

花生 EMS 诱变后代的农艺性状与品质分析

王 允, 张幸果, 李贺敏, 宋佳静, 崔党群, 殷冬梅

(河南农业大学, 郑州 450002)

摘要: 为了研究花生 EMS 诱变后代的变化趋势, 以期得到有益变异和创造新的花生种质, 本研究以 2 个花生品系花 U416、花 U606 为供试诱变亲本, 利用 0 (CK)、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 5 个 EMS 浓度直接注入花生花器得到诱变后代, 分析 M_1 、 M_2 的农艺性状与品质变化, 结果表明, EMS 对 2 个花生品系诱变效应明显, 2 个品系畸变率随 EMS 浓度增加而增大; EMS 注入的当代植株结实率和 M_1 的出苗率均低于对照, 2 个品系 M_2 均产生了多种类型的突变植株, 突变性状大部分可以稳定遗传。而这些遗传多样性的突变材料, 为花生种质创新及品种遗传改良提供基础性材料。

关键词: 花生; EMS; 突变体

Agronomic Traits and Quality Analysis of Peanut EMS Mutation Progeny

WANG Yun, ZHANG Xing-guo, LI He-min, SONG Jia-jing, CUI Dang-qun, YIN Dong-mei

(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: In order to create useful mutations and create new peanut germplasm, two different peanut lines were treated with five different concentration of EMS (0, 0.5%, 1.0%, 1.5%, and 2.0%). Through injecting EMS into peanut flower organs the agronomic characters and seed quality of M_1 and M_2 were analyzed. The results showed that the two lines mutagenic effect were obvious and the aberrations increased with the increasing concentration of EMS. The seed setting rate of the plants injected with EMS solutions and the seeding emergence rate of M_1 generation were both lower than the control. Various types of mutated plants were discovered in M_2 generations and most of the changed characters could be stably inherited. All these mutated materials were conserved in germplasm library and would be used in peanut functional genomic research and variety improvement.

Key words: peanut; EMS; mutant

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 是世界范围内广泛种植的主要油料作物之一, 我国花生种植面积位居世界第 2 位, 年产量居世界第 1 位。目前全国推广的花生品种中, 90% 的直接或间接亲本是‘伏花生’和‘狮头企’^[1], 或是含有它们的血缘, 其中优异种质资源匮乏和过分依赖少数骨干亲本资源是制约花生品种改良进展的主要原因之一^[2-3]。因此, 进一步发掘和创造农艺性状优良、适应性广、配合力高的优异花生新种质是突破花生育种的重要前提。

物理和化学方法诱发作物的突变具有操作简便、变异率高等特点, 通过理化因素诱发创造突变体

已成为种质资源创新的一种有效手段。其中, 甲基磺酸乙酯 (EMS, ethyl methane sulfonate)^[4-6] 是目前最有效且应用最广泛的一种高效化学诱变剂, EMS 诱变使 DNA 分子上形成较多的点突变, 对染色体损伤轻且不容易导致染色体畸变, 因而被广泛用于突变体的创造。A. Ashri 等^[7] 研究了不同化学诱变剂对花生胚和子叶在不同发育阶段的敏感程度的影响, 发现花生发育早期对诱变剂最敏感, 烷化剂对花生胚影响最大但不影响其后期发芽。M. R. Sivaram^[8]、朱保葛等^[9] 用 EMS 处理花生种子均育成高产品系。M. Patel 等^[10] 利用 EMS 诱变 Flo-

收稿日期: 2014-08-08 修回日期: 2014-09-05 网络出版日期: 2015-06-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150610.1505.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1204317); 河南省现代农业产业技术体系 (S2014-05-G03)

第一作者主要从事花生遗传育种研究。E-mail: wangyun1960@163.com

通信作者: 殷冬梅, 主要从事花生遗传育种研究。E-mail: yindm@126.com

runner 获得了高油酸突变体 C458, 油酸含量达到 80%, 亚油酸含量下降到 5%。王传堂等^[11]对采用 EMS 处理花生得到的高世代品系的研究发现, 处理后代的荚果和种子的外观性状和内在品质均发生了明显变异, 诱变后代的种子油分含量最高可提高 5 个百分点, 蛋白质最高可提高 3 个百分点, 而且油亚比也发生了改变, 表明 EMS 在花生品质改良中具有一定潜力。殷冬梅等^[12]采用不同的 EMS 浓度和不同处理时间处理 2 个花生品种的种子外植体, 确定了各处理每个花生品种的适宜诱变组合。王传堂等^[13-14]将 EMS 直接注入花生花器, 获得了超大果和超小果突变体, 获得了显著增产的后代材料, 而且高产性状能够稳定遗传, 突变体与野生型存在分子水平的遗传差异, 证明化学诱变育种可以作为花生高产育种的有效手段。C. Q. Fang 等^[15]通过 EMS 诱变处理从花生栽培品种 LF2 (油酸含量 44.2%) 中筛选出了 1 个油酸含量高达 60% 以上的弗吉尼亚型花生突变体 e2-4-83-12。目前, 尚需进一步研究 EMS 对花生的诱变效应, 获得更多有益的突变类型, 为花生新品种培育提供遗传种质材料。

本研究采用将 EMS 溶液直接注入花生花器的方法, 分析不同浓度的 EMS 对不同基因型花生的诱变效应, 研究 M_1 、 M_2 的农艺性状和品质性状的变化趋势, 为花生突变体库构建和培育高产、优质的花生新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为河南农业大学花生新品系花 U416 和花 U606。花 U416 为珍珠豆型, 果仁多为圆形或桃形, 连续开花习性, 株型直立, 含油量为 48.22%; 花 U606 为普通型, 果仁多为椭圆形或长椭圆形, 连续开花习性, 株型直立, 含油量 57.81%。试验材料播种于河南农业大学科教园区, 地力、肥力均匀, 常规栽培管理。

1.2 主要试剂及药品

化学诱变剂 EMS, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 蒸馏水, 超纯水, pH7.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 无水乙醚 (分析纯), 氯化钠 (分析纯), 氢氧化钾 (分析纯), 甲醇 (分析纯), 苯 (分析纯), 石油醚 (分析纯), 5.4% 的氢氧化钾甲醇溶液 (100 mL 甲醇中加入 5.4 g 氢氧化钾), 以上化学试剂均购自上海生工。脂肪酸甲酯标准品购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 EMS 溶液的配制

配制 pH7.0 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 500 mL: 称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 11.749 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.044 g, 加入双蒸水定容, 然后用 pH 计调试 pH 值至 7.0。将缓冲液作为溶剂, 配制 0 (对照, CK)、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的 EMS 溶液 (v/v), 现配现用。

1.3.2 EMS 诱变及田间种植试验 2012 年, 参照王传堂等^[11]的 EMS 诱变注入方法, 在河南农业大学科教园区花生试验田分别对花 U416 和花 U606 2 个材料进行诱变处理, 单粒播种, 单株收获 M_1 。2013 年按单株编号的顺序全部播种。生育期内详细记录株高、株型、叶片、荚果、花等植株性状, 同年 9 月按株行收获。

1.3.4 观察记载和统计方法

发芽势 (%) = 第 3 天发芽的种子数 / 总种子数 $\times 100$

发芽率 (%) = 第 6 天发芽的种子数 / 总种子数 $\times 100$

出苗率 (%) = 出苗数 / 播种的种子数 $\times 100$

相对出苗率 = 出苗率 / 对照的出苗率 $\times 100$

果/花率 (%) = 收获荚果数 / 注射花朵数 $\times 100$

仁/花率 (%) = 收获子仁数 / 注射花朵数 $\times 100$

1.3.5 品质分析方法 M_2 种子晾晒后进行粗脂肪含量和脂肪酸的测定。粗脂肪测定采用索氏提取法, 脂肪酸测定采用气相色谱法。应用 DPS 统计软件进行差异显著分析。

2 结果与分析

2.1 EMS 注射花器对花生结实的影响

利用 EMS 注射花生龙骨瓣, 当代抑制了花生的结实, 普遍出现了低结实率的现象 (表 1)。在 EMS 浓度为 0.5% ~ 2.0% 范围内, 花 U416 和花 U606 2 个品系的果/花率和仁/花率变化趋势一致, 均随 EMS 浓度的升高而降低。在 EMS 浓度为 2.0% 时, 2 个品系的果/花率和仁/花率都较低, 说明高浓度对花生当代结实的抑制效应更大。同一处理水平上, 花 U606 的果/花率和仁/花率较花 U416 高。

2.2 M_1 的田间调查结果

花 U416 和花 U606 经不同浓度 EMS 注射龙骨瓣后 M_1 的出苗情况见表 2, 结果表明 2 个品系的出苗率均低于对照, 且出苗率都随着 EMS 浓度的增加而降低。同一浓度处理下, 花 U606 的相对出苗率比花 U416 高。另外, 由于种胚受到生理损伤, 在生育期内长势与对照相比, M_1 表现为植株明显矮小、分枝少、贪青晚熟、结荚少等症状, 在 M_2 这些表型变化可以恢复。

表 1 不同 EMS 浓度处理下花生果/花率和仁/花率

Table 1 Effects of EMS concentration on pod/flower and seed/flower percentages

EMS 浓度(%) EMS concentration	花 U416		花 U606	
	果/花率(%)	仁/花率(%)	果/花率(%)	仁/花率(%)
	Pod/flower percentage	Seed/flower percentage	Pod/flower percentage	Seed/flower percentage
0.5	13.94	16.83	27	32.07
1.0	12.21 [*]	15.67 [*]	20.13	26.42
1.5	6.39 ^{**}	8.73 ^{**}	18.47 [*]	20.32 [*]
2.0	2.62 ^{**}	3.16 ^{**}	6.52 ^{**}	7.36 ^{**}

* 表示 5% 水平上差异显著, ** 表示 1% 水平上差异极显著, 下同
* and ** represent significance at 5% and 1% level respectively, the same as below

表 2 不同 EMS 浓度处理下各花生品系 M₁ 的出苗率

Table 2 Germination percentage in M₁ generations of different peanut genotypes induced by different EMS

品系 Lines	EMS 浓度(%) EMS concentration	种子数 Number of seeds	出苗数 Emergence number	出苗率(%) Emergence rate	相对出苗率(%) Relative emergence rate
花 U416(CK)	0	100	97	97.00	100
花 U416	0.5	72	62	86.48	89.15 [*]
	1.0	62	46	74.51	76.81 [*]
	1.5	39	27	68.42	70.54 [*]
	2.0	15	9	58.60	60.42 ^{**}
花 U606(CK)	0	100	93	93.00	100
花 U606	0.5	152	131	86.18	92.66
	1.0	110	91	82.80	89.03 [*]
	1.5	127	93	73.35	78.87 [*]
	2.0	40	27	67.44	72.51 ^{**}

2.3 M₂ 的田间表现和突变体特性

2.3.1 M₂ 的田间表现 M₂ 群体表型变异是评价突变体库的重要指标, 因为 M₂ 消除了 M₁ 机械损伤带来的表型变化。经诱变后, 花 U416 和花 U606 两品系 M₂ 分别产生了多种类型的突变植株(表 3,

图 1), 主要表现在株高、生育期、荚果、分枝、育性等性状, 发生表型突变的频率约为 7.63%。从表 3 可知, 花 U416 在 EMS 浓度为 1.5% 时变异类型最丰富, 花 U606 在 EMS 浓度为 2.0% 时变异类型最丰富。

表 3 M₂ 植株突变表型性状统计

Table 3 Summary of visible phenotypic classes observed in the preliminary screening of M₂ generation

表型 Phenotype	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
矮秆 Short stem	1/3	2/4	4/6	3/9
高秆 High stem	0/0	0/0	4/0	2/3
早熟 Early maturity	0/2	2/3	2/4	0/5
晚熟 Late maturity	3/2	1/2	4/3	1/2
多分枝 Multiple branches	0/0	0/0	5/1	0/3
不育 Sterility	0/0	0/3	2/4	6/5
大果 Large pod	0/0	3/2	5/0	2/6
小果 Small pod	0/0	0/0	2/1	1/4
花异常 Abnormal flower	1/2	1/2	2/0	1/2
突变体总数 Total mutants	5/9	9/16	24/19	16/39

数据为花 U416/花 U606 The datas mean Hua U416/ Hua U606

图1 M_2 突变体中几个典型表型变异株Fig. 1 Examples of phenotypic mutants observed in the M_2 populations

a:矮秆突变体;b₁:多分枝突变体;b₂:丛生株;c₁:花的柱头外露;c₂:花异常突变株;
d:大叶突变体;e:荚果突变体;f:大粒突变体;g和h:不育株
a:Short stem mutant type,b₁:Multiple branches,b₂:Overgrown mutant,c₁:Stigma extrusion,
c₂:Abnormal flower,d:Broad leaf,e:Pod mutant,f:Big kernel,g and h:Sterility mutant

(1)株高突变体:花U416的株高为32~35 cm,花U606的株高为41~45 cm。在 M_2 群体中,花U416突变群体中高秆株高平均值为38.6 cm,矮秆株高平均值为25.2 cm;花U606突变群体中高秆株高平均值为49.3 cm,矮秆株高平均值为36.3 cm。 M_2 群体中株高突变体共有41株,突变率为0.99%;矮秆突变体有32株,突变率为0.77%,高秆突变株有9株,突变率为0.22%。花U416突变群体中高秆突变体共6株,突变率为0.15%;矮秆突变体共10株,突变率为0.24%。花U606突变群体中高秆突变体共3株,突变率为0.07%;矮秆突变体22株,突变率为0.53%。

(2)生育期突变体:在 M_2 群体中有36株生育期突变体,突变率为0.88%,其中有18株早熟突变体和18株晚熟突变体,突变率均为0.435%。花U416突变群体中有4株早熟突变体和9株晚熟突变体,突变率分别为0.097%和0.217%。花U606突变群体中有14株早熟突变体和9株晚熟突变体,突变率分别为0.338%和0.217%。正常条件下,花U416生育期为110~115 d,早熟突变株生育期与对照相比提前8~10 d,株型与对照相比没有差异,但单株产量高于对照;花U606生育期为100~105 d,

其早熟突变株生育期比对照提前6~8 d,株高与对照相比稍低些,结实率高于对照。2个品系晚熟突变株与对照相比,均表现为茎秆粗壮,单株产量有所提高。

(3)多分枝突变体:花U416的分枝数为8~9个,多分枝突变株能够达到11~13个;花U606的分枝数为6~8个,多分枝突变株能够达到10~12个,另外,在花U606突变群体中还发现了丛生株,分枝数高达20个。 M_2 群体中有9株多分枝突变体,突变率为0.217%,花U416突变群体中有5株多分枝突变体,突变率为0.121%,花U606突变群体中有4株多分枝突变体,突变率为0.097%。多分枝变异株单株产量比对照增加。

(4)育性突变: M_2 中有20株不育株,突变率为0.48%。花U416突变群体中有8株不育株,突变率为0.19%,花U606突变群体中有12株不育株,突变率为0.29%。

(5)荚果突变体:经EMS诱变产生的荚果突变株中,花U416大小果突变株分别为10株和3株,突变率分别为0.24%和0.07%;花U606大果突变株8株,小果突变株为5株,突变率分别为0.19%和0.12%。荚果大小发生改变,其子粒大小也随之改

变,进而影响花生的产量,花 U416 大果突变体的百仁重达 79.3 g(对照 69.8 g),比对照高 9.5 g,小果突变体百仁重明显降低,为对照的 83%;花 U606 大果突变体的百仁重为 99.7 g,比对照(对照 96 g)高 3.7 g,小果突变体百仁重为对照的 87%。

(6)花异常突变体:EMS 诱变产生的突变群体中出现了花异常突变体,表现为柱头外露。花 U416 有 5 株花异常突变株,突变率为 0.12%,花 U606 的 M₂有 6 株花异常突变株,突变率为 0.14%。

2.3.2 M₂主要品质性状分析 表 4 为花 U416 及其 M₂主要品质性状的对比,从表中可以看出 M₂与对照的品质性状存在一定差异。这些突变体中,蛋白质含量与其对照相比没有明显的变异,粗脂肪含量与对照相比差异明显,突变体 4Y3-11 的粗脂肪

含量为 51.39%,极显著高于对照(48.22%),粗脂肪含量提高了 3.17 个百分点,这说明化学诱变可以提高花 U416 花生种子的粗脂肪含量;另外,诱变后代中也出现了粗脂肪含量极显著降低的突变体 4Y3-13,其粗脂肪含量低至 46.26%,与对照相比,降低了 1.96 个百分点。花 U416 花生种子脂肪酸中油酸和亚油酸含量经诱变后也发生了改变,如突变体 4Y3-11 和 4Y3-15 的油酸含量均极显著高于对照,分别比对照提高了 4.76 和 4.02 个百分点,其亚油酸含量极显著低于对照,分别降低了 4.92 和 3.36 个百分点,两者的油亚比也随之改变,突变体 4Y3-11 的油亚比为 1.89,4Y3-15 的油亚比为 1.76,都极显著高于对照(1.46),突变体 4Y3-3 和 4Y3-8 的油亚比也都极显著高于对照。

表 4 花 U416 及其部分 M₂种子品质性状对比

Table 4 Comparison of main quality attributes between Hua U416 and M2 of Hua U416

编号	粗脂肪(%)	蛋白质(%)	油酸(%)	亚油酸(%)	油酸亚油酸比值
Number	Fat	Protein	Oleic acid	Linoleic acid	Oleic acid to linoleic acid ratio
CK	48.22	23.85	47.37	32.51	1.46
4Y3-1	47.67	23.96	48.32	31.63	1.53
4Y3-2	47.79	23.65	48.23	31.78	1.52
4Y3-3	49.86	23.78	50.36 [*]	29.87 [*]	1.69 ^{**}
4Y3-4	48.31	23.82	47.72	32.13	1.49
4Y3-5	48.43	23.43	49.05	30.23	1.62 [*]
4Y3-6	48.33	23.52	48.87	31.06	1.57
4Y3-7	48.16	23.46	47.03	33.12	1.42
4Y3-8	50.13	23.93	49.85	30.11 [*]	1.66 ^{**}
4Y3-9	48.37	23.38	47.43	32.16	1.47
4Y3-10	48.62	23.46	47.31	32.35	1.46
4Y3-11	51.39 ^{**}	24.01	52.13 ^{**}	27.59 ^{**}	1.89 ^{**}
4Y3-12	48.69	23.76	47.76	32.31	1.48
4Y3-13	46.26 ^{**}	23.25	47.22	32.16	1.47
4Y3-14	48.25	23.31	47.56	32.14	1.48
4Y3-15	50.24	23.78	51.39 ^{**}	29.15 ^{**}	1.76 ^{**}
4Y3-16	48.63	23.81	47.15	32.64	1.44
4Y3-17	48.51	23.95	48.98	30.46	1.61 [*]
4Y3-18	49.37	23.61	49.65	31.04	1.60
4Y3-19	47.89	23.83	47.28	32.73	1.44
4Y3-20	48.36	23.39	47.21	32.64	1.45

从表 5 中可以看出,花 U606 与其 M₂的品质性状有一定差异。在调查的突变体中,出现的粗脂肪含量极显著高于对照的突变体有 4Y3-12 和 4Y3-

18,其粗脂肪含量分别为 61.54% 和 62.13%,分别比对照(57.81%)提高了 3.73 和 4.32 个百分点,这说明化学诱变可以提高花 U606 花生种子的粗脂肪

含量;花 U606 诱变后代中出现了粗脂肪含量极显著降低的突变体有 4Y3-6、4Y3-14、4Y3-16,其中 4Y3-6 的粗脂肪含量最低,仅为 51.26%,与对照(57.81%)相比,降低了 6.55 个百分点,说明化学诱变也能降低花 U606 花生种子的粗脂肪含量。

4Y3-12 突变体油酸含量(44.67%)极显著高于对照(40.75%),其亚油酸含量(35.26%)极显著低于对照(38.05%),油亚比(1.27)极显著高于对照(1.07)。在花 U606 的 M₂所调查的这 20 个突变体中,其蛋白质含量与对照相比变异不明显。

表 5 花 U606 及部分 M₂种子品质性状对比

Table 5 Comparison of main quality attributes between Hua U606 and M₂ of Hua U606

编号 Number	粗脂肪 Fat	蛋白质(%) Protein	油酸(%) Oleic acid	亚油酸(%) Linoleic acid	油酸亚油酸比值 Oleic acid to linoleic acid ratio
CK	57.81	18.69	40.75	38.05	1.07
4Y3-1	59.12	18.89	41.34	37.68	1.10
4Y3-2	59.63	19.13	39.76	39.01	1.02
4Y3-3	59.51	18.47	40.32	37.73	1.07
4Y3-4	58.35	18.84	40.13	38.54	1.04
4Y3-5	58.31	18.39	41.32	37.63	1.10
4Y3-6	51.26**	18.14	41.12	37.83	1.09
4Y3-7	57.22	18.46	40.35	38.63	1.04
4Y3-8	56.96	18.38	41.64	37.21	1.12
4Y3-9	59.26	18.95	39.53	39.06	1.01
4Y3-10	60.62*	18.85	43.45	36.12	1.20**
4Y3-11	58.37	18.53	41.23	37.91	1.09
4Y3-12	61.54**	19.32	44.67**	35.26**	1.27**
4Y3-13	57.56	18.65	41.25	37.84	1.09
4Y3-14	54.32**	18.42	41.76	37.13	1.12
4Y3-15	56.37	18.59	40.71	37.87	1.07
4Y3-16	53.52**	18.42	42.15	36.51	1.15
4Y3-17	58.32	18.78	40.81	38.03	1.07
4Y3-18	62.13**	19.06	43.36	37.65	1.15
4Y3-19	59.32	19.11	41.36	37.32	1.11
4Y3-20	58.83	18.38	40.13	38.76	1.04

3 讨论

本研究利用 EMS 溶液直接注入花器的方法处理 2 个花生品系花 U416 和花 U606,其后代产生了丰富的突变类型,如株高、生育期、多分枝、育性、荚果、花异常突变体等,发生表型突变的频率约为 7.63%。在株高突变体中,2 个品系共产生矮秆突变体的频率(0.77%)高于高秆突变体的频率(0.22%),矮秆突变体可以相应提高花生下针率,从而达到增产的效果,而且还可以抗倒伏。在生育期突变体中,2 个品系的早熟突变体生育期与对照相比都提前 6 d 以上,且单株产量或结实率高于对照,早熟突变体的获得有利于作物间的轮作,对花生高产育种也有一定意义。在荚果突变体中,花 U416 大果突变体的百仁重达 79.3 g(对照 69.8 g),比对照高 9.5 g;花 U606 大果突变体的百仁重为 99.7 g 比对照(对照 96 g)高 3.7 g。荚果大小发生改变,其子粒大小也随之改变,大果突变体在提高产量方

面十分有益。对 M₂种子的品质性状进行的研究发现,化学诱变可以改变花生的品质,特别是粗脂肪含量,花 U416 和花 U606 2 个品系都出现了粗脂肪含量高于对照和低于对照的突变体。花 U416 的粗脂肪含量可提高 3.17 个百分点或降低 1.96 个百分点,花 U606 的粗脂肪含量可提高 4.32 个百分点或降低 6.55 个百分点;花 U416 产生高 O/L 突变体的频率高于花 U606,是自身易于诱发突变还是控制 O/L 的关键酶基因发生了变异,还有待进一步研究。这些丰富的变异类型,为花生进一步的遗传改良提供了丰富的种质资源。

本试验主要调查了诱变后代的表型变化及 M₂种子的品质含量变化情况,并未对这些突变体产生的机理及其遗传物质的改变进行研究,尚需进一步从分子水平上检测突变体遗传物质的变化情况,将有利于深入认识 EMS 对花生的诱变作用,创造优异的突变种质,为新品种选育奠定基础。

(下转 926 页)