

doi:10.7668/hbxb.2014.S1.050

丽江新团黑谷近等基因系孕穗期耐冷性生化性状的主成分分析及综合评价

杨树明^{1,3}, 曾亚文^{1,2}, 王 荔⁴, 张素华¹, 杜 娟¹, 杨 涛¹, 普晓英¹, 杨晓梦¹

(1. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205; 2. 农业部西南农业基因资源与种质创制重点实验室, 云南 昆明 650223; 3. 云南省农业生物技术重点实验室, 云南 昆明 650223; 4. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:为建立鉴定水稻孕穗期耐冷种质资源的生化指标,以云南孕穗期耐冷标准品种昆明小白谷、丽粳2号和半节芒及梗稻近等基因系(十和田⁺/丽江新团黑谷/十和田)的BC₄F₈、BC₄F₉群体105个家系及亲本为材料,在大田冷水胁迫及正常温度条件下,连续在2011年和2012年于水稻孕穗期分别测定剑叶、花药和籽粒的26个生化性状,采用主成分分析、隶属函数法、逐步回归分析和K-means聚类法进行指标筛选及耐冷性综合评价。结果表明,剑叶中叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素、叶绿素c、POD活性、游离氨基酸,以及剑叶和花药中可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛、CAT活性、抗坏血酸、游离脯氨酸和籽粒中可溶性蛋白、可溶性糖、蛋白质和γ-氨基丁酸含量对耐冷性影响显著,可作为穗期耐冷性鉴定综合指标。采用隶属函数法获得低温胁迫下以剑叶、花药和籽粒中各生化性状为对象的综合耐冷D值,用K-means聚类法对各D值进行联合聚类,可将丽江新团黑谷NILs的105个株系划分为3类,其中强耐冷株系32株,中度耐冷10株,弱耐冷63株。

关键词:水稻;近等基因系;孕穗期耐冷性;生化鉴定指标;主成分分析;综合评价

中图分类号:S515.03 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)增刊-0262-11

Principal Component Analysis and Comprehensive Evaluation on Biochemical Characteristics of Cold Tolerance at Booting Stage in the Near-isogenic Lines from Japonica Rice Lijiangxintuanheigu

YANG Shu-ming^{1,3}, ZENG Ya-wen^{1,2}, WANG Li⁴, ZHANG Su-hua¹,
DU Juan¹, YANG Tao¹, PU Xiao-ying¹, YANG Xiao-meng¹

(1. Biotechnology and Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Key Laboratory of the Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China; 3. Agricultural Biotechnology Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650223, China; 4. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The biochemical evaluation system were established for screening and identifying species with cold tolerance, 105 rice materials, including three standard varieties of strong cold resistance from Yunnan Province, the NILs BC₄F₈ and BC₄F₉ generation derived from parents japonica cultivars Lijiangxintuanheigu (donor parent) and Towada (recurrent parent), and their parents, were employed for evaluation of cold tolerance and screening of cold resistance index at booting stage. 26 biochemical traits including leaves, anthers, and grains of tested materials were determined under cold water-stress and normal conditions in 2011, 2012. Comprehensive assessment of cold resistance based on the principal component analysis, subordinate function values analysis, regression analysis and K-means clustering analysis. The results showed Chlorophyll a, Chlorophyll b, total Chlorophyll, Chlorophyll c content, peroxidase (POD) activity, free amino acid content of flag leaves; soluble protein, soluble sugar, malondialdehyde

收稿日期: 2014-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30160043; 31060186); 云南省自然科学基金项目(2010CD006); 云南省技术创新人才培养项目(2011CI059; 2012HB050); 云南省农业生物技术重点实验室开放项目(2014001)

作者简介: 杨树明(1973-), 男, 云南武定人, 研究员, 博士, 主要从事作物种质资源、遗传育种及其生态环境研究。

通讯作者: 曾亚文(1967-), 男, 云南嵩明人, 研究员, 博士, 主要从事作物遗传育种及产业开发研究。

(MDA) content, catalase (CAT) activity, ascorbic acid (ASA), proline content (Pro) of flag leaves and anthers; soluble protein, soluble sugar, protein, γ -aminobutyric acid (GABA) content of grains significantly influenced the cold resistance. Thus could be used as comprehensive index for identification of cold resistance at the booting stage. The values cold resistance comprehensive evaluation (D) of biochemical traits including leaves, anthers, and grains of tested materials based on the subordinate function values was chosen as object under cold stress condition, through K-means clustering analysis, 105 lines of population should be divided into 3 categories including strongly cold-tolerant lines 32, mediate cold tolerance lines 10, and cold-sensitive lines 63.

Key words: Rice; Near-isogenic lines; Cold tolerance at booting stage; Biochemical identification index; Principal component analysis; Comprehensive evaluation

水稻 (*Oryza sativa* L.) 属起源于热带和亚热带地区的冷敏感作物。近年来, 尽管全球年均气温呈逐渐升高趋势, 但极端低温天气发生频繁, 区域性和阶段性冷害日趋加大, 低温冷害仍是限制诸多产稻国水稻生产的重要因子之一^[1]。据统计, 世界近 1 500 万 hm^2 的稻作面积受到低温威胁^[2-3], 我国每年减产稻谷 30 ~ 50 亿 kg ^[4], 云南常年稻作冷害面积高达 46.7 ~ 53.3 万 hm^2 , 约占云南稻作总面积的 1/2^[5]。解决水稻冷害除合理布局品种及安排播期外, 最有效的解决方法是建立准确、高效的耐冷评价指标, 筛选耐冷资源、选育耐冷品种。

低温或冷水胁迫对水稻整个生长发育过程都会产生影响, 但以水稻孕穗期低温对花药及剑叶发育最为敏感^[4]。此期低温可导致颖花及小孢子数量减少, 花药中绒毡层细胞异常肥大或收缩严重, 提前退化, 碳水化合物代谢失衡, 花药发育所需营养物质转运失常, 如多糖、蛋白质、游离氨基酸等减少^[6], 花粉发育延迟, 甚至败育, 花药开裂不畅、散粉不足, 可育花粉率和柱头花粉萌发率降低, 最终导致结实率下降^[7], 严重减产。其次, 在低温胁迫下水稻功能叶表现出强烈的生理反应和适应机理, 如叶绿素含量降低, 剑叶光合速率变低^[8], FBPase、SOD、POD 和 CAT 活性, 以及溢泌量、可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛、抗坏血酸、脯氨酸、膜脂肪酸不饱和指数等增加^[9-10], 且由于冷害后效作用, 使水稻后期剑叶与籽粒之间的物质合成、转运和分配受阻, 最终导致源-流-库不协调, 籽粒的可溶性蛋白、可溶性糖、蛋白质、 γ -氨基丁酸、总黄酮和生物碱含量降低, 影响产量和品质的形成^[11-12]。目前, 国内外学者提出了多种水稻孕穗期耐冷性鉴定的方法^[13-14], 并侧重于人工模拟低温下对某一个生理生化指标或单一器官进行研究^[9]。然而, 水稻耐冷性是水稻适应和抵抗低温胁迫能力强弱的多系统综合生理反应^[9], 既受遗传基因控制, 又受环境影响, 且水稻不同部位抵御低温胁迫的内在机制不同^[15], 故仅用单一指标评价

耐冷性存在片面性和不稳定性。目前, 针对大田冷水灌溉低温胁迫下水稻剑叶、花药和籽粒的综合生化指标研究尚无报道。为此, 本研究利用丽江新团黑谷近等基因系 BC_4F_8 、 BC_4F_9 群体的 105 个株系, 采用主成分分析筛选出水稻孕穗期低温胁迫下剑叶、花药及籽粒的耐冷综合生化指标, 并对其耐冷性进行综合评价, 以期为水稻孕穗期耐冷性种质、品种筛选和遗传改良提供可借鉴的指标和方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以云南孕穗期耐冷性极强 (2 级) 的标准品种昆明小白谷、丽粳 2 号和半节芒^[13] 为对照品种, 以粳稻近等基因系 (十和田⁴/丽江新团黑谷/十和田) BC_4F_8 、 BC_4F_9 群体的 105 个株系及其亲本为试验材料。轮回亲本十和田为日本商业化弱耐冷 (6 级) 粳稻品种^[16]。供体亲本丽江新团黑谷为极强 (2 级) 耐冷品种^[17]。

1.2 试验设计

2011、2012 年分别将对照品种、亲本及 BC_4F_8 、 BC_4F_9 群体种植于云南白邑 (A 地点, 海拔 2 160 m, 冷水胁迫) 和玉溪 (B 地点, 海拔 1 530 m, 正常温度) 的同一试验田。插秧规格 20 cm \times 10 cm, 单本栽插, 1 行区, 每行 15 株, 随机区组设计, 2 次重复。氮、磷、钾 (N、 P_2O_5 、 K_2O) 施用量分别为 120, 80, 80 kg/hm^2 , 常规栽培管理。白邑 2 年均 5 月 20 日移栽, 冷水胁迫为从插秧后 20 d 起, 用 16 ~ 19 $^{\circ}\text{C}$ 冷泉水持续灌溉处理至成熟期, 长期保持田间水深 25 cm。2011 年整个生育期气温 13.9 ~ 23.5 $^{\circ}\text{C}$, 其中孕穗至灌浆结实期 7, 8 月平均最低气温分别为 16.5, 17.1 $^{\circ}\text{C}$; 2012 年整个生育期气温 14.1 ~ 24.3 $^{\circ}\text{C}$, 其中孕穗至灌浆结实期 7, 8 月平均最低气温分别为 16.9, 17.5 $^{\circ}\text{C}$ 。玉溪 2 年均 5 月 22 日移栽, 整个生育期气温 18.8 ~ 26.1 $^{\circ}\text{C}$, 其中孕穗至灌浆结实期 7, 8 月平均气温为 21.8 ~ 23.5 $^{\circ}\text{C}$ 。整个

生育期气温由当地气象局提供,孕穗至灌浆结实期(7-8月)最低气温采用 MINCER 温湿度自动记录仪实测获得。

在水稻抽穗期间选取长势一致的每个家系、亲本及对照品种稻株分别剪取剑叶、当天未开放颖花(室内低温下快速剥取花药)装入塑料袋封口,立即放入冰盒,保存于 -80°C 超低温冰箱,测定各项生化指标。成熟时,收获籽粒制成糙米测定可溶性蛋白质、可溶性糖、蛋白质、 γ -氨基丁酸、总黄酮和生物碱含量。

1.3 指标测定与方法

叶绿素含量采用无水乙醇浸提法^[18];用愈创木酚法^[19]测定过氧化物酶(POD)活性;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[20];过氧化氢酶(CAT)活性、游离氨基酸含量采用紫外吸收法^[21];可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[19];用硫代巴比妥酸比色法^[19]测定丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量;抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA)含量参照李合生等^[21]方法测定;游离脯氨酸(Pro)含量采用酸性印三酮比色法^[21];总黄酮(Total flavones, TF)和生物碱(Alkaloid, AL)含量参照董晓燕^[22]方法测定; γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)含量按 Inatomi 等^[23]方法测定。蛋白质用凯氏定氮法^[24]测定籽粒全氮后乘 5.95 转换而得。每个样品测定 3 次重复。

1.4 数据处理与统计分析

所有数据经 Microsoft Excel 2003 软件处理后,运用 SPSS 17.0 软件进行主成分分析、隶属函数、回归分析和 K-means 聚类。以累计贡献率达 85% 以上为参考值,确定主成分个数。统计分析中所用公式如下。

1.4.1 隶属函数值

$$U(X_j) = \frac{(X_j - X_{\min})}{(X_{\max} - X_{\min})} \quad j = 1, 2, \dots, n$$

式中, X_j 表示第 j 个因子得分值, X_{\min} 表示第 j 个因子得分的最小值, X_{\max} 表示第 j 个因子得分的最大值。

1.4.2 主成分权重

$$W_j = \frac{P_j}{\sum_{j=1}^n P_j} \quad j = 1, 2, \dots, n$$

式中, W_j 表示第 j 个公因子在所有公因子中的重要程度, P_j 为各材料第 j 个公因子的贡献率。

1.4.3 试验材料的综合耐冷 D 值

$$D = \sum_{j=1}^n [U(X_j) \times W_j] \quad j = 1, 2, \dots, n$$

式中, D 值为低温胁迫下各试验材料用主成分评价所得的耐冷性综合评分值(即综合耐冷值)。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下参试材料叶片主要生化性状的表现

由表 1 可知,低温胁迫下除可溶性蛋白含量无明显变化外,叶片叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和叶绿素 c 含量比对照降低,而 POD、CAT 活性,以及可溶性糖、游离氨基酸、丙二醛、抗坏血酸和游离脯氨酸含量比对照明显增加。从 5 个品种看,低温胁迫下冷敏感品种十和田叶片的 3 种叶绿素和 MDA 含量的变化幅度高于强耐冷性品种昆明小白谷、丽粳 2 号、半节芒和丽江新团黑谷,而其他生化性状则相反。从 NILs 群体的分布范围看,各家系同一性状的极值在不同环境下存在一定差异,12 个生化性状的均值都介于双亲之间,且所有性状的变异范围都超出双亲值,表现出数量性状的遗传特点。

表 1 低温胁迫和正常温度下 NILs 群体和对照品种叶片的主要生化性状表现

Tab.1 The phenotypic biochemical traits in leaves of contrast varieties, parents, and NILs population under cold stress and normal conditions

项目 Items	年份/地点 Year/site	对照品种 Contrast varieties			亲本 Parents		NIL 群体 NIL population	
		昆明小白谷 KBG	丽粳 2 号 Lijing 2	半节芒 BJM	丽江新团黑谷 LTH	十和田 Towada	均值 Mean	变异范围 Range
叶绿素 a/(mg/g) Chl a	2011/A	1.55	1.71	1.72	1.94	1.21	1.84 ± 0.39	1.04 ~ 2.79
	2012/A	1.51	2.14	1.73	1.71	1.34	1.73 ± 0.52	0.65 ~ 2.75
	2011/B	1.73	2.50	2.12	2.13	2.26	2.11 ± 0.33	1.16 ~ 3.13
	2012/B	1.91	2.57	2.36	2.07	2.04	2.16 ± 0.31	1.37 ~ 3.18
叶绿素 b/(mg/g) Chl b	2011/A	0.61	0.75	0.72	0.89	0.68	0.76 ± 0.19	0.49 ~ 1.87
	2012/A	0.55	0.98	0.58	0.93	0.51	0.77 ± 0.15	0.37 ~ 1.37
	2011/B	0.71	1.04	0.97	1.12	0.93	0.96 ± 0.23	0.55 ~ 1.70
	2012/B	0.64	1.06	0.84	1.11	1.06	0.86 ± 0.16	0.44 ~ 1.27
总叶绿素/(mg/g) Chl T	2011/A	1.50	2.46	2.44	3.25	1.89	2.60 ± 0.56	0.88 ~ 3.73
	2012/A	2.06	3.12	2.31	2.64	1.85	2.50 ± 0.45	1.41 ~ 4.09

续表 1:

项目 Items	年份/地点 Year/site	对照品种 Contrast varieties			亲本 Parents		NIL 群体 NIL population	
		昆明小白谷 KBG	丽粳 2 号 Lijing 2	半节芒 BJM	丽江新团黑谷 LTH	十和田 Towada	均值 Mean	变异范围 Range
叶绿素 c/(mg/g) Chl c	2011/B	2.44	3.54	3.09	3.25	3.19	3.07 ± 0.61	1.87 ~ 4.55
	2012/B	2.50	3.33	2.80	3.20	3.10	3.02 ± 0.70	1.55 ~ 4.35
	2011/A	0.15	0.20	0.22	0.37	0.28	0.25 ± 0.07	0.04 ~ 0.40
	2012/A	0.35	0.38	0.41	0.31	0.32	0.35 ± 0.06	0.17 ~ 0.52
	2011/B	0.36	0.35	0.32	0.26	0.14	0.31 ± 0.07	0.13 ~ 0.44
	2012/B	0.32	0.39	0.42	0.36	0.29	0.34 ± 0.12	0.10 ~ 0.61
POD 活性(U/(g·min))	2011/A	43.70	68.80	31.25	46.94	54.69	62.37 ± 34.4	13.12 ~ 162.50
POD activity	2012/A	38.70	53.61	32.51	40.75	41.67	97.25 ± 54.7	12.50 ~ 256.25
可溶性蛋白/% SP	2011/B	37.50	75.00	50.07	53.29	24.06	47.05 ± 19.7	10.00 ~ 98.75
	2012/B	25.42	38.75	26.25	32.25	36.56	36.27 ± 14.1	11.25 ~ 86.25
	2011/A	1.75	1.68	1.44	1.66	1.17	1.24 ± 3.11	0.61 ~ 2.37
	2012/A	1.47	0.82	1.43	1.13	1.22	1.54 ± 5.87	0.52 ~ 3.53
可溶性糖/% SS	2011/B	1.01	1.20	1.65	1.07	1.02	1.17 ± 5.18	0.56 ~ 4.59
	2012/B	1.25	0.75	1.12	1.25	1.00	1.14 ± 4.86	0.14 ~ 3.21
	2011/A	4.82	7.59	7.37	6.02	7.88	7.38 ± 11.72	4.55 ~ 9.02
	2012/A	8.47	8.04	8.27	6.69	7.45	6.75 ± 10.26	4.09 ~ 7.68
游离氨基酸/(μg/g) FAA	2011/B	2.36	2.25	4.92	2.59	3.10	2.97 ± 8.85	1.48 ~ 5.19
	2012/B	3.47	2.04	3.03	2.24	4.01	3.30 ± 8.25	1.54 ~ 5.99
	2011/A	60.53	36.77	37.32	39.25	30.71	42.76 ± 8.83	19.52 ~ 61.22
	2012/A	34.25	38.93	27.05	27.30	35.45	41.51 ± 9.47	2.21 ~ 86.45
丙二醛/(μmol/g) MDA	2011/B	33.04	20.25	26.81	21.87	24.29	24.25 ± 8.13	4.27 ~ 44.23
	2012/B	24.29	27.35	27.95	33.39	27.86	26.59 ± 6.43	4.37 ~ 91.85
	2011/A	0.65	1.09	0.90	0.69	1.27	1.07 ± 0.27	0.59 ~ 1.78
	2012/A	0.64	1.13	0.67	0.46	1.40	1.12 ± 0.40	0.16 ~ 3.42
CAT 活性/(mg/(g·min)) CAT activity	2011/B	0.76	1.43	0.63	0.49	0.99	0.88 ± 0.26	0.08 ~ 1.52
	2012/B	0.65	1.04	0.71	0.97	0.81	1.10 ± 0.52	0.27 ~ 1.64
	2011/A	24.11	17.95	24.30	24.36	22.76	23.23 ± 2.10	16.86 ~ 24.66
	2012/A	23.27	24.03	24.21	24.70	24.54	24.08 ± 1.07	17.05 ~ 24.84
抗坏血酸/(mg/g) ASA	2011/B	18.99	13.06	15.78	17.89	13.55	21.84 ± 3.31	5.26 ~ 24.48
	2012/B	24.30	16.57	22.41	24.04	24.57	20.07 ± 0.76	19.58 ~ 24.84
	2011/A	15.89	17.25	19.12	14.70	11.62	13.33 ± 4.96	0.10 ~ 17.62
	2012/A	12.66	14.47	11.09	9.56	12.41	11.41 ± 2.89	0.40 ~ 15.78
游离脯氨酸/% Proline	2011/B	10.34	8.71	15.97	10.44	9.88	10.53 ± 5.05	0.06 ~ 17.66
	2012/B	11.78	6.78	13.72	11.81	12.97	12.04 ± 2.75	3.78 ~ 17.29
	2011/A	8.45	8.66	8.01	8.18	7.94	9.68 ± 1.85	7.13 ~ 17.52
	2012/A	9.76	8.12	9.87	8.10	6.93	9.58 ± 1.60	7.21 ~ 15.17
	2011/B	5.06	4.37	2.53	5.66	6.41	7.28 ± 1.26	4.07 ~ 11.95
	2012/B	3.35	1.99	2.41	6.46	7.02	6.64 ± 1.68	4.00 ~ 11.37

注:KBG. 昆明小白谷;BJM. 半节芒;LTH. 丽江新团黑谷;Chl a. 叶绿素 a;Chl b. 叶绿素 b;Chl T. 总叶绿素;Chl c. 叶绿素 c;POD. 过氧化物酶;SP. 可溶性蛋白;SS. 可溶性糖;FAA. 游离氨基酸;MDA. 丙二醛;CAT. 过氧化氢酶;ASA. 抗坏血酸。表 2~3,5 同。

Note;KBG. Kunmingxiaobaigu;BJM. Banjiemang;LTH. Lijiangxintuanheigu;Chl a. Chlorophyll a;Chl b. Chlorophyll b;Chl T. Total chlorophyll;Chl c. Chlorophyll c;SP. Soluble protein content;SS. Soluble sugar content;FAA. Free amino acid content. The same as Tab. 2~3,5.

2.2 低温胁迫下参试材料花药和籽粒主要生化性状的表现

由表 2 可知,与正常温度条件相比,低温下 5 个品种花药中的 POD、CAT 活性以及可溶性蛋白、可溶性糖、游离氨基酸、MDA、抗坏血酸和脯氨酸含量均有不同程度增加,且品种间各单项指标的变化幅度不同,除 MDA 外,其他生化性状值表现为强耐冷品种昆明小白谷、丽粳 2 号、半节芒和丽江新团黑谷

的变化幅度高于弱耐冷品种十和田。低温下参试材料籽粒的可溶性糖、蛋白质、γ-氨基丁酸、总黄酮和生物碱含量呈增加趋势,且强耐冷品种增加幅度高于弱耐冷品种,而可溶性蛋白则呈下降趋势。从 NILs 群体的分布范围看,所有性状均值都介于双亲之间,但变异范围都超出双亲值,且同一性状的极值在不同环境下差异较大。

表 2 低温胁迫和正常温度下 NILs 群体和对照品种花药和籽粒主要生化性状表现
Tab.2 The phenotypic biochemical traits in anther and grain of contrast varieties,
parents, and NILs population under cold stress and normal conditions

项目 Items	年份/地点 Year/site	部位 Position	对照品种 Contrast varieties			亲本 Parents		NIL 群体 NIL population	
			昆明 小白谷 KBC	丽粳 2 号 Lijing 2	半节芒 BJM	丽江新 团黑谷 LTH	十和田 Towada	均值 Mean	变异范围 Range
POD 活性/(U/(g·min)) POD activity	2011/A	花药	20.00	36.25	30.00	44.62	93.75	84.27 ± 25.9	9.25 ~ 142.50
	2012/A	花药	14.92	13.50	17.63	52.50	96.87	82.35 ± 28.1	8.75 ~ 145.00
	2011/B	花药	12.21	11.75	15.19	39.50	82.36	75.03 ± 29.9	8.36 ~ 139.30
	2012/B	花药	10.04	9.11	12.14	37.41	83.42	77.21 ± 25.4	8.12 ~ 127.50
可溶性蛋白/% SP	2011/A	花药	0.71	1.23	0.53	0.53	0.59	0.83 ± 4.5	0.19 ~ 3.33
	2012/A	花药	0.65	0.93	0.91	0.38	0.50	0.51 ± 0.1	0.32 ~ 0.74
	2011/B	花药	0.59	0.85	0.82	0.35	0.36	0.50 ± 2.4	0.17 ~ 2.59
	2012/B	花药	0.44	0.73	0.72	0.31	0.29	0.45 ± 1.9	0.16 ~ 2.87
可溶性糖/% SS	2011/A	籽粒	1.42	2.37	1.88	1.66	1.53	1.61 ± 0.1	1.10 ~ 1.86
	2012/A	籽粒	1.34	2.64	1.70	1.51	1.31	1.48 ± 0.4	0.94 ~ 4.51
	2011/B	籽粒	1.88	2.46	2.01	1.95	1.79	1.86 ± 0.4	0.99 ~ 3.64
	2012/B	籽粒	1.56	2.13	1.91	1.88	1.68	1.79 ± 0.5	1.01 ~ 3.68
	2011/A	花药	3.40	4.36	2.75	2.95	5.36	4.78 ± 2.3	0.43 ~ 9.96
	2012/A	花药	1.82	1.56	2.64	3.17	2.56	2.76 ± 1.1	0.33 ~ 7.04
	2011/B	花药	1.66	1.42	2.40	2.45	2.99	2.51 ± 2.0	0.39 ~ 6.05
	2012/B	花药	1.51	1.30	2.55	2.13	2.44	2.67 ± 2.3	0.29 ~ 6.47
	2011/A	籽粒	9.19	10.74	9.60	8.56	6.29	7.82 ± 2.9	2.71 ~ 19.49
	2012/A	籽粒	8.17	8.30	5.28	9.21	5.98	7.65 ± 1.6	1.49 ~ 13.46
	2011/B	籽粒	4.48	8.10	5.20	8.33	4.43	6.62 ± 2.5	4.91 ~ 11.27
	2012/B	籽粒	4.69	7.90	4.97	7.14	4.56	6.73 ± 1.5	2.88 ~ 12.69
游离氨基酸/(μg/g) FAA	2011/A	花药	78.05	47.75	41.99	25.40	43.88	47.12 ± 25.4	2.93 ~ 99.41
	2012/A	花药	85.41	52.53	46.19	44.72	47.96	49.70 ± 20.7	3.96 ~ 77.21
	2011/B	花药	45.53	37.49	40.91	35.07	39.74	38.59 ± 14.3	4.67 ~ 58.84
	2012/B	花药	48.27	39.51	37.86	32.11	37.45	35.43 ± 12.1	3.56 ~ 60.92
丙二醛/(μmol/g) MDA	2011/A	花药	0.45	0.91	0.71	0.85	1.04	0.70 ± 0.2	0.17 ~ 1.41
	2012/A	花药	0.37	0.67	0.48	0.83	0.76	0.79 ± 0.4	0.38 ~ 4.24
	2011/B	花药	0.34	0.61	0.43	0.58	0.41	0.65 ± 0.4	0.25 ~ 3.06
	2012/B	花药	0.31	0.53	0.41	0.64	0.56	0.57 ± 0.5	0.21 ~ 3.85
CAT 活性/(mg/(g·min)) CAT activity	2011/A	花药	24.12	21.40	24.21	22.01	20.04	21.42 ± 2.2	16.68 ~ 25.90
	2012/A	花药	24.01	23.54	26.63	20.61	24.16	22.95 ± 1.9	18.13 ~ 24.80
	2011/B	花药	21.82	20.49	23.12	23.46	17.64	19.55 ± 1.6	15.73 ~ 24.60
	2012/B	花药	19.33	18.32	21.03	24.52	18.21	17.06 ± 1.8	13.27 ~ 23.10
抗坏血酸/(mg/g) ASA	2011/A	花药	12.91	13.16	12.22	12.48	10.53	11.73 ± 2.3	5.65 ~ 16.91
	2012/A	花药	11.72	14.47	13.44	11.21	10.44	10.95 ± 2.8	3.78 ~ 17.29
	2011/B	花药	10.66	7.16	10.72	9.41	9.86	9.76 ± 1.5	5.89 ~ 12.48
	2011/B	花药	9.21	9.22	9.13	10.55	8.44	8.21 ± 1.8	4.56 ~ 13.21
脯氨酸/% Proline	2011/A	花药	8.81	8.63	13.10	8.81	5.91	7.76 ± 3.4	0.28 ~ 13.58
	2012/A	花药	7.52	9.50	14.41	12.05	6.94	7.64 ± 3.2	0.63 ~ 18.57
	2011/B	花药	6.83	5.93	9.30	5.69	3.25	5.24 ± 3.1	0.35 ~ 13.51
	2012/B	花药	5.98	6.82	11.21	7.01	4.16	5.92 ± 3.5	0.31 ~ 12.78
蛋白质/% Protein	2011/A	籽粒	9.24	8.49	8.96	10.26	9.49	9.58 ± 1.1	7.74 ~ 11.82
	2012/A	籽粒	11.46	7.89	8.01	9.77	8.03	8.80 ± 1.3	5.45 ~ 11.68
	2011/B	籽粒	8.70	7.79	8.11	7.98	6.42	7.23 ± 1.0	4.82 ~ 9.54
	2012/B	籽粒	7.91	6.43	7.14	6.32	7.95	8.03 ± 1.2	4.11 ~ 10.23
γ-氨基丁酸/(mg/kg) GABA	2011/A	籽粒	50.65	30.26	49.83	55.54	55.54	44.45 ± 15.2	18.84 ~ 90.60
	2012/A	籽粒	44.94	29.99	34.88	79.97	57.14	72.36 ± 10.3	36.24 ~ 94.00
	2011/B	籽粒	32.89	28.90	23.10	26.45	43.10	37.86 ± 8.9	11.23 ~ 77.30
	2012/B	籽粒	29.23	25.77	31.17	35.62	39.62	39.12 ± 7.1	16.11 ~ 79.50
总黄酮/(mg/kg) TF	2011/A	籽粒	141.59	199.68	141.11	193.84	129.74	148.80 ± 46.5	24.10 ~ 318.40
	2012/A	籽粒	161.33	202.40	256.84	180.10	127.00	113.10 ± 43.1	97.12 ~ 420.40
	2011/B	籽粒	122.67	123.94	109.34	184.20	115.50	120.70 ± 24.9	61.45 ~ 201.40
	2012/B	籽粒	101.21	97.43	112.56	145.40	95.50	97.60 ± 24.9	55.12 ~ 242.60
生物碱/(mg/kg) AL	2011/A	籽粒	144.85	109.55	124.97	80.67	60.45	56.96 ± 24.0	3.36 ~ 98.92
	2012/A	籽粒	69.57	98.09	56.07	50.88	57.31	45.24 ± 12.3	17.60 ~ 74.70
	2011/B	籽粒	43.09	79.06	41.56	39.61	44.99	41.93 ± 25.5	4.89 ~ 98.09
	2012/B	籽粒	52.12	87.17	60.41	42.78	39.86	37.58 ± 21.2	4.12 ~ 81.24

2.3 低温胁迫下参试材料叶片各单项指标间的相关性分析

由表 3 可知,低温下各性状间存在不同程度的相关,总趋势为叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛、CAT 活性、抗坏血酸和游离脯氨酸之间相关程度较高,12 个性状组成的 66 对性状,在 2011 年有

30 对达到显著或极显著相关($-0.18^* \sim 0.98^{**}$);而 2012 年有 29 对达到显著或极显著相关($-0.17^* \sim 0.97^{**}$)。由于指标性状间存在一定的相关性,必然导致所提供的信息发生重叠,为此,为消除指标间相互关联、信息重叠对耐冷性评价真实性的影响,本研究采用主成分分析法对 12 个生化性状进行数据转换分析。

表 3 低温胁迫下参试材料叶片 12 个生化性状相关系数矩阵

Tab.3 Correlation matrix of 12 biochemical traits of all the accessions leaves under cold stress condition

项目 Items	Chl a	Chl b	Chl T	Chl c	POD	SP	SS	FAA	MDA	CAT	ASA	Pro
Chl a		0.85 **	0.98 **	0.75 **	0.06	-0.11	-0.25 **	-0.04	0.03	-0.21 *	-0.22 *	0.08
Chl b	0.83 **		0.93 **	0.38 **	-0.13	-0.23 *	-0.27 **	0.04	0.12	-0.19 *	-0.18 *	0.04
CH T	0.97 **	0.92 **		0.65 **	0.04	-0.12	-0.26 **	0.04	0.02	-0.04	-0.19 *	0.09
Chl c	0.82 **	0.48 **	0.74 **		0.04	0.05	0.13	-0.06	0.33 **	-0.02	0.06	0.02
POD	0.09	-0.15	0.10	0.03		0.22 *	0.31 **	0.23 *	0.42 **	0.22 *	0.09	-0.13
SP	-0.03	-0.19 *	-0.05	0.02	0.21 *		0.73 **	-0.18 *	-0.14	0.19 *	0.09	-0.05
SS	-0.23 *	-0.24 **	-0.27 **	0.12	0.37 **	0.53 **		-0.04	-0.03	0.28 **	0.03	-0.33 **
FAA	-0.05	0.05	0.03	-0.08	0.19 *	-0.07	-0.07		0.10	0.06	-0.27 **	-0.18
MDA	0.03	0.14	0.05	0.31 **	0.43 **	-0.15	-0.07	0.06		-0.18 *	-0.07	0.03
CAT	-0.25 **	-0.20 *	-0.21 *	-0.14	0.19 *	-0.22 *	0.24 **	0.02	-0.02		0.09	-0.29 **
ASA	0.20 *	-0.17 *	-0.23 *	0.11	0.08	-0.09	0.13	-0.33 **	-0.12	0.03		0.26 **
Pro	0.14	0.14	0.14	0.10	0.12	-0.14	-0.42 **	-0.13	0.04	-0.26 **	0.37 **	

注:右上角和左下角分别为 2011、2012 年低温下叶片各生化性状间的相关系数;*、** .0.05 和 0.01 显著水平。表 4 同。

Note: Values above and below the diagonal correspond to correlations of biochemical traits in leaves under cold stress at Beiyi (2011, 2012), respectively; * and ** represent significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. The same as Tab. 4.

2.4 低温胁迫下参试材料花药和籽粒 14 个生化指标间的相关性分析

由表 4 可知,低温胁迫下 2011 年由 14 个性状组成的 78 对性状有 27 对达到显著或极显著相关($-0.19^* \sim -0.38^{**}$),而 2012 年有 33 对达到显

著或极显著相关($-0.18^* \sim 0.76^{**}$)。从性状间关联密切程度看,表现为花药中 POD、CAT、可溶性蛋白、可溶性糖、游离氨基酸、丙二醛及籽粒中可溶性蛋白、可溶性糖和 γ -氨基丁酸之间关联性较强。

表 4 低温胁迫下参试材料花药和籽粒 14 个生化性状相关系数矩阵

Tab.4 Correlation matrix of 14 biochemical traits of all the accessions anther and grain under cold stress condition

指标 Index	APOD	ASP	ASS	AFAA	AMDA	ACAT	AASA	APro	GSP	GSS	PR	GABA	TF
APOD		-0.21 *	0.19 *	-0.27 **	0.21 *	-0.22 *	-0.05	-0.14	-0.16	-0.38 **	-0.19 *	0.31 **	-0.08
ASP	-0.35 **		0.24 **	0.12	-0.17	0.26 **	0.02	0.02	-0.01	-0.07	0.11	0.03	-0.09
ASS	0.03	0.08		-0.05	-0.06	-0.19 *	-0.05	-0.23 **	-0.21 *	-0.23 *	-0.16	0.25 **	-0.12
AFAA	0.67 **	-0.18 *	-0.12		-0.19 *	-0.15	0.21 *	0.13	0.16	0.11	0.13	-0.19 *	0.16
AMDA	-0.21 *	0.06	-0.11	-0.19		-0.14	-0.09	0.02	-0.01	-0.22 *	-0.07	0.03	0.15
ACAT	-0.10	0.20 *	-0.25 **	0.04	-0.04		-0.06	0.34 **	0.13	0.20 *	0.13	-0.19 *	-0.12
AASA	-0.15	0.36 **	0.14	-0.26 **	0.03	0.12		0.21 *	0.08	0.08	0.19 *	0.13	0.09
APro	-0.07	-0.04	0.24 *	-0.02	-0.05	0.33 **	0.09		-0.07	-0.05	0.06	-0.07	-0.08
GSP	-0.23 *	0.69 **	0.05	-0.19 *	0.21 *	0.09	0.44 **	-0.03		0.13	0.04	-0.20 *	0.21 *
GSS	-0.18 *	0.76 **	0.16	-0.35 **	0.12	-0.20 *	0.17	-0.13	0.56 **		0.23 *	-0.37 **	-0.06
PR	0.44 **	-0.26 **	-0.22 *	0.52 **	-0.09	0.04	-0.19 *	-0.09	-0.22 *	-0.27 **		-0.03	0.04
GABA	0.15	-0.12	-0.02	-0.17	0.12	-0.25 **	-0.07	-0.13	-0.20 *	0.20 *	-0.12		-0.07
TF	-0.06	-0.07	0.14	-0.08	-0.13	-0.06	-0.17	0.05	-0.15	-0.03	-0.09	-0.05	
AL	-0.04	0.19 *	-0.05	0.09	0.15	0.04	0.16	-0.02	0.28 **	0.12	0.03	0.04	-0.22 *

注:右上角和左下角分别为 2011、2012 年低温胁迫下花药和籽粒生化性状间的相关系数。花药中:APOD. 过氧化物酶活性;ASP. 可溶性蛋白;ASS. 可溶性糖;AFAA. 游离氨基酸;AMDA. 丙二醛;ACAT. 过氧化氢酶活性;AASA. 抗坏血酸;APro. 游离脯氨酸。籽粒中:GSP. 可溶性蛋白;GSS. 可溶性糖;PR. 蛋白质。表 6 同。

Note: Values above and below the diagonal correspond to correlations of biochemical traits in anther and grain under water stress in 2011 and 2012. AP-OD. Anther POD activity; ASP. Anther soluble protein content; ASS. Anther soluble sugar content; AFAA. Anther free amino acid content; AMDA. Anther MDA content; ACAT. Anther CAT activity; AASA. Anther ascorbic acid content; APro. Anther proline content. GSP. Grain soluble protein content; GSS. Grain soluble sugar content; PR. Protein content. The same as Tab. 6.

2.5 参试材料叶片生化性状的主成分分析

由表 5 可知,在 2 年低温胁迫处理中,前 8 个综合指标的累计贡献率都超过 85%,分别为 92.271% 和 90.417%,表明可以用这 8 个主成分对供试材料耐冷性进行概括分析。表 5 显示 2 年低温胁迫处理中决定第 1 主成分大小的主要是叶绿素 a、叶绿素

b、总叶绿素、叶绿素 c,可概括为光合作用因子;决定第 2 主成分大小的主要是 POD、MDA 和 CAT,可概括为抗氧化系统因子;决定第 3、4、5、6、7、8 主成分大小的主要是脯氨酸、抗坏血酸和游离氨基酸、可溶性蛋白、可溶性糖,可以概括为渗透调节物质因子。

表 5 低温胁迫下参试材料叶片指标性状前 8 个主成分特征向量、特征值、贡献率及累计贡献率

Tab.5 Power vector (PV), eigenvalues (E), contribution rate (CR), and cumulative contribution rate (CCR) of first eight principal components from all the accessions leaves under cold stress condition

年份 Year	特征向量 PV	PV(1)	PV(2)	PV(3)	PV(4)	PV(5)	PV(6)	PV(7)	PV(8)
2011	Chl a	0.985	0.040	0.047	0.046	-0.043	-0.088	0.014	0.015
	Chl b	0.886	0.084	0.108	-0.254	0.010	-0.038	0.007	-0.230
	CH T	0.985	0.056	0.069	-0.054	-0.028	-0.073	0.013	-0.070
	Chl c	0.736	-0.177	-0.053	0.459	-0.118	-0.099	0.013	0.229
	POD	0.012	0.759	0.079	-0.020	-0.077	-0.138	-0.238	0.511
	SP	-0.162	0.452	0.238	0.566	0.285	-0.200	-0.204	-0.437
	SS	0.339	0.251	-0.290	-0.128	0.303	0.713	-0.294	-0.047
	FAA	-0.084	0.355	0.482	0.254	-0.544	0.352	-0.125	-0.041
	MDA	-0.065	0.679	0.180	-0.550	0.051	-0.240	0.077	-0.120
	CAT	0.047	0.549	-0.175	0.276	0.255	0.186	0.682	0.080
	ASA	0.056	-0.240	0.550	0.029	0.678	-0.020	-0.141	0.252
	Pro	-0.008	-0.240	0.767	-0.141	-0.068	0.249	0.291	0.010
	特征值 E	3.427	1.891	1.355	1.080	1.023	0.870	0.777	0.650
	贡献率% CR	28.556	15.759	11.289	8.998	8.527	7.250	6.474	5.418
	累计贡献率/% CCR	28.556	44.314	55.603	64.602	73.129	80.379	86.853	92.271
2012	Chl a	0.983	-0.060	0.033	0.008	0.038	-0.004	-0.003	-0.028
	Chl b	0.882	0.070	-0.131	-0.029	0.127	-0.038	0.102	-0.133
	CH T	0.989	-0.019	-0.023	-0.006	0.07	-0.017	0.034	-0.067
	Chl c	0.814	-0.245	0.173	0.009	-0.134	0.008	-0.094	0.152
	POD	0.121	0.513	-0.057	0.116	0.218	0.106	-0.31	-0.192
	SP	0.042	-0.326	-0.647	0.017	0.139	0.792	0.444	0.429
	SS	-0.074	-0.174	0.277	0.278	0.191	0.385	-0.147	0.434
	FAA	0.015	0.274	-0.441	0.587	-0.475	0.139	0.531	0.129
	MDA	-0.059	0.613	0.450	0.013	0.274	-0.032	0.166	0.054
	CAT	0.172	0.476	0.178	-0.267	-0.195	0.107	0.208	0.126
	ASA	0.013	-0.256	0.468	0.469	-0.444	0.288	0.295	-0.383
	Pro	0.176	0.265	0.104	0.512	0.017	-0.378	-0.314	0.397
	特征值 E	3.470	1.425	1.207	1.125	1.050	0.915	0.863	0.795
	贡献率/% CR	28.913	11.875	10.058	9.375	8.752	7.628	7.192	6.624
	累计贡献率/% CCR	28.913	40.788	50.846	60.221	68.973	76.601	83.793	90.417

2.6 参试材料花药和籽粒生化性状的主成分分析

由表 6 可知,在 2 年低温胁迫处理中,前 10 个主成分的累计贡献率分别为 84.460% 和 91.914%,反映了原评价指标的大部分信息。因此,选择 10 个主成分较为合适。表 6 显示 2 年低温胁迫处理中决定第 1 主成分大小的是花药 POD、CAT、可溶性糖、

可溶性蛋白、游离氨基酸、抗坏血酸及籽粒可溶性蛋白、可溶性糖、蛋白质、 γ -氨基丁酸。决定第 2 主成分大小的是花药可溶性蛋白、游离氨基酸、抗坏血酸、CAT、MDA 及籽粒可溶性蛋白、蛋白质、总黄酮、生物碱、 γ -氨基丁酸。决定第 3 主成分大小的是花药 POD、CAT、游离氨基酸、抗坏血酸、脯氨酸和籽粒

可溶性糖、可溶性蛋白、总黄酮、 γ -氨基丁酸。决定第 4 主成分大小的有花药 POD、MDA、可溶性糖、游离氨基酸、抗坏血酸及籽粒蛋白质、总黄酮、 γ -氨基丁酸。决定第 5 主成分大小的有花药 MDA、可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸及籽粒可溶性蛋白、蛋白质、 γ -氨基丁酸。决定第 6 主成分大小的有花药 MDA、可溶性蛋白、抗坏血酸、脯氨酸及籽粒生物碱、总黄

酮。决定第 7 主成分大小的有花药 MDA、可溶性糖、可溶性蛋白、抗坏血酸及籽粒生物碱、 γ -氨基丁酸。决定第 8 主成分大小的有花药 CAT、MDA、脯氨酸及籽粒可溶性糖、可溶性蛋白、生物碱。决定第 9 主成分大小的有花药 POD、可溶性糖、抗坏血酸和籽粒蛋白质、总黄酮。决定第 10 主成分大小的有花药 POD、CAT 及籽粒可溶性糖、脯氨酸。

表 6 低温胁迫下参试材料花药和籽粒指标性状的前 10 个主成分特征向量、特征值、贡献率及累计贡献率

Tab. 6 Power vector (PV), eigenvalues (E), contribution rate (CR) and cumulative contribution rate (CCR) of first ten principal components from all the accessions anthers and grains under cold stress condition %

年份 Year	特征向量 PV	PV(1)	PV(2)	PV(3)	PV(4)	PV(5)	PV(6)	PV(7)	PV(8)	PV(9)	PV(10)
2011	APOD	-0.649	0.107	0.097	0.026	-0.239	-0.217	0.020	0.144	0.401	-0.310
	ASP	0.009	0.448	0.157	-0.249	0.361	-0.522	0.391	0.044	-0.282	0.113
	ASS	-0.515	0.272	-0.132	-0.085	-0.332	0.241	-0.121	-0.103	-0.299	0.501
	AFAA	0.340	0.351	0.408	-0.494	-0.180	-0.022	-0.196	-0.030	0.272	0.059
	AMDA	-0.221	-0.623	0.224	0.000	0.340	0.258	0.308	-0.157	-0.084	-0.037
	ACAT	0.418	-0.158	-0.508	0.224	-0.056	-0.030	0.045	0.489	0.176	0.281
	AASA	0.126	0.335	0.383	0.516	0.167	0.153	-0.374	0.159	-0.298	-0.237
	APro	0.089	0.083	-0.143	-0.560	0.466	0.438	-0.237	0.328	0.007	-0.087
	GSP	0.452	-0.213	0.363	0.012	-0.304	-0.148	0.143	0.474	-0.246	-0.016
	GSS	0.690	0.090	-0.232	0.169	-0.081	-0.055	-0.166	-0.398	-0.065	-0.107
	PR	0.410	0.383	0.137	0.342	0.330	0.175	0.269	-0.102	0.382	0.237
	GABA	-0.629	0.269	0.125	0.349	0.141	0.113	0.015	0.212	0.070	0.111
	TF	0.153	-0.305	0.706	0.007	-0.136	0.146	-0.057	-0.040	0.123	0.292
	AL	0.166	0.352	-0.048	-0.058	-0.391	0.536	0.537	0.025	-0.085	-0.261
	特征值 E	2.343	1.431	1.414	1.215	1.093	1.037	0.912	0.871	0.768	0.741
	贡献率/% CR	16.732	10.224	10.098	8.678	7.810	7.409	6.511	6.221	5.485	5.292
	累计贡献率/% CCR	16.732	26.956	37.054	45.732	53.543	60.951	67.463	73.684	79.169	84.460
2012	APOD	-0.599	0.299	0.378	0.338	0.262	0.247	-0.008	0.188	0.014	0.013
	ASP	0.812	0.274	0.072	0.246	-0.209	0.158	-0.147	-0.027	-0.074	0.036
	ASS	0.189	-0.212	-0.167	0.570	0.462	-0.110	0.436	0.044	-0.358	0.017
	AFAA	-0.593	0.594	0.155	0.290	0.030	0.076	0.025	0.036	0.102	-0.054
	AMDA	0.248	0.004	0.267	-0.583	0.079	0.345	0.490	0.379	0.043	0.008
	ACAT	0.034	0.388	-0.630	-0.179	0.075	0.215	-0.074	-0.020	-0.239	0.539
	AASA	0.481	0.358	-0.132	0.133	0.350	-0.334	-0.049	0.222	0.500	0.154
	APro	0.002	0.125	-0.627	-0.104	0.376	0.398	-0.246	0.027	0.022	-0.453
	GSP	0.761	0.407	0.076	0.089	-0.120	0.099	0.073	0.094	0.077	-0.033
	GSS	0.751	-0.045	0.384	0.279	-0.073	0.248	-0.197	0.035	-0.186	-0.061
	PR	-0.577	0.469	0.205	0.050	-0.222	0.110	-0.012	0.015	-0.119	0.081
	GABA	-0.008	-0.423	0.524	-0.139	0.496	0.170	-0.374	-0.053	0.035	0.265
	TF	-0.100	-0.457	-0.222	0.399	-0.197	0.469	0.221	-0.227	0.428	0.162
	AL	0.240	0.448	0.265	-0.237	0.283	0.011	0.236	-0.686	0.036	-0.059
	特征值 E	3.245	1.833	1.669	1.307	1.036	0.871	0.810	0.768	0.694	0.635
	贡献率/% CR	23.179	13.093	11.920	9.335	7.400	6.222	5.783	5.487	4.959	4.537
	累计贡献率/% CCR	23.179	36.271	48.191	57.526	64.926	71.148	76.931	82.418	87.377	91.914

2.7 耐冷性综合评价及聚类分析

根据上述主成分分解及其特征向量值求得各材料不同环境下分别以剑叶、花药和籽粒生化性状为对象的综合耐冷 D 值 ($D_1 \sim D_4$)。采用 K-means 聚

类法对 $D_1 \sim D_4$ 值进行联合聚类分析 (图略), 可将 NILs 群体的 105 个株系划分为 3 类, 其中强耐冷株系 32 株, 中度耐冷 10 株, 弱耐冷 63 株 (表 7)。

表 7 低温胁迫下参试材料耐冷性 D 值及综合评价

Tab. 7 The D value and comprehensive evaluation of all the accessions for cold tolerance(ECT) under cold stress condition

No.	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	ECT	No.	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	ECT
昆明小白谷 KBG	0.594	0.671	0.607	0.620	强	13	0.467	0.361	0.394	0.389	弱
丽粳 2 号 LJ	0.587	0.605	0.635	0.642	强	15	0.407	0.468	0.502	0.498	弱
半节芒 BJM	0.553	0.445	0.556	0.532	强	17	0.455	0.318	0.503	0.395	弱
丽江新团黑谷 LTH	0.579	0.585	0.541	0.492	强	18	0.482	0.362	0.545	0.453	弱
4	0.530	0.567	0.462	0.449	强	19	0.386	0.375	0.380	0.349	弱
6	0.588	0.457	0.565	0.454	强	20	0.449	0.444	0.483	0.310	弱
14	0.571	0.484	0.478	0.275	强	21	0.438	0.465	0.508	0.497	弱
16	0.588	0.577	0.448	0.303	强	22	0.601	0.362	0.404	0.325	弱
34	0.509	0.576	0.469	0.518	强	23	0.441	0.465	0.493	0.398	弱
35	0.583	0.562	0.432	0.455	强	25	0.483	0.323	0.468	0.443	弱
40	0.648	0.484	0.378	0.468	强	26	0.424	0.399	0.484	0.433	弱
41	0.555	0.410	0.337	0.474	强	30	0.499	0.422	0.552	0.553	弱
42	0.688	0.452	0.574	0.522	强	31	0.534	0.423	0.402	0.410	弱
43	0.666	0.511	0.521	0.443	强	33	0.425	0.462	0.484	0.434	弱
49	0.583	0.452	0.395	0.391	强	36	0.445	0.388	0.439	0.358	弱
52	0.576	0.547	0.484	0.491	强	37	0.550	0.364	0.370	0.400	弱
53	0.509	0.555	0.433	0.451	强	38	0.496	0.486	0.398	0.390	弱
56	0.684	0.501	0.485	0.511	强	45	0.400	0.349	0.473	0.357	弱
63	0.587	0.487	0.420	0.485	强	46	0.344	0.436	0.338	0.300	弱
66	0.552	0.672	0.507	0.394	强	47	0.399	0.330	0.492	0.385	弱
72	0.647	0.629	0.334	0.466	强	48	0.392	0.349	0.534	0.425	弱
73	0.634	0.560	0.376	0.457	强	50	0.389	0.366	0.412	0.438	弱
74	0.603	0.544	0.383	0.412	强	51	0.391	0.493	0.431	0.380	弱
80	0.605	0.698	0.456	0.412	强	54	0.440	0.348	0.341	0.353	弱
81	0.595	0.392	0.382	0.419	强	55	0.466	0.321	0.481	0.468	弱
82	0.660	0.534	0.462	0.387	强	57	0.444	0.515	0.402	0.379	弱
87	0.466	0.513	0.411	0.413	强	58	0.408	0.352	0.426	0.403	弱
88	0.640	0.541	0.388	0.430	强	59	0.438	0.400	0.361	0.378	弱
89	0.721	0.477	0.430	0.409	强	60	0.444	0.332	0.505	0.322	弱
90	0.497	0.523	0.453	0.418	强	61	0.424	0.379	0.389	0.443	弱
91	0.664	0.597	0.440	0.452	强	62	0.423	0.380	0.479	0.336	弱
92	0.564	0.402	0.436	0.453	强	64	0.416	0.390	0.392	0.322	弱
99	0.553	0.553	0.554	0.411	强	65	0.425	0.407	0.495	0.355	弱
103	0.514	0.528	0.413	0.387	强	67	0.351	0.479	0.345	0.317	弱
104	0.631	0.549	0.362	0.464	强	68	0.494	0.333	0.374	0.388	弱
105	0.620	0.552	0.292	0.486	强	69	0.427	0.436	0.523	0.443	弱
9	0.553	0.458	0.537	0.450	中	70	0.551	0.502	0.397	0.367	弱
24	0.278	0.580	0.529	0.434	中	71	0.372	0.468	0.344	0.380	弱
27	0.458	0.440	0.550	0.444	中	75	0.591	0.420	0.474	0.338	弱
28	0.370	0.523	0.462	0.475	中	76	0.438	0.386	0.422	0.433	弱
29	0.530	0.505	0.500	0.453	中	77	0.434	0.486	0.348	0.398	弱
32	0.507	0.579	0.477	0.452	中	78	0.408	0.353	0.459	0.385	弱
39	0.531	0.534	0.576	0.506	中	79	0.457	0.363	0.393	0.317	弱
44	0.471	0.386	0.515	0.557	中	83	0.448	0.366	0.468	0.413	弱
95	0.397	0.461	0.564	0.494	中	84	0.535	0.351	0.407	0.397	弱
102	0.474	0.431	0.494	0.539	中	85	0.470	0.302	0.360	0.416	弱
1	0.439	0.417	0.489	0.337	弱	86	0.468	0.310	0.403	0.456	弱
2	0.432	0.479	0.488	0.474	弱	93	0.518	0.309	0.418	0.423	弱
3	0.429	0.413	0.487	0.409	弱	94	0.467	0.476	0.538	0.485	弱
5	0.425	0.371	0.474	0.379	弱	96	0.384	0.321	0.444	0.352	弱
7	0.450	0.309	0.522	0.504	弱	97	0.450	0.314	0.376	0.390	弱
8	0.448	0.465	0.530	0.463	弱	98	0.381	0.331	0.343	0.389	弱
10	0.481	0.450	0.475	0.422	弱	100	0.484	0.289	0.388	0.376	弱
11	0.501	0.420	0.485	0.460	弱	101	0.412	0.360	0.462	0.473	弱
12	0.542	0.380	0.535	0.422	弱	十和田 Towada	0.317	0.377	0.364	0.396	弱

注: D₁ ~ D₄ 分别代表 2011 和 2012 年低温胁迫下叶片、花药和籽粒的综合评价价值。

Note: D₁ ~ D₄ represent comprehensive evaluation of all the accessions for cold tolerance(ECT) under cold stress condition(Baiyi leaves, anthers and grains, 2011 and 2012), respectively.

2.8 回归分析及耐冷鉴定指标的筛选

分别以综合耐冷 $D_1 \sim D_4$ 值为因变量, 对应各指标性状值为自变量建立最优回归方程:

$$D_1 = -0.374 - 0.023X_1 + 0.102X_3 + 0.187X_4 + 0.052X_6 + 0.014X_7 + 0.001X_8 + 0.003X_9 + 0.014X_{10} + 0.003X_{11} + 0.005X_{12} \quad (F = 172.889^{**}, r = 0.977, R^2 = 0.944)$$

$$D_2 = -0.126 + 0.045X_1 + 0.096X_2 + 0.033X_3 + 0.098X_4 + 0.002X_5 - 0.017X_6 + 0.004X_7 + 0.001X_8 + 0.068X_9 + 0.003X_{10} + 0.002X_{11} + 0.007X_{12} \quad (F = 132.236^{**}, r = 0.990, R^2 = 0.980)$$

D_1 、 D_2 分别表示白邑 (2011 和 2012 年叶片)。式中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 和 X_{12} 分别代表参试材料叶片的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、叶绿素 c、POD、可溶性蛋白、可溶性糖、游离氨基酸、MDA、CAT、抗坏血酸和脯氨酸等性状。

$$D_3 = -0.180 + 0.027A_2 - 0.008A_3 - 0.008A_5 + 0.006A_6 + 0.008A_7 + 0.019A_9 - 0.001A_{10} + 0.040A_{11} + 0.001A_{12} \quad (F = 211.430^{**}, r = 0.972, R^2 = 0.944)$$

$$D_4 = -0.189 + 0.119A_2 + 0.009A_3 + 0.051A_5 + 0.001A_6 + 0.017A_7 - 0.002A_8 + 0.105A_9 + 0.009A_{10} - 0.002A_{11} + 0.001A_{12} \quad (F = 265.142^{**}, r = 0.963, R^2 = 0.927)$$

D_3 和 D_4 分别表示白邑 (2011 年和 2012 花药和籽粒)。式中 A_2 、 A_3 、 A_5 、 A_6 、 A_7 、 A_8 、 A_9 、 A_{10} 、 A_{11} 、 A_{12} 分别代表花药中可溶性蛋白、可溶性糖、MDA、CAT、抗坏血酸、游离脯氨酸以及籽粒中可溶性蛋白、可溶性糖、蛋白质和 γ 氨基丁酸等性状。

在回归方程 $D_1 \sim D_4$ 中, 入选的指标对相应耐冷性综合评价均有显著影响, 方程都达到极显著水平。利用这 4 个方程可以对 105 个株系耐冷性进行预测, 可靠性分别达到 98.1%、94.6%、98.6%、97.7%。

3 讨论

云南稻作分布纬度 (北纬 $21^\circ \sim 29^\circ$) 和海拔 (76.4 ~ 2 695 m) 跨度较大, 蒋志农^[25] 按海拔将云南水稻种植划分为 6 个生态稻作区, 即湿热籼稻区 (海拔 1 200 m 以下)、干热河谷籼稻区 (海拔 1 200 ~ 1 500 m)、籼粳交错区 (海拔 1 400 ~ 1 600 m)、温暖粳稻区 (海拔 1 600 ~ 1 800 m)、冷凉粳稻区 (海拔 1 800 ~ 2 200 m) 和寒冷粳稻区 (海拔 2 200 ~ 2 700 m), 复杂的生态气候, 不仅使云南稻作区水稻孕穗期障碍型冷害频繁发生^[26], 还驯化出丰富且耐冷性较强的地方稻种资源, 云南已成为水稻孕穗期耐冷性种质评价、育种及应用的理想基地^[5]。姜丽霞等^[27] 认

为, 孕穗期水稻对低温最敏感的时期为抽穗前 14 ~ 18 d, 临界温度为 18 $^\circ\text{C}$ 。本研究采用 16 ~ 19 $^\circ\text{C}$ 长期冷水灌溉田间鉴定供试材料的耐冷性, 2 年孕穗至灌浆结实期 7 ~ 8 月最低气温为 16.5 ~ 17.5 $^\circ\text{C}$, 自然低温较重, 说明该鉴定结果较为可靠。

前人采用人工气候室鉴定法研究表明, 水稻孕穗期冷性不仅与品种、形态及生理生化反应有关, 而且受低温强度及持续时间的影响, 是个复杂的生理过程^[14]。低温胁迫下水稻叶片叶绿素含量降低^[28], 可溶性糖、可溶性蛋白、游离氨基酸、脯氨酸等渗透调节物质增加^[15,29], 作为保护酶系统的 SOD、CAT、POD 活性和 MDA 含量提高^[9], 并将它们视为衡量水稻耐冷的单项指标^[9,30]。本研究表明, 除可溶性蛋白外, 长期冷水胁迫明显降低功能叶的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和叶绿素 c 含量, 但叶片 POD、CAT 活性增强, 可溶性糖、游离氨基酸、丙二醛、抗坏血酸和游离脯氨酸含量提高, 且强耐冷品种 (株系) 增加幅度高于弱耐冷品种 (株系), 花药中相同生化成分变化趋势与叶片相似。此外, 低温下籽粒可溶性糖、蛋白质、 γ -氨基丁酸、总黄酮和生物碱含量也增加, 而可溶性蛋白则降低。说明水稻孕穗期低温胁迫后抗氧化酶活性、抗氧化剂和渗透物质含量提高是其适应低温的综合能力反映, 且功能叶片生物物质代谢的变化与其幼穗发育关系较为密切。本研究利用主成分分析将水稻剑叶 12 个单项生化指标转换成为 8 个相互独立的综合指标, 而水稻花药和籽粒 14 个生化性状则被转换成 10 个主成分, 得到各主成分的隶属函数值及权重值, 最终求得不同冷害环境及指标的耐冷综合 $D_1 \sim D_4$ 值, 其中 D_1 为 0.278 ~ 0.721, 平均值为 0.496; D_2 为 0.289 ~ 0.698, 平均值为 0.447; D_3 为 0.292 ~ 0.635, 平均值为 0.453; D_4 为 0.275 ~ 0.642, 平均值为 0.425, 这种基于数理统计定量分析获得的 D 值差异反映出选用叶片、花药和籽粒的综合生化指标比用单一指标 (部位) 更能客观、真实、全面地反映水稻抗低温特性实质。为此, 本研究采用 $D_1 \sim D_4$ 值联合聚类分析法将参试材料分为耐冷性强、中、弱 3 组, 通过逐步回归分析得到剑叶叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、叶绿素 c, 以及剑叶和花药的 POD、可溶性蛋白、可溶性糖、游离氨基酸、MDA、CAT、抗坏血酸、游离脯氨酸和籽粒可溶性蛋白、可溶性糖、蛋白质和 γ -氨基丁酸等 16 个孕穗期耐冷鉴定指标, 这与 Theocharis 等^[9]、Suzuki 等^[30] 的结果较为一致, 并在分子水平证实用其评价水稻耐冷较为准确、可靠^[31]。

参考文献:

- [1] Zhou L, Zeng Y W, Zheng W W, *et al.* Fine mapping a QTL *qCTB7* for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 7 using a near-isogenic line[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(5): 895 – 905.
- [2] Kuroki M, Saito K, Matsuba S, *et al.* A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(5): 593 – 600.
- [3] Farrell T C, Fox K M, Lewin L G. Minimising cold damage during reproductive development among temperate rice genotypes. II. Genotypic variation and flowering traits related to cold tolerance screening[J]. Australian Journal Agricultural Research, 2006, 57: 89 – 100.
- [4] Zhou L, Zeng Y W, Hu G L, *et al.* Characterization and identification of cold tolerant near-isogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Breeding Science, 2012, 62: 196 – 201.
- [5] Zeng Y W, Yang S M, Cui H, *et al.* QTLs of cold Tolerance-related traits at the booting stage for NIL-RILs in rice revealed by SSR[J]. Genes & Genomics, 2009, 31(2): 143 – 154.
- [6] Oliver S N, Dongen J T, Alfred S C, *et al.* Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene *OSINV4* is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility[J]. Plant Cell and Environment, 2005, 28(12): 1534 – 1551.
- [7] 邓化冰, 车芳璐, 肖应辉, 等. 开花期低温胁迫对水稻花粉性状及剑叶理化特性的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(1): 66 – 72.
- [8] 范淑秀, 王嘉宇, 毛艇, 等. 水稻孕穗期叶绿素含量的 QTL 定位[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 69 – 72.
- [9] Theocharis A, Clement C, Barka E A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures[J]. Planta, 2012, 235(6): 1091 – 1105.
- [10] 阳标仁, 余显权, 赵福胜, 等. 水稻孕穗期抗冷鉴定指标选择[J]. 山地农业生物学报, 2008, 27(2): 101 – 104, 122.
- [11] Fernandez O, Theocharis A, Bordiec S, *et al.* Burkholderia phytofirmans strain PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrates metabolism[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2012, 25: 496 – 504.
- [12] 谢勇武, 杨树明, 曾亚文, 等. 粳稻 02428 × 02428c 重组自交系孕穗期耐冷性 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(6): 681 – 684.
- [13] 戴陆园, 叶昌荣, 熊建华, 等. 水稻耐冷性鉴定评价方法[J]. 中国水稻科学, 1999, 12(1): 62 – 67.
- [14] Jiang W, Lee J, Chu S H, *et al.* Genotype × environment interactions for chilling tolerance of rice recombinant inbred lines under different low temperature environments[J]. Field Crops Research, 2010, 117, 226 – 236.
- [15] Theocharis A, Bordiec S, Fernandez O, *et al.* Burkholderia phytofirmans strain PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low non-freezing temperatures[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2011, 25: 241 – 249.
- [16] Horisue N, Kunihiro Y, Higashi T, *et al.* Screening for cold tolerance of Chinese and Japanese rice varieties and selection of standard varieties[J]. Tropical Agricultural Research Service, 1988, 21: 76 – 87.
- [17] 杨树明, 王荔, 曾亚文, 等. 粳稻丽江新团黑谷近等基因系孕穗期耐冷性指标性状的遗传分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(1): 7 – 11.
- [18] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [19] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学试验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001.
- [20] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [21] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184 – 185.
- [22] 董晓燕. 生物化学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 34 – 37.
- [23] Inatomi K, Slaughter J C. The role of glutamate decarboxylase and γ -aminobutyric acid in germinating barley[J]. Journal of Experimental Botany, 1971, 22: 561 – 571.
- [24] 陈能, 罗玉坤, 谢黎虹, 等. 我国水稻品种的蛋白质含量及与米质的相关性研究[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1193 – 1196.
- [25] 蒋志农. 云南稻作[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1995.
- [26] 钟楚, 朱颖墨, 朱勇, 等. 云南不同类型一季稻产量形成及其与气象因子的关系[J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 2831 – 2842.
- [27] 姜丽霞, 季生太, 李帅, 等. 黑龙江省水稻空壳率与孕穗期低温的关系[J]. 应用生态学报, 2010, 21(7): 1725 – 1730.
- [28] Ruelland E, Zachowski A. How plants sense temperature[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 69(3): 225 – 232.
- [29] Uemura M, Warren G, Steponkus P L. Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness[J]. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1800 – 1807.
- [30] Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, *et al.* ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress[J]. Plant Cell Environment, 2012, 35(2): 259 – 270.
- [31] 杨树明. 强耐冷稻种丽江新团黑谷近等基因系孕穗期耐冷性及 QTLs 分析[D]. 昆明: 云南农业大学, 2014.