

甲基磺酸乙酯诱变西瓜种子的条件优化

赵展¹, 王晓婷¹, 李林¹, 侯晟灿², 霍治邦², 张新成¹

(1. 开封市农业物联网工程技术中心·河南省高标准农田智能灌溉工程研究中心·开封大学信息工程学院
河南开封 475004; 2. 开封市农林科学研究院 河南开封 475004)

摘要: 为探明 EMS 诱变西瓜种子的最佳条件, 以石红为试材, 设置种子切口与不切口 2 种处理方式, 采用 6 个诱变浓度(0.40%, 1.00%, 1.20%, 1.40%, 1.60%和 2.00%)和 5 个诱变时间(4、10、12、14、16 h)共 30 个不同处理组合对西瓜种子萌发的影响进行研究。结果表明, 切口处理能显著提高西瓜种子对 EMS 诱变剂的敏感性, 共筛选出 6 个处理组合, 诱变效果最接近半致死剂量, 分别是 1.20%+12 h、1.20%+14 h、1.20%+16 h、1.40%+12 h、1.40%+14 h 和 1.40%+16 h, 对应的西瓜种子相对发芽率分别为 50.38%、52.21%、51.97%、48.95%、49.97%和 48.82%。以用量少且用时短为原则, 确定 EMS 诱变西瓜种子的最佳组合是 1.20% EMS 诱变 12 h。

关键词: 西瓜; 甲基磺酸乙酯; 诱变; 条件优化

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)01-081-05

Optimization of conditions for mutagenesis of watermelon seeds with ethyl methanesulfonate

ZHAO Zhan¹, WANG Xiaoting¹, LI Lin¹, HOU Shengcan², HUO Zhibang², ZHANG Xincheng¹

(1. Kaifeng Agricultural Internet of Things Engineering Technology Center/Research Center of High-standard Farmland Intelligent Irrigation Project in Henan/College of Information Engineering, Kaifeng University, Kaifeng 475004, Henan, China; 2. Kaifeng Academy of Agriculture and Forestry, Kaifeng 475004, Henan, China)

Abstract: To investigate the optimal condition of ethyl methanesulfonate (EMS) on the seed germination of watermelon, the variety Shihong was selected as material in this study. Set two treatment methods of seed incision and non incision. Six different concentrations of EMS (0.40%, 1.00%, 1.20%, 1.40%, 1.60% and 2.00%) and five different induced times (4 h, 10 h, 12 h, 14 h and 16 h) were set up to study the effect on the seed germination of watermelon under 30 different combinations of concentration and time. The results showed that the sensitivity of seeds to EMS mutagens could be significantly improved by incision treatment. A total of six combinations whose mutagenic effect was closest to the standard of half lethal dose were selected. The six combinations were 1.20%+12 h, 1.20%+14 h, 1.20%+16 h, 1.40%+12 h, 1.40%+14 h and 1.40%+16 h, respectively. The corresponding relative germination rates of watermelon seeds were 50.38%, 52.21%, 51.97%, 48.95%, 49.97% and 48.82%, respectively. In summary, the optimal condition was 1.20% of EMS for 12 h according to the principle of using less and using less time.

Key words: Watermelon; Ethyl methanesulfonate; Mutant; Optimization of conditions

西瓜是我国重要的蔬菜型水果, 因其品质好、瓤质细、抗病强等特点而深受消费者和生产者的喜爱和信赖, 具有很重要的经济价值。但在西瓜长期育种过程中, 由于育种目标大多单一, 使得西瓜种质资源的遗传基础越来越狭窄, 进而使西瓜的产量、品质等重要性状在生产上均受到较大限制; 且单一化的种质资源也让西瓜病害越来越严重, 常给生产者带来无法挽回的经济损失。鉴于此, 在西瓜

遗传育种过程中, 利用现代育种技术和方法创新种质资源, 拓宽其遗传基础就显得尤为重要。

目前, 利用物理诱变方法和化学诱变方法对作物进行诱变育种已成为选育新品种、创新种质资源的有效手段^[1]。化学诱变方法主要是利用化学诱变剂(如烷化剂、叠氮化物、碱基类似物等)对植物进行诱导变异, 具有周期短、频率高、范围广等特点, 能够在较短时间内获得大量突变体材料, 这些材料

收稿日期: 2021-01-05; 修回日期: 2021-02-09

基金项目: 开封大学博士基金项目(KDBS-2017-003); 河南省高等学校重点项目(20B210013、21A520029、21A520028); 开封市科技发展规划(科技攻关)项目(2102009)

作者简介: 赵展, 女, 讲师, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 13525579383@163.com

通信作者: 张新成, 男, 教授, 研究方向为农业物联网。E-mail: kfzxc@kfu.edu.cn

直接或间接地应用于新品种和新种质资源的选育^[1-2]。甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methanesulfonate)是一种高效稳定且应用广泛的化学诱变剂,在诱变过程中,能够使DNA分子发生较多点突变,染色体畸变减少,并通过置换其他分子中的氢原子使得一些碱基烷基化而诱导突变^[3]。大量研究结果表明,要获得良好的诱变效果,必须要有适宜的诱变剂量(诱变剂量=诱变液浓度×处理时间),通常把诱变处理后50.00%植株存活的剂量即半致死剂量作为选择依据^[4-5]。弭宝彬等^[6]研究发现EMS诱变冬瓜种子时最佳的诱变条件为1.20% EMS诱变12 h,此时冬瓜种子发芽率、成苗率分别为54.67%、51.83%,接近半致死剂量。黄东福等^[7]对农作物EMS的诱变条件进行分析后表明大部分作物的EMS诱变半致死剂量在1.00%以内,且处理时间集中在4~8 h时,可以获得较好的诱变效果。

以开封市农林科学研究院的高代自交系石红为研究材料,采用6个处理浓度(0.40%、1.00%、1.20%、1.40%、1.60%和2.00%)和5个处理时间(4、10、12、14、16 h)相互组合的方式,对西瓜种子进行了EMS诱变最佳条件的筛选,通过对诱变处理后种子的发芽率和相对发芽率进行分析,获得EMS诱变西瓜种子的最佳诱变剂量,为构建西瓜突变体库,创制新的种质资源,进而深入研究西瓜的基因组和拓宽西瓜的遗传背景奠定了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试西瓜材料为高代自交系石红,由开封市农林科学研究院西瓜研究所提供。EMS诱变剂(水剂)购自Sigma公司。试验于2020年7月26日至8月初在开封大学信息工程学院农业物联网协同创新中心农业基础实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 EMS溶液的配制方法 EMS诱变剂用pH 7.0的0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液配制成0.40%、1.00%、1.20%、1.40%、1.60%和2.00%的溶液。

1.2.2 EMS的处理方法 西瓜种子诱变前设计2种种子处理方式:指甲刀切口和不切口。将切口和不切口的西瓜种子对EMS的敏感性进行测试:用0.40%和1.00%的EMS溶液分别处理切口和不切口的西瓜种子各4 h和10 h。每个处理用50粒种子,3次重复。

确定最佳的种子处理方式后,将试验设诱变浓

度和诱变时间2个因素,采用二因素完全随机区组设计方法,因素1为EMS诱变浓度,设6个浓度水平,即0.40%、1.00%、1.20%、1.40%、1.60%;因素2为诱变时间,设5个诱变时间水平,即4、10、12、14、16 h。试验共30个处理,3次重复,每个处理用50粒种子。试验处理均以pH 7.0的0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液处理作为对照,诱变结束后,用1.0 mol·L⁻¹的硫代硫酸钠溶液终止反应,接着用0.1 mol·L⁻¹的硫代硫酸钠溶液冲洗,再用蒸馏水清洗3遍,将种子平铺于滤纸上沥水,后用纱布包好放置于28℃恒温培养箱中催芽。

1.2.3 测定发芽率 分别统计7 d后的种子发芽数,计算发芽率和相对发芽率,筛选出EMS溶液的半致死剂量,确定最佳的EMS诱变浓度和时间。

发芽率=发芽种子数/供试种子数×100%,相对发芽率=处理的实际发芽率/对应CK的实际发芽率×100%。

1.3 数据处理

采用Excel 2016处理试验数据并分析作图,使用IBM SPSS 22.0统计软件采用LSD法分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 EMS溶液对西瓜种子切口与不切口的影响

利用切口与不切口2种处理方式对EMS诱变西瓜种子的敏感性进行检测后发现(表1),0.40%的低浓度处理下,处理时间为4 h时,与对照相比,切口与不切口2种处理方式对西瓜种子的实际发芽率和相对发芽率无影响,都是100%;但当浓度为0.40%,处理时间为10 h时,切口西瓜种子的实际发芽率和相对发芽率都比对照显著降低了4.00%,而不切口种子的实际发芽率和相对发芽率与对照相比无变化;当诱变浓度为1.00%,处理时间为4 h时,2种处理方式对西瓜种子的实际发芽率和相对发芽率都无显著变化;但当浓度为1.00%,处理时间为10 h时,种子切口的处理方式使西瓜种子的实际发芽率和相对发芽率都分别比对照显著下降了20.00%,而不切口的处理方式下西瓜种子的实际发芽率和相对发芽率仅下降了3.33%。由此可见,当诱变浓度较低且诱变时间较短时,种子不管是切口还是不切口对EMS诱变剂都不敏感;当诱变浓度和诱变时间达到一定程度时,相同条件下,种子进行切口处理能够显著提高西瓜种子对EMS诱变剂的敏感性。

表1 不同种子处理方式对西瓜种子发芽率的影响

处理时间/h	EMS 处理浓度/%	切口		不切口	
		实际发芽率/%	相对发芽率/%	实际发芽率/%	相对发芽率/%
4	0.00	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	0.40	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	1.00	99.33±1.16 a	99.33±1.16 a	100.00 a	100.00 a
10	0.00	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
	0.40	96.00±2.00 b	96.00±2.00 b	100.00 a	100.00 a
	1.00	80.00±2.00 c	80.00±2.00 c	96.67±1.16 b	96.67±1.16 b

注:表中同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。后同。

2.2 诱变时间和诱变浓度对西瓜种子发芽率的影响

2.2.1 诱变时间对西瓜种子发芽率的影响 相同诱变浓度条件下,研究诱变时间对西瓜种子发芽率的影响(表2)发现,当诱变浓度为 0.40%时,诱变时间分别为 4、10、12 h 的西瓜种子相对发芽率与对照相比无显著差异,而诱变时间为 14 h 和 16 h 时的西瓜种子相对发芽率分别比对照显著降低了 7.34% 和 11.78%;当诱变浓度分别为 1.00%、1.20%、1.40%、1.60%和 2.00%时,诱变 10、12、14、16 h 的西瓜种子相对发芽率均低于诱变 4 h 的相对发芽率,且均达到了显著水平。以上结果表明,诱变浓度和诱变时间对西瓜种子的发芽率都有较大影响,当诱变浓度较低为 0.40%时,诱变时间在短期内对西瓜种子发芽率的影响效果差异不明显,但超过一定时间后有显著的影响效果;当诱变浓度≥1.00%时,诱变时间≥10 h 的影响效果均显著低于诱变时间为 4 h 的诱变效果。

2.2.2 诱变浓度对西瓜种子发芽率的影响 相同诱变时间条件下,研究 EMS 的诱变浓度对西瓜种子发芽率的影响发现,当诱变时间为 4 h 时,诱变浓度为 0.40%和 1.00%的西瓜种子相对发芽率与对照相比无显著差异,而诱变浓度分别为 1.20%、1.40%、1.60%和 2.00%的西瓜种子相对发芽率均显著低于对照(图1);当诱变时间为 10 h 和 12 h 时,诱变浓度为 0.40%的西瓜种子相对发芽率与对照相比均无显著变化,但 1.00%~2.00%的西瓜种子相对发芽率都比对照低,且都达到了显著水平(图2、图3);诱变 14 h 和 16 h 时,诱变浓度 0.40%~2.00%的西瓜种子相对发芽率都显著低于对照(图4、图5)。由此可见,诱变时间和诱变浓度协同影响 EMS 的诱变效果,诱变时间一定时,诱变浓度越高西瓜种子的相对发芽率越低;与对照相比,诱变时间较短、诱变浓度较低时对西瓜种子相对发芽率的影响不大,诱变浓度越高,影响越显著;当诱变时间较长时,低

表2 同一浓度下不同诱变时间对西瓜种子发芽率的影响

EMS 处理浓度/%	处理时间/h	实际发芽率/%	相对发芽率/%
0.00(CK)	4	100.00	100.00 a
	10	99.33±2.31	100.00 a
	12	96.67±1.15	100.00 a
	14	90.67±1.15	100.00 a
	16	84.67±1.15	100.00 a
0.40	4	100.00	100.00 a
	10	96.00±2.00	96.64±1.18 ab
	12	93.33±2.30	96.57±3.13 ab
	14	84.00±2.00	92.66±2.51 bc
	16	74.67±3.01	88.22±4.57 c
1.00	4	99.33±1.16	99.33±1.16 a
	10	80.00±2.00	80.56±2.88 b
	12	74.00±3.46	76.59±4.47 bc
	14	64.67±5.33	71.34±5.76 c
	16	62.00±3.34	73.22±3.72 bc
1.20	4	92.67±3.06	92.67±3.06 a
	10	68.67±3.06	69.12±2.52 b
	12	48.67±5.03	50.38±5.69 c
	14	47.33±3.15	52.21±3.33 c
	16	44.00±2.00	51.97±2.48 c
1.40	4	91.33±3.06	91.33±3.06 a
	10	55.33±1.15	55.73±3.60 b
	12	47.33±3.07	48.95±2.75 c
	14	45.33±4.16	49.97±3.95 c
	16	41.33±1.16	48.82±1.19 c
1.60	4	83.33±3.06	83.33±3.06 a
	10	44.67±3.06	44.97±3.00 b
	12	42.67±2.31	44.13±2.19 b
	14	40.00±5.30	44.07±5.25 b
	16	38.67±4.16	45.64±4.52 b
2.00	4	72.00±2.00	72.00±2.00 a
	10	40.00±1.16	40.31±5.83 b
	12	32.33±3.06	33.11±2.12 bc
	14	30.33±1.15	33.09±2.26 bc
	16	26.00±5.30	30.68±6.00 c

注:表中差异显著性分析为相同诱变浓度下不同诱变时间的西瓜种子相对发芽率之间的比较。

浓度的诱变效果依然不显著,但随着诱变浓度的增大,影响效果越来越明显,且均能够达到显著水平;

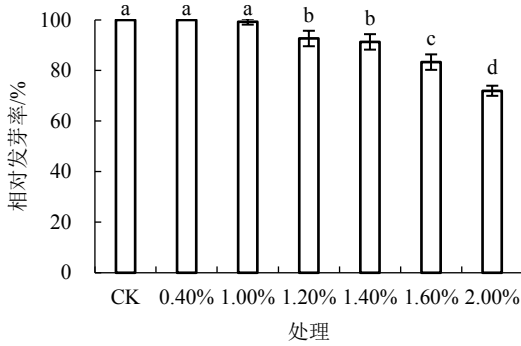


图1 不同 EMS 浓度诱变 4 h 对西瓜种子相对发芽率的影响

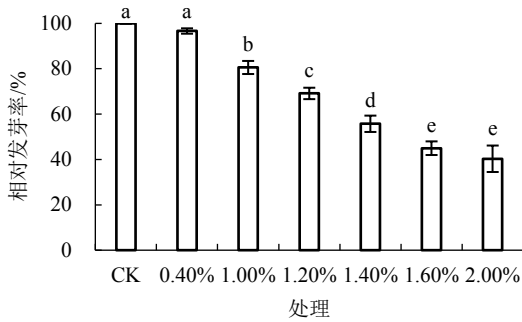


图2 不同 EMS 浓度诱变 10 h 对西瓜种子相对发芽率的影响

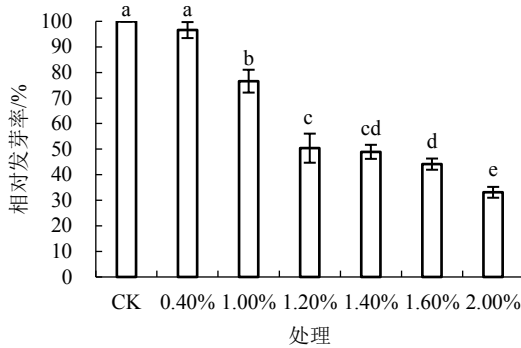


图3 不同 EMS 浓度诱变 12 h 对西瓜种子相对发芽率的影响

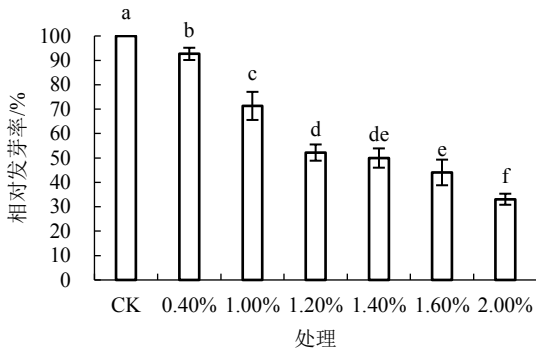


图4 不同 EMS 浓度诱变 14 h 对西瓜种子相对发芽率的影响

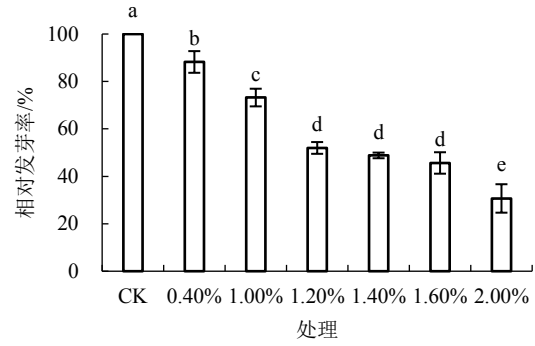


图5 不同 EMS 浓度诱变 16 h 对西瓜种子相对发芽率的影响

当诱变时间足够长时,即使诱变浓度较低,诱变效果也较显著。

2.3 最佳诱变浓度和诱变时间的确定

最佳诱变剂量(包括诱变浓度和诱变时间)才能够达到最佳的诱变效果。本试验利用 6 个诱变浓度和 5 个诱变时间共 30 个组合对 EMS 诱变西瓜种子的剂量效应进行了分析(表 2 和图 1),当诱变浓度为 1.20%,诱变时间分别为 12、14、16 h 时,西瓜种子相对发芽率分别为 50.38%、52.21%和 51.97%;当诱变浓度为 1.40%,诱变时间分别为 12、14、16 h 时,西瓜种子相对发芽率分别为 48.95%、49.97%和 48.82%。由上述结果可知,当诱变浓度为 1.20%~1.40%、诱变时间为 12~16 h 时,西瓜种子的相对发芽率能够达到半致死剂量,以诱变浓度越低和诱变时间越短为最好的原则,获得最佳的诱变组合为诱变浓度 1.20%、诱变时间 12 h。

3 讨论和结论

最佳的诱变剂量是获得最佳突变频率,得到理想突变体的关键。而合适的诱变材料处理方式是降低诱变剂使用量和缩短诱变时间进而获得最佳诱变剂量的重要措施之一。康保珊等^[8]在利用 EMS 诱变瓠瓜种子的研究中发现,利用 1.00% 的 EMS 诱变浓度诱变 12 h,不开壳种子的相对发芽率能够达到 99.20%,但开壳种子的相对发芽率却下降到了 46.00%左右,对 EMS 诱变的敏感性显著提高。在其他葫芦科作物中,甜瓜种子不切口且 EMS 处理浓度在 1.00%~3.00% 之间的发芽率能够达到 97.00%以上^[9]。本试验发现对西瓜种子进行不切口处理时,1.00% 的诱变浓度下即使诱变时间达到 10 h,种子相对发芽率依然能够达到 96.67%,而切口处理后该条件下的种子相对发芽率下降到了 80.56%,与前人研究结论类似^[8],也进一步说明在进行 EMS 诱变处理中,可以通过种子切口或者开壳的处理方式

来提高种子对诱变剂的敏感性。

目前,关于是否存在低浓度、短时间的 EMS 处理对植物种子或者幼苗有一定的促进作用还没有统一论。李雪宝等^[10]研究表明低浓度的 EMS 能够促进水稻种子的发芽势及幼苗生长发育。霍雅馨等^[11]在箭筈豌豆中发现 EMS 的短时处理能够促进其幼苗生长。康保珊等^[8]在瓠瓜中发现低浓度、短时间的 EMS 诱变处理能够促进开壳瓠瓜种子发芽率的提高。但王春语等^[1]在分析 EMS 处理高粱种子的最佳诱变剂量中发现随着 EMS 诱变时间的增长和 EMS 诱变浓度的增加,高粱出苗率呈现出逐渐降低的趋势。孔德培等^[12]在棉花中也发现 EMS 对棉花种子的萌发有抑制作用,EMS 浓度越大,处理时间越长,对种子发芽势和活力的抑制作用越显著。本试验中低浓度、短时间的 EMS 处理后西瓜种子的相对发芽率与对照相比有所降低,但差异不显著。此外,多数研究也表明,高浓度的 EMS 处理短期内会对细胞造成无法完全修复的生理损伤,并抑制植株的生长发育^[8]。本试验中同样发现高浓度的 EMS 条件下,即使诱变时间较短也能够显著降低西瓜种子的相对发芽率。

EMS 是一种高效、稳定的化学诱变剂,具有成本低、操作简单、点突变频率高,而染色体畸变频率低等特点,且 EMS 诱变多为显性,易于突变体筛选。目前,利用 EMS 诱变来创新种质资源已在不同作物育种中有了广泛应用,但在该过程中,筛选出最佳的诱变剂量是获得最佳的诱变效果的前提。通常是以半致死剂量为标准,一般以 50% 的种子相对发芽率作为半致死剂量的指标^[8]。殷冬梅等^[13]以半致死剂量为选择标准,确定了 2 个花生品种的最佳诱变组合,分别是中花 5 号的 0.90% 诱变 7 h 和 1.20% 诱变 5 h,远杂 9102 的 0.60% 诱变 7 h 和 0.90% 诱变 7 h,不同品种最佳诱变组合不同。孔德培等^[12]利用 EMS 诱变亚洲棉发现 0.60% 的 EMS 溶液处理 8 h 时其种子的发芽率和发芽指数分别为 51.00% 和 18.84,该组合下的诱变效果最佳。康保珊等^[8]对开壳瓠瓜种子的 24 个浓度/时间处理组合的研究中,发现 1.00%~2.00% 的 EMS 诱变浓度为瓠瓜最适宜诱变浓度,在此浓度范围内,诱变 8~12 h 可达到半致死剂量,提高浓度需要相应缩短诱变时间。王学征等^[14]利用 EMS 诱变西瓜种子发现 1.80% 6 h 的组合、1.00% 9 h 的组合、1.40% 9 h 的组合和 1.00% 12 h 的组合发芽率均接近 50%,并最终确定 EMS 的最佳诱变条件为处理浓度 1.00% 且

诱导时间 9 h。本试验以半致死剂量为标准,通过 6 个诱变浓度和 5 个诱变时间共 30 个诱变处理组合发现,EMS 诱变浓度为 1.20%~1.40%,诱变时间达到 12 h~16 h 的组合都能够使西瓜种子相对发芽率达到 50.00% 左右,但以诱变浓度越低和诱变时间越短为原则获得最佳的诱变组合为诱变浓度 1.20% 和诱变时间 12 h。本试验结果与王学征等^[14]的试验结果相比诱变浓度增大,诱变时间延长,出现该问题的原因可能是西瓜品种以及西瓜自身基因型的不同造成的。

大量研究已经证实,最佳的 EMS 诱变条件有利于获得最佳的诱变效果^[6,12],对于构建突变体库、筛选突变体材料有重要的作用。目前,关于西瓜 EMS 诱变条件和诱变效果的研究相对较少,具体的诱变机制仍处于探究阶段。本试验中利用诱变浓度和诱变时间的不同处理组合,筛选到了 EMS 诱变西瓜种子的最佳诱变剂量,为西瓜突变体库的构建和突变体材料的筛选提供了基础,但该条件下能否获得满意的变异率还有待进一步的验证。

参考文献

- [1] 王春语,朱振兴,李丹,等.高粱 EMS 诱变及突变体筛选、鉴定[J].生物技术通报,2014(9):78-83.
- [2] 杨富军,王绍伦,高华援,等.不同基因型花生 EMS 诱变条件分析及突变系筛选[J].安徽农业科学,2014,42(33):11778-11781.
- [3] 靳鲲鹏,李丹,李小霞,等.大豆诱变育种的研究进展[J].北方农业学报,2020,48(5):30-33.
- [4] 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):205-212.
- [5] 降云峰,刘永忠,李万星,等.甲基磺酸乙酯诱变技术在大豆育种上的应用[J].园艺与种苗,2012(6):12-15.
- [6] 弭宝彬,谢玲玲,王鑫,等.冬瓜 EMS 诱变条件优化及突变体筛选[J].中国农学通报,2018,34(21):35-41.
- [7] 黄冬福,付文婷,韩世玉,等.农作物 EMS 诱变研究进展[J].北方园艺,2015(24):188-194.
- [8] 康保珊,李俊香,刘丽锋,等.甲基磺酸乙酯诱变瓠瓜种子的条件筛选[J].中国瓜菜,2017,30(2):7-10.
- [9] DAHMANI-MARDAS F, TROADEC C, BOUALEM A, et al. Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach[J]. PLoS One, 2010, 5(12):e15776.
- [10] 李学宝,杨学荣.EMS 对水稻种子萌发生长初期的影响[J].湖北农业科学,1989(2):4-6.
- [11] 霍雅馨,王娜,张吉宇,等.3 种诱变因子对箭筈豌豆种子萌发的影响[J].草业科学,2014,31(3):438-445.
- [12] 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):336-344.
- [13] 殷冬梅,杨秋云,杨海棠,等.花生突变体的 EMS 诱变及分子检测[J].中国农学通报,2009,25(5):53-56.
- [14] 王学征,朱娜娜,高清宇,等.EMS 诱变西瓜种子条件分析[J].东北农业大学学报,2015,46(7):35-39.