

引文格式: 张慧, 阮明菊, 王韦, 等. 辣木甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变及表型变异的初步研究[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2022, 37(2): 302–310. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202107026

辣木甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变及 表型变异的初步研究*

张 慧^{1#}, 阮明菊^{1#}, 王 韦¹, 王 睿¹, 杜建武¹, 曾千春^{1,2**}

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南辣木研究所, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】通过甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变筛选获得性状优良的多油辣木 (*Moringa oleifera* Lam.) PKM-1 品种基础材料, 为后续育种提供有利种质资源。【方法】设置 5 个 EMS 质量分数 (0、0.7%、0.9%、1.1% 和 1.3%) 及 2 个处理时间 (10 和 12 h) 诱变处理多油辣木 PKM-1 种子, 分析出苗情况及 M₁ 代幼苗相对成苗率, 得到适宜的处理参数; 分析诱变后代 M₁ 和 M₂ 代的表型变异特征。【结果】EMS 处理可极显著降低辣木种子出苗率和相对出苗率 ($P<0.01$), EMS 质量分数越高, 起始出苗时间越长; EMS 抑制辣木幼根的生长, 随着 EMS 质量分数的增加, 根长逐渐变短, 苗高也受到不同程度抑制。1.1% EMS 处理 10 h, 辣木种子的相对出苗率和相对成苗率分别为 58.60% 和 57.07%, 诱变效果最佳。进一步 EMS 诱变处理辣木种子 700 粒, 共筛选获得 M₁ 代变异材料 88 株, 变异频率为 33.33%; M₂ 代变异材料 132 株, 变异频率为 43.14%; M₁-M₂ 代变异性状遗传频率为 10.26%, M₂ 代新出现变异株 68 株, 变异频率为 35.98%。【结论】本研究确定了辣木种子 EMS 诱变的最佳参数为 1.1% EMS 处理 10 h, M₁ 和 M₂ 代分别筛选出 9 种和 11 种表型变异材料, 为 M₃ 代获得稳定遗传可供育种利用的新材料奠定了基础。

关键词: 辣木; 甲基磺酸乙酯 (EMS); 诱变; 表型变异

中图分类号: Q949.748.503

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 02-0302-09

Preliminary Study on the Ethyl Methane Sulfonate Mutagenesis and Phenotypic Variation of *Moringa oleifera* Lam.

ZHANG Hui¹, RUAN Mingju¹, WANG Wei¹, WANG Rui¹, DU Jianwu¹, ZENG Qianchun^{1,2}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Moringa Research Institute, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To obtain the variety PKM-1 of *Moringa oleifera* Lam. with excellent traits and provide basic research materials to support the follow-up genetic improvement and breeding of *M. oleifera*, the ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis was exploited to generate mutants.

[Methods] Seeds of the PKM-1 from *M. oleifera* were subjected to be treated with five EMS mass fractions (0, 0.7%, 0.9%, 1.1%, and 1.3%) along with time periods 10 or 12 hours. The effects of EMS

收稿日期: 2021-07-12

修回日期: 2021-10-16

网络首发日期: 2022-03-22

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860414); 国家现代农业产业技术体系辣木育种岗位项目 (CARS-11-YNZQC); 云南省院士专家工作站 (2019IC007)。

作者简介: #对本文文献等同, 为并列第一作者。张慧 (1984—), 女, 山西晋中人, 博士, 讲师, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 627637829@qq.com; 阮明菊 (1996—), 女, 云南临沧人, 在读硕士研究生, 主要从事分子设计与种质创新研究。E-mail: 1183623018@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 曾千春 (1964—), 男, 湖南祁阳人, 博士, 教授, 主要从事作物种质创新与育种研究。E-mail: zengqianchun@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220319.1936.001.html>



treatment on the seed emergence and seedling growth were analyzed, and the optimal combination for PKM-1 EMS mutagenesis was then determined, and the phenotypic variation characteristics of the mutagenesis in the offspring M_1 and M_2 were analyzed. [Results] The seedling emergence rate and relative seedling emergence rate of *M. oleifera* were extremely significantly reduced with EMS treatment ($P<0.01$). The higher the EMS mass fraction, the longer the initial germination time. The seeds emergence and the root growth of PKM-1 were both inhibited by EMS treatment. With the increase of EMS mass fraction, the root length gradually became shorter and the seedling height was either inhibited to some extent. The relative emergence rate and seedling formation rate of *M. oleifera* seeds treated with 1.1% EMS mass fraction for 10 hours were 58.60% and 57.07%, respectively, demonstrating the best mutagenesis effect. Furthermore, 700 *M. oleifera* seeds were treated by EMS mutagenesis. A total of 88 mutant materials of M_1 generation were obtained, with a mutation frequency of 33.33%; and 132 M_2 generation mutant materials were obtained, and the variation frequency was 43.14%. The genetic frequency of mutant traits among M_1 - M_2 generation was 10.26%. The number of new mutant lines in M_2 generation was 68, and the variation frequency was 35.98%.

[Conclusion] The optimal parameters for EMS mutagenesis of *M. oleifera* seeds were 1.1% EMS with 10 hours treatment. Nine phenotypic variation materials of M_1 and 11 phenotypic variation materials of M_2 were generated, which laid a foundation for obtaining stable genetic mutants of *M. oleifera* in the next M_3 .

Keywords: *Moringa oleifera*; ethyl methane sulfonate (EMS); mutagenesis; phenotypic variation

辣木为辣木科 (Moringaceae) 辣木属 (*Moringa* Adans) 热带落叶木本蔬菜及油料植物, 富含多种营养物质^[1], 具有极高的药用、生态和经济价值^[2]; 目前中国已经引种栽培印度传统辣木、印度改良辣木和非洲辣木 3 个品种, 主要分布在云南、贵州、广东、广西、海南和台湾等省区^[3]。云南辣木主栽品种为多油辣木 PKM-1, 杂交指数为 5, 以异花授粉为主, 品种内高度杂合, 种性容易退化^[4]。目前, 辣木优质种质资源少, 选育具有优良性状的辣木新品种具有重要意义。

已有辣木研究主要集中于辣木功能成分^[5]、药用价值^[6]、栽培技术^[7]和辣木快繁^[8]等方面。黄苏南等^[9]曾尝试通过花药培养获得双单倍体植株, 实现 PKM-1 品种内纯合。甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 诱变具有突变类型广、突变频率高和染色体损伤小等优势, 是植物诱变育种中应用最广泛、效果最好的一种化学诱变方法, 已经在木本植物的突变体育种研究及种质资源创制中取得了一定进展^[10]。安佰义等^[11]以白桦种子为材料进行 EMS 诱变筛选, 得出 EMS 诱变不但延迟了种子发芽起始时间, 还显著降低了白

桦种子发芽率; 陈敦萍等^[12]用 EMS 处理小桐子种子, 在 M_1 代诱变植株中共筛选到 7 株具有冠幅较大、叶片繁密和长势较好的明显表型变异单株; 李玉环^[13]运用 EMS 诱变亚麻种子构建亚麻突变体库并筛选出具有耐盐性的抗逆品种; 叶春秀等^[14]运用 EMS 处理陆地棉, M_2 代中获得双茎、无顶端和子叶黄斑等突变植株, 对部分 M_2 代及突变植株进行 SSR 分析后显示突变植株与对照在电泳条带上存在差异, 一定程度上说明其在 DNA 水平上发生了变异。

辣木是从国外引进的植物, 虽然现在对辣木的研究逐渐深入, 但多集中于栽培技术、引种试种和产品开发等方面, 在种质创新和新品种选育方面研究较少, 关于 EMS 诱变辣木的研究还未见报道。因此, 本研究以多油辣木 PKM-1 种子为材料, 分析 5 个 EMS 质量分数和 2 个处理时间对辣木种子出苗及苗期生长情况的影响, 筛选出 EMS 诱变辣木种子的最佳条件, 并对其 M_1 和 M_2 代表型变异特征进行分析, 为辣木种质创新以及培育优质的辣木新品种提供基础材料和理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为多油辣木 PKM-1 种子, 2018 年收获于云南省农业科学院热区生态农业研究所辣木试验基地。EMS 诱变剂购于美国 SIGMA 公司, 货号为 M0880。

1.2 试验方法

1.2.1 EMS 最佳诱变条件的筛选

参照 EMS 对杉木^[15]和青檀^[16]等的诱变处理条件, 共设置 5 个 EMS 质量分数 (0、0.7%、0.9%、1.1% 和 1.3%) 及 2 个处理时间 (10 和 12 h)。EMS 质量分数的配制按照崔霞等^[17]的方法, 溶质为 EMS 诱变剂, 溶剂为 pH 7.0 的磷酸缓冲液, 以不添加 EMS 诱变剂的磷酸缓冲液为对照。选取饱满、完好的辣木种子清水浸泡 4 h, 充分吸水后晾干, 于不同质量分数的 EMS 中浸泡处理。浸泡期间用玻璃棒搅拌, 处理完成后用 0.5% 硫代硫酸钠中和 10 min, 流水冲洗 2 h, 播种至盛有沙土的育苗盘 (长×宽×高为 40 cm×30 cm×12 cm), 播种深度 1~2 cm, 每处理播种 1 盘, 每盘播种 10 行, 每行 15 粒。育苗盘放置于温度 15~40 ℃ 的大棚中, 适时浇水保持土壤湿度约为 65%。每个处理 150 粒种子, 试验重复 3 次。

1.2.2 M₁ 代测定指标及其方法

播种后第 5 天起, 每天观察出苗情况, 记录出苗时间和出苗株数。在各盘中随机标记 5 株同一天出苗的植株, 至第 5 天时测量其根长和苗高, 然后移植到营养袋中; 其余材料待苗高约 3 cm 时移植至装有配方土 ($V_{\text{育苗基质}}:V_{\text{黄土}}:V_{\text{沙子}}=6:3:1$) 的营养袋中。适时浇水保持土壤湿度约为 65%, 保持温度 15~40 ℃, 第 15 天统计移植后的成活株数。各指标计算方法为:

出苗率=出苗种子数/种子总数×100%;

相对出苗率=处理组出苗率/对照组出苗率×100%;

相对致死率=(对照组出苗率-各处理组出苗率)/对照组出苗率×100%;

相对成苗率=移植后成活株数/移植总株数×100%。

1.2.3 M₁ 和 M₂ 代种植与表型变异植株筛选

2019 年春季, 用筛选到的适宜质量分数和时间处理辣木种子 700 粒, 构建 M₁ 代群体。当育苗袋中的辣木幼苗长到约 30 cm 时, 将幼苗定植

到元谋辣木试验基地 (N25°41', E101°52', 平均海拔 898 m)。该地区气候属典型南亚热带干热季风气候, 年平均气温 21.9 ℃, 年平均降水量 613.8 mm。株行距为 1.0 m×1.0 m, 定植后浇定根水, 常规田间管理。在 M₁ 代植株生长期, 从株型、叶型和叶色等对表型性状变异的植株进行筛选, 并通过拍照记录与对照植株存在性状差异的单株, 统计植株突变类型并计算植株突变率: 突变率=突变株数/成活总株数×100%。果实成熟后, 按单株采收辣木种子。

2020 年 8 月, 从 M₁ 代中挑选 49 个表型变异单株和 52 个表型正常单株 (小叶对生, 薄纸质, 全缘, 叶片平展, 叶面为绿色, 植株形状较松散) 共计 101 份辣木种子按株系 (M₂) 播种, 每株选取 6 粒饱满的种子作为 M₂ 代株系进行育苗播种, 每个株系定植 3~5 株, 对照组定植 3 株。M₂ 代播种于同为干热河谷的元江沙坪坝辣木试验基地 (N23°62', E101°95', 海拔 380 m)。该地区年平均气温 23.4 ℃, 年平均降水量 738 mm。株行距为 1.2 m×1.2 m, M₂ 代群体共存活 306 个单株 (101 个株系), 构建成 M₂ 代群体。常规田间管理。全生育期调查记录变异表型、变异株数量及比例, 并对各突变表型进行拍照。

1.3 M₁ 和 M₂ 代性状变异及表型分析

根据 M₁ 代变异株的特点进行 M₂ 代株系突变性状的重复观测与表型鉴定, 计算 M₂ 代中 M₁ 代的变异性状遗传频率和 M₂ 代新增突变频率:

M_1-M_2 代的表型变异性状遗传频率=对应 M₂ 代中与 M₁ 代出现相同表型变异株数/M₁ 代变异总株数×100%;

M_2 代新增表型突变频率 = M₁ 代未出现变异但 M₂ 代出现变异总株数/M₁ 代正常表型总株数×100%。

1.4 数据统计与分析

使用 SPSS 22、DPS 7.05 和 Excel 软件进行数据统计和分析。

2 结果与分析

2.1 EMS 处理对辣木种子出苗的影响

由表 1 可知: 不同质量分数 EMS 处理 10 和 12 h 后, 辣木种子的出苗均受到抑制, 且随着 EMS 质量分数的增加, 辣木种子的出苗率和相对出苗率均极显著降低 ($P<0.01$), 相对致死率极显

表 1 不同质量分数 EMS 诱变处理对辣木种子出苗的影响

Tab. 1 Effects of different mass fractions of EMS on the emergence of *Moringa oleifera* seeds

处理时间/h treatment time	EMS质量分数/% EMS mass fraction	出苗率/% seedling emergence rate	相对出苗率/% relative seedling rate	相对致死率/% relative fatality
10	0 (CK)	77.33±0.88 Aa	100.00±0.77 Aa	0.00±0.77 Ee
	0.7	69.33±1.86 Bb	89.65±1.42 Bb	10.44±1.42 Dd
	0.9	57.66±2.91 Cc	74.64±1.12 Cc	25.36±1.12 Cc
	1.1	45.33±2.03 Dd	58.60±3.13 Dd	41.40±3.13 Bb
	1.3	20.66±1.53 Ee	26.77±1.34 Ee	73.23±1.34 Aa
12	0 (CK)	77.33±0.88 Aa	100.00±1.56 Aa	0.00±1.56 Ee
	0.7	70.00±3.05 Bb	90.52±1.32 Bb	9.48±1.32 Dd
	0.9	49.33±4.37 Cc	63.79±1.36 Cc	36.21±1.36 Cc
	1.1	36.33±2.51 Dd	46.98±1.04 Dd	53.12±1.04 Bb
	1.3	17.33±2.08 Ee	22.39±1.56 Ee	77.61±1.56 Aa

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$); 下同。
Note: In the same column, different lowercase letters mean significant differences ($P<0.05$), different uppercase letters mean extremely significant differences ($P<0.01$); the same as below.

著升高 ($P<0.01$)。结合出苗率和相对致死来看: 1.1% EMS 质量分数处理 10 和 12 h, 辣木种子相对出苗率分别为 58.60% 和 46.98%, 相对致死率分别为 41.40% 和 53.12%, 较接近半致死率。

2.2 EMS 处理对辣木种子出苗进程和相对成苗率的影响

由表 2 可知: 随着 EMS 质量分数的增加和

处理时间的延长, 出苗时间推后、出苗持续时间显著延长, 相对成苗率显著降低。处理 10 h 条件下, 随着 EMS 质量分数的增加, 出苗起始时间由 6.00 d 推后至 14.33 d, 出苗持续时间由 6.67 d 延长至 10.33 d; 处理 12 h 条件下, 随着 EMS 质量分数的增加, 出苗起始时间由 6.00 d 推后至 15.33 d, 出苗持续时间由 6.67 d 延长至 11.00 d。

表 2 不同 EMS 质量分数与处理时间对辣木种子出苗的影响

Tab. 2 Effects of different EMS mass fractions and treatment time on the emergence of *M. oleifera* seeds

处理时间/h treatment time	EMS 质量分数/% EMS mass fraction	相对成苗率/% relative seedling survival rate	出苗起始时间/d initial emergence time	出苗持续时间/d continuous emergence time
10	0 (CK)	100.00±1.73 Aa	6.00±0.00 Fg	6.67±0.33 Bc
	0.7	64.16±2.69 Bb	8.33±0.33 Ef	9.00±0.58 Ab
	0.9	63.75±2.17 Bb	9.67±0.33 Ee	9.00±0.00 Ab
	1.1	57.07±1.59 Cc	12.00±0.58 CDd	9.68±0.33 Ab
	1.3	45.68±2.25 Ee	14.33±0.33 ABb	10.33±0.33 Aa
12	0 (CK)	100.00±1.73 Aa	6.00±0.00 Fg	6.67±0.33 Bc
	0.7	63.57±0.68 Bb	9.33±0.33 Ee	9.00±0.00 Ab
	0.9	50.51±1.74 Dd	11.67±0.33 Dd	9.33±0.33 Ab
	1.1	42.77±1.48 Ee	13.33±0.33 BCc	9.33±0.33 Ab
	1.3	35.67±1.20 Ff	15.33±0.58 Aa	11.00±0.57 Aa

2.3 EMS 质量分数对辣木幼苗生长的影响

由图 1 可知: 随着 EMS 质量分数的增加, 处理 10 和 12 h 均使根长和苗高减小, 其中处理 12 h 的减小幅度更为明显。

2.4 M₁ 代群体性状变异及表型分析

EMS 处理 700 粒辣木种子, 共获得 M₁ 代单株 264 株, 成株率为 37.71%。M₁ 代群体中出现

了丰富的变异, 共有 88 株发生 1 个或多个性状的变异, 变异频率为 33.33% (表 3)。共得到 9 种变异类型的 M₁ 植株 (图 2), 其中叶色变异 3 种 (叶片锈斑、叶片黄化、叶色深绿革质), 叶形变异 5 种 (叶片大、叶片小、叶片卷曲、叶片狭长、连体叶), 株型变异 1 种 (植株矮化)。由于 EMS 的毒害作用, 大部分突变植株未能开花结果, 最

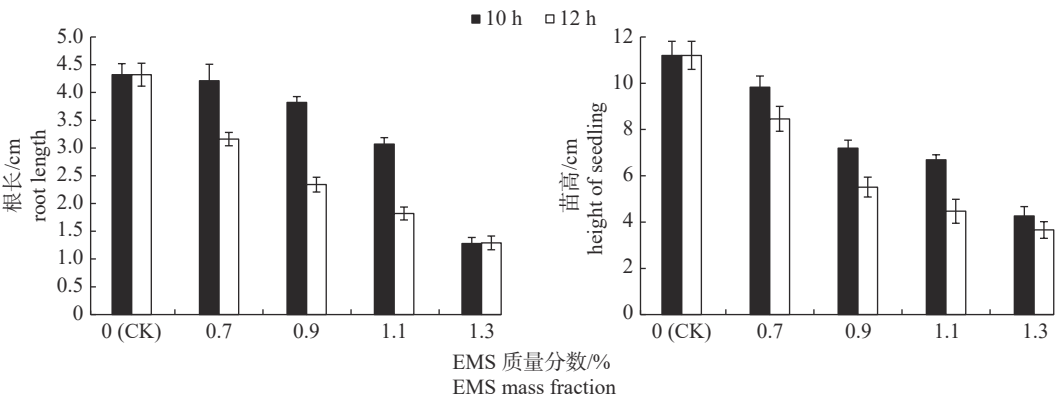


图 1 不同 EMS 质量分数和处理时间对辣木根长和苗高的影响

Fig. 1 Effects of different EMS mass fractions and treatment time on the root length and seedling height of *Moringa oleifera*

表 3 辣木表型突变统计

Tab. 3 Statistics of phenotype mutation of *M. oleifera*

形态学性状 morphological character	表型特征 phenotypic characteristic	突变株数 mutation number	突变频率/% mutation frequency
叶色 leaf color	叶片黄化 leaf yellowing	11	4.17
	叶片锈斑 leaf rust	1	0.38
	深绿革质 dark green and leathery leaf	7	2.65
叶型 leaf type	叶片卷曲 leaf curl	5	1.89
	叶片狭长 narrow length leaf	3	1.52
	连体叶 conjoined leaf	2	0.76
	叶片大 leaf large	19	7.19
	叶片小 leaf small	4	1.14
株型 plant type	植株矮化 dwarfing plant	70	26.52
合计 total		88	33.33

终收获突变单株 49 份。

2.5 M₂ 代群体性状变异及表型分析

M₂ 代共获得 306 个单株 (101 个株系), 并出现了丰富的变异, 部分突变体可见 11 种突变表型, 表现出复合性状突变。由表 4 可知: M₂ 代共鉴定突变株 132 株, 变异频率为 43.14%。其中叶型性状突变 7 种 (图 3), 叶色性状突变 3 种 (图 4), 株型性状突变 1 种 (图 5)。M₁ 的 9 种变异类型中, 叶片卷曲、叶片狭长、叶片大、叶片锈斑、叶片黄化和连体叶在 M₂ 代中有所表现, 但 M₁ 代中叶片深绿革质、叶片小以及变异率最

大的植株矮化在 M₂ 代中未发现, 说明这些表型的变异在 M₂ 代可以恢复。此外, M₂ 代也表现出 M₁ 代不曾有的新变异类型, 如喇叭状叶、叶片倒卵形、叶片尖凹、花叶和芽多分支。其中, 芽多分支表现在植株生长早期, 叶腋分化能力强。

2.6 M₁-M₂ 代变异性状遗传频率

由表 5 可知: M₂ 代共获得的 306 个单株



注: a) 对照; b) 叶色锈斑; c) 叶片大; d) 叶片卷曲; e) 叶片小; f) 叶片狭长; g) 叶片黄化; h) 叶色深绿革质; i) 连体叶; j) 植株矮化。
Note: a) CK; b) leaf rust; c) leaf large; d) leaf curl; e) leaf small; f) narrow length leaf; g) leaf yellowing; h) dark green and leathery leaf; i) conjoined leaf; j) dwarfing plant.

图 2 辣木种子 EMS 诱变获得 9 种变异类型

Fig. 2 Nine kinds of mutant types by EMS treatment in *M. oleifera* seeds

表 4 M₂ 代辣木突变类型统计

Tab. 4 Statistics of mutation type of M₂ generation *M. oleifera*

形态学性状 morphological character	表型特征 phenotypic traits	突变株数 mutation number	突变频率/% mutation frequency
叶型 leaf type	叶片狭长 narrow length leaf	1	0.33
	喇叭状叶 leaf blade hornlike	1	0.33
	连体叶 conjoined leaf	16	5.23
	叶片大 leaf large	77	25.16
	叶片卷曲皱缩 leaf curl and shrivel	61	19.93
	叶片倒卵形 leaf blade obovate	17	5.56
	叶片尖凹 concave blade tip	20	6.54
叶色 leaf color	花叶 mosaic	38	12.42
	叶片锈斑 leaf rust	5	1.63
	叶片黄化 leaf yellowing	2	0.65
株型 plant type	芽多分支 bud multi-branch	14	4.58
合计 total		132	43.14

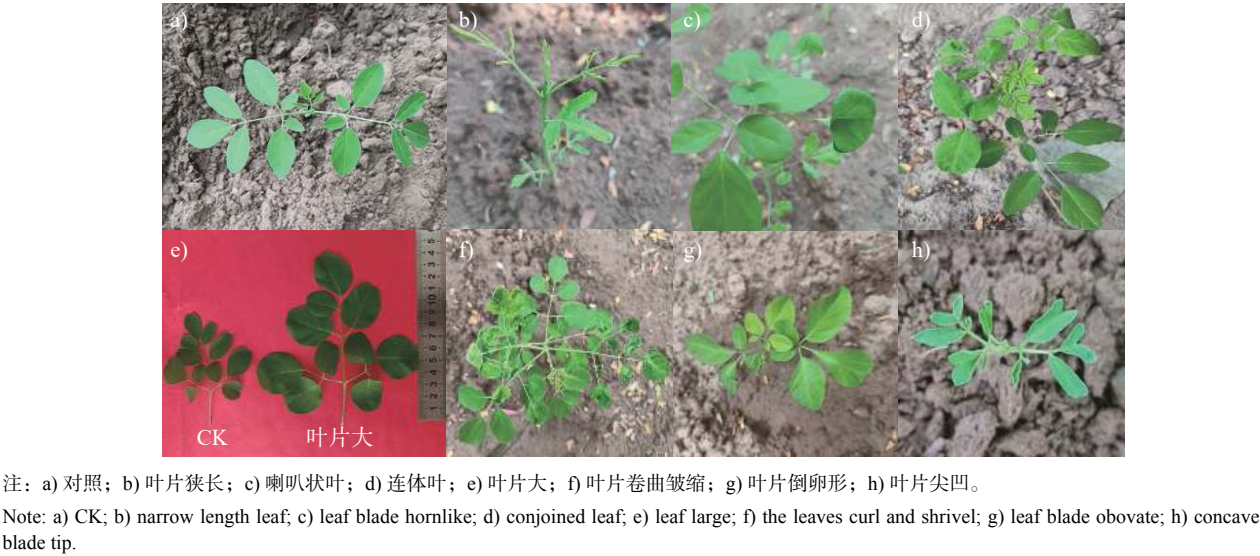


图 3 M₂ 代辣木植株叶型变异

Fig. 3 Leaf type variation of *M. oleifera* in M₂ generation

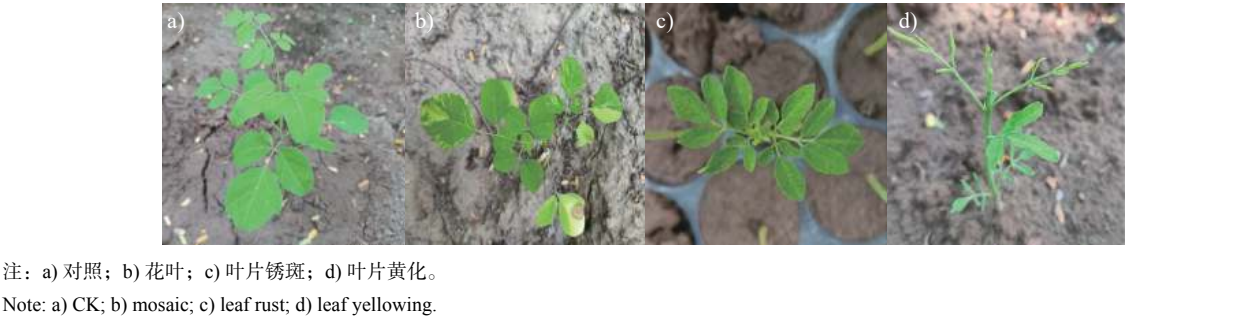
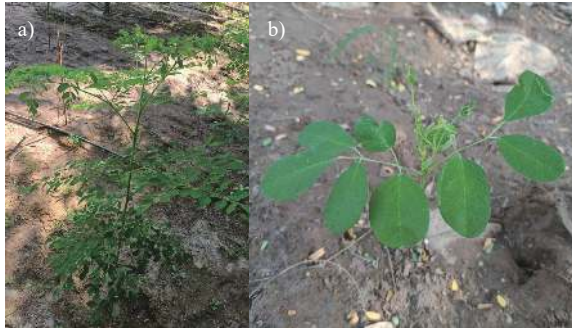


图 4 M₂ 代辣木植株叶色变异

Fig. 4 Leaf color variation of *M. oleifera* in M₂ generation



注: a) 对照; b) 芽多分支。
Note: a) CK; b) bud multi-branch.

图 5 M₂ 代辣木植株株型变异

Fig. 5 Plant type variation of *M. oleifera* in M₂ generation

中, 有 117 株源自 M₁ 代的 49 株突变株, 有 189 株源自 M₁ 代的 52 株正常株。对这 306 株 M₂ 代进行表型突变性状的重观测, 结果显示: 在 M₂ 代中, 与对应 M₁ 代出现相同表型的植株只有 12 株, M₁-M₂ 代表型变异性状遗传频率为 10.26%, 其中叶型的遗传频率最大, 主要为叶型中叶片变大 (6 株, 突变频率为 5.13%); M₁ 代突变频率最大的植株矮化 (26.52%) 在 M₂ 代得到恢复; M₂ 代新出现 68 株变异株, 突变频率为 35.98%; 变异类型主要为叶型变异, 其次为叶色变异, 株型变异 (芽多分支) 的突变频率为 4.23%。

表 5 辣木 EMS 诱变突变类型及频率

Tab. 5 Variation types and frequency of EMS mutagenesis in *M. oleifera*

年份 year	诱变世代 mutagenic generation	材料来源 material source	总株数 total number of plants	突变株数及频率 number and frequency of mutants	突变类型的数量及比例 number and proportion of mutant types		
					叶型 leaf type	叶色 leaf color	株型 plant type
2019—2020	M ₁	700粒辣木种子 700 <i>M. oleifera</i> seeds	264	88 (33.33%)	33 (12.50%)	19 (7.20%)	70 (26.52%)
2020—2021	M ₂	M ₁ 突变株 M ₁ mutant plant	117	12 (10.26%)	11 (9.40%)	1 (0.85%)	0
		M ₁ 正常株 M ₁ normal plant	189	68 (35.98%)	59 (31.22%)	31 (16.40%)	8 (4.23%)

3 讨论

本研究表明: 不同 EMS 质量分数和处理时间均可极显著降低辣木种子出苗率, 这与高维锡等^[18]EMS 诱变处理沙枣种子的研究结果一致。不同质量分数 EMS 和处理时间对辣木种子出苗的抑制表现在种子发芽起始时间和发芽进程延迟, 且随着 EMS 质量分数增加, 抑制效应增强, 这与安佰义等^[11]的研究结果类似。EMS 诱变处理抑制辣木幼苗地上部和地下部的生长, 根长减小 0.09~3.04 cm, 苗高减小 1.37~7.54 cm, 且随着诱变质量分数增加, 抑制作用增强, 这与前人对羊草^[19]和木槿^[20]的研究结果一致。

半致死剂量 (LD₅₀) 是作物 EMS 诱变的关键^[21], 适宜诱变剂质量分数及处理时间是成功诱变突变体植株的关键因素之一^[22]。诱变剂的质量分数越高, EMS 越易溶解产生有机酸, 毒害作用越强, 会对种子产生严重损伤; 若诱变剂的质量分数较低, 则变异不明显^[23-24]。王鹏伟等^[25]以泡桐种子为材料, 确定 120 mg/L EMS 浸种 12 h 能达到较好的半致死效果; 徐刚等^[26]确定 1.2% EMS 诱变处理 8~12 h 为麻疯树种子 EMS 诱变的半致死剂

量; 王莹等^[27]用 LD₅₀ 为指标确定旱柳愈伤组织的 EMS 最佳诱变条件为 0.4% EMS 处理 3 h。本研究以辣木种子为材料, 以半致死率为最佳诱变条件的筛选标准, 得出 1.1% EMS 处理辣木种子 10 和 12 h 均较为接近半致死率。结合辣木种子的出苗和幼苗生长情况, 诱变处理 12 h 对辣木幼苗生长的抑制作用更强, 确定 1.1% EMS 处理 10 h 为辣木种子最适诱变参数。

表型性状的突变类型及突变频率对评价诱变群体具有重要意义^[28]。通常认为: 诱变后产生的突变多为隐性, 在 M₁ 代不表现出不同性状, 只有经过自交后才能有所表现, 因此, 很多诱变相关的研究不在 M₁ 代对突变体进行选择。但王长里等^[29]对小麦的 EMS 诱变研究发现: 小麦 M₁ 代群体中出现了早熟、矮秆和大穗等显性突变体, 且突变频率很高, 故认为突变的选择在各世代都要进行。本研究也在辣木 EMS 诱变 M₁ 代群体中得到了表型发生丰富变异的突变植株, 因此在 M₁ 代进行突变性状的选择是十分必要的。表型性状筛选主要以未经诱变的植株作为对照, 观测诱变群体中各个单株的表型性状特征, 若在单株

中发现与对照植株表型性状有明显的变异即认定为该单株发生了表型性状突变^[28]。经过 EMS 诱变的辣木种子胚细胞会受到损伤, 进而在 M_1 代群体中表现出明显的畸形, 这不仅能够进一步证明诱变剂的效果, 还可以得到丰富的突变体。EMS 诱变多数会产生不良的农艺性状诱变, 而对于高产或高品质等优良突变少之又少。本研究获得了极少数重要表型性状明显优于对照的突变单株, 如芽多分支和叶片变大的突变体, 可以为提高辣木产量及辣木新品种选育研究提供基础材料。姜颖等^[30]对 EMS 诱变火麻一号的后代进行形态分析, 从后代植株中筛选到叶色、叶形、株型及生育变异 4 个类型的突变体, 利用 RAPD 分子标记分析发现: 突变体的 DNA 序列发生变化, 为突变体的真实性提供了分子水平上的证据。本研究在 M_1 和 M_2 代辣木植株中进行表型筛选, 得到叶型、叶色和株型等典型表型变异植株, 为下一步从分子水平上验证突变的发生提供了基础材料。正常多油辣木叶片多为卵圆形、椭圆形或长圆形, 叶片平展, 本研究发现有的植株新长出的嫩叶小并且叶缘卷曲或狭长, 在叶片成熟后转为正常叶。这些变异表型在 M_1 和 M_2 代中都有出现, 可能是 EMS 诱变存在残留药物的后效作用, 在 M_1 代引起的生物损伤较大, 在 M_2 代也存在一定的生物损伤。这些叶片突变仍需在 M_3 代进行进一步研究。已有研究表明: 叶色突变基因可以直接或间接影响叶绿素合成和降解, 改变突变体中的叶绿素含量, 引起光合效率下降, 严重时甚至导致植株死亡^[31]。本研究筛选得到的黄化苗突变体是否存在等位突变以及其对叶绿素的产生机制还需要进一步研究。本研究在 M_2 代辣木植株发现芽多分支的株型性状突变, 叶腋分化能力强, 有望作为下一步辣木突变体高产研究的基础材料, 进一步加快辣木新品种选育进程。

种植于元江的 M_2 代共获得 306 个单株, 来自 101 个 M_1 株系, 表型调查发现: 在 M_1 代中变异率最大的植株矮化并没有遗传给 M_2 代, 说明 M_1 代株型矮化变异是由于 EMS 毒性损伤引起的, 这与对北高丛越橘^[32]的研究结果一致。 M_1 - M_2 代表型变异株为 12 株, 变异性状遗传频率为 10.26%, M_2 代新出现变异株 68 株, 突变频率为 35.98%, 可能与 EMS 诱变造成点突变和变异性状调控的复杂性等有一定关系^[33], 故还未得到稳

定遗传。为进一步明确上述突变类型是否具有遗传性和稳定性, 将来还需从具有表型突变的 M_2 代中随机挑选突变株(系), 系统调查其 M_2 或 M_3 代的突变性状, 最终获得可稳定遗传的突变体材料。同时, 可在 M_3 代挑选表型性状明显的突变株进行分子鉴定, 为下一步进行辣木功能基因组研究及新品种选育提供基础材料。

4 结论

辣木种子 EMS 诱变的最佳条件为 1.1% EMS 处理 10 h, 该处理下种子相对出苗率为 58.60%, 相对成苗率为 57.07%。 M_1 代共获得 264 个单株, 突变株 88 株, 共 9 种变异类型, 突变频率为 33.33%; 共获得源于 101 个 M_1 株系的 M_2 单株 306 株, 突变株 132 株, 可分为 11 种突变表型, 变异频率为 43.14%。 M_1 - M_2 代变异性状遗传频率为 10.26%; M_2 代新出现变异株 68 株, 突变频率为 35.98%, 为下一步 M_3 代获得稳定遗传的辣木突变体奠定了基础。

[参考文献]

- [1] LEONE A, SPADA A, BATTEZZATI A, et al. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(6): 12791. DOI: 10.3390/ijms160612791.
- [2] ATAWODI S E, ATAWODI J C, IDAKWO G A, et al. Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of *Moringa oleifera* Lam.[J]. Journal of Medicinal Food, 2010, 13(3): 710. DOI: 10.1089/jmf.2009.0057.
- [3] 盛军. 现代辣木生物学[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2015.
- [4] 吴疆翀. 云南引种辣木繁育系统的研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2010.
- [5] 郭刚军, 胡小静, 徐荣, 等. 干燥方式对辣木叶营养、功能成分及氨基酸组成的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 39. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201811007.
- [6] 周永萍, 燕建召, 孙辉, 等. 浅析辣木的药用价值[J]. 现代农村科技, 2016(21): 37. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5329.2016.21.028.
- [7] 张德, 龙会英, 郑益兴, 等. 不同种植密度和栽培管理对辣木农艺性状的影响[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 1870. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4829.2014.05.013.
- [8] 杨春梅, 屈云慧, 汪国鲜, 等. 辣木组织培养和快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2218. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2015.05.070.
- [9] 黄苏南, 汪秉琨, 杨睿, 等. 多油辣木PKM-1花药培养获

- 得愈伤组织[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(2): 308. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201705046.
- [10] 刘威, 杨峰, 任旭东, 等. EMS对种子萌发影响的进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4585. DOI: 10.13271/j.mpb.015.004585.
- [11] 安佰义, 丁晓丽, 吴双, 等. EMS诱变白桦种子发芽的条件筛选[J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 6073. DOI: 10.13271/j.mpb.017.006073.
- [12] 陈敦萍, 李凌, 沈世华, 等. 小桐子SRAP-PCR体系优化与M₁代变异植株的分子鉴定[J]. 核农学报, 2009, 23(2): 209.
- [13] 李玉环. 亚麻耐盐突变体的筛选及种质耐盐性的评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2017.
- [14] 叶春秀, 庄振刚, 谢宗铭. 新疆早熟陆地棉EMS诱变后代鉴定及分子标记检测[J]. 分子植物育种, 2015, 13(8): 1730. DOI: 10.13271/j.mpb.013.001730.
- [15] 吴博. 四种诱变剂对杉木的诱变效应研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [16] 朱翠翠. 青檀种质资源遗传多样性分析及诱变育种[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [17] 崔霞, 梁燕, 李翠, 等. 化学诱变及其在蔬菜育种中的应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(3): 205. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2013.03.025.
- [18] 高维锡, 程毛, 齐艳, 等. EMS诱变对沙枣种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2019, 34(4): 450. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4748.2019.04.010.
- [19] 臧辉, 武自念, 孔令琪, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变对羊草种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5765. DOI: 10.13271/j.mpb.016.005765.
- [20] 孙慧. EMS诱变海滨木槿及抗寒突变体筛选的初步研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2019.
- [21] ALI B T, AMIN B T, BEHZAD S. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination[J]. Scientific Research, 2012, 3(6): 1661. DOI: 10.4236/ajps.2012.312202.
- [22] AWADHESH K, VARUN K, LAL S K, et al. Influence of gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS) on the levels of phytic acid, raffinose family oligosaccharides and antioxidants in soybean seeds of different genotypes[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2015, 24(2): 204. DOI: 10.1007/s13562-014-0258-6.
- [23] 刘莉, 李培英. 新农1号狗牙根胚性愈伤EMS诱变初探[J]. 新疆农业大学学报, 2016, 39(4): 273. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8614.2016.04.003.
- [24] 骆海波, 邹颀, 贺从安, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)对萝卜早期发育性状的诱变效应[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(5): 608. DOI: 10.3969/gab.032.000608.
- [25] 王鹏伟, 赵改丽, 翟晓巧, 等. 南方泡桐突变体构建及黄化苗体外植株再生的研究[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(4): 390. DOI: 10.16445/j.cnki.1000-2340.2010.04.021.
- [26] 徐刚, 尹春英, 牟东岭. 甲基磺酸乙酯(EMS)处理对麻疯树(*Jatropha curcas* L.)萌发种子的生理效应[J]. 种子, 2010, 29(10): 49. DOI: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2010.10.049.
- [27] 王莹, 郭聪, 谈峰, 等. 甲基磺酸乙酯诱变筛选耐盐旱柳愈伤组织变异体研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(19): 57. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2019.19.013.
- [28] 谢玲玲, 周火强, 弭宝彬, 等. EMS诱变技术研究概况及应用进展[J]. 湖南农业科学, 2020(6): 92. DOI: 10.16498/j.cnki.hnnkx.2020.006.024.
- [29] 王长里, 付晶, 杨学举. EMS诱导小麦突变体的研究及展望[J]. 安徽农业科学, 2008(19): 8038. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2008.19.081.
- [30] 姜颖, 孙宇峰, 潘冬梅, 等. 工业大麻甲基磺酸乙酯(EMS)诱变体的筛选及RAPD分析[J]. 作物杂志, 2017(6): 50. DOI: 10.16035/j.issn.1001-7283.2017.06.009.
- [31] 刘新亮, 李先民, 何小三, 等. 植物叶色黄化突变分子机理的研究进展[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1358. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2017.08.05.
- [32] 郑文娟. EMS诱变北高丛越橘(*Vaccinium* L.)的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [33] 孔德培, 屈凌波, 张雪妍, 等. 亚洲棉EMS诱变条件优化与突变体筛选[J]. 棉花学报, 2017, 29(4): 336. DOI: 10.11963/1002-7807.kdplfg.20170703.

责任编辑: 何承刚