

## 甲基磺酸乙酯对烤烟种子发芽率的处理效应

王军伟<sup>1,2</sup>, 蒋彩虹<sup>1</sup>, 宋志美<sup>1</sup>, 张丽<sup>1,2</sup>, 王鲁<sup>1</sup>, 王元英<sup>1</sup>, 刘贯山<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

**摘要:** 以不同浓度的甲基磺酸乙酯 (EMS) 作为化学诱变剂, 烤烟不同品种的种子为供试材料, 探讨了 EMS 化学诱变剂对烟草种子发芽率、根长等性状差异的诱变处理效应。结果表明, 在浓度为 0.1%~1.3% 的处理范围内, EMS 对种子的发芽率主要呈抑制作用, 但低浓度处理对种子发芽率和种子根长有促进作用, 高浓度处理对种子发芽率和种子根长均呈显著抑制作用; 以半致死浓度为选择标准, 确定了不同烤烟品种间 EMS 诱变处理种子的适宜浓度为 0.35%~0.52%, 致死浓度均为 1.3%; 供试品种间 EMS 处理反映的敏感性为云烟 87=云烟 97>红花大金元>中烟 100>K326。

**关键词:** 烤烟; 种子; EMS; 半致死浓度; 突变体

中图分类号: S572.02

文章编号: 1007-5119 (2011) 03-0017-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2011.03.004

## Mutagenic Effects of Ethyl Methane Sulfonate on Flue-cured Tobacco Seeds

WANG Junwei<sup>1,2</sup>, JIANG Caihong<sup>1</sup>, SONG Zhimei<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1,2</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, WANG Yuanying<sup>1</sup>,  
LIU Guanshan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In this study, tobacco seeds of different varieties were treated with the chemical mutagen, ethyl methane sulfonate (EMS). The germination rate and root lengths of the mutated seeds were measured. The results showed that germination was inhibited at EMS concentrations of 0.1%-1.3%, while the lower concentration EMS could increase the germination rate; the higher concentration EMS could significantly inhibit the germination and root elongation. By the selection criteria of lethal concentration 50, the appropriate concentrations of EMS for treating flue-cured tobacco seeds were 0.35%-0.52% and lethal concentrations for all five varieties were 1.3%. The sensitivity of tested tobacco varieties to EMS in descending order was Yunyan87=Yunyan97 > Honghuada-jinyuan > Zhongyan100 > K326.

**Keywords:** flue-cured tobacco; seeds; EMS; lethal concentration 50; mutant

诱变育种是人为利用物理或化学因素来处理种子、植株、组织、细胞或花粉使其基因型产生遗传变异, 从中选择培育新品种的方法<sup>[1]</sup>。物理诱变应用较多的是辐射诱变, 即用  $\gamma$  射线、 $\beta$  射线、 $\chi$  射线、中子等物理因素诱发变异。其诱因是高能射线造成基因突变、染色体结构变异。化学诱变是用化学诱变剂如甲基磺酸乙酯 (Ethyl Methane Sulfonate, EMS)、硫酸二乙酯等烷化剂或碱基类似物等处理植物材料, 以诱发遗传物质的突变, 从而

引起形态特征的变异, 然后根据育种目标, 对这些变异进行鉴定、培育和选择, 最终育成新品种。EMS 由于其操作简便, 成本较低, 诱变效果具有一定专一性和破坏性较小, 诱变频率高, 突变性状多为显性基因控制, 易于筛选<sup>[2]</sup>, 染色体畸变相对较少<sup>[3]</sup>等优点, 被有效用于各种作物的诱发突变育种, 已育成的水稻、小麦、大麦和大豆<sup>[4]</sup>等突变体达 2 250 个<sup>[5]</sup>。目前, 关于 EMS 处理烟草的诱变育种报道还不多, 陈廷俊等<sup>[6]</sup>利用 0.3% EMS 处理烟草

基金项目: 国家烟草专卖局项目“烟草突变体库创建与功能基因组学研究”(110200701022)

作者简介: 王军伟, 男, 在读硕士, 研究方向为烟草分子育种。E-mail: wangjunweiwang@163.com。\*通信作者, E-mail: liuguanshan2002@163.com

收稿日期: 2010-09-10

修回日期: 2011-03-13

Burley18 的花培单倍体幼苗心叶, 并接种 CMV, 结合绿岛组织培养技术, 筛选出抗 CMV 的细胞突变系 R2 和 R3。Medrano H 等<sup>[7]</sup>研究发现, 经 0.1% 浓度处理 1 h 和 0.05% 浓度处理 1~2 h 的烟草花药, 对提高花粉脱分化小植株的数量最有效。

本试验以 EMS 作为诱变剂, 通过探讨 EMS 对烟草种子发芽率、根长等性状的诱变效应, 以期为开展烟草种子化学诱变研究, 构建烟草突变体库奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为烤烟主要品种: 中烟 100、红花大金元、K326、云烟 97、云烟 87。种子由中国农业科学院烟草研究所种质资源库提供。EMS 诱变剂购自 SIGMA 公司, 规格为 5G。

### 1.2 处理浓度与方法

处理浓度分别为 0 (CK)、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1% 和 1.3%。处理方法是将 pH 6.5 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )<sup>[8]</sup> 作为溶剂, 配制浓度为 0 (CK)、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1% 和 1.3% 的 EMS 溶液 (V/V)。称取供试种子各 1 g, 用纯水浸种 4 h。用滤纸吸干种子表面的水后, 将种子分别加到装有 500  $\mu\text{L}$  上述浓度 EMS 溶液的 EP 管中, 放置于 26  $^{\circ}\text{C}$ 、110 rpm 的摇床内, 诱变处理 16 h。诱变处理后, 用 pH 6.5 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液润洗, 每隔 0.5 h 换一次磷酸缓冲液, 洗 3 次后用长流自来水冲洗 2 h 左右。然后将种子点播于铺有滤纸的培养皿中, 每个处理重复 4 次, 在 26  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。第 14 天调查发芽率<sup>[9]</sup>, 第 30 天统计根长。发芽率/% = (14 d 发芽种子数/供试种子数)  $\times 100\%$ ; 相对发芽率指处理的发芽率/对照的发芽率。相对根长指处理的根长/对照的根长。在不同浓度 EMS 处理烤烟种子后, 以相对发芽率为 0.5 时的 EMS 处理浓度即半致死浓度 (Lethal concentration 50, LC50) 为标准, 探究 EMS 的适宜处理浓度。

### 1.3 数据分析

对试验中的种子发芽率和种苗根长进行调查, 结果用 SPSS 11.5<sup>[10]</sup> 及 SAS 9.1<sup>[11]</sup> 数据软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 EMS 对烤烟发芽率的影响

半致死浓度 (LC50) 指处理后种子或植物的某一器官成活率为对照 50% 的处理浓度。一般以半致死浓度为基准, 通过增加或降低试验剂量以选择适宜处理浓度<sup>[12]</sup>。由表 1 和图 1 可以看出, 与 CK 相比, 全部 EMS 处理对烟草种子的发芽率均有较大影响。不同品种对 EMS 的敏感性不同, 但总趋势都是随着 EMS 浓度的升高, 相对发芽率直线下降。在 0.1%~0.5% 浓度区间内随 EMS 处理浓度的升高, 发芽率下降的幅度较小, 而在 0.7%~1.3% 浓度区间内随 EMS 处理浓度的升高, 发芽率下降的幅度较大。5 个品种的下降幅度不同, K326 下降幅度最小, 中烟 100、红花大金元、云烟 87 次之, 云烟 97 下降幅度最大。当 EMS 浓度达 1.3% 时, 发芽率全部为 0, 说明 5 个烤烟品种的致死浓度均为 1.3%。

差异显著性分析表明, 同一烤烟品种不同 EMS 浓度的发芽率间差异显著, 不同烤烟品种同一 EMS 浓度的发芽率间也有显著差异 (CK 和 1.3% EMS 浓度除外), 而且前者的差异程度大于后者, 这说明 EMS 浓度是造成供试种子发芽率变化的主要因素, 但存在有基因型差异。

表 1 不同品种经 EMS 处理后烤烟的发芽率 %  
Table 1 Germination rate of different flue-cured tobacco varieties treated by various EMS concentrations

品种	EMS 浓度							
	CK	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3
中烟 100	98a	89Ab	80Ac	60Ad	46Ae	23Af	10Ag	0h
K326	97a	89Ab	82Ac	69Bd	49Ae	26Af	9Ag	0h
红花大金元	98a	86Ab	71Bc	54Bd	40Be	22Af	13Ag	0h
云烟 97	95a	75 Bb	56Cc	42Cd	32BcE	11Bf	2Bg	0 g
云烟 87	96a	81Cb	62Dc	45Cd	35Ce	20Bf	8 Bg	0 g

注: 同列不同大写字母表示同一浓度不同品种差异性达到显著水平 ( $\alpha=0.05$ ); 同行不同小写字母表示不同浓度同一品种差异性达到显著水平 ( $\alpha=0.05$ ), 下同。

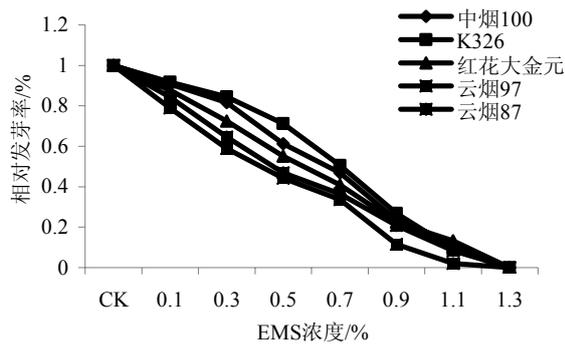


图 1 不同浓度 EMS 处理后供试品种的相对发芽率

Fig.1 Relative germination rate of various cultivars treated by different EMS concentrations

通过逐步回归分析，获得了 5 个烤烟品种发芽率随 EMS 浓度变化的回归方程(表 2)。可以看出，发芽率与 EMS 浓度呈显著负相关。由回归方程可以计算出，中烟 100、K326、红花大金元、云烟 87 和云烟 97 的 EMS LC50 分别为 0.49%、0.52%、0.43%、0.35%和 0.35%。从图 1 中也可以直观地看出，云烟 87 和云烟 97 的 EMS LC50 是一致的，但比中烟 100、K326 和红花大金元的低，其中 K326 的最高。由此可以认为，供试烤烟品种对 EMS 的敏感性由大到小依次为云烟 87=云烟 97>红花大金元>中烟 100>K326。

表 2 5 个烤烟品种的发芽率和 EMS 浓度的回归方程

Table2 Regression equations between germination rate and EMS concentrations for five flue-cured tobacco varieties

品种	回归方程	R <sup>2</sup>
中烟 100	$\hat{y}=98.94-7869x$	0.992**
K326	$\hat{y}=100.9-7894x$	0.983**
红花大金元	$\hat{y}=93.9-7492x$	0.993**
云烟 87	$\hat{y}=83.37-7190x$	0.957**
云烟 97	$\hat{y}=88.10-7255x$	0.978**

注：\*\*表示相关极显著 ( $\alpha=0.01$ )，下同。

### 2.2 EMS 对烤烟种苗根长的影响

由表 3 和图 2 看出，浓度为 0.1%的 EMS 对各品种种苗根长均有促进作用。中烟 100、K326、红花大金元、云烟 97、云烟 87 的种苗根长分别比 CK 增长了 6.77%、4.74%、5.37%、2.52%、1.18%。随着 EMS 浓度进一步提高，根长受到抑制，且损伤程度随着 EMS 浓度的逐步增加而加大。其中随

EMS 浓度增大，K326 的根长与 CK 相比减短最小，中烟 100、红花大金元、云烟 87 次之，云烟 97 减短最大。

表 3 不同浓度 EMS 处理后供试品种种苗根长 cm

Table3 Root lengths of various cultivars treated by different EMS concentrations

品种	EMS 浓度/%								
	CK	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	
中烟 100	3.84a	4.1b	3.45Ac	3.21Ad	2.41Ae	1.8Af	0.2g	0g	
K326	4.01a	4.2ba	3.83ABb	3.54ABc	2.72ABd	2.3ABe	0.5f	0f	
红花大金元	3.91a	4.12ba	3.23ABb	3.12BCc	2.23BCc	1.56ABd	0.1e	0e	
云烟 97	3.97a	4.07b	3.13Bc	2.86BCd	1.97Ce	1.13ABf	0fg	0g	
云烟 87	4.23a	4.28b	3.34Bc	3.08Cd	2.14Ce	1.27Bf	0.1g	0h	

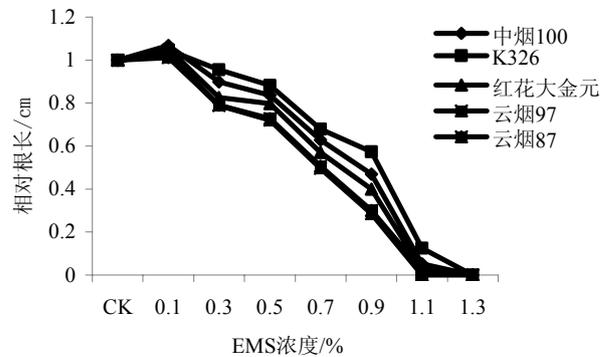


图 2 不同浓度 EMS 处理后 5 个烤烟品种的种苗相对根长

Fig.2 Relative root lengths of five flue-cured tobacco varieties treated by different EMS concentrations

虽然同一品种不同 EMS 浓度的种苗根长之间以及不同品种同一 EMS 浓度 (CK、1.1%和 1.3%EMS 浓度除外)的种苗根长之间均达到显著差异，但根长的差异程度要小于发芽率。通过逐步回归分析，也获得了 5 个烤烟品种根长随 EMS 浓度变化的回归方程，种苗的根长与 EMS 浓度呈显著负相关(表 4)。

表 4 5 个烤烟品种的种苗根长和 EMS 浓度的回归方程

Table 4 Regression equations between root length and EMS concentrations for 5 flue-cured tobacco varieties

品种	回归方程	R <sup>2</sup>
中烟 100	$\hat{y}=4.38-327.1x$	0.937**
K326	$\hat{y}=4.638-326.7x$	0.908**
红花大金元	$\hat{y}=4.330-334.1x$	0.953**
云烟 87	$\hat{y}=4.509-359.8x$	0.976**
云烟 97	$\hat{y}=4.245-343.5x$	0.973**

### 3 讨论

目前,烟草诱变育种多采用 $\gamma$ 射线<sup>[13]</sup>、离子注入<sup>[14]</sup>等物理方法,关于烟草化学诱变特别是 EMS 诱变处理的报道较少。本试验选取 5 个烤烟栽培品种中烟 100、红花大金元、K326、云烟 97、云烟 87 进行不同 EMS 浓度处理。结果表明,在 0.1%~1.3%处理的浓度范围内,EMS 对种子的发芽率主要呈抑制作用。以半致死浓度为选择标准,确定了 EMS 诱变烤烟不同品种的适宜浓度为 0.35%~0.52%,致死浓度均为 1.3%。它们对 EMS 的诱变敏感性顺序为云烟 87=云烟 97>红花大金元>中烟 100>K326。Julio E 等<sup>[15]</sup>采用白肋烟(BB16NN)为材料,以种子处理后 7 d 的发芽势降低 25%~40%为筛选条件,选择的 EMS 适宜处理浓度为 0.6%和 0.8%。史跃伟等<sup>[16]</sup>以烤烟(K346、NC82 和云烟 85)为材料,得出 EMS 适宜的诱变浓度为 0.35%,且 3 个品种对 EMS 的诱变敏感性顺序为云烟 85>K346≈NC82。本试验得到的烤烟适宜 EMS 诱变浓度比拟南芥的适应浓度 0.2%<sup>[17]</sup>要高,与大豆的适应浓度 0.4%<sup>[18]</sup>接近,比小麦的适应浓度 0.9%或 1.0%<sup>[19]</sup>和水稻的适应浓度 1.5%<sup>[20]</sup>的要低的多,与史跃伟等<sup>[16]</sup>得到的烤烟 EMS 诱变适宜浓度 0.35%接近,但比其稍高。因此,在对植物种子进行处理时,不同种植物之间,同种植物不同类型(例如烤烟和白肋烟)之间以及同种类型(例如烤烟)不同品种之间 EMS 诱变的适宜浓度以及对 EMS 的敏感性均存在显著差异。

通过差异显著性分析发现,同一烤烟品种不同 EMS 浓度的发芽率间差异显著,说明 EMS 浓度是影响烤烟种子发芽率的主要因素;而不同烤烟品种同一 EMS 浓度烤烟种子的发芽率也有显著差异(CK 和 1.3%EMS 浓度除外),可见品种也是影响 EMS 处理种子发芽率的关键因素。但是前者的差异程度大于后者,因而在进行 EMS 诱变处理时,针对不同的烟草品种类型要分别摸索其适宜的 EMS 浓度。

试验表明,低浓度处理对种子发芽率和种子根的伸长有促进作用,高浓度处理对种子发芽率和种子根的伸长均呈显著抑制作用。原因可能是低浓度的 EMS 能促进细胞的呼吸作用,生理代谢增强,从而促进其生长分化;而高浓度的 EMS 则对烟草的生理代谢有抑制作用,且浓度越高代谢受到的抑制作用越强。

烤烟 EMS 诱变适宜浓度的获得为创建烟草突变体库奠定了基础,后续研究也得到了许多不同表型的突变体。这些突变材料可用于克隆和阐明烟草的重要功能基因,是烟草功能基因组研究中不可缺少的重要组成部分<sup>[21]</sup>。还可直接育成烟草新品种或创造新的烟草种质资源,极大丰富烟草的遗传资源。

#### 参考文献

- [1] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005.
- [2] 安学丽,蔡一林,王久光,等. 化学诱变及其在农作物育种上应用[J]. 核农学报,2003,17(3):239-242.
- [3] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse genetic screen in Arabidopsis[J]. Genetics, 2003, 164: 731-740.
- [4] 韩锁义,杨玛丽,陈远东,等. 大豆“南农 94-16”突变体库的构建及部分性状分析[J]. 核农学报,2008(2):131-135.
- [5] Ahloowalia B S, Maluszynski M, Nichterlein K. Global impact of mutation-derived varieties[J]. Euphytica, 2004, 135: 187-204.
- [6] 陈廷俊. 烟草抗 CMV 细胞突变系筛选系统研究[J]. 植物保护学报,1997,24(4):317-320.
- [7] Medrano H, Millo E P, Guerri J. Ethyl-methane-sulphonate effects on anther cultures of Nicotiana glauca[J]. Euphytica, 1986, 35: 161-168.
- [8] 薛万新. 种子生理学[D]. 西安:西北农业大学,1998.
- [9] 杨春雷,林国平,杨久红,等. 烟草种子渗透调节技术及机理研究[J]. 中国烟草学报,2009,15(2):50-54.
- [10] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC50[J]. 昆虫知识,2006,43(3):414-417.
- [11] 曹建敏,邱军,杨德廉,等. 不同等级烤烟多酚含量及其规律性分析[J]. 中国烟草科学,2009,30(6):21-24.

(下转第 27 页)

- [17] Smykal P, Gennen J, De Bodt S, et al. Flowering of strict photoperiodic *Nicotiana* varieties in non-inductive conditions by transgenic approaches[J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65(3): 233-242.
- [18] 宗成文, 房经贵, 陶建敏, 等. 葡萄 MADS-box 家族基因保守片段的克隆与序列分析[J]. *果树学报*, 2007, 25(1): 27-32.
- [19] Shore P, Sharrocks A D. The MADS-box family of transcription factors[J]. *Eur J Biochem*, 1995, 229(1): 1-13.
- [20] Becker A, Theissen G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003 29(3): 464-89.
- [21] 王军, 王益奎, 韦建玉, 等. 烟草早花成因与控制[J]. *广西农业科学*, 2004, 35(4): 331-332.
- [22] Blazquez M A, Weigel D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2000, 404(6780): 889-892.
- [23] Samach A, Onouchi H, Gold S E, et al. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2000, 288(5471): 1613-1616.
- [24] Sheldon C C, Rouse D T, Finnegan E J, et al. The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(7): 3753-3758.
- [25] Hartmann U, Höhmann S, Nettessheim K, et al. Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2000, 21(4): 351-360.
- [26] Li D, Liu C, Shen L, et al. A repressor complex governs the integration of flowering signal in *Arabidopsis*[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(1): 110-120.
- [27] Yu H, Xu Y, Tan EL, et al. AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(25): 16336-16341.
- [28] Koo S C, Bracko O, Park M S, et al. Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene *AGAMOUS LIKE6*[J]. *Plant J*, 2010, 62(5): 807-816.
- [29] Perry S E, Nichols K W, Fernandez D E. The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(11): 1977-1989.
- [30] Fernandez D E, Heck G R, Perry S E, et al. The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(2): 183-198.
- [31] Rounsley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(8): 1259-1269.
- [32] Alvarez-Buylla E R, Liljegren S J, Pelaz S, et al. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes[J]. *Plant J*, 2000, 24(4): 457-466.
- [33] Burgeff C, Liljegren S J, Tapia-López R, et al. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots[J]. *Planta*, 2002, 214(3): 365-372.

(上接第20页)

- [12] 西南农业大学. 蔬菜育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 139.
- [13] 佟道儒, 贾兴华.  $\gamma$ 射线诱变烟草花药培养的突变体[J]. *核农学报*, 1991, 5(4): 193-198.
- [14] 殷凤生, 林国平, 孙学永, 等. 离子注入对烟草种子萌发及苗期生长发育的影响[J]. *中国烟草科学*, 1999, 20(2): 15-19.
- [15] Julio E, Laporte F, Reis S, et al. Reducing the content of nicotine in tobacco via targeted mutation breeding[J]. *Mol Breed*, 2008, 21: 369-381.
- [16] 史跃伟, 任学良, 王轶, 等.  $\gamma$ 射线与 EMS 单一及复合处理对烤烟种子活力的诱变效应[J]. *贵州农业科学*, 2009, 37(12): 62-65.
- [17] 赵淑清. 一种筛选拟南芥突变体的有效方法[J]. *遗传*, 2001, 23(3): 260-262.
- [18] 陈远东, 喻德跃. EMS 诱发大豆“南农 94-16”突变体库的扩建及部分突变体的 SSR 分析[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 574-582.
- [19] Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, et al. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat[J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 115.
- [20] Till B J, Cooper J, Tai T H, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING[J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 19.
- [21] 蔡刘体, 郑少清, 胡重怡, 等. 烟草突变体库及其在功能基因组研究中的应用[J]. *中国烟草科学*, 2008, 29(6): 27-31.