

# 耐冷玉米自交系的筛选

李 亮,高明波,袁海洋,于清涛,刘焕成  
(哈尔滨市农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150029)

**摘要:**耐冷玉米自交系是耐冷玉米品种选育的关键,为提供耐冷玉米品种的选育材料,以不同遗传背景的 100 份玉米自交系为试验材料,通过发芽期耐冷性筛选、幼苗期耐冷性筛选、低温下相对电导率测定、低温下抗氧化保护酶活性分析等试验,筛选得到相对耐冷性强的玉米自交系 4 份。

**关键词:**玉米;耐冷性;电导率;抗氧化保护酶

**中图分类号:**S513.034 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)07-0004-05 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.07.0004

低温冷害是严重影响植物生长发育的非生物逆境危害之一<sup>[1-2]</sup>。玉米原产于南美洲地区,是一种喜温作物,对低温十分敏感。低温冷害可以影响玉米全生育期的生长,从而严重影响玉米的最终产量。玉米冷害主要分三种类型:延迟型冷害、障碍型冷害、混合型冷害。延迟型冷害发生在玉米营养生长阶段,可以导致玉米生长延缓、熟期拖后、籽粒水分过高造成玉米产量与品质的下降。障碍型冷害是玉米在生殖生长期突然遭受短时

间低温,使玉米生殖器官的生理功能受到破坏,影响生殖器官的生长,最终产生畸形穗等病态果实,进而影响作物产量。混合型冷害则是指一个生长季节先后遭受了延迟型冷害和障碍型冷害。由于近些年来天气变化不确定性增加,低温冷害发生频率增加,冷害类型趋于复杂。特别在我国的高纬度寒冷地区冷害发生频率逐年增加。在这些地区玉米产业是农业生产的重中之重,玉米种植面积不断扩大,低温冷害每年造成的玉米产量损失巨大,加大了玉米生产的风险。选择耐低温的玉米品种进行种植,是抵御低温冷害风险,降低损失最经济、有效的途径之一。因此,耐低温玉米品种在生产中需求迫切。耐冷玉米品种的选育工作迫在眉睫,耐冷玉米自交系又是耐冷玉米品种选育

收稿日期:2016-04-12  
第一作者简介:李亮(1984-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,助理研究员,从事玉米育种与耐逆性相关研究。E-mail: dongming116@163.com。

[13] Gregorio G B, Senadhira D T, Graham R D. Improving iron and zinc value of rice for humannutrition[J]. Agriculture et development, 1999(23): 68-81

[14] Liang J F, Han B Z, Han L Z, et al. Iron, zinc and phytic acid content of selectedrice varieites from China[J]. J Sci Food Agr, 2007, 87: 504-510.

[15] 廖江林,黄友生,黄国庆,等.改良爪哇稻米粒中铁与锌含量的测定与分析[J].西南农业大学学报:自然科学版, 2006, 28(6): 913-916

## Selection of Iron Enriched Rice Germplasm Resources in Heilongjiang Province

LI Wan<sup>1,2</sup>, WANG Yong-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Guo-min<sup>1</sup>

(1. Rice Molecular Breeding In Northern Chinese Academy of Sciences Joint Research Centre, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Post-doctoral Research Workstation, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** Iron contentis different in different genotypes rice grain, screening out rich-iron rice varieties has great significance for the development of iron rich resources of rice in Heilongjiang province. The fields creening experiment of rice germplasm resources was conducted in Heilongjiang province. The results showed that iron content in rice resources was different, the variation range of iron content was 2. 85~7. 69 mg•kg<sup>-1</sup>, the average was 4. 62 mg•kg<sup>-1</sup>, the ratio of the maximum and minimum was 2. 70. Frequency distribution of 137 resources iron content was close to a unimodal normal distribution, which indicated that iron content of rice grains was controlled by multiple genes.

**Keywords:** Heilongjiang province; rice; iron-rich; microelement

的关键。所以,玉米自交系的耐冷性鉴定与选择显得至关重要。

耐冷玉米自交系的鉴定方法和指标很多。目前,中外学者主要对玉米芽期和苗期进行耐冷研究。其研究分别在田间和室内进行,并且应用了不同鉴定指标。室内评鉴指标有发芽率、发芽指数、相对发芽率、相对发芽指数、相对苗干重、相对根干重、相对苗全长、相对电导率、叶片组织失水量等。田间评鉴指标有出苗率、出苗指数、相对出苗率、苗干重等。郑昀晔等<sup>[3]</sup>采用相对发芽率、相对苗干重和相对根干重等指标筛选得到黄 C、综 3、黄早四、自 330、478、丹 340、掖 107、天四 8 个耐冷自交系。杨光等<sup>[4]</sup>通过测定低温发芽和苗期低温胁迫下相对电导率等生理生化指标,结合田间验证,筛选出耐冷自交系 YW9706、YW9816 和 ZD5114。Mock 等<sup>[5]</sup>以出苗率、出苗指数、苗干重等为指标筛选得到了耐冷自交系 Mo17。Brandolini 等<sup>[6]</sup>以相对发芽率、相对出苗率、相对发芽、相对出苗指数和相对植株生长速率等作为指标,评价分析了 33 个安第斯山脉玉米群体的耐冷特性。耐冷群体 Basto /Rastro-jero、Viana、Enano levantino/Hembrilla 和 Bade,以及群体 Silver King、Puenteareas 和 Rojo de Tolosa 也是通过发芽率、早期活力、存活率等为指标鉴定获得的<sup>[7-8]</sup>。

逆境胁迫易引起细胞内活性氧水平升高而导致氧化胁迫,植物抗逆性的强弱与抗氧化酶活性高低密切相关<sup>[9-10]</sup>。抗氧化保护酶类可以清除植物在逆境胁迫下能量代谢产生的大量活性氧,维持相对的活性氧动态平衡,防止膜脂过氧化物伤害,具有稳定膜透性的作用。它们的活性变化经常作为反映植物抗胁迫能力大小的指标。张毅等<sup>[11]</sup>发现在低温胁迫下,抗冷性弱的自交系的过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性降低较多。王华等<sup>[12]</sup>同样发现 SOD 活性达到半致死温度前有一个上升峰,但随着温度继续降低,活性急剧下降,抗寒性强的品种其活性下降的速率较抗寒性弱的品种缓慢。

本研究以不同遗传背景的 100 份玉米自交系为试验材料,把发芽期耐冷性筛选、幼苗期耐冷性筛选、低温下相对电导率测定、低温下抗氧保护酶活性分析等试验有机地结合起来,根据每种试验的结果,相互印证、相互补充证明各种自交系的耐

低温能力,以期能筛选得到一些耐冷性强的玉米自交系,为后续耐冷玉米品种的选育提供优质资源保障。同时对玉米耐冷性鉴定方法与鉴定指标进行摸索,以期建立一套准确的耐冷玉米品系和品种鉴定体系,为更科学、规范的体系建立提供理论与数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以不同遗传背景的 100 份玉米自交系为试验材料,编号为 1-100 号。耐低温型自交系郑 58,低温敏感型自交系昌 7-2。

### 1.2 方法

1.2.1 芽期耐冷性筛选 (1)温度筛选:每份自交系先用蒸馏水清洗 3 次,再用 75%乙醇浸泡 3 min,再用蒸馏水清洗 3 次;用 2%次氯酸钠浸泡 3 min,取出,用蒸馏水清洗 3 次。温水浸种 24 h 后转入垫有湿润滤纸的培养皿上,每个品种 50 粒(3 次重复),分别置于 0、4、6、8、12℃恒温无光照培养箱中发芽,对照组置于 25℃恒温无光照培养箱中发芽,期间保持种子充分湿润。每天调查发芽率,记录发芽数达 50%所需的天数。(2)低温处理与发芽率调查:种子消毒处理同上。每个品种 50 粒(3 次重复),置于 8℃恒温无光照培养箱中发芽,对照组置于 25℃恒温无光照培养箱中发芽,期间保持种子充分湿润。7 d 后每天调查发芽率,最后计算每份自交系的相对发芽率。初筛耐冷自交系。相对发芽率 =  $A/B \times 100\%$ 。A:8℃处理组发芽率,B:25℃处理组发芽率。

1.2.2 苗期耐冷性筛选 (1)试验设计:玉米幼苗长到三叶一心时,在人工智能型培养箱中进行低温处理,设温度梯度分别为 0、4、6、8、10℃,以 25℃下生长幼苗为对照(CK),每个温度水平分别处理 0、3、6、12、24、48 h。各处理完成后要立即取样,取新鲜叶片保存于液氮中以备进行相关指标测定。(2)测定项目及方法:电导率测定采用 DDS-11A 型数显电导仪法:称取鲜叶片 1 g 左右,加去离子水,室温振荡浸提后,用 DDS-11A 型直读电导仪测定电导率(R1),再将样品在沸水浴上浸提 10 min,冷却后,再测量电导率(R2),叶片质膜透性用相对电导率表示。相对电导率(%) =  $R1/R2 \times 100$

SOD 活性测定:采用氮蓝四唑(NBT)法测定 SOD 活性。

POD 活性测定:采用愈创木酚法测定 POD 活性。

每种处理的 SOD 活性和 POD 活性测定试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 筛选温度确定

由表 1 可知,品种随着温度的下降,发芽率达到 50%的时间(A)随之延长,6℃需 19 d 左右,8℃需 12 d 左右,12℃需 7 d 左右,25℃时仅需不到 2 d,0℃与 4℃低温处理 25 d 均未出现发芽现象。通过对不同温度处理下各自交系的发芽情况以及达到 50%发芽率所需要的时间长短的分析,发现 0℃与 4℃使种子丧失了发芽能力;6℃时虽然可以鉴定出不同自交系的耐冷性,但种子发芽时间过长,并且部分种子丧失了发芽能力;12℃时各种自交系的发芽时间接近,无法用发芽率来区分每种自交系。而在 8℃时各个自交系区分比较明显。所以,选择 8℃作为研究自交系耐冷性鉴定的筛选温度。

表 1 各品种在不同温度下的发芽情况

Table 1 Germination of each variety at different temperatures

温度/℃ Temperature	0	4	6	8	12	25
天数/d Days	>25	>25	19	12	7	2

2.2 低温胁迫下各自交系的发芽率和相对发芽率

由表 2 看出,在 8℃处理下,不同玉米自交系的发芽率随着时间的延长而逐渐增加,其中有 71、62、84 和 4 号自交系的发芽率在低温处理下始终高于其它自交系,15 d 后分别达到 94.0%、89.3%、84.0%和 80.0%,耐冷自交郑 58 的发芽率为 80.7%,冷敏感型自交系昌 7-2 的发芽率为 0。71、62 和 84 自交系发芽率高于郑 58,4 号自交系也与它相近。有 55 份自交系在 8℃处理 15 d 后发芽率低于 80%高于 30%,其余自交系的发芽率低于 30%,其中有 5 份自交系发芽率与昌 7-2 一样为 0。在 25℃下,3 份自交系的发芽率不到 50%,可能与种子储藏不当有关。其余 97 份自交系的发芽率都在 90%以上,郑 58 与昌 7-2 的发芽率分别为 98%和 96%。结果表明,71、62、84 和 4 号 4 份自交系耐冷性相对较强,是耐冷自交系。

表 2 各自交系在 8℃低温下处理不同时间的发芽率

Table 2 Germination rate of each variety under low temperature 8℃

品种 Varieties	25℃时发芽率/% Germination rate under 25℃	8℃时发芽率/% Germination rate under 8℃		
		9 d	12 d	15 d
71	96	88.0	94.0	94.0
62	100	70.0	89.3	89.3
84	90	42.0	60.0	84.0
4 号	100	40.0	80.0	80.0
郑 58	98	30.7	72.0	80.7
昌 7-2	96	0	0	0

2.3 叶片电导率

通过 DDS-11A 型数显电导仪法,对得到的相对耐冷自交系在不同低温胁迫下的相对电导率进行了测定。电导率的增大是细胞电解质外渗增加所致,是细胞膜系统遭受伤害的指标。细胞膜受到损害的程度越大,电导率的值也就越高。细胞膜受到损害将严重影响植物的生长。所以,在逆境胁迫下植物的细胞膜受损伤程度越小,电导率值就越低,该植物的耐冷能力就越强。由图 1 可以看出,随着胁迫温度的不断降低,各自交系的相对电导率逐渐增加,也就是细胞膜系统遭受伤害的程度在逐渐增大。71、62、84、4 号自交系以及郑 58 和昌 7-2 的相对电导率值都不断增加,但是 71、62、84、4 号自交系与郑 58 的电导率值相近,并且增加幅度低于昌 7-2。说明 71、62、84 和 4 号自交系耐冷能力与郑 58 相似,并大于昌 7-2。同时 71 自交系的电导率的增加幅度最小,说明其受低温损伤的程度最小,其耐低温的能力相对也就最强。

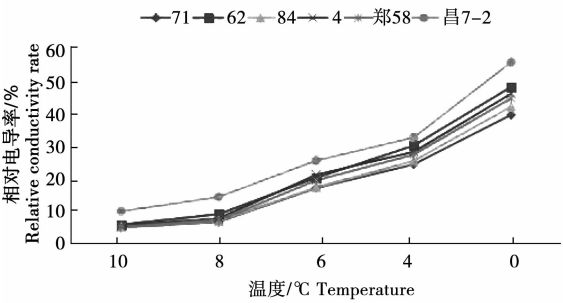


图 1 相对电导率测定结果  
Fig.1 Relative conductivity rate

## 2.4 SOD 和 POD 活性测定

在 0 ℃ 低温处理 0、3、6、9、12、24、48 h 后分别测定 71、62、84、4 号自交系以及郑 58 和昌 7-2 的 SOD、POD 活性。随着低温胁迫时间的延长,每个自交系的 SOD 活性逐渐上升。4 号自交系与昌 7-2 的 SOD 活性在 9 h 左右达到最大值,其余自交系在 12 h 左右达到最大值,继续低温胁迫,SOD 的活性急剧下降。每种自交系 SOD 活性变化趋势大体相似,但是 71、84 和郑 58 的 SOD 活性相对较高并且峰值相近,昌 7-2 的 SOD 活性始终较低(见图 2)。随着低温胁迫的时间延长,POD 的活性同样出现了先增高后下降的趋势。62 与 4 号自交系在 6 h 左右出现峰值,71、84 和郑 58 在 9 h 左右出现峰值,而昌 7-2 的 POD 活性只在胁迫刚开始阶段有小幅上扬,随后就开始下降(见图 3)。SOD 和 POD 活性的测定结果显示,4 个自交系和郑 58 在相同的处理阶段生长情况明显好于昌 7-2,SOD 活性和 POD 活性相对较高。SOD 和 POD 可以消除低温胁迫下产生的有毒物质,保护细胞膜的完整,从而避免或减轻低温胁迫对植物的伤害。SOD 和 POD 活性高可能与自交系耐冷能力相对较强相关。说明 4 个自交耐冷性要强于昌 7-2,并且 71 和 84 的耐冷能力更强。

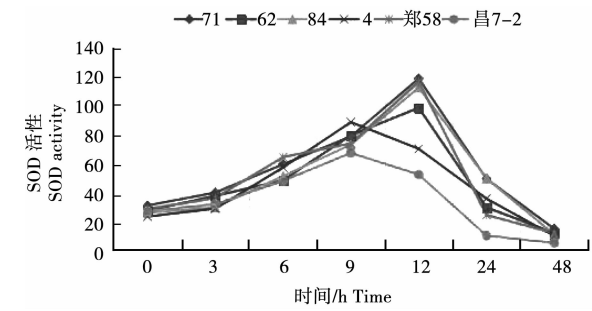


图 2 SOD 活性测定结果  
Fig. 2 SOD activity measurement results

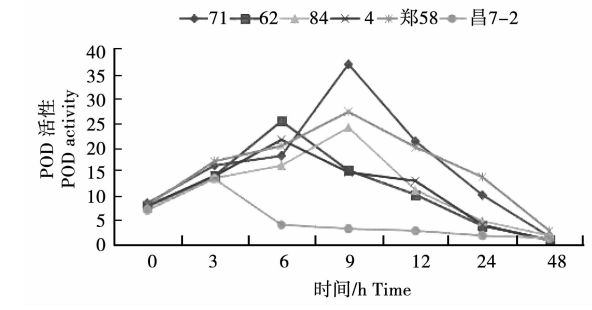


图 3 POD 活性测定结果  
Fig. 3 POD activity measurement results

## 3 结论与讨论

玉米的耐冷性受多基因控制,分子机理复杂。虽然近些年经研究人员的不懈努力玉米的耐冷性分子机理逐渐清晰,但是其复杂的数量性状特性仍然在一定程度上制约着玉米耐冷资源材料的选育。利用低温胁迫下,调查分析玉米发芽率、出苗情况来确定玉米的耐冷能力是目前较为常见且简单易行的方法。扈光辉等<sup>[13]</sup>以发芽率和发芽指数为指标,在 20、11 和 7 ℃ 3 种温度梯度下,鉴定出 5 个耐冷玉米自交系。Hodges 等<sup>[14]</sup>通过室内和田间综合分析对 7 个玉米自交系的耐寒性进行了鉴定。SOD 活性和 POD 活性可作为植物在逆境胁迫下的生物标记物。SOD 活性和 POD 活性的高低与玉米耐逆能力的强弱相关。大量的研究报道显示 SOD 活性和 POD 活性越高,植物的耐逆能力就越强。在低温胁迫下,耐低温能力强的品种 SOD 和 POD 活性明显高于低温敏感性品种。把低温胁迫下玉米自交系的发芽率、发芽指数、出苗情况、电导率以及 SOD 和 POD 活性测定等试验结果有机地结合起来,建立一套玉米自交系耐冷性的综合评定体系。这种常规的评价体系具有操作简单、快速、成本低和试验结果准确等优点,为以后快速选育耐冷玉米自交系及品种提供了保障。

本研究利用控温光照培养箱控制温度,对不同遗传背景的 100 份自交系进行了耐低温鉴定,并以耐低温自交系郑 58、低温敏感型自交系昌 7-2 作为参照。通过对不同温度下玉米发芽率的分析确定了耐低温筛选温度为 8 ℃,这与前人的研究结果相似<sup>[15]</sup>。在 8 ℃ 下不同玉米自交系发芽率明显不同,耐低温能力强的玉米自交系发芽率高于耐低温能力弱的。郑 58 的发芽率远高于昌 7-2。通过发芽率的比较分析,初步认定 71、62、84、4 号自交系耐低温能力相对较强。低温胁迫下自交系的电导率与郑 58 相似,明显低于昌 7-2。从电导率的测定结果不难看出,低温胁迫下 71、62、84、4 号自交系的电导率相对较低,耐低温能力相对较强。在低温胁迫下,4 个自交系的 SOD 和 POD 活性迅速上升,明显高于对照。这可能是玉米幼苗对低温胁迫的一种自我保护的应激反

应,这种反应越强烈说明抵抗低温的能力越强。随着低温胁迫的时间延长,SOD 和 POD 活性在达到峰值后都出现了下降的现象,但是 71、62、84、4 号自交系下降的速度明显要低于对照。这些现象与前人的研究结果相似<sup>[16-17]</sup>。通过对发芽率、电导率、SOD 和 POD 活性测定结果的综合分析,发现 71、62、84、4 号自交系的耐低温能力相对较强,为耐冷自交系。因此,本研究中通过发芽率、电导率、SOD 和 POD 活性测定等试验的综合分析,确定玉米自交系的耐低温能力是一种行之有效的办法。这种方法不仅可以为以后耐冷玉米自交系与品种的筛选鉴定提供技术和理论参考,同时通过这种方法筛选鉴定的耐冷自交系也为以后耐冷玉米品种选育提供了有力的材料支持。

#### 参考文献:

- [1] Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 1263-1274.
- [2] Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Signaling during cold, drought and salt stress [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 165-183.
- [3] 郑昀晔,胡晋,张胜,等. 玉米自交系发芽期和苗期耐寒性的鉴定[J]. *浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2006, 32(1): 41-45.
- [4] 杨光,刘宏魁,李世鹏,等. 玉米抗冷种质资源的筛选与鉴定[J]. *玉米科学*, 2012, 20(1): 57-60, 66.
- [5] Mock J J, McNeill M J. Cold tolerance of maize inbred lines adapted to various latitudes in North America[J]. *Crop Science*, 1979, 19(2): 239-42.
- [6] Brandolini A, Landi P, Monfredini G, et al. Variation among Andean races of maize for cold tolerance during heterotrophic and early autotrophic growth[J]. *Euphytica*, 2000,

111(1): 33-41.

- [7] Revilla P, Boyat A, lvarez A, et al. Contribution of autochthonous maize populations for adaptation to European conditions[J]. *Euphytica*, 2006, 152(2): 275-282.
- [8] Rodriguez V M, Malvar R A, Butrón A, et al. Maize populations as sources of favorable alleles to improve cold-tolerant hybrids[J]. *Crop Science*, 2007, 47(5): 1779-1786.
- [9] Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999(57): 231-245.
- [10] Dat J F, Foyer C H, Scott I M. Change in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings[J]. *Plant Physio*, 1998(118): 1455-1461.
- [11] 张毅,顾慰连,戴俊英. 低温对玉米光合作用、超氧化物歧化酶活性和子粒产量的影响[J]. *作物学报*, 1992, 18(5): 6-9.
- [12] 王华,王飞,李嘉瑞. 低温对杏品种花及幼果的伤害和若干生理指标的影响[J]. *江苏农业学报*, 1999, 15(4): 237-240.
- [13] 扈光辉,张志武,杨德光. 玉米耐低温冷害研究进展[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(33): 1-7.
- [14] Hodges D M, Hamilton R I, Charest C. A chilling resistance test for inbred maize lines[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 1994, 74(4): 687-691.
- [15] 温万里. 黑龙江省常用玉米自交系抗冷性鉴定及生理生化机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- [16] Robert Sobkowiak, Katarzyna Rymer, Renata Rucińska, et al. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspensio culture of soybean cells[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51(1): 219-222.
- [17] Ismail Cakmak, Walter J Horst. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 1991, 83(3): 463-468.

## Screening of Cold Tolerance Maize Inbred Lines

LI Liang, GAO Ming-bo, YUAN Hai-yang, YU Qing-tao, LIU Huan-cheng

(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150029)

**Abstract:** Cold tolerance maize inbred lines is the key to the cold tolerance maize variety breeding. In order to provide the material support for the cold tolerance maize variety breeding, taking 100 maize inbred lines with different genetic background, the cold resistance screening in germination period, the cold resistance screening in seedling stage, the relative electrical conductivity measurement and protective enzyme activity analysis under low temperature were studied. The results showed that four relatively cold resistance of maize inbred lines were obtained.

**Keywords:** maize; cold tolerance; conductivity rate; antioxidant protective enzyme