

黄瓜萌芽期和苗期耐冷性评价*

苗永美^{1,2} 宁宇¹ 曹玉杰¹ 沈佳¹ 庞欣¹ 崔利¹ 程春燕¹ 陈劲枫^{1,2*}

(¹作物遗传与种质创新国家重点实验室/南京农业大学园艺学院,南京 210095; ²安徽科技学院生命科学学院,安徽凤阳 233100)

摘要 选用13份黄瓜材料,研究萌芽期和苗期共12个指标与黄瓜耐冷性的关系,对材料进行耐冷性评价。结果表明:17℃下的相对发芽率、相对发芽势、相对胚根长和相对活力指数在13份黄瓜材料中差异显著($P < 0.05$),并与黄瓜耐冷性的相关关系显著;苗期4℃处理2d时各材料之间生理差异明显,冷害指数与恢复后成活率的相关性显著,而与总蛋白、电导率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的相关性不显著。通过聚类分析将黄瓜材料耐冷性分为3个等级,通过逐步回归分析建立了两个生育期黄瓜耐冷性方程,可根据置信区间估计值对黄瓜的耐冷性进行较好的评价。

关键词 黄瓜 耐冷性 主成分分析 逐步回归

文章编号 1001-9332(2013)07-1914-09 中图分类号 S642.2 文献标识码 A

Evaluation of cucumber's chilling tolerance at germination and seedling stages. MIAO Yongmei^{1,2}, NING Yu¹, CAO Yu-jie¹, SHEN Jia¹, PANG Xin¹, CUI Li¹, CHENG Chun-yan¹, CHEN Jin-feng¹ (¹State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China). -Chin. J. Appl. Ecol. 2013 24(7): 1914-1922.

Abstract: A total of 13 cucumber materials were used to study the relationships of cucumber's chilling tolerance with the 12 growth indices at germination and seedling stages. There existed significant differences in the relative germination rate, germination index, hypocotyl length, and vigor index at 17℃ among the 13 materials ($P < 0.05$), which also significantly correlated to the chilling tolerance. At seedling stage, the physiology among the materials after treated at 4℃ for 2 days had obvious difference. Chilling injury index had significant correlation with the survival rate after recovery, but less correlation with the soluble protein (SP) content, electric conductivity (EC), and superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) activities. The chilling tolerance of the materials was classified into three levels by clustering analysis, and the cucumber's chilling tolerance equations at the two stages were established through stepwise regression analysis. Based on confidence interval value, the chilling tolerance of cucumber could be well assessed.

Key words: cucumber; chilling tolerance; principal component analysis; stepwise regression.

黄瓜(*Cucumis sativus*)是世界性蔬菜,也是我国设施蔬菜栽培的主要作物之一。黄瓜是喜温作物,正常情况下,黄瓜生育界限温度为10~30℃,日温

25~30℃,夜温13~15℃,气温在10℃以下生理活动失调,未经锻炼或温度骤降至5~10℃会出现冷害,2~3℃就会使植株死亡^[1]。当黄瓜遇到低于生育适温的连续低温时,会产生生理障碍,影响光合作用,延长生育期,造成不同程度的减产^[2-4]。黄瓜不耐冷的特性提高了北方保护地栽培的生产成本,限制了早春及晚秋的露地栽培,因此选育耐冷品种是解决黄瓜冷害的重要措施之一。黄瓜的耐冷性主

* 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB119001-01, 2012CB113900)、国家高技术研究发展计划专项(2012AA100202)、国家自然科学基金项目(31071801)和江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(11)1002)资助。

** 通讯作者。E-mail: jfchen@njau.edu.cn
2013-02-07 收稿, 2013-05-21 接受。

要由材料决定,受环境影响较小^[5],准确鉴定黄瓜耐冷性首先要建立有效的评价体系。目前对黄瓜耐冷性的研究主要对萌芽期或苗期进行鉴定,一般选用形态特征和生理生化等多指标体系,主要采用相关性分析和隶属函数法进行评价,选用的材料较少,并且只分析了某一个时期的耐冷性,如张红梅等^[6]分析了4个黄瓜品种的苗期抗冻性;于拴仓等^[7]对4个黄瓜品种萌芽期耐低温性进行了鉴定;李晓明^[8]对2个黄瓜品种苗期低温下生理指标和冷害指数进行了相关性分析。黄瓜在发芽期、苗期、成株期的耐冷性可能由不同基因控制,因此在不同时期应该有不同的耐冷鉴定体系^[9]。本研究对13份黄瓜材料的发芽期和幼苗期进行低温处理,采用主成分分析、聚类分析、回归分析等数量分析方法进行综合性评价,研究黄瓜在不同生育时期的耐冷性,并建立较为可靠的评价体系,旨在为黄瓜种质资源的耐冷鉴定和抗冻育种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

所用13份黄瓜材料为南京农业大学葫芦科作物种质创新实验室的多代自交系,包括美国加工型黄瓜‘NC-76’、‘Chipper’、‘Beit Alpha’和‘Marketmore97’欧洲温室型黄瓜‘EC1’、‘EC5’和‘Hazard’华南型黄瓜‘平望’和‘二早子’,华北型黄瓜‘北京截头’、‘长春密刺’和‘L8’及西双版纳黄瓜‘SWCC12’。

1.2 试验设计

1.2.1 低温发芽试验 选取饱满的种子,于58℃温汤浸种4h,然后放入垫两层滤纸的培养皿中,分别于15℃、17℃、18℃的人工气候箱(型号RXZ-1000B)中在黑暗条件下发芽,不定时地补充同温度的水以保持滤纸湿润,以28℃为常温对照,每个处理90粒种子,重复3次。

1.2.2 苗期耐冷试验 种子按1.2.1方法浸种,28℃下催芽24h,露白后播种于草炭和珍珠岩(2:1)混合基质中,用32孔穴盘育苗,常规管理。幼苗培养至二叶一心期时移入人工气候箱中,设置培养条件:25℃/18℃,12h/12h,光强200 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度75%。培养至三叶一心期时选取健壮整齐一致的幼苗进行4℃低温处理,处理前浇透水,其他培养条件同上。每24h统计冷害分级,并取样用于生理指标测定。在分别处理1d和2d后进行常温恢复,3d后统计成活率,每份材料30株左右,重复3次。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 种子萌发试验测定指标 每天统计发芽粒数,参考顾兴芳等^[9]的方法计算相关指标:发芽率=发芽种子数/种子总数×100%;发芽指数 $GI = \sum (Gt/Dt)$, Gt 为在 t 天的发芽数, Dt 为相应的发芽日数;发芽结束后量取胚根长(cm);活力指数=发芽指数×胚根长;相对发芽率=低温下发芽率/常温下发芽率×100%;相对发芽指数=低温下发芽指数/常温下发芽指数×100%;相对胚根长=低温下长度/常温下长度×100%;相对活力指数=低温下活力指数/常温下活力指数×100%。其中,常温发芽情况于第2天统计,15℃、17℃和18℃发芽情况分别于第10、7、6天统计。

1.3.2 苗期冷害指数及生理指标测定 根据黄瓜叶片的冷害症状进行分级:0级:无受害症状;1级:叶片轻微受害,叶缘发黄;2级:叶片有小部分面积出现脱水斑;3级:叶片约有一半的面积出现脱水斑;4级:叶片大部分面积出现脱水斑;5级:叶片几乎全部干枯。按下式公式计算冷害指数(CII)^[8]:

$$CII = (1 \times S1 + 2 \times S2 + 3 \times S3 + 4 \times S4 + 5 \times S5) / N$$

式中: $S1 \sim S5$ 分别为1~5级症状的植株数; N 为总的植株数。

低温处理0、1、2d时随机取叶片,用打孔器($d=0.8 \text{ cm}^2$)取10个叶圆片,采用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白(SP)含量,超氧化物歧化酶(SOD)活性参考Giannopolitis等^[10]的方法测定,过氧化物酶(POD)活性参考Kochba等^[11]的方法测定,过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外法测定^[12],抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性参考沈文飏等^[13]的方法测定。用打孔器打取相同面积的叶圆片,加10mL超纯水(ddH_2O),浸泡2.5h,测定电导率 E_1 ,然后煮沸30min,冷却至室温测定电导率 E_2 ,去离子水电导率为 E_0 ,叶片电导率(EC)按 $EC = (E_1 - E_0) / (E_2 - E_0)$ 计算。

1.3.3 相关指标的计算 耐冷综合指标 CI_i 参考程建权^[14]的方法计算:

$$CI_i = \sum_{j=1}^8 E_{ij} \cdot X_j'$$

式中: CI_i 表示第 i 个综合指标; E_{ij} 表示第 i 个主成分第 j 个单项指标对应的特征向量; X_j' 表示第 j 个单项指标的标准化值。

隶属函数 ux_{ij} 、综合指标权重 w_j 及综合评价价值 D_i 参照王贺正^[15]的方法计算:

$$u(x_{ij}) = (x_{ij} - x_{j \min}) / (x_{j \max} - x_{j \min})$$

式中: x_{ij} 表示 i 材料主成分分析中第 j 个综合指标值; $x_{j \max}$ 、 $x_{j \min}$ 分别表示指标的最大值和最小值, 对于同一综合指标而言, 各黄瓜材料的隶属函数值的大小反映了耐冷性的强弱.

$$w_j = p_j / \sum_{j=1}^n p_j$$

式中: w_j 表示第 j 个综合指标在所有综合指标中的重要程度; p_j 为主成分分析中第 j 个综合指标的贡献率.

$$D_i = \sum_{j=1}^n [u(x_{ij}) \cdot w_j]$$

式中: D_i 表示第 i 个材料用综合指标评价所得的耐冷综合评价值. 根据 D 值大小可以对各黄瓜材料的耐冷性进行排序.

通过逐步回归分析建立最优回归方程, 将各材料相应的测定数据代入方程, 所得值即为预测值 VP , 该值可辅助检测所建方程的准确性.

D 值区间估计: 当 $\alpha = 0.05$ 时, D 值的置信区间参照下列公式计算:

$$\bar{X} - S \times t \frac{0.05}{2} (n-1) / \sqrt{n} < \mu < \bar{X} + S \times t \frac{0.05}{2} (n-1) / \sqrt{n}$$

1.4 数据处理

采用 PASW statistic 18 软件对数据进行方差分析和相关性分析, 运用 SAS 软件进行主成分分析, 获得各指标的贡献率. 聚类分析法进行耐冷性分级, 逐步回归法建立 D 值与指标之间的回归方程.

2 结果与分析

2.1 黄瓜萌芽期耐冷温度筛选及评价体系的建立

2.1.1 黄瓜萌芽期耐冷鉴定温度的筛选 以 28 °C 为对照, 13 份黄瓜材料分别于 15 °C、17 °C 和 18 °C 3 个低温下发芽, 通过相对发芽率、相对发芽指数、相对根长和相对活力指数评价低温下的发芽能力. 15 °C 下发芽至第 10 天时只有 L8 的少数种子能发芽, 其他材料均未发芽(数据未列出); 方差分析表明, 各材料间发芽能力不存在差异, 说明 15 °C 低温严重抑制了绝大多数材料的种子发芽. 17 °C 和 18 °C 下各材料间发芽能力存在差异, 方差分析表明, 17 °C 下发芽能力差异更明显(表 1), 18 °C 时多数材料能较好地发芽, 差异不大, 其中有 9 份材料相对发芽率达 100%(数据未列出). 本研究选择 17 °C 作为黄瓜萌芽期耐冷鉴定温度, 下文仅对 17 °C 下的萌芽指标进行分析.

表 1 17 °C 下不同材料黄瓜的相对发芽率、相对发芽指数、相对胚根长和相对活力指数

Table 1 Relative germination rate, germination index, hypocotyl length and vigor index of different cucumber materials at 17 °C

编号 Code	RGR (%)	RGI (%)	RHL (%)	RVI (%)
C1	33.3bcde	12.5bcd	796.3bc	103.7b
C2	65.0bcd	26.8ab	275.0bc	67.4c
C3	12.5de	4.7cd	271.7bc	25.6c
C4	2.2e	5.1d	294.1bc	4.4d
C5	32.2bcde	14.3bcd	484.1bc	78.2c
C6	72.2abc	28.3ab	835.5bc	225.4b
C7	25.0cde	8.8bcd	425.9bc	40.1c
C8	96.7a	23.4abc	2550.0a	634.0a
C9	80.0ab	16.1bcd	1144.5b	110.6b
C10	55.0abcd	14.4bcd	553.9bc	83.7c
C11	32.5bcde	10.4bcd	789.1bc	75.9c
C12	100.0a	38.3a	575.0bc	165.2b
C13	4.2e	6.0d	112.5c	2.0d

C1: NC-76; C2: Chipper; C3: Beit Alpha; C4: Marketmore97; C5: EC1; C6: EC5; C7: Hazard; C8: 二早子 Erzaizi; C9: 平望 Pingwang; C10: 北京截头 Beijingjietou; C11: 长春密刺 Changchunmici; C12: L8; C13: SWCC12. RGR: 相对发芽率 Relative germination rate; RGI: 相对发芽指数 Relative germination index; RHL: 相对胚根长 Relative hypocotyl length; RVI: 相对活力指数 Relative vigor index. 不同小写字母表示材料间差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters meant significant difference among materials at 0.05 level. 下同 The same below.

2.1.2 黄瓜萌芽指标相关性分析 对 13 份黄瓜材料在 17 °C 和 28 °C 萌芽期的 GR、GI、HL 和 VI 4 个指标的相对值进行相关性分析(表 2). 结果表明 4 个指标之间呈正相关性, 且相关性较大, 其中 RGR 与其他 3 个指标呈显著或极显著正相关, RHL 与 RVI 呈极显著正相关.

2.1.3 黄瓜萌芽指标主成分分析及耐冷性综合评价

数据标准化后再进行主成分分析, 用 SAS 软件进行主成分程序运算, 得到样本相关矩阵的特征向量和累计贡献率(表 3). 结果表明, 前 2 个主成分的贡献率分别为 74.8% 和 22.4%, 累计贡献率达 97.2%, 表明这 2 个综合指标代表了原来 4 个单项指标 97.2% 的信息, 将原来的 4 个单项指标转换为 2 个新的相互独立的综合指标. 在 2 个新确定的综

表 2 黄瓜萌芽指标之间的相关性分析

Table 2 Correlation analysis among germination indices of cucumber

	RGR	RGI	RHL	RVI
RGR	1			
RGI	0.885**	1		
RHL	0.633*	0.323	1	
RVI	0.687**	0.493	0.940**	1

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. 下同 The same below.

合指标中,第 1 主成分(PC1)中 RGR 的特征向量最大(0.534),第 2 主成分(PC2)中 RGI 的特征向量最大(0.656) 2 个主成分主要与种子发芽率和发芽速率关系大。

根据 2 个主成分的特征向量及各指标的相对值求出 13 份材料的 2 个综合指标,并在此基础上计算出隶属函数值、权重、综合评价值和预测值(表 4)。D 值的大小代表耐冷性强弱,因此根据综合评价值对黄瓜萌芽期的耐冷性进行排序。根据 D 值采用最小距离法进行聚类分析,将黄瓜萌芽期耐冷性分为 3 类,Ⅰ类包括 C8 和 C12,属于萌芽期耐冷型;Ⅱ类包括 C2、C6 和 C9,属于中度耐冷型;其他 8 种属于萌芽期冷敏感型(图 1)。

2.1.4 黄瓜萌芽期耐冷指标的筛选 以 D 值为因变量,各单项指标的相对值为自变量,通过逐步回归分析建立最优回归方程为:

表 3 各主成分的特征向量及贡献率

Table 3 Eigenvectors of principal components (PC) and contribution rate

主成分 PC	RGR	RGI	RHL	RVI	贡献率 Contribution rate (%)	累计贡献率 Accumulated contribution rate (%)
PC1	0.534	0.446	0.489	0.525	74.8	74.8
PC2	0.340	0.656	-0.548	-0.392	22.4	97.2

表 4 萌芽期各材料的综合指标(CI)、隶属函数值(μ)、权重(w_j)、综合评价值(D)和预测值(VP)

Table 4 Value of comprehensive index (CI), subordinate function values(μ), weight (w_j), comprehensive evaluation (D) and prediction (VP) of each material at germination stage

编号 Code	CI(1)	CI(2)	$\mu(1)$	$\mu(2)$	D	VP
C1	-0.345	-0.375	0.262	0.382	0.289	0.287
C2	0.256	1.401	0.359	0.845	0.471	0.469
C3	-1.674	-0.438	0.045	0.365	0.119	0.118
C4	-1.870	-0.486	0.013	0.353	0.091	0.092
C5	-0.609	0.065	0.219	0.496	0.282	0.281
C6	1.379	0.706	0.542	0.664	0.570	0.564
C7	-1.132	-0.222	0.133	0.422	0.200	0.199
C8	4.193	-1.837	1.000	0.000	0.770	0.754
C9	0.849	0.006	0.456	0.481	0.462	0.460
C10	-0.171	0.226	0.290	0.539	0.347	0.345
C11	-0.546	-0.448	0.229	0.363	0.260	0.258
C12	1.857	1.993	0.620	1.000	0.707	0.703
C13	-1.952	-0.246	0.000	0.415	0.096	0.096
w_j			0.770	0.230		

CI(1)、CI(2): 分别根据 PC1、PC2 的各特征向量计算出的综合指标值 The value of comprehensive indices calculated according to eigenvectors of PC1 and PC2; $\mu(1)$ 、 $\mu(2)$: 分别是 CI(1)、CI(2) 的隶属函数值 The subordinate function values of CI(1) and CI(2). 下同 The same below.

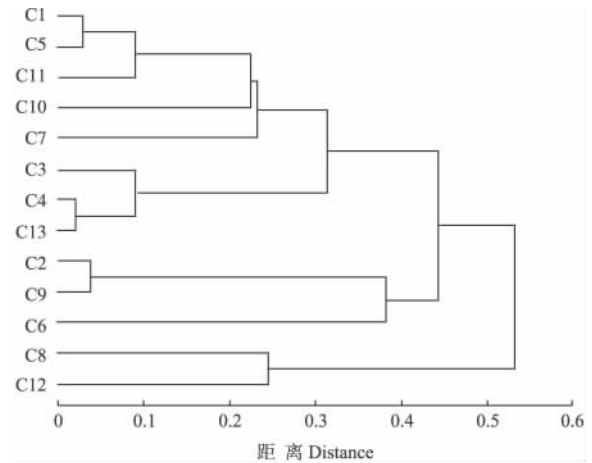


图 1 黄瓜萌芽期耐冷性聚类图

Fig. 1 Dendrogram of cucumber chilling tolerance at germination stage.

C1: NC-76; C2: Chipper; C3: Beit Alpha; C4: Marketmore97; C5: EC1; C6: EC5; C7: Hazard; C8: 二早子 Erzaizi; C9: 平望 Pingwang; C10: 北京截头 Beijingjietou; C11: 长春密刺 Changchunmici; C12: L8; C13: SWCC12. 下同 The same below.

$$D = 0.024 + 0.260X_1 + 0.927X_2 + 0.005X_3 + 0.023X_4 \quad (1)$$

式中: $X_1 \sim X_4$ 分别表示相对发芽率、相对发芽指数、相对胚根长和相对活力指数,方程决定系数 $R^2 = 0.9999$. 因此认为发芽期统计的 4 个指标对黄瓜耐冷性具有显著影响. 相关分析表明,13 份材料的萌芽期耐冷预测值(VP)与综合评价值(D)之间的相关系数为 0.9999,呈显著正相关,说明用此方程对黄瓜萌芽期耐冷性进行预测准确性较高。

2.2 黄瓜苗期耐冷评价体系的建立

2.2.1 黄瓜苗期冷害指标的方差分析 13 份材料在低温处理过程中无论从叶片受冻情况、恢复后的成活率还是生理指标上都表现出差异(表 5、表 6). 方差分析结果表明,与处理前相比,经过 2 d 低温处理后可溶性蛋白、电导率及 4 种保护酶活性变化与处理 1 d 时相比差异较大;冷害指数越大,说明受到的伤害越大,电解质外渗越严重,两者呈正相关,而与抗氧化酶活性呈负相关(表 7),因此选用低温处理 2 d 时各统计指标的相对变化量进行分析和评价体系的建立。

2.2.2 黄瓜苗期耐冷性主成分分析和耐冷性评价 将处理 2 d 时测定的 6 项生理指标相对变化量与冷害指数及恢复后的成活率进行相关性分析(表 8),结果表明,各单项指标均存在一定的相关性,但都不显著. 因为相对电导率和冷害指数越大,说明幼苗越不耐冷,因此用其倒数进行耐冷性评价. 将各观测值标准化后进行主成分分析,得到特征向量和累计

表 5 幼苗在 4 °C 低温下的冷害情况
Table 5 Chilling injury of seedlings at 4 °C

编号 Code	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
<i>CII</i> (1 d)	2.81	2.83	1.67	2.74	2.85	2.17	2.68	3.52	2.17	1.67	2.58	2.25	2.35
SRAR (%)	83.3	90.0	100.0	80.0	90.0	62.50	88.0	66.7	75.0	100.0	80.0	95.0	75.7
<i>CII</i> (2 d)	3.37	2.32	3.04	3.24	2.13	2.70	3.78	4.45	3.60	2.67	2.46	2.82	4.43
SRAR (%)	32.0	85.0	80.0	71.4	62.5	80.0	60.0	0	66.7	100.0	12.5	87.5	20.0

CII: 冷害指数 Chilling injury index; SRAR: 恢复后成活率 Survival rate after recovery.

表 6 低温处理前后各单项指标值
Table 6 Values of each index before and after low temperature treatment

编号 Code	SP			EC (%)			SOD		
	CK	1 d	2 d	CK	1 d	2 d	CK	1 d	2 d
C1	0.37ab	0.25c	0.25a	38.6bc	64.3abcd	73.0abc	0.81c	2.50g	3.59de
C2	0.50ab	0.26c	0.33a	37.4bcd	57.6cd	59.7d	1.42abc	3.29cd	3.72h
C3	0.45ab	0.34abc	0.28a	24.0g	40.1ef	59.7d	1.21bc	2.65efg	2.91fg
C4	0.32b	0.37abc	0.32a	31.5f	71.8a	59.2d	1.15bc	2.76a	4.71ab
C5	0.41ab	0.32abc	0.36a	32.2ef	34.8f	56.2d	1.50abc	2.72efg	3.91cd
C6	0.44ab	0.37abc	0.33a	30.7f	34.9f	60.1d	1.90ab	3.11cde	3.89cd
C7	0.44ab	0.30bc	0.27a	34.1cdef	44.2e	56.8d	1.48abc	2.36fg	2.65g
C8	0.48ab	0.25c	0.35a	34.4cdef	68.2ab	66.6bcd	1.89ab	3.37c	5.03a
C9	0.51ab	0.43a	0.36a	40.1b	64.0abcd	73.0abc	1.98ab	4.10b	3.81de
C10	0.58a	0.41ab	0.36a	45.6a	65.4abc	66.80bcd	1.17bc	2.79def	3.73de
C11	0.53ab	0.29bc	0.38a	36.7bcde	60.0bcd	65.1cd	2.16a	4.31ab	4.31bc
C12	0.45ab	0.25c	0.36a	34.8cdef	67.8ab	77.1ab	1.55abc	2.20g	3.36ef
C13	0.41ab	0.25c	0.31a	33.4cdef	56.7bcd	80.0a	2.18a	2.86cdef	3.43de

编号 Code	POD			CAT			APX		
	CK	1 d	2 d	CK	1 d	2 d	CK	1 d	2 d
C1	11.0c	1.93fg	90.4bcd	23.7bcde	19.7bcd	43.0ab	12.00bc	4.17bc	9.33abc
C2	51.2a	4.44ef	83.3cd	23.2cde	19.7bcd	46.7a	18.10abc	4.78b	14.04a
C3	71.8a	4.00efg	47.1c	18.8def	30.8a	34.0abc	10.80bc	4.11bc	7.52bcde
C4	48.8b	10.00b	240.6a	27.3abcd	18.3cd	29.9c	8.41bc	4.17bc	8.57abcd
C5	12.1c	1.41g	151.9abc	13.5ef	25.4abc	40.4abc	8.79bc	1.50c	11.30a
C6	8.8c	5.72de	166.9ab	20.2cde	22.6abcd	35.0abc	22.64a	2.29bc	7.55bcde
C7	12.3c	4.70 e	42.9d	8.3f	29.4a	35.1abc	20.70abc	1.78c	3.60f
C8	42.4a	8.48bc	101.2bcd	27.0abcd	28.4ab	31.2bc	8.60bc	3.50bc	10.40ab
C9	18.5c	6.43cde	73.6cd	36.0a	14.1d	33.3bc	11.60bc	3.76bc	7.61bcde
C10	12.6c	7.89bcd	43.2d	33.4ab	22.2abcd	32.6bc	4.71c	4.36bc	7.29bcde
C11	35.7b	15.30a	115.6bcd	33.4ab	28.9a	33.5bc	9.17bc	7.99a	5.64def
C12	13.5c	4.34ef	62.7d	31.0abc	27.2abc	34.1abc	5.25c	1.53c	4.65ef
C13	18.4c	15.30a	77.9bcd	33.1ab	23.4abcd	28.8c	8.50bc	3.98bc	6.66cdef

SP: 可溶性蛋白 Soluble protein; EC: 电导率 Electric conductivity; SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; APX: 抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase. 下同 The same below.

表 7 不同处理时期冷害指数与其他指标变化值的相关系数
Table 7 Correlation coefficients between *CII* and variation of other indices at different treatment stages

<i>CII</i>	SP	EC	SOD	POD	CAT	APX	SRAR
1 d	-0.204	0.225	-0.272	-0.375	0.125	-0.261	-0.449
2 d	-0.092	0.376	-0.126	-0.319	-0.130	-0.135	-0.563*

贡献率(表 9), 前 5 个主成分的累计贡献率达 91.3%, 大于 85%, 表明这 5 个综合指标代表了原来 8 个单项指标 91.3% 的信息, 将原来的 8 个单项指标转换为 5 个新的相互独立的综合指标。在 5 个新确定的综合指标中, PC1 中的 SOD 和 POD 特征向

量最大, 为 0.545, PC2 中的相对电导率、PC3 和 PC4 中的可溶性蛋白、PC5 中的 CAT 特征向量最大, 分别为 0.503、0.495、0.528 和 0.388。

根据各主成分的特征向量值(表 9) 及各项指标标准化值求出 13 份材料的 5 个综合指标值, 以此为

表 8 苗期处理 2 d 后各单项指标相对变化量的相关系数

Table 8 Correlation coefficients among the relative variations of each index after treatment for 2 days at seedling stage

	SP	EC	SOD	POD	CAT	APX	CII	SRAR
SP	1							
EC	0.106	1						
SOD	0.272	-0.251	1					
POD	0.288	-0.109	0.029	1				
CAT	-0.201	-0.270	-0.116	0.073	1			
APX	0.275	-0.204	0.448	-0.009	-0.382	1		
CII	-0.092	0.376	-0.126	-0.319	-0.130	-0.135	1	
SRAR	-0.034	-0.176	0.073	0.261	0.138	0.066	-0.563*	1

表 9 各主成分的特征向量及贡献率

Table 9 Eigenvectors of principal components (PC) and contribution rates

主成分 PC	SP	EC	SOD	POD	CAT	APX	CI	SRAR	贡献率 Contribution rate (%)	累计贡献率 Accumulated contribution rate (%)
PC1	0.241	0.248	0.545	0.545	-0.146	0.449	0.202	0.155	33.2	33.2
PC2	-0.296	0.503	-0.127	-0.127	0.403	-0.060	0.479	0.482	23.6	56.8
PC3	0.495	-0.178	-0.345	-0.345	-0.412	0.255	0.430	0.257	14.0	70.9
PC4	0.528	-0.387	0.167	0.167	0.526	-0.432	0.163	0.161	12.2	83.1
PC5	0.266	0.275	-0.126	-0.126	0.388	0.276	0.251	-0.730	8.2	91.3

表 10 苗期各材料的综合指标 (CI)、隶属函数值(μ)、权重(w_j)、综合评价(D)和预测值(VP)Table 10 Value of comprehensive index (CI), subordinate function values (μ), weight (w_j), comprehensive evaluation (D) and prediction (VP) of each material at seedling stage

编号 Code	CI(1)	CI(2)	CI(3)	CI(4)	CI(5)	$\mu(1)$	$\mu(2)$	$\mu(3)$	$\mu(4)$	$\mu(5)$	D	VP
C1	1.844	-1.081	-2.213	0.444	-0.208	0.822	0.246	0.000	0.724	0.339	0.490	0.520
C2	0.459	1.943	0.030	-0.183	-0.089	0.555	1.000	0.613	0.546	0.381	0.662	0.669
C3	-0.869	0.067	-0.109	0.256	-1.155	0.298	0.532	0.575	0.671	0.000	0.424	0.454
C4	2.765	-1.469	0.365	1.413	-0.329	1.000	0.149	0.705	1.000	0.296	0.671	0.694
C5	1.167	1.162	1.121	1.072	1.641	0.691	0.805	0.912	0.903	1.000	0.811	0.839
C6	-1.126	0.587	0.598	0.836	-0.651	0.249	0.662	0.768	0.836	0.180	0.508	0.532
C7	-2.414	1.654	-1.925	0.847	0.397	0.000	0.928	0.079	0.839	0.555	0.415	0.445
C8	-0.045	-2.066	-0.647	-1.098	0.974	0.457	0.000	0.428	0.286	0.762	0.339	0.374
C9	-1.077	-0.224	0.352	-0.664	-0.679	0.258	0.460	0.701	0.409	0.171	0.391	0.431
C10	2.387	1.803	-0.036	-2.102	-0.413	0.927	0.965	0.595	0.000	0.266	0.702	0.728
C11	-0.911	-0.188	0.520	-0.578	1.096	0.290	0.469	0.747	0.434	0.805	0.472	0.503
C12	-0.252	-0.197	1.445	0.363	-0.797	0.418	0.466	1.000	0.701	0.128	0.532	0.573
C13	-1.931	-1.986	0.502	-0.608	0.217	0.093	0.020	0.742	0.425	0.491	0.254	0.259
w_j						0.364	0.259	0.153	0.134	0.090		

基础计算出隶属函数值、综合指标权重、综合评价(D)和预测值(表 10)。D 值大小反映苗期耐冷性强弱, 可依据 D 值大小对 13 份材料的耐冷性强弱进行排序。根据 D 值采用最小距离法进行聚类分析, 把 13 份黄瓜材料在苗期的耐冷性分为 3 类, I 类只包括 C5, 得分最高, 属于耐冷型; II 类包括 C2、C4 和 C10, 属于中度耐冷型; 其他属于冷敏感型(图 2)。

2.2.3 黄瓜苗期耐冷指标的筛选 综合评价(D 值)是综合形态、生理各项指标的最终评价, 反映

黄瓜耐冷性强弱。以 D 值为因变量, 各单项指标的相对变化量为自变量, 通过逐步回归分析建立最优回归方程:

$$D = 0.9361 + 0.3777X_1 - 0.1062X_2 + 0.0269X_3 + 0.039X_5 + 0.1378X_6 - 0.1048X_7 + 0.1037X_8 \quad (2)$$

式中: $X_1 \sim X_3$ 、 $X_5 \sim X_8$ 分别表示 SP、EC、SOD、POD、APX 相对变化量、冷害指数和恢复后成活率, 方程决定系数 $R^2 = 0.9953$ 。将相关数据代入回归方程得到预测值, 相关分析表明, 13 份材料的苗期耐冷预

表 11 黄瓜不同生育期耐冷性综合评价

Table 11 Comprehensive evaluation of cucumber chilling tolerance at different growth stages

分级 Rank	萌芽期 Germination stage			苗期 Seedling stage		
	编号 Code	D 值平均值 Mean of D value	置信区间 Confidence interval	编号 Code	D 值平均值 Mean of D value	置信区间 Confidence interval
I	C8 > C12	0.739	(0.652, 0.826)	C5	0.811	0.811
II	C6 > C2 > C9	0.501	(0.383, 0.619)	C10 > C4 > C2	0.679	(0.637, 0.720)
III	C10 > C1 > C5 > C11 > C7 > C3 > C13 > C4	0.210	(0.017, 0.404)	C12 > C6 > C1 > C11 > C3 > C7 > C9 > C8 > C13	0.425	(0.252, 0.598)

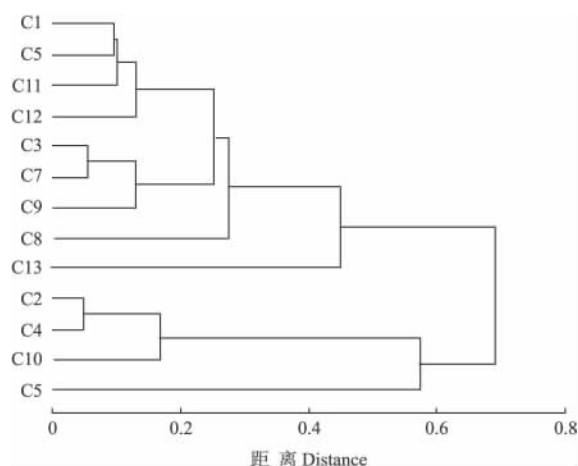


图 2 黄瓜苗期耐冷性聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cucumber chilling tolerance at seedling stage.

测值 (VP) 与综合评价值 (D) 之间的相关系数为 0.9977, 呈显著正相关, 说明用此方程对黄瓜苗期耐冷性进行预测准确性较高。

2.3 黄瓜不同生育期耐冷性比较

由表 11 可以看出, 黄瓜在不同生育时期的耐冷性不同, C8 和 C12 两份材料低温发芽效果好, 但在苗期表现为不耐冷, 说明黄瓜耐冷性在不同发育时期由不同的基因控制, 可能因差异表达导致不同生育时期的耐冷性存在差异。根据分级结果, 计算每个黄瓜材料 D 值的平均值, 并进行区间估计, 建立了黄瓜耐冷性评价体系: 萌芽期用方程 (1) 进行评价, $D > 0.6518$ 为耐冷型, $0.4041 \leq D \leq 0.6518$ 为中度耐冷型, $D < 0.4041$ 为冷敏感型; 苗期用方程 (2) 进行评价, $D > 0.8106$ 为耐冷型, $0.5982 \leq D \leq 0.8106$ 为中度耐冷型, $D < 0.5982$ 为冷敏感型。

3 讨 论

低温是影响作物生产的主要非生物胁迫因素之一。在整个生育期植物都容易遭受低温伤害, 在外部形态、生理代谢、基因表达等方面都会发生显著变化^[1-4, 16-17]。不同的材料在低温响应机制及基因表

达模式、数量上都存在一定的差异^[5, 18-19], 因此, 要确切鉴定一个品种的抗寒性强弱, 不能根据某个单一生理生化指标或形态表现进行判定, 而应根据多个指标进行综合分析, 耐冷性强的品种一般具有较高的生理活性, 且在受到逆境胁迫时, 也能维持较稳定的生理体系。黄瓜在不同生育期的耐冷性由不同的基因控制^[5], 具体表现也不尽相同, 因此, 应该有各自的评价和鉴定体系。

黄瓜种子适宜发芽温度为 25 ~ 30 °C, 低温 (13 ~ 17 °C) 下种子的发芽率、发芽速度明显降低, 但不同生态型品种的低温发芽力有显著差异。纪颖彪等^[20]确定了 8 个黄瓜品系的低温发芽温度, 认为 13 °C 下不同品系的发芽指数差异显著。于拴仓等^[7]在 15 °C 低温下, 通过隶属函数法对 4 个黄瓜品种芽期耐低温性进行鉴定, 认为胚根伸长率可以反映黄瓜的耐低温性。本研究选用 13 个黄瓜材料进行了 15 °C、17 °C 和 18 °C 共 3 个温度的发芽试验, 结果表明, 15 °C 时发芽力极低, 大部分材料都不能发芽; 而 18 °C 时发芽能力有极大提高, 材料之间差异较小。通过方差分析表明, 17 °C 下材料的发芽力差异更显著, 因此, 选用 17 °C 作为黄瓜芽期耐冷性鉴定温度。这与上述提到的研究所用的鉴定温度不同, 可能与黄瓜品种差异有关。本研究采用低温和常温的相对值以消除种子本身的影响, 对 4 个发芽指标进行主成分分析, 得出综合评价值, 据此进行聚类分析把 13 份材料分成 3 个等级。

4 °C 低温常被选为作物苗期耐冷性鉴定温度^[17, 21]。本研究参考 Chung 等^[21]的试验方法, 也选用 4 °C 作为黄瓜苗期鉴定温度。黄瓜苗期的耐冷性鉴定选用形态指标和生理指标相结合的方法, 并通过相关性分析进行评价, 冷害指数能反映叶片受低温伤害情况, 可直接衡量植株的受害程度^[6, 8, 21]; 恢复后的成活率可反映植株经过冷害后的恢复能力; 植株受到低温冷害后可溶性蛋白、电导率及 4 种抗氧化酶等生理代谢过程发生变化, 常被用于评价作物的抗逆性。张红梅等^[6]分析了 4 个黄瓜品种的形

态指标、叶绿素荧光及 3 种生理指标与品种抗冻性的关系, 结果表明, 叶绿素含量和叶绿素荧光参数与黄瓜的冷害指数显著相关; 李晓明^[8]对两个黄瓜品种苗期低温下生理变化和冷害指数进行了相关性分析, 结果表明, 冷害指数与电导率、CAT 显著相关, 而与 POD 和 SOD 相关性不显著; 闫世江等^[22]采用叶长、叶宽等形态指标的低温与常温相对百分率及半致死温度为指标, 把 25 份材料分为 3 个等级. 本研究将形态指标、成活率及生理指标进行相关性分析, 发现 4 ℃ 处理 2 d 后恢复 3 d 的成活率与冷害指数相关性显著, 与其他几个指标相关性不显著, 这与李晓明^[8]的结论不完全一致, 可能与处理温度、时间、材料等因素有关. 通过主成分分析及对黄瓜的耐冷性进行综合评价, 可以把黄瓜的耐冷性分为耐冷型、中度耐冷型和冷敏感型 3 类.

水稻在整个生育期也容易遭受冷害, 不同生育时期的耐冷性及其鉴定都有相关研究, 水稻不同时期的耐冷性不是孤立的, 而是存在着许多相关性: 芽期耐冷性与孕穗期和开花期耐冷性密切相关, 幼苗期与成熟期的耐冷性相关性显著, 插秧期耐冷性与开花期耐冷性呈显著正相关; 但有学者分析了籼稻和粳稻各个生育时期耐冷性的相关性, 并未见明显的规律^[23]. 本研究中, 13 份黄瓜材料在萌芽期和苗期的耐冷性相关性不显著. 顾兴芳等^[9]用 6 份黄瓜材料配制 15 个组合研究耐冷遗传特性, 认为低温下相对发芽势、相对发芽指数、相对胚根长符合加-显性效应, 以显性效应为主, 而相对发芽率不符合加-显性效应; 而纪颖彪等^[20]用 8 份材料配制 64 个组合进行研究, 认为黄瓜低温发芽力由非加性效应决定^[20]; Cai 等^[24]认为黄瓜苗期耐冷性由加性基因控制; 闫世江等^[25-26]用 4 份黄瓜材料配制完全双列杂交, 统计了黄瓜苗期低温下 5 个形态指标, 认为符合加-显性模型, 用 6 份材料分析苗期低温下 4 个生理指标也符合加-显性模型. 可见, 黄瓜耐冷性遗传在不同发育时期、不同材料之间不尽相同, 说明黄瓜的耐冷性机制较为复杂. 因此, 在评价和利用黄瓜耐冷性研究中, 应本着全面、综合的原则, 不同时期需要不同的评价鉴定指标和方法.

既然作物耐冷性是个抗寒性状的综合反映, 对任何单项机理的研究都有一定的局限性, 因此, 从形态、生理生化等众多指标中筛选出能反映作物耐冷性的综合指标, 作为作物耐冷性鉴定指标已成为共识^[27-29]. 其中水稻的抗逆性包括耐冷性研究较为深入广泛, 不同的生育时期都有各自的评价和鉴定

体系^[29]. 然而在黄瓜耐冷性鉴定标准及评价体系研究中缺乏系统性和规范性. 本研究对 13 份黄瓜材料两个生育时期的耐冷性进行了研究, 通过回归分析建立不同生育时期的耐冷性评价方程, 从而把作物耐冷性这一主观经验上的模糊分析上升为数理统计上的定量分析, 从而使黄瓜的耐冷性评价更为客观、科学合理, 为今后黄瓜耐冷性研究提供一种更为准确、科学的评价方法.

参考文献

- [1] Lu S-X (卢淑雯). Development of study on chilling tolerance breeding in cucumber. *Heilongjiang Agricultural Sciences* (黑龙江农业科学), 2007(6): 105 - 107 (in Chinese)
- [2] Zhou Y-H (周艳虹), Yu J-Q (喻景权), Qian Q-Q (钱琼秋), et al. Effects of chilling and low light on cucumber seedling growth and their antioxidative enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2003, 14(6): 921 - 924 (in Chinese)
- [3] Jiang Z-S (姜振升), Sun X-Q (孙晓琦), Ai X-Z (艾希珍), et al. Responses of Rubisco and Rubisco activase in cucumber seedlings to low temperature and weak light. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, 21(8): 2045 - 2050 (in Chinese)
- [4] Bi H-G (毕焕改), Wang M-L (王美玲), Jiang Z-S (姜振升), et al. Impacts of suboptimal temperature and low light intensity on the activities and gene expression of photosynthetic enzymes in cucumber seedling leaves. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, 22(11): 2894 - 2900 (in Chinese)
- [5] Li S-D (李树德). Breeding Progress for Disease Resistance of Main Vegetables in China. Beijing: Science Press, 1995 (in Chinese)
- [6] Zhang H-M (张红梅), Jin H-J (金海军), Ding X-T (丁小涛), et al. Screening of determining indicators of early cold tolerance of cucumber. *Acta Agriculturae Shanghai* (上海农业学报), 2009, 25(4): 31 - 35 (in Chinese)
- [7] Yu S-C (于拴仓), Cui H-W (崔鸿文), Meng H-W (孟焕文). Appraisal methods and indexes for low-temperature tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) at seed germination stage. *Acta Universitatis Agriculturae Boreali-Occidentalis* (西北农业大学学报), 2000, 28(3): 1 - 6 (in Chinese)
- [8] Li X-M (李晓明). The Study on Selecting Sensitive Indicator and Effects of Ca²⁺ to Chilling Tolerance of Cucumber. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [9] Gu X-F (顾兴芳), Feng L-L (封林林), Zhang C-Z (张春震), et al. Genetic analysis of the cucumber germinating ability in low temperature. *China Vegetables* (中国蔬菜), 2002(3): 5 - 7 (in Chinese)
- [10] Giannopolitis CN, Ries SK. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedling. *Plant*

- Physiology*, 1977, **59**: 315 – 318
- [11] Kochba J, Lavee S, Spiegel-roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant and Cell Physiology*, 1977, **18**: 463 – 467
- [12] Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 1982, **32**: 93 – 101
- [13] Shen W-B (沈文飏), Xu L-L (徐朗莱), Ye M-B (叶茂炳), et al. Study on determination of ASP activity. *Plant Physiology Communications (植物生理学通讯)*, 1996, **32**(3): 203 – 205 (in Chinese)
- [14] Cheng J-Q (程建权). City Systems Engineering. Wuhan: Wuhan University Press, 2002 (in Chinese)
- [15] Wang H-Z (王贺正). Study on Drought Resistance and Screening Identification Indexes of Drought Resistance in Rice. PhD Thesis. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [16] Yang G, Zou HD, Wu Y, et al. Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2011, **106**: 127 – 141
- [17] Lu M-H (逯明辉), Li X-M (李晓明), Chen J-F (陈劲枫), et al. Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2005, **38**(12): 2492 – 2495 (in Chinese)
- [18] Ahmad P, Majeti MN, Prasad JV. Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change [EB/OL]. (2012) [2013-01-28]. <http://books.google.com.hk>
- [19] Cheng LB, Gao X, Li SY, et al. Proteomic analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Meer.) seeds during inhibition at chilling temperature. *Molecular Breeding*, 2010, **26**: 1 – 17
- [20] Ji Y-B (纪颖彪), Cai Z-H (蔡洙湖), Zhu Q-J (朱其杰). Analysis of combining ability and heritability for low-temperature germination ability in cucumber. *Journal of China Agricultural University (中国农业大学学报)*, 1997, **2**(5): 109 – 114 (in Chinese)
- [21] Chung SM, Staub JE, Fazio G. Inheritance of chilling injury: A maternally inherited trait in cucumber. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2003, **128**: 526 – 530
- [22] Yan S-J (闫世江), Si L-T (司龙亭), Ma Z-G (马志国), et al. Research on low temperature resistance in different source *Cucumis sativus* L. *Journal of Shenyang Agriculture University (沈阳农业大学学报)*, 2006, **37**(5): 766 – 768 (in Chinese)
- [23] Zhao Z-W (赵正武), Li S-G (李仕贵), Huang W-Z (黄文章), et al. Development and foreground of cold tolerance in different low temperature sensitive stage of rice. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences (西南农业学报)*, 2006, **19**(2): 330 – 335 (in Chinese)
- [24] Cai ZH, Zhu QJ, Xu Y. Studies on inheritance of chilling tolerance in cucumber seedling stage. *Acta Horticulturae*, 1995, **402**: 206 – 213
- [25] Yan S-J (闫世江), Si L-T (司龙亭), Ma Z-G (马志国), et al. Genetic analysis of chilling tolerance and correlation morphological characters of cucumber seedling. *Journal of Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学学报)*, 2008, **39**(1): 11 – 14 (in Chinese)
- [26] Yan S-J (闫世江), Si L-T (司龙亭), Zhang J-J (张建军), et al. Genetic analysis of chilling tolerance of cucumber seedling and related physiological characters in low temperature and weak light. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报)*, 2011, **31**(3): 531 – 535 (in Chinese)
- [27] Mills LJ, Ferguso JC, Keller M. Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2006, **57**: 194 – 200
- [28] Deng H-B (邓化冰), Che F-L (车芳璐), Xiao Y-H (肖应辉), et al. Effects of low temperature stress during flowering period on pollen characters and flag leaf physiological and biochemical characteristics of rice. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2011, **22**(1): 66 – 72 (in Chinese)
- [29] Fu X-Q (付学琴), He H-H (贺浩华), Wen P (文飘), et al. Drought resistance evaluation system for backcross lines of Dongxiang common wild rice. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2012, **23**(5): 1277 – 1285 (in Chinese)

作者简介 苗永美,女,1976年生,博士研究生,主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究。E-mail: mym416@163.com

责任编辑 张凤丽