

不同大豆品种萌发期抗旱性鉴定方法研究

李玥, 王兴荣, 张彦军, 王红梅, 祁旭升

[1. 甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 农业农村部西北寒旱区作物基因资源与种质创新重点实验室(部省共建), 甘肃 兰州 730070]

摘要: 为筛选出大豆萌发期抗旱性鉴定的适宜试验条件, 以大豆品种陇中黄 601、垦鉴豆 15、九农 29、长农 16 为供试材料, 采用蛭石法和滤纸法进行发芽试验, 运用内源转录间隔区 (Internally Transcribed Spacer, ITS) 序列分析法进行发芽床筛选, 测定各供试大豆品种的发芽率、硬实豆数、发霉豆数, 并进行了蛭石湿度和 PEG-6000 浓度筛选。结果表明, 蛭石法发芽试验能明显减少大豆发芽试验中产生霉菌的种类与数量, 适宜在大豆萌发期抗旱性鉴定中应用。且在蛭石湿度为 170%、PEG-6000 浓度为 22% 的条件下, 不同大豆品种间的发芽率差异比较明显, 硬实豆数和发霉豆数少, 试验数据可靠, 可作为大豆萌发期抗旱性鉴定试验的适宜条件。且在此条件下, 4 个供试大豆品种的抗旱性表现由强到弱依次为陇中黄 601、九农 29、长农 16、垦鉴豆 15。

关键词: 大豆; 萌发期; 抗旱性鉴定; 蛭石法; 发芽床; 蛭石湿度; PEG-6000 浓度

中图分类号: S565.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-2172(2024)04-0337-05

[doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2024.04.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.2097-2172.2024.04.007)

Study on the Methods for Drought Resistance Identification of Different Soybean Varieties at Germination Stage

LI Yue, WANG Xingrong, ZHANG Yanjun, WANG Hongmei, QI Xusheng

[1. Crop Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Innovation in the Cold and Arid Northwest Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Jointly Established by the Ministry and Province), Lanzhou Gansu 730070, China]

Abstract: To select appropriate experimental conditions for the identification of drought resistance during the germination period of soybeans, varieties Longzhonghuang 601, Kenjiandou 15, Jiunong 29, and Changnong 16 were used as test materials. Germination tests were conducted using vermiculite and filter paper methods, with screening of germination beds through Internally Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis. The germination rate, number of hard beans, and number of moldy beans were measured, along with selection for vermiculite moisture and PEG-6000 concentration. Results showed that the vermiculite method significantly reduced the types and quantities of molds in soybean germination tests, making it suitable for drought resistance identification during the germination period. At a vermiculite moisture of 170% and PEG-6000 concentration of 22%, significant differences in germination rates among the soybean varieties were observed, with fewer hard and moldy beans, providing reliable test data. These conditions are suitable for drought resistance identification tests during the soybean germination period. Under these conditions, the drought resistance of the 4 soybean varieties ranked from strongest to weakest as followed Longzhonghuang 601, Jiunong 29, Changnong 16 and Kenjiandou 15.

Key words: Soybean; Germination stage; Drought resistance identification; Vermiculite method; Germination bed; Vermiculite moisture; PEG-6000 concentration

大豆为豆科大豆属一年生双子叶草本植物, 是世界上最重要的豆类作物, 具有食用、饲用和 酿造等多种应用价值。大豆生长期需水较多, 水分对大豆的产量形成具有重要的作用^[1-2]。随着全

收稿日期: 2024-01-18

基金项目: 兰州市人才创新创业项目(2022-RC-64); 甘肃省农业科学院科研条件建设及成果转化项目(重点研发计划)(2021GAAS04); 2022年省级重点人才项目(农作物种质资源保护利用与人才培养)(2022RCXM083); 甘肃省农业科学院青年基金项目(2023GAAS34)。

作者简介: 李玥(1987—), 女, 山东济南人, 助理研究员, 硕士, 主要从事大豆种质资源与遗传育种研究工作。Email: lyue31@126.com。

通信作者: 祁旭升(1966—), 男, 甘肃会宁人, 研究员, 主要从事大豆种质资源与遗传育种研究工作。Email: qixusheng6608@sina.com。

球气候的变化, 干旱已成为全球最大的自然灾害之一, 干旱胁迫下作物各时期的生长发育都会受到影响, 成为影响作物产量的重要障碍因子^[3]。萌发期是大豆整个生活史的关键阶段, 如果萌发期水分不足, 容易出现缺苗断垄现象, 最终导致产量及品质降低^[4-6]。萌发期抗旱性鉴定也是大豆抗旱性鉴定研究的关键, 鉴定大豆萌发期抗旱性、筛选抗旱种质资源, 对大豆抗旱品种选育、抗旱机理及干旱调控缓解机制研究具有重要意义。

国内外研究表明, 作物品种间萌发期的抗旱性存在很大差异。陈学珍等^[7]在干旱胁迫下对 20 个大豆品种进行芽期抗旱性鉴定, 获得丹豆 6、海 94 和蒙城小黑豆等 3 份抗旱性种质; 肖佳雷等^[8]对 78 份大豆种质资源进行了发芽期抗旱鉴定, 获得耐旱品种 5 个、较耐旱品种 18 个; Nayer 等^[9]对玉米品种 704 和 301 进行聚乙二醇(PEG-6000)诱导的水分胁迫研究表明, 品种 704 的萌发率下降幅度高于品种 301; Kumar 等^[10]和 Delachieve 等^[11]一致认为, 在干旱胁迫下, 作物不同品种间差异显著; Willanborb 等^[12]的研究显示, 包衣种子的萌发特性受到渗透胁迫的影响。研究者对不同大豆品种的抗旱性进行评价研究的结果显示, 不同品种抗旱性可归为抗旱型品种、干旱敏感型品种和较抗旱型品种^[13-16]。

利用聚乙二醇(PEG-6000)高渗溶液模拟干旱胁迫来研究种子萌发期的抗旱性是目前实验室最常用的手段^[4, 8, 17-20]。梁峥等^[17]在 30% 的 PEG-6000 浓度下研究了大豆子叶中几种酶活性和可溶性蛋白含量的变化。张荣平等^[18]采用 15%、30%、45% 等 3 种 PEG-6000 浓度处理大豆种子, 研究了各处理对大豆种子下胚轴脂叙合酶活性及脯氨酸含量的影响。顾龚平等^[19]采用 20% 的 PEG-6000 浓度处理研究了其对大豆幼苗活力和活性氧代谢的影响。舒英杰等^[20]认为, 室内采用 PEG-6000 浸种法模拟干旱胁迫鉴定大豆发芽期耐旱性的适宜浓度为 20%~25%。综上研究结果认为, PEG-6000 模拟干旱胁迫的浓度因作物和品种而异, 利用滤纸作为基质进行的发芽试验, 尽管采取了无菌处理和每天更换溶液, 但在 PEG-6000 胁迫处理下与空白对照均会出现硬实豆和豆粒发霉的现象, 这极大地影响了试验数据的准确性, 进而影响了对

种质资源的筛选评价。

本研究利用不同发芽床、不同浓度的 PEG-6000 模拟干旱胁迫筛选处理浓度和不同蛭石湿度等试验条件, 分析适于进行大豆种子萌发期抗旱性鉴定的条件, 以期利用渗透胁迫鉴定大豆种子萌发期的抗旱性提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试大豆材料为陇中黄 601、悬鉴豆 15、九农 29、长农 16, 均由国家作物种质资源库(甘肃分库)提供, 其中陇中黄 601 田间表现抗旱性较高, 悬鉴豆 15 抗旱性较弱。供试蛭石(1~3 mm)和 PEG-6000 (Molecular Biology Grade)均采购于兰州博域生物科技有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 滤纸法发芽试验 选择大小、色泽一致, 饱满、种皮完好的大豆种子, 用 10% NaClO 溶液消毒 15 min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次。按照 30 粒/皿的标准置于直径为 15 cm、铺有 2 层滤纸的培养皿内, 分别加入 30 mL 体积浓度为 20%、21%、22%、23%、24% 的 PEG-6000 溶液, 置于光照培养箱中在(25±1)℃、光照 16 h 的条件下催芽培养, 利用称重法每天向培养皿中补充加水。3 次重复。

1.2.2 蛭石法发芽试验 按照设定的蛭石湿度(110%、130%、150%、170%、190%)将蛭石分别与溶剂(无菌水/浓度为 20%、21%、22%、23%、24% 的 PEG-6000 溶液)混合均匀后, 各取 35 g 平铺在直径为 15 cm 培养皿中, 按照 30 粒/皿的标准均匀放置用湿巾揉搓干净的大豆种子, 再覆盖一层混合均匀的蛭石至培养皿上边缘, 用保鲜膜包好, 在保鲜膜上扎 10 个小孔, 放入人工培养箱中, 在温度为 23℃、相对湿度为 85%、光照 16 h 的条件下催芽培养。3 次重复。

1.3 蛭石湿度确定

蛭石湿度=(溶液体积×100)/蛭石干重

发芽培养按照 1.2.2 蛭石法发芽试验设计进行。共设 5 个蛭石湿度, 分别为 110%、130%、150%、170%、190%, 3 次重复。于培养第 7 天统计大豆发芽数、硬实豆数、发霉豆数, 并计算各大豆品种的发芽率。

1.4 PEG-6000 适宜浓度确定

共设 5 个 PEG-6000 浓度处理, 分别为 20%、21%、22%、23%、24%。3 次重复。以 1.3 确定的蛭石湿度准备培养基质, 于培养第 7 天统计大豆发芽数、硬实豆数、发霉豆数, 并计算各大豆品种的发芽率。

1.5 ITS 序列分析

将 2 种方法中出现的不同颜色、不同形态的霉菌采用 Qiagen DNeasy PowerSoil Pro Kit (Cat No. 47014 /47016) 进行核酸提取, 检测核酸完整度和浓度后送苏州佳世生物技术有限公司进行 ITS 序列分析。使用高保真酶对 DNA 样本进行扩增, 并使用 Invitrogen Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。使用 KAPA Hyper Prep Kit 进行文库构建, 使用 Illumina NovaSeq 进行测序。

1.6 数据统计与分析

用 Microsoft Excel 2013 整理试验数据, 用 IBM SPSS 19 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 萌发试验发芽床确定

滤纸法发芽试验和蛭石法发芽试验均于试验第 7 天分别出现 5 种和 2 种不同颜色、不同形态的霉菌(封三图 1), 对其进行基因组 DNA 提取, 并将提取的 DNA 样品送苏州佳世生物技术有限公司进行 ITS 序列分析, 首先对原始数据(Raw reads)进行过滤处理, 对处理后的数据进行去接头、拼接、过滤、去嵌合体, 得到有效数据(Effective Tags)。将有效数据与真菌 UNITE 数据库(<https://unite.ut.ee>)按照 97% 的相似度进行比对, 进行物种分类, 获得物种匹配数。ITS 序列分析结果(封三图 2)显示, 滤纸法发芽试验共出现 9 个属(嗜热真菌属、德克酵母属、念珠菌、根酶菌属、布氏白粉菌属、马拉色菌属、曲霉菌属、青霉菌属、维多利亚维

希尼克氏酵母)的真菌, 蛭石法发芽试验共出现 3 个属(根酶菌属、曲霉菌属、青霉菌属)的真菌, 而且蛭石法发芽试验中匹配上的霉菌数明显比滤纸法的少。由此可见, 蛭石法发芽试验能明显减少霉菌种类与数量, 可保证发芽试验结果的准确性。同时, 蛭石法发芽试验取消了清洗种子和每天加水的步骤, 明显降低了试验工作量和试验投入成本。综上认为, 蛭石发芽床更适宜进行大豆萌发期抗旱性研究, 蛭石法可替代溶液滤纸法应用于大豆萌发期的抗旱性研究。

2.2 蛭石湿度的确定

由图 3 可知, 随着蛭石湿度的增加, 各供试大豆品种的发芽率均呈先增加再降低的趋势。其中在 170% 的蛭石湿度条件下, 各供试大豆品种发芽率均达到 90% 以上(图 3-A)。在该条件下, 悬鉴豆 15 的硬实豆数为 3.0 粒, 陇中黄 601、长农 16、九农 29 的硬实豆数均为 0(图 3-B); 悬鉴豆 15、长农 16 的发霉豆数均为 2.0 粒; 陇中黄 601、九农 29 的发霉豆数均为 0(图 3-C)。根据以上结果, 最终确定发芽试验最佳蛭石湿度为 170%。

2.3 PEG-6000 浓度筛选

从表 1 可以看出, 4 个大豆品种在不同 PEG-6000 浓度处理下发芽率均受到不同程度的抑制。当 PEG-6000 浓度达到 23% 以上时, 4 个供试大豆品种的平均发芽率均低于 45%, 出苗率过低, 幼苗生活力极差, 已失去生产意义, 不适合用于模拟干旱胁迫。PEG-6000 浓度为 22% 时, 4 个供试大豆品种的发芽率均在 50% 以上, 且出现发霉豆数和硬实豆数的比例均低于 PEG-6000 浓度为 20%、21% 的处理, 而硬实豆数和发霉豆数情况的存在, 会严重影响试验的准确性, 因此在发芽试验中应尽可能降低硬实豆数和发霉豆数所占的比例。当 PEG-6000 浓度为 22% 时, 不同大豆品种

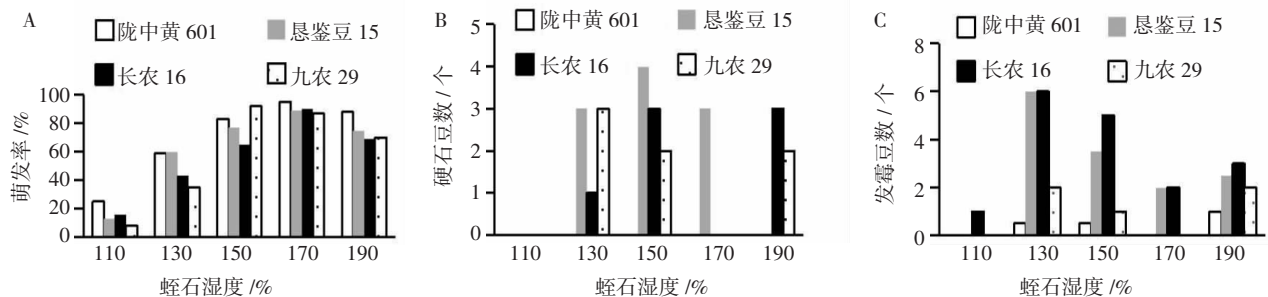


图 3 不同蛭石湿度下的大豆萌发情况

表 1 不同 PEG-6000 浓度下各大豆品种的发芽情况^①

PEG-6000 浓度	陇中黄601			长农16			九农29			悬鉴豆15		
	发芽率 /%	硬实 豆数 /粒	发霉 豆数 /粒	发芽率 /%	硬实 豆数 /粒	发霉 豆数 /粒	发芽率 /%	硬实 豆数 /粒	发霉 豆数 /粒	发芽率 /%	硬实 豆数 /粒	发霉 豆数 /粒
20%	80.0±2.9 a	0	0.5	29.0±0.6 b	1.0	4.0	74.0±5.6 a	0	0	81.0±1.0 a	0	3.0
21%	72.7±1.5 a	0	2.5	38.3±2.6 c	3.0	6.0	55.0±2.9 b	0	2.5	42.7±1.5 bc	0	6.0
22%	70.0±2.9 a	0	1.0	51.0±2.3 c	1.0	2.0	60.0±2.9 b	0	0.5	52.7±1.5 bc	0	2.0
23%	42.7±2.9 a	0	0	23.0±2.3 c	0.5	2.0	37.7±2.9 b	0	1.0	0±1.5 d	0	2.5
24%	17.7±1.5 a	0	0	3.0±1.7 b	2.5	0	17.7±1.5 a	0	0	0±0.0 b	0	3.0

①同行标有不同小写字母者组间差异显著($P < 0.05$)。

的发芽率有明显差异, 其中陇中黄 601 与其余品种差异均达显著水平; 九农 29 与悬鉴豆 15 差异不显著, 但与长农 16 差异达显著水平; 悬鉴豆 15 与长农 16 差异不显著。由此可见, 22% 的 PEG-6000 浓度适合作为模拟干旱胁迫的 PEG 浓度。且在此浓度胁迫下, 4 个供试大豆品种的抗旱性表现由强到弱依次为陇中黄 601、九农 29、长农 16、悬鉴豆 15, 与田间表现一致。

3 讨论与结论

种子萌发是植物生长发育的前提, 是对环境因素最为敏感的阶段。随着环境干旱的不断加重, 对种子萌发的影响也越来越大。目前, 多数学者们采用 PEG-6000 模拟干旱胁迫用于筛选和鉴定作物的抗旱性, 并在小麦、棉花、玉米、苜蓿、紫苏等作物上筛选到了抗旱性较好的品种^[21-25]。李凤珍等^[26]采用滤纸法发芽床, 经 20% PEG-6000 渗透胁迫处理, 筛选出强抗旱性品种小红麦; 鲁守平等^[27]在 PEG-6000 模拟干旱胁迫条件下筛选出抗旱性较强的乌拉尔甘草 1 号和乌拉尔甘草 2 号。本研究采用 PEG-6000 模拟干旱法研究了大豆种质资源抗旱性鉴定方法, 将发芽床由普遍使用的滤纸替换为蛭石, 大大降低了大豆较难解决的萌发发霉豆数和硬实豆数问题, 提高了试验结果的可靠性。最终确定大豆萌发期 PEG-6000 最适胁迫浓度为 22%、蛭石最适湿度为 170%。在该试验条件下, 降低了大豆萌发期研究中出现的较难解决的发霉豆数和硬实豆数问题, 提高了试验结果的可靠性, 并可减少试验工作量和投入成本。由此可见, 蛭石法可替代溶液滤纸法用于大豆萌发期的抗旱性研究。

ITS 序列分析结果表明, 蛭石法发芽试验能明

显减少大豆发芽试验中霉菌的种类与数量, 更适宜进行大豆萌发期抗旱性研究。在蛭石湿度为 170%、PEG-6000 浓度为 22% 条件下, 不同大豆品种间发芽率差异比较明显, 硬实豆数和发霉豆数少, 试验数据可靠, 适合作为进行大豆萌发期抗旱性鉴定的适宜试验条件。试验结果还显示, 4 个供试大豆品种的抗旱性表现由强到弱依次为陇中黄 601、九农 29、长农 16、悬鉴豆 15, 这与田间表现一致。

参考文献:

- [1] 苗以农, 石连旋. 大豆生理学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2008.
- [2] 梁成第. 大豆抗旱性的鉴定方法[J]. 中国油料作物学报, 1990(1): 34-37.
- [3] 徐立明, 张振葆, 梁晓玲, 等. 植物抗旱基因工程研究进展[J]. 草业学报, 2014, 23(6): 293-303.
- [4] 王利彬, 刘丽君, 裴宇峰, 等. 大豆种质资源芽期抗旱性鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(1): 36-42.
- [5] 刘 博, 卫 玲, 肖俊红, 等. PEG 模拟干旱条件下大豆萌发特性研究[J]. 种子, 2018, 37(12): 56-60.
- [6] 赵振宁, 赵宝颀. 不同大豆品种在萌发期对干旱胁迫的生理响应及抗旱性评价[J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(2): 131-136.
- [7] 陈学珍, 谢 皓, 郝丹丹, 等. 干旱胁迫下 20 个大豆品种芽期抗旱性鉴定初报[J]. 北京农学院学报, 2005, 20(3): 54-56.
- [8] 肖佳雷, 李 炜, 来永才, 等. 黑龙江省春大豆种质资源芽期抗旱鉴定与筛选[J]. 作物杂志, 2012(1): 142-145.
- [9] NAYER MOHAMMADKHANI, REZA HEIDARI. Water stress induced by polyethylene glycol 6000 and sodium chloride in twomaize cultivars[J]. Pakistan Journal of Bi-

- ological Sciences, 2008, 11(1): 92-97.
- [10] KUMAR R R, KARJOL K, NAIK G R. Variation of sensitivity to drought stress in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) cultivars during seed germination and early seedling growth[J]. World Journal of Science and Technology, 2011, 1(1): 11-18.
- [11] DELACHIAVE M E A, DE PINHO S Z. Germination of *Senna occidentalis* link: seed at different osmotic potential levels[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2003, 46: 163-166.
- [12] WILLANBORB C J, GULDEN R H, JOHNSON E N, et al. Germination characteristics of polymer-coated canola (*Brassica napus* L.) seeds subjected to moisture stress at different temperatures[J]. Agronomy Journal, 2004, 96: 786-791.
- [13] 李文滨, 宋春晓, 苋兴起, 等. 干旱胁迫下 20 个大豆品种抗旱性评价[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(4): 1-10.
- [14] 吴 伟, 陈学珍, 谢 皓, 等. 干旱胁迫下大豆抗旱性鉴定[J]. 分子植物育种, 2005(2): 188-194.
- [15] 陈亚光, 咎 凯, 杨雨阳, 等. 不同大豆品种(系)萌发期抗旱性综合评价[J]. 天津农业科学, 2023, 29(10): 13-17; 24.
- [16] 王 敏, 杨万明, 侯燕平, 等. 不同类型大豆花荚期抗旱性形态指标及其综合评价[J]. 核农学报, 2010, 24(1): 154-159.
- [17] 梁 峥, 赵 原, 郑光华, 等. 聚乙二醇处理大豆种子子叶中几种酶活性和可溶性蛋白含量的变化[J]. 植物生理学报, 1991(1): 20-24.
- [18] 张荣平, 王振镒, 高俊凤, 等. PEG 处理大豆种子对下胚轴脂氧合酶活性及脯氨酸含量的影响[J]. 西北植物学报, 1993(2): 103-108.
- [19] 顾龚平, 吴国荣, 陆长梅, 等. PEG 处理对大豆幼苗活力及活性氧代谢的影响[J]. 中国油料作物学报, 2000(2): 29-33.
- [20] 舒英杰, 周玉丽, 时侠清, 等. 大豆种子发芽期耐旱性鉴定的适宜 PEG-6000 浓度筛选[J]. 大豆科学, 2015(1): 56-59.
- [21] 惠红霞, 李树华, 许 兴. 高渗溶液鉴定小麦抗旱性的方法研究[J]. 宁夏农学院学报, 2000, 21(3): 28-32.
- [22] 张雪妍, 刘传亮, 王俊娟, 等. PEG 胁迫方法评价棉花幼苗耐旱性研究[J]. 棉花学报, 2007, 19(3): 205-209.
- [23] 李向东, 范翠丽, 曹熙敏. PEG 模拟干旱条件下 4 个玉米品种的苗期抗旱性研究[J]. 现代农业科技, 2011(1): 71-72.
- [24] 伏兵哲, 兰 剑, 李小伟, 等. PEG-6000 干旱胁迫对 16 个苜蓿品种种子萌发的影响[J]. 种子, 2012, 31(4): 10-14.
- [25] 李 丹, 石浏芃. PEG-6000 模拟干旱胁迫对紫苏种子萌发的影响[J]. 寒旱农业科学, 2022, 1(12): 167-170.
- [26] 李凤珍, 马晓岗. PEG 处理下青海栽培小麦萌发期及幼苗期抗旱性研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(21): 44-48.
- [27] 鲁守平, 孙 群, 洪 露, 等. 不同种源地乌拉尔甘草发芽期抗旱性鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 189-194.