 工作量大, 早代选择的效率极低, 这有可能因试验的规模和环境条件的影响而丢失有希望的材料^[5]。研究者虽然提出利用生理生化指标鉴定作物的耐盐性^[1,2,6], 但是, 由于实验操作程序复杂、效率不高, 而且鉴定结果具有波动性。因此, 这一方法未能实际应用于作物耐盐碱育种的实践中。创立一种简单易行、高效准确, 从而能在作物耐盐碱育种过程中付诸实施的耐盐性鉴定和选择方法, 对于作物耐盐碱育种是至关重要的。

近些年的研究工作证实, 植物配子体基因的表达很大程度上与孢子体基因的表达相互重叠。利用分子杂交实验证明, 在紫甘蓝草中, 64%的 mRNA 既能在其孢子体组织中表达, 又能在配子体中表达^[7]。在玉米花粉基因组表达的 mRNA 中, 约有 85%的 mRNA 出现在玉米的孢子体组织中^[8]。利用同工酶分析试验表明, 在番茄的孢子体中表达的 30 种同工酶(由 28 种不同基因编码), 发现其中 18 种同工酶也可以由单倍体的花粉基因组产生, 而在花粉粒中表达的 19 种同工酶, 有 18 种可以产生在孢子体的不同发育阶段^[9]。大麦的 50 种同工酶中, 有 30 种既能在花粉组织中表达, 也能够出现在根、茎、叶等孢子体组织中^[10]。这说明植物的基因组中, 大约有 2/3 基因的表达交替发生在孢子体和配子体阶段。在臭氧、高低温、重金属离子、病毒素和除草剂等逆境条件下, 许多植物的孢子体和配子体同时表现出抗逆性, 并且抗逆性显著相关^[11]。因此, 我们利用耐盐性不同的 8 个棉花品种(系), 探讨棉花孢子体(植株)和配子体(花粉)耐盐性的关系, 以期能为棉花耐盐育种提供一个用于育种材料鉴定及杂交

* 山东省科委资助项目

收稿日期: 1995-09-21, 收到修改稿日期: 1996-04-10

后代耐盐性选择的简便有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用品种枝棉 3 号和商丘 24 由中国农科院棉花研究所品种资源室胡绍安研究员赠送, 鲁棉 6 号、鲁棉 12 号、中棉所 17 号和泗棉 3 号由山东农业大学棉花育种研究室于凤英教授提供, 棉花品系 91-11 和 91-15 是作者选育已经稳定的品系^[3]。

1.2 方法

1.2.1 棉花植株的耐盐性 棉花种子经硫酸脱绒后, 种植在直径为 20 cm 的有机玻璃缸内, 缸内装有等体积混合的珍珠岩和蛭石。每个缸内种植 10 粒种子, 每个品种重复 3 次。待种子出苗后, 用 400 ml Hongland 培养液和分别含有 100 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 的 Hongland 培养液进行浇灌。然后利用称重法, 每隔两天补充蒸发的水分, 两周后每缸保留 4 株。用自然光和人工加光保持每天光照 15 小时, 白天平均温度 24℃, 夜晚平均温度 20℃。8 周后, 利用叶面积仪测定各处理植株的叶片总面积, 并称量各植株的鲜重。

1.2.2 棉花花粉的耐盐性 利用 Shivanna 等^[12]的液滴培养技术(sitting drop culture)以确定不同盐浓度对棉花花粉的影响, 培养液的配方按照 Barrow 的棉花花粉活力测定方法配制^[13], 其成分为 100 ml 水中溶解硫酸锰和硝酸钙各 0.14 g。根据不同的盐胁迫需要分别加入不同浓度的 NaCl。将 20 μ l 培养液放在凹形载玻片上, 取当日开放棉花的花朵, 让其开裂的花药跟液滴接触, 这样每个液滴中大约有 150~1200 个花粉粒。每个处理重复 4 次。将这些凹形载玻片放置在湿润的培养皿内, 在 25℃ 的条件下, 光照培养 20 分钟后, 进行观察。在统计花粉萌发和花粉管长度时, 每个液滴培养取 8 个视野。只有花粉管的长度为花粉粒直径的 2 倍时, 才能视为该花粉粒萌发。根据 3000 个花粉粒的萌发状况, 以确定每个品种的花粉平均萌发率。花粉管的长度包括花粉粒至花粉管顶端的长度, 每个处理随机取 200 个花粉粒进行测量, 以确定每个品种的花粉管的平均长度。

1.2.3 棉花植株和花粉耐盐性相关分析 计算不同盐浓度条件下, 棉花叶片总面积和叶片鲜重减少的百分数和花粉萌发率的相关性, 并对相关系数进行检验, 以确定棉花整体植株的耐盐性和棉花花粉耐盐性是否一致。

2 结果与分析

2.1 棉花植株的耐盐性

盐分胁迫降低了所有供试棉花品种(系)的叶片总面积和叶片鲜重, 而且随着盐胁迫强度的增强棉花叶片总面积和鲜重下降愈显著, 但是, 棉花叶片总面积和叶片鲜重下降的百分数品种之间存在着差异(表 1)。在 100 mmol/L NaCl 盐分胁迫条件下, 耐盐品种(系)叶片总面积和鲜重比对照下降 20% 以下, 而盐敏感品种的这两项指标比对照下降 30%。在 150 mmol/L NaCl 盐分胁迫条件下, 盐敏感品种的叶片总面积和鲜重比对照下降 50% 以上, 而耐盐品种(系)仅下降 40% 以下。

在许多作物的耐盐性研究中, 通常以植株生长量下降 50% 的外界盐浓度, 来确定某个作物或品种的耐盐性^[14]。以此作为依据, 本实验的 8 个棉花品种(系)中, 枝棉 3 号、商丘 24、91-11 和 91-15 这四个品种(系)在 150 mmol/L NaCl 胁迫下, 植株生长减少量小于 50%, 故

表 1 8 个不同棉花品种(系)在不同盐胁迫条件下叶片总面积和鲜重(8 周后)

Table 1 Total leaf area and fresh weight response of 8 cotton cultivars under different salt stress conditions for 8 weeks

品种(系) Cultivar (line)	不同 NaCl 浓度下叶片总面积			不同 NaCl 浓度下叶片鲜重		
	Total leaf area under different concentrations of NaCl			Fresh weight under different conc. of NaCl		
	0 ⁽¹⁾	100	150	0 ⁽²⁾	100	150
91-11	483.6	8.2	25.8	6.7	8.4	27.3
91-15	518.1	16.1	39.8	7.0	18.7	32.9
枝棉 3 号 Zhimian 3	489.4	9.1	28.7	6.5	7.9	29.1
鲁棉 6 号 Lumian 6	601.2	28.5	67.8	7.9	26.6	64.3
商丘 24 SQ 24	469.4	19.5	34.6	6.4	19.6	37.7
中棉所 17 ZMS 17	431.5	34.9	52.5	5.2	35.0	55.1
鲁棉 12 Lumian 12	560.1	31.7	70.2	7.8	31.9	65.8
泗棉 3 号 Simian 3	541.5	29.7	59.0	8.2	30.3	65.6

1. 该列数值为绝对数值, 其它二列数字为不同盐浓度下比对照减少的百分数

1. Data in this column are absolut values(cm²/plant), values under other salinity levels are percentage of reduction over the control.

2. 该列数值为绝对数值, 其它数字为不同盐浓度下比对照减少的百分数

2. Data in this column are absolut values(g/plant), values under other salinity levels are percentage of reduction over the control.

为耐盐品种(系)。鲁棉 6 号、鲁棉 12 号、中棉所 17 和泗棉 3 号它们在 150 mmol/L NaCl 胁迫下, 植株生长减少量大于 50%, 故它们为盐敏感品种。这一结果跟前人利用盐池^[4]和盐碱地种植^[3]本实验部分品种(系)鉴定的结果基本一致。

2.2 棉花花粉的耐盐性

在不加盐的对照培养液中, 8 个供试棉花品种(系)花粉粒萌发的百分率在 75%~94% 之间, 当培养液中 NaCl 浓度为 35 mmol/L 时, 盐分对这 8 个品种(系)花粉粒的影响各异, 91-11、枝棉 3 号和商丘 24 三个品种(系)的花粉粒萌发率比对照升高, 其余几个品种(系)的花粉粒萌发率比对照降低。在培养液中 NaCl 达到 100 mmol/L 时, 这 8 个棉花品种(系)中仅有 2 个耐盐品种(系)花粉粒萌发率超过 50%, 而盐敏感品种花粉粒萌发率均未超过 20%。当培养液中 NaCl 的浓度达到 150 mmol/L 时, 耐盐品种(系)花粉粒的萌发率也未超过 10%, 盐敏感棉花品种(系)花粉粒几乎不能萌发(表 2)。对实验结果进行方差分析表明, 棉花品种(系)之间花粉粒的萌发率($F=12.3$, $df=7$, $P\leq 0.01$)、盐处理之间($F=16.7$, $df=3$, $P\leq 0.01$)以及品种(系)和处理之间互作($F=19.4$, $df=21$, $P\leq 0.01$)的差异均达极显著水平。

在对照培养液中, 花粉管的长度一般为 120~3653 μm , 平均为 1566 μm 。这是花粉粒直径的 36 倍, 当培养液中增加盐浓度时, 花粉管长度总趋势降低, 但是, 盐敏感品种(系)和耐盐品种(系)花粉管长度的下降没有表现出与其耐盐的一致性(表 2)。

表 2 在不同 NaCl 胁迫条件下体外培养的花粉萌发率及花粉管长度

Table 2 In vitro pollen germination and pollen tube growth under different NaCl levels in sitting drop culture

品种(系) Cultivar (line)	花粉萌发的百分率 Pollen germination percentage under different NaCl levels(%)				花粉管长度 Pollen tube length under different NaCl levels(μm)			
	0	35	100	150	0	35	100	150
	91-11	90.1	92.7	70.6	5.1	2204	137	94
91-15	94.7	89.6	47.7	7.5	1562	1412	1342	64
枝棉 3 Zhimian 3	83.3	86.9	59.9	4.6	1279	1021	975	67
鲁棉 6 Lumian 6	92.6	47.4	7.4	0	120	116	117	0
商丘 24 SQ 24	75.2	78.5	36.3	7.1	3653	1231	327	11
中棉所 17 ZMS 17	87.3	39.4	15.5	1.2	417	374	238	26
鲁棉 12 Lumian 12	91.7	19.2	11.1	0	1825	1312	972	0
泗棉 3 Simian 3	86.5	57.1	14.6	0.7	1467	945	162	18

2.3 盐胁迫条件下, 棉花植株生长减少量和花粉萌发率的相关性分析

以棉花花粉粒萌发的百分率作为自变量, 以棉花叶片总面积和鲜重下降的百分数作为因变量, 在 4 种盐胁迫水平下, 对它们进行线性相关分析, 结果(表 3)表明, 盐胁迫条件下, 棉花花粉萌发率和叶片总面积及鲜重下降的百分数相关几乎均达极显著水平。这说明棉花整体植株的耐盐性和花粉的耐盐性是一致的。因此, 盐溶液中花粉粒的萌发率可以反映整体植株的耐盐性。

表 3 在不同 NaCl 浓度下花粉萌发率和植株生长减少的百分数的相关系数

Table 3 Regression coefficients between pollen germination (independent variable) and percentage of growth reduction (dependent variable) for cotton cultivars under different NaCl levels

测试盐浓度 Salinity level for estimating (mmol/L)		B	R ²
叶面积 Leaf area	花粉粒萌发率 Pollen germination		
	35	-0.348	0.821**
	100	-0.412	0.926**
	35	-0.586	0.810**
叶鲜重 Leaf fresh weight	35	-0.675	0.883**
	100	-0.336	0.767*
	100	-0.401	0.880**
	35	-0.569	0.809**
150	-0.675	0.918**	

$$r_{0.01}(7) = 0.798 \quad r_{0.05}(7) = 0.666$$

3 讨论

作物的耐盐性是以作物生长的气候和栽培条件为基础, 作物(品种、生育期等)、土壤(水

分含量、盐离子类型等)和环境(温度、湿度和光照等)都对作物的耐盐性产生影响,因此,反映作物内在生理学特性的绝对耐盐性是比较困难的^[15]。本研究采用水培的方法鉴定棉花的耐盐性,在一次加盐后,利用称重法补充水分,基本上保持了水培过程中盐浓度的相对稳定。在水分、离子成份、温度和湿度一致的情况下,以植株生长减少量确定某个品种(系)的耐盐性,部分品种(系)鉴定结果跟大田种植及盐池鉴定结果一致。故利用水培的方法能够相对准确地反映某个棉花品种(系)的耐盐性。

利用水培反映棉花的耐盐性时,150 mmol/L NaCl 浓度能够使耐盐品种(系)和盐敏感品种(系)生长减少量产生显著差异。而测定花粉的耐盐性时,150 mmol/L NaCl 的盐浓度几乎使所有花粉都不能萌发和生长,而100 mmol/L NaCl 则能使参试品种(系)花粉萌发产生差异,由此说明,花粉比整体植株对盐分更为敏感,利用水培鉴定棉花整体植株耐盐性的适宜盐浓度为150 mmol/L NaCl,利用液滴培养鉴定棉花花粉耐盐性的适宜浓度为100 mmol/L NaCl。盐胁迫条件下,棉花花粉粒萌发率跟整体植株的耐盐性显著相关,而花粉管的长度则不能反映其整体植株的耐盐性。前人在研究铝胁迫条件下,番茄花粉和整体植株抗铝性中,也得到跟本实验相似的结果,即番茄花粉粒的萌发率跟整体植株的抗铝性相关显著,而花粉管的长度跟抗铝性无关^[16]。McLeod 利用生长调节剂处理植物的花粉时发现,一些生长调节剂促进花粉管的伸长,而对花粉粒的萌发却有抑制作用^[17]。显然花粉粒的萌发和花粉管的伸长是有着显著区别的两种现象,它们受不同因素的影响。因此,这可能是花粉粒的萌发率能反映整体植株的抗逆性,而花粉管长度则不能的原因。

棉花花粉在100 mmol/L 盐溶液中的萌发率跟整体植株在150 mmol/L 盐溶液中耐盐性相关极为显著,这说明棉花的耐盐性是其孢子体和配子体同时表达的一个性状,因此,在棉花耐盐碱育种过程中,不仅可以对耐盐亲本鉴定,而且可以对杂交后代进行耐盐性选择,即选择在盐溶液中萌发率较高的花粉进行授粉,通过进行多代花粉选择后有可能培育出耐盐品种,国外利用花粉选择已培育出耐金属离子和耐盐植物品种^[18,14],我们也正在利用花粉选择进行棉花耐盐碱育种。利用花粉鉴定和选择棉花的耐盐性具有显著的优点。首先,棉花花粉不仅数量大,体积小,易控制选择条件,而且对花粉选择比孢子体选择早一个世代,其次,能够节约大量时间、空间和劳动力,提高耐盐碱育种的效率。假定棉花的耐盐性由4对独立基因控制,那么基因全部是杂合状态 F_1 代杂种可产生单倍体的类型 $2^4=16$ 种,这个数目仅相当杂交一枚棉花柱头上所接受花粉量的1/2000,但欲使上述配子体的每一种基因型均能在下一个孢子体世代出现, F_2 的最小群体规模是 $4^4=256$ 株,大约需40 m²土地种植。如果通过花粉对耐盐性选择跟植株选择一样有效,那么一个柱头上发生的花粉选择,其效果相当于次年在4~8 ha 土地上对植株的选择。因此,利用花粉进行棉花耐盐性鉴定和选择具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- 1 刘 宛,1992,植物生理通讯,26(4),279~281
- 2 沈法富、尹承岱,1993,棉花学报,5(1),39~44
- 3 沈法富、于元杰、尹承岱,1995,棉花学报,7(1),18~21
- 4 中国棉花种质资源与抗性协作组,1992,中国棉花,19(3),17~18
- 5 Richard, R. A., 1983, Euphytica., 32, 413~438

- 6 Norlyn, J. D., Emanuel Epstein, 1984, *Crop Sci.*, 24, 1090~1092
- 7 Mascarendas, J. P., et al., 1986, In: Mulcahy D. L. et al. (eds), *Biotechnology and Ecology of Pollen*, Springer. Berlin. Heidelberg. New York. pp.39~44
- 8 Sari. Gorla. M. et al., 1975, *Theor. Appl. Genet.* 46, 289~294
- 9 Tanksley, S. D., D. Zamir., C. D. Rick, 1981, *Science*, 213, 453~455
- 10 Pederson, S. et al. 1987, *Theor. Appl. Genet.*, 74, 200~206
- 11 Hormaza, J. L., M. Herrero. 1992, *Theor. Appl. Genet.*, 83, 663~672
- 12 Shivanna, K. N., N. S. Rangaswamy, 1992, *Pollen Biology*, Springer Berlin Heidelberg, New York. pp.67~98
- 13 Barrow, J. R. 1981, *Crop Sci.*, 21, 441~443
- 14 Sacher, R., D. L. Mullahy, R. Staples., 1983, *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. Elsevier New York, pp. 329~333
- 15 Somani, L. L. 1991, *Crop Production with Saline Water.*, India Agro. Botanical Publishers, pp. 98~158
- 16 Search, K. B., D. L. Mulcahy., 1990, *Theor. Appl. Genet.*, 80, 289~295
- 17 Mchleod, K. A. 1975, *Ann. Bot.*, 39, 591~596
- 18 Searcy, K. B., D. L. Mulcahy, 1985, *Theor. Appl. Genet.*, 69, 597~602

Screening of Whole Plants and Pollen Grains of Cotton for Salt Tolerance

Shen Fafu Yin Chengyi Yu Yuanjie Lu Fengzhen Chen Li

(*Shandong Agricultural University, Tai'an 271018*)

Abstract Whole plants and pollen grains of 8 cotton cultivars (*G. hirsutum* L.) were screened for salt tolerance. The result indicated that the percentages of reduction of the total leaf areas and leaf fresh weights of whole plants raised in Hoagland solution modified by addition of 100, 150 mmol/L NaCl could be used as good indexes of salt tolerance. The pollen germination percentages of the same 8 cultivars by sitting drop culture were also proved to be reliable indexes of salt tolerance, but pollen-tube growth were not. It was found that the whole plant salt tolerance and the pollen grain salt tolerance of cotton were highly significantly correlated with each other, indicating that salt tolerance of cotton is a trait that could be expressed in both the sporophyte and gametophyte. The advantages of pollen grain screening for salt tolerant cotton were also discussed.

Key words Cotton; Salt tolerance; Pollen grains screening