

小麦耐 1,2,4-三氯苯胁迫基因型的苗期筛选

张国良^{1,2}, 陈文军¹, 戴其根¹, 孙国荣¹, 孙洁², 陶金飞², 严林锋²

(1. 扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏 扬州 225009; 2. 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223001)

摘要: 为了评定不同小麦基因型对 1,2,4-三氯苯(TCB)的耐性强弱,确定合适的筛选指标和筛选浓度,采用发芽试验和砂培小麦幼苗的方法,以 0(对照)、3 和 6 mmol·kg⁻¹ 沙 3 个浓度的 TCB 处理 15 个小麦基因型,以发芽势、发芽率、最长根长、根数、株高、芽鞘长、地上部干重、根干重和总干重的性状相对值(处理测定值/对照测定值×100%)作为幼苗耐性指数(tolerance index, TI)。基于耐性指数对各基因型进行聚类分析,将 15 个小麦基因型聚为耐性、较耐、较敏感和敏感 4 类。结果表明,虽然选用的两个胁迫浓度都可以用于基因型耐性鉴定,而且鉴定结果相似,但 3 mmol·kg⁻¹ 沙更为合适。

关键词: 小麦; 基因型; TCB 胁迫; 耐性评定

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)01-0030-05

Screening of Tolerant Wheat Genotypes to 1, 2, 4-Trichlorobenzene Stress at Seedling Stage

ZHANG Guo-liang^{1,2}, CHEN Wen-jun¹, DAI Qi-gen¹, SUN Guo-rong¹, SUN Jie², TAO Jin-fei², YAN Lin-feng²

(1. Key Lab for Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Life Science and Chemistry Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

Abstract: In order to evaluate the tolerance of fifteen wheat varieties to 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB) stress and identify proper screening indices and concentration, the effects of 1,2,4-TCB on the wheat seed germination and seedling were studied. The concentrations of 1,2,4-TCB were 0, 3 and 6 mmol·kg⁻¹ sand, and 1,2,4-TCB dissolved in 0.5 mL acetone were added into sands. Germination potential, germination rate, the longest root length, root number, plant height, coleoptile length, the dry weight of shoot and roots of different wheat varieties at seedling stage were measured. Character relative values were got from measured values of treated groups and control groups, and were used as tolerance indices (TI) of early seedlings. Cluster analysis of different wheat varieties based on TI was adopted. The results showed that the fifteen wheat varieties could be grouped into four types, i.e. TCB sensitive varieties (including BL0207 and Yangmai 16), relatively sensitive varieties (including Zhenyumai029 and Huai0208), tolerant varieties (including Zhen9023, Huai0303, Huamai1, Neixiang188-36, Wanmai19, Ningmai13 and Zoumai) and relatively tolerant varieties (including Yanfu188, Wenmai8, Huaimai18 and Huaimai19). Though the two concentrations of 1,2,4-TCB used may be adopted to evaluate different wheat varieties and the result was similar, the concentration of 3 mmol·kg⁻¹ sand was better.

Keywords: wheat; genotypes; TCB stress; tolerance evaluation

三氯苯(TCB)有 3 种同分异构体 1,2,4-TCB、1,2,3-TCB 及 1,3,5-TCB。在工农业生产中以 1,2,4-TCB 应用最为广泛,常作为印染载体、电解液、溶剂、润滑剂、除草剂、灭火剂、导热剂等。一些农用杀虫剂如林丹、六六六在降解过程中也产生

1,2,4-TCB。它们以废水、垃圾、废气和废渣等多种形式进入环境,造成不同环境介质的污染。据美国环境保护局(EPA)统计,美国 2001 年向土壤中排放了 1,2,4-TCB 3 497 kg, 累计已排放 53 023 kg, EPA 已将其列入优先控制污染物黑名单^[1,2]。我国在珠三角、长三角、环渤海湾等地区和沈阳、兰州、西安等城市的污泥、土壤及地下水中均检测到了 1,2,4-TCB,在水中浓度可达 1.55 μg·L⁻¹, 在污泥中其含量高达 2.929 mg·kg⁻¹ DW^[3]。在土壤泥浆和活性污泥中,1,2,4-TCB 很难降解^[4,5]。污水灌溉以及用污泥制作肥料使用,均

收稿日期: 2007-03-25

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD02A03)

作者简介: 张国良(1976—), 男, 博士研究生, 讲师, 主要从事作物逆境生理、农产品质量安全与环境方面的研究工作。

E-mail: hgzgl@sina.com

会导致农田中 1,2,4-TCB 的累积。Yaowu He 等研究了水稻土中 1,2,4-TCB 含量在 0~1 000 mg·kg⁻¹ 时生长一季水稻后,土壤中 1,2,4-TCB 残留情况和稻株中累积情况,稻株中 1,2,4-TCB 的含量高达 4.01~35.90 mg·kg⁻¹ DW^[6]。王泽港等也在稻米中检测 1,2,4-TCB 的浓度达 30~40 μg·kg⁻¹ DW^[7],张建英等在叶菜类和根菜类蔬菜中也检测到了 1,2,4-TCB^[8],这说明环境中该类化合物的存在将导致其在农产品中的积累,进而通过食物链累积危害人类健康。

国内外对该类化合物的研究相当活跃,主要集中在生态效应、生物(尤其是水生生物)体内的富集及其引起的毒性毒理机制等研究方面^[9-11]。对高等植物的生态效应和毒性机理研究较少^[7、12],尤其是耐 1,2,4-TCB 胁迫小麦基因型的筛选相关研究未见报道。

有研究资料表明,良种在农业增产诸因素中所占比重一般可达 30%~40%,由品种选育到产生显著的社会经济效益,要经过一系列的中间环节,其中最重要的环节之一是品种的筛选鉴定^[13]。育种工作者总是希望采用比较简单的方法来评定品种表现^[14],而有效的评价指标是进行快速、高效的耐性鉴定的关键。如何从众多指标中挑选出最具有代表性的指标,化繁为简,是长期以来人们最为关注的问题^[15]。要获得耐 1,2,4-TCB 胁迫的小麦种质材料,必须做大量的种质资源筛选工作,但对所有的品种都做全生育期试验费工费时。苗期是植物生命周期的重要阶段,也是对外界环境因子最敏感的时期之一,苗期的生长性状可作为评价植物耐性的重要指标^[16]。因此,可以先进行苗期筛选,获得比较典型的材料,并适当缩小群体,然后进行全生育期鉴定试验^[17]。本研究在实验室人工气候箱条件下,采用砂培的方法在幼苗期对 15 个小麦基因型耐 1,2,4-TCB 胁迫的差异性进行了鉴定,同时确定了小麦基因型耐 1,2,4-TCB 胁迫的合适的筛选指标和筛选环境,为小麦优质安全生产和耐性育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小麦(*Triticum aestivum*) 15 个基因型:烟幅 188、温麦 8 号、淮麦 18、淮麦 19、郑 9023、淮 0303、华麦 1 号、内乡 188-36、皖麦 19、宁麦 13、周麦 18、郑育麦 029、淮 0208、BL0207、扬麦 16。供试药品:1,2,4-三氯苯(TCB),纯度为 96%,购自中国医药集团上

海化学试剂公司。

1.2 试验设计

用 0.5 mL 丙酮溶解 1,2,4-TCB 投入沙中,混匀。设 0、3、6 mmol·kg⁻¹ 沙 3 个 1,2,4-TCB 处理浓度,每个处理重复 3 次。

1.3 种子发芽与幼苗培养

选择健壮、饱满的小麦种子经 0.2% 的 KMnO₄ 消毒 20 min,然后用自来水、去离子水冲洗干净,再用去离子水浸种 6 h 后,分别播于不同浓度的 1,2,4-TCB 的培养皿(规格为 90 mm×10 mm)中进行发芽,每个培养皿装干沙 60 g,播种 40 粒。培养皿放置在人工气候箱中。开始 3 d 设置 27℃ 进行暗发芽,以后白天 24℃,夜晚 20℃。实验室自然光下生长,光照时间为 14 h。采用 Hoagland 营养液培养小麦,一叶一心时用 1/2 浓度营养液,1.5 d 后用完全营养液。

1.4 测定项目与数据处理

播种后第 3 d 调查发芽势,第 7 d 调查发芽率。第 8 d 测定最长根长、根数、株高、芽鞘长,并将地上部与地下部分离,在 105℃ 烘箱内杀青 15 min,然后 80℃ 烘干至恒重后分别称取干重。

用 Excel 进行差异显著性检验、相关分析和 DPS 软件进行聚类分析^[18]。为消除试验材料生物学上的固有差异,采用性状相对值作为幼苗耐性指数(tolerance index, TI)。性状相对值=(3 或 6 mmol·kg⁻¹ 沙测定值/对照测定值)×100%。各性状指标的英文缩写如下:相对最长根长(RRL)、相对根数(RRN)、相对株高(RPH)、相对芽鞘长(RCL)、相对发芽势(RGP)、相对发芽率(RGR)、相对地上部干重(RSW)、相对根干重(RRW)、相对总干重(RTW)。

2 结果与讨论

2.1 1,2,4-TCB 合适筛选浓度的确定

种质资源筛选和鉴定试验中的处理浓度合适,对于加大基因型间差异,使耐性差异充分表现非常有利。处理浓度太低,多数供试材料性状表现基本一致,很难区分各品种耐性相对强弱;而处理浓度过高,许多品种或几个品种都被致死,显然也不行,所以两种情况都不利于有效筛选种质资源。本研究选择 1,2,4-TCB 3 和 6 mmol·kg⁻¹ 沙两个处理浓度,由表 1 和表 2 可以看出,在两个 TCB 处理浓度下,相对最长根长、相对根干重值都较小,但地上部指标、相对发芽势等的值相对较大,这表明地下部指标对 TCB 胁迫较为敏感。从变异系数来看,两个浓度下的相对最

表 1 3 mmol·kg⁻¹ TCB 下小麦各基因型各项指标的差异Table 1 Differences of each relative index among 15 genotypes at 3 mmol·kg⁻¹ of TCB

基因型	RRL	RRN	RPH	RCL	RGP	RGR	RSW	RRW	RTW
烟幅 188	26.19	121.43	86.01	99.00	102.65	100.00	93.38	49.41	72.06
温麦 8 号	27.66	108.11	81.89	95.17	103.90	95.65	94.75	49.11	73.75
淮麦 18	19.21	88.52	84.27	102.91	107.84	110.58	87.67	37.02	62.46
淮麦 19	24.80	107.32	88.35	96.51	100.00	102.04	88.52	39.02	60.79
郑 9023	24.01	107.14	80.81	96.54	83.08	107.79	87.87	44.96	68.90
淮 0303	19.19	111.27	82.54	95.86	83.33	95.41	92.08	37.04	64.37
内乡 188-36	17.11	76.56	84.55	98.53	83.02	99.12	79.32	37.77	55.15
宁麦 13	18.04	92.41	68.43	88.83	92.06	97.89	72.57	47.47	61.51
华麦 1 号	12.90	126.98	73.68	91.98	74.07	101.90	89.96	37.78	65.11
皖麦 19	14.19	105.08	82.76	88.94	76.53	101.83	78.88	40.20	58.38
周麦 18	19.24	112.16	73.18	89.37	96.55	100.00	71.04	34.19	52.43
郑育麦 029	11.76	97.40	68.21	89.43	54.81	92.59	76.48	37.04	58.45
淮 0208	15.08	117.11	59.09	86.15	45.12	95.76	61.05	30.49	46.82
BL0207	11.08	106.76	41.75	84.30	32.76	91.43	51.00	26.01	37.96
扬麦 16	8.74	82.67	18.33	80.52	25.00	93.69	23.52	19.35	21.65
平均值	17.95	104.06	71.59	92.27	77.38	99.05	76.54	37.79	57.32
标准差	5.79	14.13	19.21	6.17	26.40	5.35	19.26	8.29	13.56
变异系数	32.27	13.58	26.83	6.69	34.12	5.41	25.17	21.94	23.67

表 2 6 mmol·kg⁻¹ TCB 下小麦各基因型各项指标的差异Table 2 Differences of each relative index among 15 genotypes at 6 mmol·kg⁻¹ of TCB

基因型	RRL	RRN	RPH	RCL	RGP	RGR	RSW	RRW	RTW
温麦 8 号	26.65	113.51	85.49	96.30	101.30	89.13	92.38	48.42	72.15
烟幅 188	23.30	137.50	80.42	97.80	100.88	98.29	92.39	50.24	71.96
淮麦 18	21.24	96.72	87.41	92.72	112.75	110.58	80.36	51.70	66.09
淮 0303	16.70	119.72	84.25	99.78	81.94	100.00	93.20	40.29	66.56
淮麦 19	24.49	110.98	84.47	94.51	85.57	91.84	81.29	35.28	55.52
周麦 18	17.02	121.62	70.57	88.23	95.69	98.28	78.41	33.79	55.88
郑 9023	17.86	107.14	75.81	88.41	72.31	98.70	78.94	37.84	60.77
宁麦 13	14.49	112.66	70.22	87.98	112.70	109.47	67.70	27.21	49.86
皖麦 19	13.51	115.25	74.61	87.69	101.02	104.59	71.61	30.56	49.85
内乡 188-36	14.18	93.75	72.25	87.64	88.68	94.74	72.88	39.35	53.38
郑育麦 029	9.52	84.42	68.79	88.66	70.19	100.93	77.42	40.29	60.44
华麦 1 号	14.51	106.35	48.03	85.65	44.44	100.95	65.38	24.76	46.04
淮 0208	11.15	121.05	48.39	82.51	35.37	96.61	50.40	24.97	38.56
BL0207	9.71	114.86	36.82	79.53	20.69	93.33	49.64	23.47	35.98
扬麦 16	9.02	82.67	12.74	57.38	25.00	96.40	17.16	19.43	18.18
平均值	16.22	109.21	66.68	87.65	76.57	98.92	71.28	35.17	53.42
标准差	5.60	14.72	21.20	10.04	31.18	5.95	19.97	10.13	14.61
变异系数	34.49	13.48	31.79	11.46	40.72	6.02	28.02	28.80	27.35

长根长、相对株高、相对发芽势和各相对干重的变异系数较大,说明这些指标在 TCB 胁迫下存在较大的基因型差异。两个处理浓度为对小麦各指标的影响基本一致,但以 6 mmol·kg⁻¹ 沙的处理各项指标的平均值更低,有的品种的根长、株高等性状已经受到严重抑制,所以 6 mmol·kg⁻¹ 沙的浓度已经偏高。因此,选

择 3 mmol·kg⁻¹ 沙左右作为筛选浓度比较适合。为了便于分析,下文的图和表仅列出 3 mmol·kg⁻¹ 沙处理的数据,且仅对 3 mmol·kg⁻¹ 沙处理的数据展开分析。

2.2 小麦苗期各项相对指标的相关性和差异

从表 3 可以看出,除了相对根数和相对发芽率两项指标外,其他 7 项指标两两之间均呈极显著正相

表 3 小麦基因型各项相对指标的相关性
Table 3 Correlation coefficients among relative indices

指标	RRL	RRN	RPH	RCL	RGP	RGR	RSW	RRW	RTW
RRL									
RRN	0.269								
RPH	0.713**	0.244							
RCL	0.717**	0.016	0.850**						
RGP	0.824**	0.132	0.868**	0.823**					
RGR	0.427	0.015	0.580*	0.669**	0.628*				
RSW	0.718**	0.388	0.950**	0.839**	0.828**	0.509			
RRW	0.772**	0.252	0.794**	0.645**	0.799**	0.390	0.830**		
RTW	0.752**	0.394	0.897**	0.773**	0.823**	0.477	0.969**	0.926**	

注:**表示 $P<0.01$ 的显著水平,*表示 $P<0.05$ 的显著水平。

关。不同小麦基因型各单项指标的变异幅度、平均值、标准差和变异系数各不相同(表 1),而且 15 个基因型按各单项指标分别排序的次序也不完全相同,但是总的趋势却是一致的,以烟幅 188、温麦 8 号排在前列,而以扬麦 16、BL0207 排名靠后。

2.3 合适筛选指标的确定

刘宛等^[2]的研究结果表明,在 1,2,4-三氯苯胁迫下,小麦种子发芽率是一个相对不敏感的指标,而初生根伸长最为敏感,植株干重亦系较为敏感;地上部与根部相比,后者较为敏感。本研究结果表明(表 1 和表 2),相对最长根长、相对根干重的平均值和极大值都较小,而其他各项指标的平均值和极大值相对较大,这说明地下部对 1,2,4-TCB 较为敏感,而且变异系数较大,说明这两项指标适合作为评定各品种耐性差异的指标,但它们的变异幅度较小,分别为 8.74%~27.66% 和 19.35%~49.41%,所以单独用这 2 项指标评定各品种耐性差异时要慎重。

相对根数虽然属于地下部指标,但大部分品种的这项指标均在 100% 以上,而且平均值达 104.06%,这说明小麦受到 1,2,4-TCB 胁迫时根长受到抑制,可能通过增加根数来缓解环境的压力,它与其他指标没有显著的相关性,变异系数也小,不适于作为筛选指标。相对芽鞘长变异幅度(80.52%~102.91%)、标准差(6.17%)以及变异系数(6.69%)都小,若单独作为评价指标也不很合适。相对发芽率的平均值为 99.05%,各品种的该项指标值均在 90% 以上,标准差(5.35%)和变异系数(5.41%)也较小,而且它与其他指标(相对芽鞘长除外)没有极显著的相关性,所以该指标同样不适合用于衡量小麦对 1,2,4-TCB 耐性的相对强弱。

相对株高、相对地上部干重、相对总干重、相对发

芽势等指标的变异幅度以及变异系数(见表 1 和表 2)都较大,说明这些指标在 1,2,4-TCB 胁迫下存在着很大的基因型差异,说明这些指标可能是衡量小麦对 1,2,4-TCB 耐性相对强弱的较好指标。

2.4 不同耐性小麦种质资源的聚类分析

如表 1 和表 2 所示,2 个处理浓度下各小麦基因型相对根数和相对发芽率的平均值大于或接近 100%,变异系数均较小,而且它们与其他指标的相关性也不好,这说明用这 2 项指标作为筛选指标不合适,所以本文将这 2 项指标剔除,选择其他极显著的 7 项指标,采用 DPS 软件对所获得的数据进行聚类分析,用欧氏距离和离差平方和法得到聚类图,如图 1 所示。

取欧氏距离 0.60,把 15 个小麦品种聚成 4 类,并

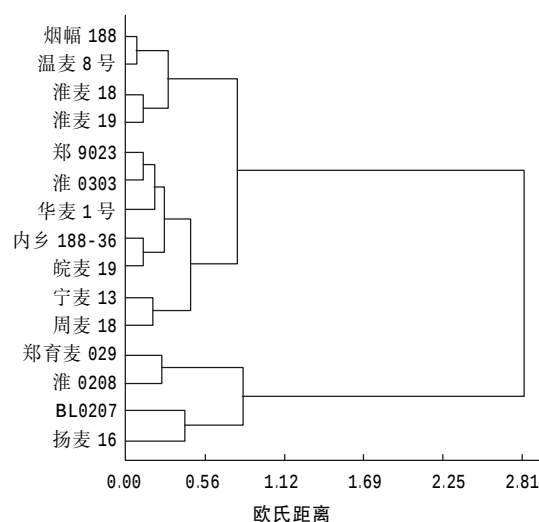


图 1 基于 $3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCB 处理下 7 项相对指标对 15 个基因型的聚类分析

Figure 1 Dendrogram of cluster analysis of 15 genotypes based on the 7 relative indices at $3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCB of level

表 4 各耐性类型的小麦基因型及其相对指标平均值

Table 4 The numbers of the wheat genotypes and their relative indices means obtained from the dendrogram showed in Figure 1

类别	基因型	相对指标平均值/%						
		RRL	RPH	RCL	RGP	RSW	RRW	RTW
1	烟幅 188、温麦 8 号、淮麦 18、淮麦 19	24.47	85.13	98.40	103.6	91.08	43.64	67.27
2	郑 9023、淮 0303、华麦 1 号、内乡 188-36、皖麦 19、宁麦 13、周麦 18	17.81	77.99	92.86	84.09	81.67	39.92	60.84
3	郑育麦 029、淮 0208	13.42	63.65	87.79	49.97	68.77	33.77	52.64
4	BL0207、扬麦 16	9.91	30.04	82.41	28.88	37.26	22.68	29.81

计算各类品种 7 项指标的平均值(表 4)。第一类包括 4 个品种,耐性指数(性状相对值)最高,属于耐性品种;第二类包括 7 个品种,耐性指数较高,属于较耐品种;第三类包括 2 个品种,耐性指数较低,属于较敏感品种;第四类包括 2 个品种,耐性指数最低,属于敏感品种。

3 结论

(1) 选择了 1,2,4-TCB $3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 沙和 $6 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 沙两个处理浓度对小麦胁迫的影响,结果表明 $3 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 沙的浓度更适合进行小麦耐 1,2,4-TCB 基因型的筛选与鉴定。

(2) 小麦相对最长根长、相对株高、相对发芽势、相对地上部干重、相对根干重、相对总干重等指标,是评价小麦对 1,2,4-TCB 胁迫的耐性强弱较好指标,但若想获得确切的结论还需全生育期的田间综合鉴定。

(3) 通过聚类分析的方法,得出烟幅 188、温麦 8 号、淮麦 18、淮麦 19 属于耐性品种;BL0207、扬麦 16 属于敏感品种,这为小麦抗逆栽培和耐性品种选育提供了一定的技术依据。

参考文献:

- [1] 余刚,牛军峰,黄俊.持久性有机污染物——新的全球性环境问题[M].北京:科学出版社,2005.7.
- [2] Jaime D, Manuel R, Mario D. 1,2,4-Trichlorobenzene flow characteristics in saturated homogeneous and stratified porous media[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2006, 177: 3-17.
- [3] 蔡全英,莫测辉,吴启堂,等.部分城市污泥中氯苯类化合物的初步研究[J].*环境化学*,2002,21(2):139-143.
- [4] Brunsbach F R, Reineke W. Degradation of chlorobenzenes in soil slurry

by a specialized organism[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994,42: 415-420.

- [5] Freitag D, Ballhom L, Geyer H, et al. Environmental hazard profile of organic chemicals [J]. *Chemosphere*, 1985, 14: 1589-1616.
- [6] Yaowu H, Tieheng S, Ziqing O, et al. Fate of 1,2,4-Trichlorobenzene (1,2,4-TCB) in soil-rice paddy system[J]. *Chemosphere*, 1996, 32(7): 1381-1389.
- [7] 王泽港,万定珍,杨亚春,等. 1,2,4 三氯苯和萘对水稻产量及品质的影响[J]. *中国水稻科学*, 2006, 20(3): 295-300.
- [8] Jianying Z, Wei Z, Jun P, et al. Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area[J]. *Environment International*, 2005, 31: 855-860.
- [9] Schroll R, Brahushi F, Dörfler, et al. Biomineralisation of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population[J]. *Environmental Pollution*, 2004, 127: 395-401.
- [10] 徐晓白,戴树桂,黄玉瑶.典型化学污染物在环境中的变化及生态效应[M].北京:科学出版社,1998.55-165.
- [11] Kong F X, Hu W, Liu Y. Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga[J]. *Environ Exper Bot*, 1998, 40: 105-111.
- [12] 刘宛,宋玉芳,周启星,等.氯苯胁迫对小麦种子发芽和幼苗生长的影响[J]. *农业环境保护*, 2001, 20(2): 65-68.
- [13] 王书子,吴少辉,高海涛,等.旱地小麦品种筛选鉴定及其形态特征探讨[J]. *干旱地区农业研究*, 2001, 19(2): 76-80.
- [14] 兰居生,胡顺福,张景瑞.作物抗旱指数的概念和统计方法[J]. *华北农学报*, 1990, 5(2): 20-25.
- [15] 冀天会,张灿军,谢惠民,等.小麦品种抗旱性鉴定产量指标的比较研究[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(1): 103-106.
- [16] 肖美秀,林文雄,陈冬梅,等.耐 Cd 水稻种质资源的筛选[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2006, 35(2): 117-122.
- [17] 郭再华,贺立源,徐才国,等.水稻耐低磷种质资源的筛选鉴定指标[J]. *作物学报*, 2005, 31(1): 65-69.
- [18] 唐启义,冯明光.实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002. 332-335.