

研究报告

Research Report

基于叶面温度和抗旱性评价等级的耐干旱萱草品种筛选方法的建立

李昊 季顶宇 吉子宜 尹冬梅 刘翔 秦巧平 倪迪安* 张志国

上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海, 201418

* 通信作者, dani@sit.edu.cn

摘要 我国有大量的干旱与半干旱的地区, 选育耐干旱品种是当前包括萱草在内的园艺植物育种的重要目标之一。实验通过叶片表面温度测定的方法初步筛选, 进而通过测定气孔导度、气孔密度、离体叶片失水率和相对含水量等耐干旱指标、以及观察干旱处理及复水后的萱草地上部分外观形态, 综合上述指标进行了抗旱性分级, 建立一套萱草耐干旱品种简单、快速的筛选方法。相关性分析表明萱草叶面温度与抗旱性呈正相关, 本研究为从萱草引种或杂交后代群体中快速筛选耐旱萱草品种提供参考。

关键词 萱草, 叶片表面温度, 气孔导度, 气孔密度, 耐干旱分级筛选体系

Screening Drought-tolerant Daylily Plants Based on Leaf Surface Temperature

Li Hao Ji Dingyu Ji Ziyi Yin Dongmei Liu Xiang Qing Qiaoping Ni Di'an* Zhang Zhiguo

School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai University of Technology, Shanghai, 201418

* Corresponding author, dani@sit.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0011

Abstract There are lots of arid and semi-arid areas in China. Breeding drought tolerant cultivars is one of the important objectives of horticultural plant breeding, including daylily. In order to establish a simple and rapid selection and evaluation system of drought tolerant daylily cultivars, 10 daylily cultivars with the highest and lowest leaf surface temperature were selected by the method of measuring leaf surface temperature. The drought resistant indexes such as stomatal conductance, stomatal density, water loss and relative water content of detached leaves were measured, and the aboveground biomass of daylily cultivars after drought treatment were observed for the classification of daylily cultivars. Correlation analysis showed that there was a positive correlation between leaf temperature and drought resistance. Aforementioned results provided the basis for reference for the selection of drought tolerant daylily cultivars from a large number of introduction plants or hybrid progenies.

Keywords Daylily (*Heimerocallis fulva*), Leaf surface temperature, Stomatal conductance, Stomatal density, Drought tolerance grading and screening system

萱草(*Heimerocallis fulva*)为多年生宿根草本, 因其具有观赏期长、观赏性高、适用性强、品种丰富和群体功能强等优点, 日益受到人们的重视。我国有上

千年的萱草栽培历史, 如《诗经》中的《国风·卫风·伯兮》对萱草的描写是历史上首次记述萱草, 但目前绝大部分萱草栽培品种由美国一些植物园、园艺爱好

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 5 月 29 日; 接受日期: 2020 年 6 月 4 日; 发表日期: 2020 年 6 月 11 日

引用格式: 李昊, 季顶宇, 吉子宜, 尹冬梅, 刘翔, 秦巧平, 倪迪安, 张志国, 2020, 基于叶面温度和抗旱性评价等级的耐干旱萱草品种筛选方法的建立, 分子植物育种(网络版), 18(11): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0011) (Li H., Ji D.Y., Ji Z.Y., Yin D.M., Liu X., Qing Q.P., Ni D.A., and Zhang Z.G., 2020, Screening drought-tolerant daylily plants based on leaf surface temperature, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(11): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0011))

者收集原产中、日等亚洲国家的萱草属植物,通过杂交育种所得,20世纪80年代我国萱草育种工作者则陆续从欧美国家引种萱草栽培种,并进行杂交育种工作。截至目前美国萱草协会收录的萱草品种已经超过八万种(王婧,2018,上海应用技术大学生态技术与工程学院,pp.2-18),笔者所在课题组通过近多年的努力收集了149个萱草品种,为耐干旱萱草品种的选育及杂交育种工作提供必要的材料。

全球有萱草属植物16种,其中有11种原产我国(Rodriguez-Enriquez and Grant-Downton, 2013)。我国地形复杂、气候多变,有大量的土地处在干旱与半干旱之间,因此选育耐干旱品种是包括萱草在内的园艺植物育种的重要目标之一。20世纪以来我国园艺工作者从国外引进了大量性状优良的萱草品种,并开展了适合本地气候条件的萱草新品种选育和杂交育种工作(金立敏等,2012)。叶片表面温度与气孔开度之间存在很大的相关性(Negi et al., 2008; Chen et al., 2016),有学者利用叶面温度构建干旱胁迫对作物影响的模型(Perera et al., 2002)。

植物在根系供水不足或蒸腾速率很高时,都会遭受干旱胁迫,而在干旱和半干旱气候下,这两种情况往往是一致的(Reddy et al., 2004)。水分胁迫是萱草养护过程中经常面临的严重问题,严重的干旱导致萱草观赏性下降,甚至失水而死亡。几乎所有植物都具有一定干旱耐受性,但其耐旱能力因物种、品种而异(Chaitanya et al., 2003)。这为从多个萱草品种中筛选耐干旱品种成为可能,耐旱萱草筛选体系的研究尚未见报道。有学者以无花果为材料尝试通过茎水势、相对含水量、叶绿素稳定性指数等筛选抗旱品种,该方法繁琐且耗时较多不利于大规模的筛选(Gholami et al., 2012)。目前快速筛选耐旱研究较少,由于叶表面温度方法简便快速,且蒸腾速率与植物气孔导度呈显著正相关(杨淑巧等,2015),而气孔导度很大程度上能反映植物的耐干旱能力(Negi et al., 2008; Chen et al., 2016)。通过萱草叶片表面温度的测定及计算,对待测萱草进行初步筛选,进而选取叶片表面温度最高及最低的萱草品种进一步通过离体叶片失水率、叶片相对含水量等抗旱指标明确已筛选出的萱草品种中的抗旱品种,建立基于萱草形态指标的耐干旱萱草品种评价体系,验证以叶片温度为指标筛选出的耐干旱萱草,探索以叶温为简易指标筛选耐干旱萱草方法的可行性,为大规模、多品种、快速筛选萱草抗旱新品种提供参考。

1 结果与分析

1.1 萱草叶表面温度测定及耐干旱萱草初步筛选

本研究通过对课题组前期收集的149个萱草品种进行了叶片表面温度的大规模测定,结果显示最低叶片表面温度为28.6度,最高为32.8度(表1)。在此基础上,实验选取8个叶片表面温度最高和最低萱草品种进行下一步的耐干旱品种筛选和测定。

1.2 耐干旱萱草耐干旱指标的测定和比较

目前萱草栽培种大多为二倍体和四倍体,本研究对参与实验的所有二倍体和四倍体萱草的叶面温度进行了统计分析,结果表明二倍体萱草的叶面温度总体上明显高于四倍体萱草(图1)。由于课题组收集的一部分萱草品种染色体倍性信息不明,因此实验采用流式细胞术对进行了萱草染色体倍性检测(表2)。

气孔导度是植物抗旱性的重要指标之一,实验对随机选取的8个萱草品种进行了气孔导度的测定。结果显示‘害羞老虎’和‘莉莉百合’等萱草品种的气孔导度明显高于‘X-12’、‘猛子花’、‘冲里花’等萱草品种(图2)。

由于植物气孔导度主要由气孔开度和密度所决定,因此实验使用扫描电镜测定并计算上述8个品种萱草的气孔密度,结果表明‘莉莉百合’、‘害羞老虎’、‘花叶井’和‘X-13’气孔密度较高;而‘猛子花’、‘X-12’和‘冲里花’气孔密度相对较小(图3)。

离体叶片失水率也是植物耐旱性重要评价指标之一(Clarke et al., 1989),且离体叶片失水率与气孔

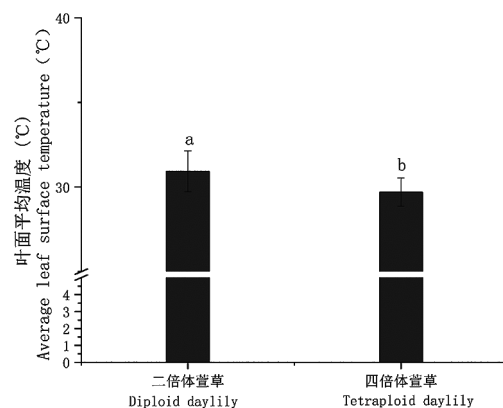


图1 二倍体和四倍体萱草叶面平均温度比较

注:不同小写字母表示 $p<0.05$ 水平的显著性差异

Figure 1 Comparison of leaf surface temperature between diploid and tetraploid daylily cultivars

Note: The different lowercase letter in the picture indicate significant difference of $p<0.05$

表 1 萱草叶面温度比较

Table 1 Leaf temperature of daylily cultivars

萱草品种	英文名称	叶面温度	萱草品种	英文名称	叶面温度
daylily cultivars	English name	Leaf temperature	Daylily cultivars	English name	Leaf temperature
‘西蒙斯序曲’	'Simmons Overture'	31.3	‘X-15’	‘X-15’	29.6
‘午夜万花筒’	'Midnight Kaleidoscope'	30.3	‘B-33’	‘B-33’	29.9
‘中期花’	'Zhongqihua'	30.4	‘B-31’	‘B-31’	29.8
‘中国山’	'Chinese Mountain'	30.4	‘X-11’	‘X-11’	29.8
‘芝加哥之火’	'Chicago Fire'	29.3	‘C-9’	‘C-9’	30.8
‘诱惑’	'Seducator'	31.6	‘C-8’	‘C-8’	31.4
‘隐秘深处’	'Hidden Depths'	31.1	‘C-7’	‘C-7’	31.1
‘音乐边境’	'Border Music'	31.5	‘C-6’	‘C-6’	30.6
‘一品红’	'Christmas Greetings'	31	‘C-5’	‘C-5’	30.8
‘胭脂画布’	'Cochineal Canvas'	30.8	‘C-4’	‘C-4’	30.3
‘星际旅行者’	'Astral Voyager'	31	‘C-3’	‘C-3’	30.2
‘大空海岸’	'Spacecoast Better Late'	31	‘C-22’	‘C-22’	30.3
‘小葡萄紫’	'Little Grapette'	30.3	‘C-21’	‘C-21’	29.5
‘小加文’	'Gavin Petit'	31.3	‘C-2’	‘C-2’	30.3
‘紫色情缘’	'Purplelicious'	30.5	‘C-19’	‘C-19’	30.1
‘紫色短裙’	'Lavender skirt'	30.2	‘C-17’	‘C-17’	30.4
‘午后’	'Always Afternoon'	29.1	‘C-16’	‘C-16’	30.1
‘沃拉里斯’	'Volaris'	31.8	‘C-14’	‘C-14’	30.4
‘威猛栗子’	'Mighty Chestnut'	31.3	‘C-13’	‘C-13’	30.4
‘外星人’	'Extra Terrestrial'	31.4	‘B-21’	‘B-21’	29.4
‘糖果优雅’	'Elegant Candy'	31.6	‘B-20’	‘B-20’	29.5
‘世纪风暴’	'Storm of the Century'	30.7	‘B-2’	‘B-2’	32.8
‘莎基’	'Bonibrae Sharky'	30.5	‘B-19’	‘B-19’	29.7
‘秋红’	'Autumn Red'	29.7	‘B-17’	‘B-17’	30.9
‘切诺基’	'Cherokee Patterns'	30.9	‘B-15’	‘B-15’	29.3
‘强盗’	'Bandolero'	30.1	‘B-14’	‘B-14’	29.9
‘歉意’	'Pardon Me'	30.3	‘B-13’	‘B-13’	30.6
‘奇异糖果’	'Exotic Candy'	31.5	‘B-12’	‘B-12’	30.6
‘你的天使’	'Your Angel'	30.9	‘B-11’	‘B-11’	30.8
‘魔蝶’	'Enchanted Butterfly'	30.1	‘B-10’	‘B-10’	29.2
‘摩西之火’	'Moses' Fire'	31.3	‘B-1’	‘B-1’	30.7
‘摩洛哥之夏’	'Moroccan Summer'	31.2	‘X-9’	‘X-9’	29.8
‘面霜’	'Facepaint'	31.8	‘x-7’	‘x-7’	30.6
‘黑色激情’	'Black Passion'	30.2	‘X-64’	‘X-64’	30.1
‘猛子花’	'mengzihua'	32.6	‘X-63’	‘X-63’	30.1
‘玫瑰犀牛’	'Rosy Rhino'	29.8	‘X-61’	‘X-61’	29.6
‘玛丽里德’	'Marry Reed'	29.4	‘X-59’	‘X-59’	29.3
‘洛岛红’	'Rhode Island Red'	30.4	‘X-58’	‘X-58’	29.4
‘打男爵’	'Beat the Barons'	30.7	‘X-57’	‘X-57’	29.6
‘莉莉百合’	'Lilly and Petals'	29.1	‘C-12’	‘C-12’	30.2
‘冲里花’	'chonglihua'	30.6	‘C-11’	‘C-11’	30.4
‘草莓糖’	'Rosy Rhino'	29.4	‘C-1’	‘C-1’	30.1
‘布奇’	'Here Lies Butch'	29.7	‘B-9’	‘B-9’	30.5
‘贝拉’	'Bela Lugosi'	30	‘B-8’	‘B-8’	30.5

续表 1

Continuing table 1

萱草品种	英文名称	叶面温度	萱草品种	英文名称	叶面温度
daylily cultivars	English name	Leaf temperature	daylily cultivars	English name	Leaf temperature
‘北极雪’	'Arctic Snow'	30.1	‘B-7’	‘B-7’	30.3
‘白丹’	'Dan White'	29.9	‘B-6’	‘B-6’	30.5
‘八月桂’	'Mountain Laurel'	29.8	‘B-5’	‘B-5’	30.5
‘艾伦黄’	'Blake Allen'	29.9	‘B-4’	‘B-4’	30.8
‘阿帕契红’	'Chicago Apache'	30.1	‘B-38’	‘B-38’	29.7
‘阿拉米达东’	'Alameda East'	29.6	‘X-54’	‘X-54’	29.7
‘里约狂欢’	'Rio Fiesta'	31.4	‘X-53’	‘X-53’	29.7
‘凯瑟琳玫瑰’	'Rose Katherine'	31.2	‘X-51’	‘X-51’	29.7
‘金蜘蛛’	'Golden Tarantula'	30.6	‘X-47’	‘X-47’	29.5
‘金娃娃’	'Stella de Oro'	31.5	‘X-46’	‘X-46’	29.4
‘杰克芝士’	'Gemini Jack'	30.7	‘X-45’	‘X-45’	29.4
‘假日之歌’	'Holiday Song'	31.4	‘X-44’	‘X-44’	29.4
‘假面舞会’	'Mask Ball'	30.3	‘X-42’	‘X-42’	29.5
‘贾森索尔特’	'Jason Salter'	31.2	‘X-40’	‘X-40’	29.4
‘幻想之网’	'Web of Illusion'	31.4	‘X-37’	‘X-37’	29.7
‘华盖之月’	'Marque Moon'	30.4	‘X-36’	‘X-36’	30
‘花叶井母株’	'Huyemum'	30.6	‘X-34’	‘X-34’	30.1
‘花叶井’	'Huayejin'	28.6	‘X-33’	‘X-33’	29.7
‘黑莓糖’	'Blackberry Candy'	31.1	‘X-31’	‘X-31’	29.5
‘害羞老虎’	'shy tiger'	29.2	‘X-3’	‘X-3’	29.6
‘高丽橙’	'Orange Crush'	29.7	‘X-26’	‘X-26’	29.9
‘粉万重’	'Pink Abundance'	30.4	‘X-24’	‘X-24’	30.2
‘番茄干’	'Sun Dried Tomatoes'	30.8	‘X-23’	‘X-23’	30.1
‘肚脐活结’	'Belly Button Slipknots'	30.3	‘X-2’	‘X-2’	29.8
‘EYE’	'All About Eve'	30.1	‘X-18’	‘X-18’	29.6
‘热浪’	'Tropical Heat Wave'	31.8	‘B-36’	‘B-36’	29.6
‘吉林’	'Jilin'	30.6	‘B-34’	‘B-34’	30
‘蓝脸’	'Blue in the Face'	30.3	‘B-30’	‘B-30’	29.9
‘X-13’	'Lavender Blue Baby'	29.1	‘B-29’	‘B-29’	29.4
‘X-12’	'Lorynn Nicole'	28.7	‘B-23’	‘B-23’	29.4
‘B-32’	'B-32'	30.1			

导度密切相关。因此实验对筛选到的上述 8 个叶表面温度较高和较低的萱草品种进行了离体叶片失水率测定。结果显示不同萱草品种 5h 后离体叶片失水率在 5%~30%之间,品种间差异显著。‘莉莉百合’、‘害羞老虎’和‘x-13’失水率显著高于‘猛子花’和‘冲里花’(图 4)。

叶片相对含水量是反映植物体内水分状况的重要参数(孙彩霞和沈秀瑛, 2002),也是衡量植物抗旱性的一个重要指标。结果显示随着干旱胁迫时间的增加,所有萱草品种的叶片相对含水量(RWC)总体呈下降趋势,但品种不同,下降的幅度有所不同(图 5)。

干旱胁迫期处理 7d 后,‘猛子花’、‘冲里花’和‘莉莉百合’的叶片相对含水量下降较小,其次为‘X-12’和‘花叶井’,‘害羞老虎’的叶片相对含水量下降较多;干旱胁迫实验 14 d 后,‘害羞老虎’的 RWC 含量下降幅度高达 38.3%。

此外,实验还对干旱处理后的萱草进行了观察,如图 6 所示,干旱胁迫实验 7d 后,‘害羞老虎’叶尖开始焦化,‘午后’上半部分叶片叶边缘开始出现枯黄,其余品种萱草生理状态良好。干旱胁迫实验 14 d 后,‘害羞老虎’叶尖及上半部分 1/3 处,开始出现干枯焦化,整株植物开始萎蔫。干旱胁迫实验 21 d 后,

表 2 萱草 DNA 倍性

Table 2 DNA ploidy of daylily cultivars used in this study

序号 No	品种名称 Name of daylily cultivars	英文名称 English name	倍性 Ploidy	采集地 Location
1	‘莉莉百合’	‘Lilly and Petals’	四倍体 Tetraploid	山东 Shandong
2	‘x-13’	‘Lavender Blue Baby’	二倍体 Diploid	山东 Shandong
3	‘x-12’	‘Lorynn Nicole’	四倍体 Tetraploid	山东 Shandong
4	‘害羞老虎’	‘shy Tiger’	二倍体 Diploid	山东 Shandong
5	‘猛子花’	‘mengzihua’	二倍体 Diploid	山西 Shanxi
6	‘午后’	‘Always Afternoon’	四倍体 Tetraploid	山东 Shandong
7	‘花叶井’	‘Huayejing’	四倍体 Tetraploid	山东 Shandong
8	‘冲里花’	‘Chonglihua’	二倍体 Diploid	山西 Shanxi

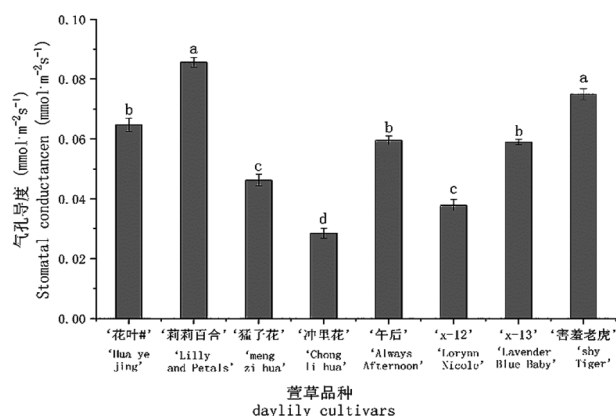


图 2 萱草品种间气孔导度的比较

注: 不同小写字母表示 $p < 0.05$ 水平的显著性差异

Figure 2 Comparison of stomatal conductance of daylily cultivars

Note: The different lowercase letter in the picture indicate significant difference of $p < 0.05$

‘X-12’和‘害羞老虎’三分之二叶片干枯;‘花叶井’和‘莉莉百合’叶尖开始出现枯黄,‘猛子花’、‘冲里花’外层少量叶片脱落;‘午后’1/3的外层叶片干枯卷曲。干旱胁迫实验 28d 后,害羞老虎干枯叶片占全株 2/3,整株形态皱缩干枯,‘X-12’和‘X-13’干枯枝叶占整株植物近 1/2,植物形态皱缩干枯,叶尖枯黄,叶边缘焦化蜷缩。‘花叶井’叶尖焦化干枯,外层叶片干枯卷曲,‘猛子花’植株形态保持良好,外层少量叶片枯萎脱落,‘冲里花’、‘莉莉百合’叶尖开始枯黄,叶片边缘焦化卷曲。复水 7 天后,‘猛子花’、‘冲里

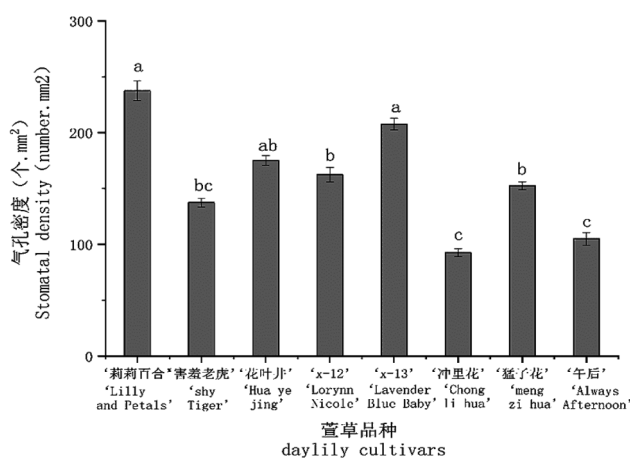


图 3 萱草品种间气孔密度的比较

注: 不同小写字母表示 $p < 0.05$ 水平的显著性差异

Figure 3 Comparison of stomatal density of daylily cultivars

Note: The different lowercase letter in the picture indicate significant difference of $p < 0.05$

花’、‘莉莉百合’完全恢复正常,叶片自然舒展,‘X-12’、‘X-13’、花叶井、需人工剪除部分枝叶,‘害羞老虎’需要人工帮助剪除部分枝叶更换保水基质后才能恢复。

1.3 建立萱草耐干旱评价筛选体系

耐干旱萱草品种的筛选和鉴定是选育耐干旱萱草品种的基础。植物遭受到干旱胁迫后,植物地上部分的外观形态变化是最直观可见(图 6),但难以定量

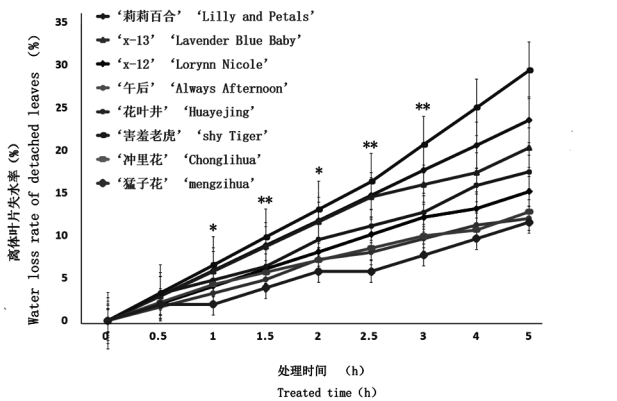


图4 萱草品种间离体叶片失水率比较

注: *, **: $p < 0.05$ 与 $p < 0.01$ 的差异

Figure 4 Comparison of water loss of detached leaves among different daylily cultivars

Note: *, **: The difference between $p < 0.05$ and $p < 0.01$

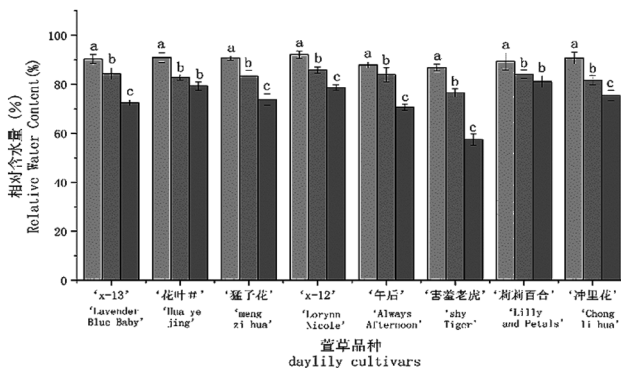


图5 干旱胁迫下萱草品种间相对含水量的比较

注: 不同小写字母表示 $p < 0.05$ 水平的显著性差异

Figure 5 Comparison of relative water content under drought stress (RWC)

Note: The different lowercase letter in the picture indicate significant difference of $p < 0.05$

比较。因此本研究通过叶片形态指标(表3)、叶片颜色指标(表4)、叶片质感指标(表5)、干旱胁迫形态指数(表6)和复水7d后萱草形态变化指标的综合评价(表7),建立萱草耐干旱评价等级标准评价基于叶片温度为指标筛选出的萱草品种(表8),分别为I级(高度耐干旱)、II级(耐干旱)、III级(不耐干旱)和IV级(极不耐干旱)。根据此分级标准,在进行抗旱性测试的萱草品种中,‘猛子花’为高度耐干旱萱草品种,‘莉莉百合’、‘冲里花’和‘花叶井’为耐干旱萱草品种,‘X-12’、‘X-13’和‘午后’为不耐干旱萱草品种,‘害羞老虎’为极不耐干旱萱草品种(表9)。

1.4 萱草叶面温度、耐干旱指标和耐旱性相关性分析

表10列出了各变量的相关系数,平均数和标准



图6 不同萱草品种干旱处理后的形态观察

注: 0 d, 7 d, 14 d, 21 d, 28 d 为干旱胁迫实验处理天数, 复水 7 d 为干旱胁迫试验后正常浇水 7 天

Figure 6 Morphological characteristics of difference daylily cultivars after drought stress treatment

Note: 0 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d were the treatment times of drought stress experiment, and 7d of rewatering was the normal

差。从表中可以看出叶面温度与萱草气孔密度、萱草相对含水量存在显著的负相关,与耐旱性存在显著正相关。气孔密度和气孔导度、相对含水量、离体叶片失水率存在中度的正相关。气孔导度与相对含水量呈弱的负相关。

2 讨论

耐干旱品种适用性较强,且可减少养护费用、节约水资源,由于全世界有大量的干旱或半干旱地区,因此耐干旱植物的选育有比较重要的意义。耐干旱植物的选育一般采用叶片相对电导率、质膜透性、丙二醛含量、脯氨酸含量、叶片可溶性糖等耐干旱指标,特别是通过观察干旱处理及复水后的植物生长状态的变化等方法来综合判断(Chen et al., 2016)。但上述方法费时费力,同时会给植物带来一些不可逆的损害。因此非常有必要建立了一个简单、直观的耐干旱萱草筛选和评价方法可为萱草抗旱品种的大规

表 3 叶片形态指标分级和得分标准

Table 3 The Classification and scoring standard of leaf shape index

观测值分级	叶片形态	得分
Observation index classification	Leaf morphology	Scoring
I	叶片自然舒展 Leaves unfold naturally	5
II	叶尖焦化, 形态舒展 Blades' top display coking, but leaves still unfold	4
III	叶尖, 叶边缘焦化干枯, 形态卷曲 Blades' top and leaf edges display coking, leaves crimp	3
IV	叶片干枯萎蔫下垂 Leaves wither and wilt	2
V	叶片萎蔫卷曲, 干枯脱落 Leaves wither, crimp and fall off	1

表 4 叶片颜色指标分级和得分标准

Table 4 The grading and scoring of the leaf color criteria

观测值分级	叶色	得分
Observation index classification	Leaf color	Scoring
I	全株绿叶, 叶片自然舒展 Whole plant displays green, and leaves unfold naturally	5
II	叶尖焦化 Blades' top display coking	4
III	叶尖焦化, 叶边缘干枯 Blades' top display coking and leaf edges withered	3
IV	焦枯叶片占全株 1/2 Scorched leaves account for one-half of the whole plant	2
V	焦枯叶片占全株 2/3 Scorched leaves account for two thirds of the plant	1

表 5 叶片质感指标分级和得分标准

Table 5 Grading range and scoring standard of leaf texture and glossiness index

观测值分级	叶片质感和光泽度	得分
Observation index classification	Leaf texture and glossiness	Scoring
I	叶片饱满水润, 富有光泽 Leaves are full of water and luster	2
II	叶片干枯粗糙, 叶脉显现 Leaves are dry and rough, and veins appear	1

模、筛选和评价体系。

耐干旱植物一般能持久地保持水分, 气孔蒸腾失水一般占蒸腾作用总失水的 80%~90%, 有学者研究运用切枝蒸腾法发现植物气孔蒸腾远高于角质层蒸腾(温国胜等, 2003)。在遭遇到干旱胁迫, 植物迅速有效地通过气孔调控来改变植株自身的生理状态。一般情况下, 为响应干旱胁迫, 植物体内 ABA 浓度上升, 并导致气孔迅速地关闭、蒸腾速率降低, 以减

少水分的散失(温达志等, 2000; Chen et al., 2016)。由于叶片表面温度与气孔开度之间存在很大的相关性(Negi et al., 2008), 因此本实验尝试利用叶片表面温度来进行大规模无损检测, 再通过上述方法进行验证。从表 10 可以看出萱草叶面温度与抗旱能力呈正相关, 因此叶面温度的确可用于植物抗旱能力的初步评估。

本实验在叶面温度大规模测定的基础上, 选取

表 6 萱草干旱胁迫形态指数分级

Table 6 Classification of morphological drought resistance index of daylily cultivars under drought stress

抗旱分级	干旱表型(28 d 干旱处理)
Drought resistance classification	Morphological changes of drought stress (28 d drought treatment)
I	叶片自然向外延展, 全株绿叶, 叶尖绿色, 复水 7 d, 萱草恢复正常 The leaves naturally extend outward, the whole plant displays green, blades' top is green, and the plants returns to normal after 7 days of rehydration
II	中层叶片向内翻卷, 外层开始萎蔫枯黄, 叶尖及边缘焦化, 复水 7 d, 萱草恢复正常 The middle layer of leaves rolled inward, the outer layer began to wilt and wither, and the tip and edge of leaves were coked, and the plants returns to normal after 7 days of rehydration
III	中层叶片萎蔫下垂, 外层叶片焦化干枯 Middle layer leaves wilt and droop, outer layer leaves scorch and dry
IV	外层焦化干枯叶片占全株 1/2, 全株萎蔫卷曲, 叶片干枯 Coking leaves of the outer layer accounts for one-half of the whole plant, the whole plant is wilted and curled, and the leaves are dry
V	干枯叶片占全株 2/3, 植物皱缩干枯, 复水无法恢复, 植株死亡 The withered leaves account for two thirds of the whole plant, the plant shrinks and dries up, plants cannot be recovered after rehydration, and the plant dies finally

表 7 复水 7 d 后萱草形态变化指标评级和得分标准

Table 7 The grading range and scoring standard of morphological change indexes 7 days after recover

观测值分级	恢复 7 d 形态变化	得分
Observation index classification	Morphological changes after 7 d of watering	Scoring
I	无需干预, 自然恢复 Natural recovery without intervention	4
II	剪除部分枝叶, 自然恢复 Natural recovery after cutting off some leaves	3
III	剪除部分枝叶, 更换基质, 自然恢复 Natural recovery after cutting off some leaves and replacing culture media	2
IV	剪除部分枝叶, 更换基质, 植株死亡 The plant dies finally, even after cutting off some leaves and replacing culture media	1

表 8 萱草耐干旱评价等级

Table 8 Evaluation system of drought tolerance and determination of drought tolerance grade

抗旱性综合评级	得分	耐旱级别
Comprehensive rating of drought resistance	Scoring	Drought tolerance level
I	14-16	高度耐干旱 Highly resistance to drought stress
II	11-13	耐干旱 Resistance to drought stress
III	7-10	不耐干旱 Sensitive to drought stress
IV	0-6	极不耐干旱 Highly sensitive to drought stress

了 8 个品种进行了进一步一系列耐旱指标的测定。选取了 8 个品种中‘猛子花’和‘冲里花’叶面温度较高超过 32℃, 其它几个萱草品种的叶面温度较低, 在

29℃左右。这 8 个品种中有 4 个四倍体萱草品种, 分别为‘莉莉百合’、‘x-12’、‘午后’和‘花叶井’, 它们的叶面温度都较低。其原因可能与多倍体植物的气孔

表 9 供试萱草品种形态耐干旱分级

Table 9 Drought tolerance classification of tested daylily cultivars

编号 Number	名称 Name	地上形态部分筛选指标 Partial screening of aboveground morphology				耐旱得分 Drought tolerance score	耐旱等级 Drought tolerance grade
		叶片形态 Leaf morphology	叶片颜色 Leaf color	叶片质感 Leaf texture	复水形态 Morphology after rewatering		
1	‘莉莉百合’ ‘Lilly and Petals’	4	4	1	3	12	II
2	‘x-13’ ‘Lavender Blue Baby’	3	3	1	2	9	III
3	‘x-12’ ‘Lorynn Nicole’	2	2	1	2	7	III
4	‘害羞老虎’ ‘Shy Tiger’	2	1	1	2	6	IV
5	‘猛子花’ ‘Mengzihua’	5	4	1	4	14	I
6	‘午后’ ‘Always Afternoon’	3	2	1	3	9	III
7	‘花叶井’ ‘Huayejing’	3	3	2	3	11	II
8	‘冲里花’ ‘Chonglihua’	3	3	1	4	11	II

表 10 萱草叶面温度、耐干旱指标和耐旱性相关性分析

Table 10 Correlation analysis of leaf temperature, drought tolerance index and drought tolerance ability of daylily

	M	SD	1	2	3	4	5	6
1 叶面温度 Leaf surface temperature	30.26	1.87	1					
2 气孔密度 Stomatal density	158.13	49.08	-0.576 **					
3 气孔导度 Stomatal conductance	0.06	0.02	-0.421 *	0.622 **	1			
4 相对含水量 Relative water content	73.63	7.45	-0.530 **	0.549 **	0.035	1		
5 离体叶片失水率 Water loss rate of detach leaves	0.17	0.07	-0.427 *	0.651 **	0.702 **	0.105	1	
6 耐旱性 Drought tolerance grade	9.875	2.73	0.783 **	-0.566 **	-0.413 *	-0.472 **	-0.604 **	1

注: *, **: $p < 0.05$ 与 $p < 0.01$ 的差异

Note: *, **: The difference between $p < 0.05$ and $p < 0.01$

开度一般明显大于二倍体植物,蒸腾作用较为旺盛,导致叶面温度较低 (Korban et al., 2009; Podwyszynska et al., 2015)。从图 1 也可以看出四倍体萱草叶面温度要明显低于二倍体萱草,因此可以推测四倍体萱草的抗旱能力可能不如二倍体萱草,当然影响植物耐旱性的因素除了叶片水分蒸发(其主要表现为叶

面温度)外,植物特别是根的生长情况也是耐干旱的重要因素,四倍体萱草相较于二倍体萱草有更高的根冠比,根的数量较多,根系深度、广度都有提升 (Wang et al., 2016)。因此四倍体萱草‘莉莉百合’在实验中有更高的气孔导度,更低的叶面温度,但也可以通过较强的根系度过干旱期。四倍体萱草都是萱草

育种者用过加倍而来,因此二倍体萱草更适合用于耐旱基因挖掘和遗传转化研究,本实验通过叶面温度初步筛选和耐干旱验证在二倍体萱草中筛选得到1个高度耐干旱(I级)品种‘猛子花’(其叶面温度较高,达32.6℃)。四倍体萱草具有枝叶粗壮、内含物多,在重瓣、花色、花瓣边缘褶皱和花型等方面具有独特的优势,而这些正是近些年来美国萱草协会评选获奖萱草品种的主要特点(何琦等,2011),因此从筛选耐旱四倍体萱草尤为重要。本实验从四倍体植物中筛选得到2个耐干旱萱草(II级),分别为‘莉莉百合’和‘花叶井’。本实验结果为下一步萱草耐旱育种及耐旱基因的挖掘提供参考。

3 材料与方 法

3.1 供试材料

萱草材料从美国、山东德州、山西等地引种、苗龄为三年,约149个品种(表1)。上述萱草种植于上海应用技术大学植物园或使用上口直径30 cm,下口直径24 cm,高约28 cm,温室栽培,以草炭,蛭石,珍珠岩以4:2:2的比例调配基质,正常田间管理。

3.2 测定方法

萱草叶面温度测定: 实验在上海应用技术大学植物园玻璃温室进行,时间为2018年8月,实验使用菲力尔(FLIR)红外热成像仪(E75型号)测定萱草叶面温度,所选植株已盆栽栽培一年以上,无病虫害,生长健壮。选取中层成熟叶片上三分之一处部向阳面,同时避免阳光直射,排除日光反射对精密红外测温仪的影响,随机选取三个点测定叶面温度指标取平均值,实验重复三次。

离体叶片失水率的测定:2018年8月,早上8:00~10:00分别从待测萱草上剪取3片叶片置于称量纸上称重,放在室内弱光下,置于称量纸上,避免阳光直射,室内恒温并保持20℃放置不同时间段(分别是0,0.5,1,1.5和2 h),称量叶片的重量,称量5次。实验重复三次,以此来计算不同品种萱草叶片失水率。**相对含水量(RWC)测定:**2018年8~9月,早上8:00~10:00,剪取干旱处理0 d,7 d,14 d生理状态相似不同品种的萱草三片中层成熟的叶片,迅速装入实验袋封装。并置于冰盒中迅速带回实验室,实验室保持恒温,避光。将实验材料从塑料取出,擦干叶片上的水分,用万分之一电子天平称量,记录叶片初始重量,即样品鲜重(W_f),放入蒸馏水中吸水24 h后,称

饱和重(W_s),然后将叶片放入80℃烘箱中烘干48 h,称干重(W_d),计算各品种萱草的相对含水量 $RWC = (W_f - W_d) / (W_s - W_d)$,实验重复三次,取平均值。

气孔导度测定: 采用LI-6400XT便携式光合作用测量系统(美国LI-COR公司),在上午9~12点自然光照下,随机选取不同品种萱草叶片向阳面进行测定,待系统稳定后,测定气孔导度。

气孔密度测定: 将带有植物下表皮的萱草叶片载玻片放在500倍的电子扫描显微镜(Hitachi S-3400N)下观察,运用显微测量软件对气孔特性指标进行测定,气孔数量观测为5个视野。

DNA倍性检测: 采用便携式流式细胞仪CyFlow Counter 希森美康按如下步骤测定萱草DNA倍性。(1)取10~15 mg新鲜、幼嫩萱草叶片组织样本置于培养皿中,滴加400 uL核提取缓冲液,使用锋利刀片切碎叶片至糊状(材料须浸没在解离液里,以便更好地游离细胞核),切割60~180 s保证萱草组织均匀切碎,加入1 600 μ L,DAPI染色溶液,4℃静置10 min,使用30 μ m(400目)过滤样本,将样品移至上样管。(2)利用CyFlow Counter流式细胞仪检测。(3)出峰后记录分析萱草倍性。

萱草干旱胁迫实验:2018年8月至9月期间,选取盆栽培养一年以上的萱草植株作为实验材料,无病虫害,生长健壮,生理状态相似,采用盆栽控水实验,定植于装有等量基质的栽培盆中,花盆口径规格均为30 cm。实验前一天浇足水分后持续进行干旱胁迫实验,期间保持每盆萱草基质含水量基本保持一致,并分别在干旱处理0 d,7 d,14 d,21 d,28 d拍照记录不同品种间的形态表现,每次拍照记录相隔7 d。干旱胁迫28 d,之后开展复水实验,复水7 d时拍照记录复水后萱草的生长状况。

3.3 数据处理

实验采用Excel2019统计软件对调查数据进行分析,计算平均值和标准偏差,使用绘制出图表,再用SPSS21.0软件进行分析处理,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),用Duncan多重比较检验不同品种植株的差异(在 $p < 0.05$ 水平上进行比较),3次重复;图片用Photoshop CC进行处理。

作者贡献

倪迪安和李昊是本研究的试验设计者,李昊是试验研究的执行人同时完成数据分析和论文初稿的写作;季顶宇和吉子宜,协助实验执行;尹冬梅、刘翔

和秦巧平参与试验设计, 试验结果分析; 倪迪安和张志国是项目的负责人, 指导试验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由上海市科技兴农项目[2019-02-08-00-08-F01107]资助。

参考文献

- Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D., and Reddy A.R., 2003, Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars, *Plant Growth Regulation*, 40: 75-80
- Chen S.F., Liang K., Yin D.M., Ni D.A., Zhang Z.G., and Ruan Y.L., 2016, Ectopic expression of a tobacco vacuolar invertase inhibitor in guard cells confers drought tolerance in *Arabidopsis*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 36(6): 1381-1385
- Clarke J.M., Romagosa I., Jana S., Srivastava J.P., and Mccaig T. N., 1989, Relationship of excised-leaf water loss and yield of durum wheat in diverse environments, *Canadian J. Plant Sci.*, 69(4): 1075-1081
- Gholami M., Rahemi M., and Rastegar S., 2012, Use of rapid screening methods for detecting drought tolerant cultivars of fig (*Ficus carica* L.), *Scientia Horticulturae*, 143: 7-14
- He Q., Gao Y.K., and Gao S.Y., 2011, Advances in *Hemerocallis* Breeding, *Heilongjiang Nongye Kexue* (Heilongjiang Agricultural Sciences), (3): 137-139 (何琦, 高亦珂, 高淑滢, 2011, 萱草育种研究进展, *黑龙江农业科学*, (3): 137-139)
- Jin L.M., Zhou Y.Z., Guo Z.H., and Huang B.J., 2012, Effect of inbred, hybrid and different cultivation environments on seed setting characteristics of *Hemerocallis hybrid*, *Hubei Nongye Kexue* (Hubei Agricultural Sci), 51(13): 2760-2763 (金立敏, 周玉珍, 郭志海, 黄保健, 2012, 大花萱草自交, 杂交及不同栽培环境结实率比较, *湖北农业科学*, 51(13): 2760-2763)
- Korban S.S., Wannarat W., Rayburn C.M., Tatum T.C., and Rayburn A.L., 2009, Genome size and nucleotypic variation in *Malus* germplasm, *Genome*, 52(2): 148-155
- Negi J., Matsuda O., Nagasawa T., and Oba Y., Takahashi H., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Hashimoto M., and Iba K., 2008, CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells, *Nature*, 452(7186): 483-486
- Reddy A.R., Claitanya K.V., and Vivekanadan M., 2004, Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *J. Plant Physiol.*, 161(11): 1189-1202
- Rodriguez-Enriquez M.J., and Grant-Downton R.T., 2013, A new day dawning: *Hemerocallis* (daylily) as a future model organism, *AoB Plants*, 5: pls055
- Wen G.S., Zhang G.S., Zhang M.R., Wang L.R., and Ji C.X., 2003, Stomatal transpiration and cuticular transpiration of *Sabina vulgaris* under drought stress, *Zhejiang Linxueyuan Xuebao* (Journal of Zhejiang Forestry College), 20 (3): 268-272 (温国胜, 张国盛, 张明如, 王林和, 吉川贤, 2003, 干旱胁迫条件下臭柏的气孔蒸腾与角质层蒸腾, *浙江林学院学报*, 20(3): 268-272)
- Wen Z.D., Zhou G.Y., Zhang D.Q., Ding M.M., Huang D.G., Luo Z.L., and Li D.M., 2000, A comparison on transpiration rate and water use efficiency in leaves of four forage grasses. (*Journal of tropical and Subtropical Botany*), S3: 67-76 (温达志, 周国逸, 张德强, 丁明懋, 黄得光, 罗仲良, 李德明, 2000, 四种禾本科牧草植物蒸腾速率与水分利用效率的比较, *热带亚热带植物学报*, S3: 67-76)
- Perera R.S., Cullen B.R., and Eckard R.J., 2019, Using Leaf Temperature to Improve Simulation of Heat and Drought Stresses in a Biophysical Model, *Plants*, 9(8): 8
- Podwyszynska M., Gabryszewska E., and Dyki B., 2015, Phenotypic and genome size changes (variation) in synthetic tetraploids of daylily (*Hemerocallis*) in relation to their diploid counterparts, *Euphytica*, 203: 1-16
- Sun C.X., and Shen X.Y., 2002, Advances in Studies on identification indexes and methods of quantitative analyses for crop drought resistance, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 18(1): 49-51 (孙彩霞, 沈秀瑛, 2002, 作物抗旱性鉴定指标及数量分析方法的研究进展, *中国农学通报*, 18(1): 49-51)
- Wang X.L., Wang H.W., Liu S.X., Ferjani A., Li J.S., Yan J.B., Yang X.H., and Qin F., 2016, Genetic variation in ZmVPP1 contributes to drought tolerance in maize seedlings, *Nature Genetics*, 48(10): 1233-1241
- Yang S.Q., Xu Q., Liu Y.P., Wang X.M., Cai Y.F., Pei L., and Guo W.Z., 2015, Research on the photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristic of winter wheat, *Nongxue Xuebao* (Journal of Agriculture), (3): 5-10 (杨淑巧, 许琦, 刘跃鹏, 王晓民, 柴永峰, 裴蕾, 郭文治, 2015, 冬小麦光合作用和叶绿素荧光特性的研究, *农学学报*, (3): 5-10)