

EMS 处理对大白菜种子萌发及主要生化指标的影响

卢 银 刘梦洋 王彦华 罗双霞 轩淑欣 赵建军 申书兴*

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000)

摘 要: 为了探讨大白菜诱变育种的新方式, 研究了不同浓度 EMS 处理对大白菜种子萌发、幼苗生长及其主要生化指标的影响。结果表明: 在 0~1.0% 浓度范围内, 随着 EMS 浓度的增加, 大白菜种子的发芽势、发芽率逐渐降低, 幼苗根尖和叶缘褐化程度逐渐加剧, 成活率下降, 种子浸出液电导率以及种子和幼苗的 MDA 含量均逐渐增加; EMS 对种子及幼苗 SOD、POD 活性影响表现为低浓度促进, 高浓度抑制。适宜大白菜种子诱变处理的 EMS 浓度范围为 0.4%~0.6%。

关键词: 大白菜; EMS; 发芽率; SOD; POD; MDA

基因突变是种质创新的根本途径, 但在自然条件下基因突变率很低, 人工诱变可使基因突变率提高千倍以上, 甲基磺酸乙酯 (ethyl methyl sulfonate, EMS) 是当今应用效果最好的化学诱变剂之一, 已成功地应用于多种作物的诱变育种 (Wang et al., 2008; Stephenson et al., 2012), 并在作物突变体库的构建和反向遗传学等基础研究中发挥了重要作用。Feiz 等 (2009a, 2009b) 利用 EMS 诱变技术创建了 2 500 株普通软质小麦突变体库, 并推算每隔 12 kb 有 1 个突变发生, 是目前报道突变频率最高的突变体库。Slade 等 (2005) 应用定向诱导基因组局部突变技术 (targeting induced local lesions in genomes, TILLING) 从 EMS 诱变种子后代 1 920 个糯性基因小麦突变个体中筛到 246 个等位基因, 获得了丰富的遗传信息和有价值的突变个体。在芸薹属作物中, EMS 诱变研究主要针对甘蓝型油菜, 关于大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson] EMS 诱变研究尚无

报道 (和江明等, 2004; Ferrie et al., 2008; 原小燕等, 2010)。本试验采用不同浓度的 EMS 处理大白菜种子, 对种子萌发特性、电导率及种子和子叶幼苗超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量变化进行研究, 确定适宜大白菜种子诱变处理的适宜 EMS 浓度, 明确 EMS 处理对细胞膜透性及保护酶系统的影响, 为大白菜诱变育种及反向遗传学等基础研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于 2012 年 8 月在河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室进行。以市售大白菜当年商品种津育 80 及河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室低温保存 5 a 的自交系种子 99-2 为试材。津育 80 为青麻叶直筒形, 中晚熟, 生育期 80~85 d, 球顶呈花心形; 99-2 为筒形, 球顶部合抱, 中晚熟, 生育期 80 d 左右。

1.2 方 法

1.2.1 EMS 处理对种子萌发的影响 挑选饱满的种子, 每个品种分成 6 组, 每组 50 粒, 25 °C 清水浸种 2 h 后分别用浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的 EMS 浸种, 80 r·min⁻¹ 高速震荡处理 4 h, 自来水冲洗 2 h 后转至铺有双层滤纸的培养皿中, 置于培养箱中 25 °C / 20 °C (昼 / 夜) 条件下催

卢银, 女, 博士研究生, 讲师, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: luagzoujidong@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 申书兴, 男, 教授, 博士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: shensx@hebau.edu.cn

收稿日期: 2014-01-16; 接受日期: 2014-02-25

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目 (2012AA100202-5), 农业科研杰出人才培养计划项目

芽。以清水处理为对照, 每处理 3 次重复。3 d 后统计发芽势, 7 d 后统计发芽率, 10 d 后统计成活率, 并记录子叶幼苗发育情况。

1.2.2 EMS 处理对种子浸出液电导率的影响 挑选饱满的种子, 每个品种分成 6 组, 每组 50 粒, 称质量; EMS 处理同 1.2.1, 自来水冲洗 2 h 后, 于 10 mL 蒸馏水中浸泡 0.5 h, 采用上海雷磁仪器厂生产的 DDS-307 型电导仪测定浸出液电导率; 以静置 0.5 h 的蒸馏水为空白对照 (毛培胜等, 2008)。

1.2.3 EMS 处理对种子和幼苗 POD、SOD 活性及 MDA 含量的影响 分别用浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 的 EMS 高速震荡处理 4 h、水洗 2 h 的种子及催芽 7 d 后的幼苗各 1 g, 进行 SOD、POD

活性及 MDA 含量测定。以清水处理为对照, 3 次重复。SOD 活性测定采用 Fridorich NBT 光还原法 (李合生, 1999), POD 活性测定采用愈创木酚法 (张志良, 2000), MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法 (赵世杰等, 1991)。

2 结果与分析

2.1 EMS 处理对大白菜种子萌发的影响

由表 1 可知, EMS 处理对大白菜种子萌发及幼苗发育产生了抑制作用。随着 EMS 浓度增加, 津育 80 和 99-2 的发芽势、发芽率及成活率大体呈逐渐下降的趋势, 幼苗的损伤程度也逐渐加剧, 表现为幼苗弱小、根尖及子叶叶缘褐化、腐烂发黑等现象。

表 1 不同浓度 EMS 处理对大白菜种子萌发及幼苗发育特性的影响

EMS 浓度/%	材料	发芽势/%	发芽率/%	成活率/%	幼苗发育情况
清水 (CK)	津育 80	94	96	94	良好
	99-2	93	96	94	良好
0.2	津育 80	94	94	91	少量根尖及叶缘轻微褐化
	99-2	90	94	90	少量根尖及叶缘轻微褐化
0.4	津育 80	83	88	73	少量根尖及叶缘轻微褐化
	99-2	63	81	52	50% 根尖及叶缘中度褐化
0.6	津育 80	67	72	54	50% 根尖及叶缘中度褐化
	99-2	38	41	37	幼苗弱小, 褐化严重, 部分幼苗褐化部位腐烂发黑
0.8	津育 80	57	61	61	幼苗弱小, 褐化严重, 部分幼苗褐化部位腐烂发黑
	99-2	22	13	13	大部分幼苗严重褐化并腐烂发黑坏死
1.0	津育 80	16	18	10	大部分幼苗严重褐化并腐烂发黑坏死
	99-2	11	2	0	出芽时芽尖即严重褐化并腐烂坏死

通常以半致死剂量为适宜处理浓度, 本试验中, 当 EMS 浓度为 0.4% 时, 99-2 种子催芽 10 d 后的成活率为 52%, 且发育成植株后能正常生长; 当 EMS 浓度为 0.6% 和 0.8% 时, 津育 80 的成活率接近 50%, 但 EMS 浓度为 0.8% 的处理后期幼苗逐渐死亡, 最终发育成植株的仅为 27%。所以处理 99-2 和津育 80 种子的适宜 EMS 浓度为 0.4% ~ 0.6%。

2.2 EMS 处理对大白菜种子电导率的影响

由图 1 可知, 当 EMS 浓度低于 0.2% 时, 两种大白菜种子浸出液的电导率均在 $5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下; 当 EMS 浓度大于 0.2% 时, 两种大白菜种子浸出液的电导率均随 EMS 浓度增加而增大; 当 EMS 浓度为 1.0% 时, 津育 80 和 99-2 种子浸出液的电导率分别增至 108.65 、 $268.73 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。说明随着 EMS 浓度增加, 更多的细胞内物质渗漏, 细胞

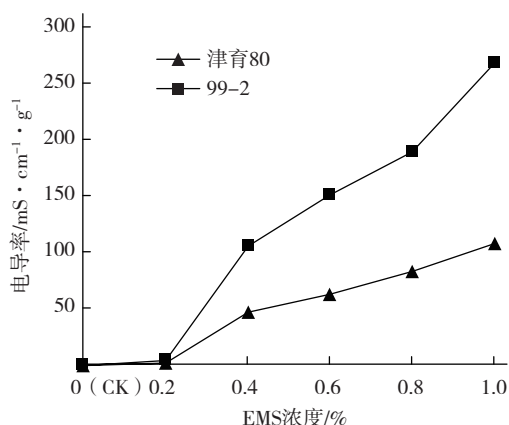


图 1 不同浓度 EMS 处理对大白菜种子电导率的影响
质膜受害严重, 且 99-2 较津育 80 受害程度更大。

2.3 EMS 处理对大白菜种子及幼苗 SOD、POD 活性的影响

如图 2、3 所示, 随着 EMS 浓度增加, 大白菜种子及幼苗 SOD、POD 活性均呈先增加后降低的趋

势,且种子的SOD、POD活性整体高于幼苗。当EMS浓度为0.6%时,津育80种子及幼苗SOD、POD活性均达到最大值;而99-2种子及幼苗SOD、POD活性达到最大值时的EMS浓度为0.4%。

不同浓度EMS处理的99-2种子SOD活性均远远高于津育80,POD活性除0.6%浓度处理外亦均高于津育80。99-2幼苗的SOD、POD活性基本上低于津育80,EMS浓度低于0.6%时,二者差异不大;而当EMS浓度高于0.6%时,99-2幼苗SOD、POD活性迅速下降,与津育80的差异增大。

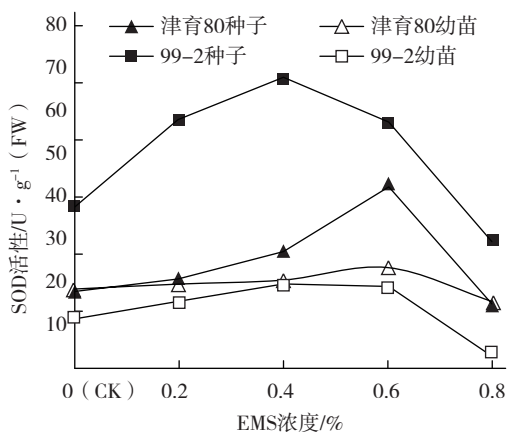


图2 不同浓度EMS处理对大白菜种子及幼苗SOD活性的影响

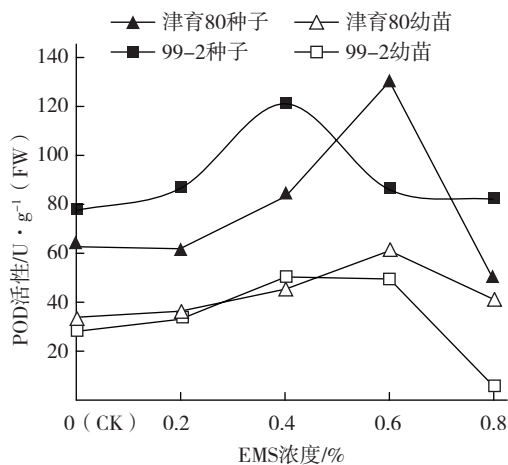


图3 不同浓度EMS处理对大白菜种子及幼苗POD活性的影响

2.4 EMS处理对大白菜种子及幼苗MDA含量的影响

由图4、5可知,随着EMS浓度的增加,两种大白菜种子和幼苗的MDA含量都呈现逐渐升高的趋势,种子的MDA含量均明显高于幼苗;且不同浓度EMS处理99-2种子和幼苗的MDA含量均高

于津育80。当EMS浓度为0.4%~0.6%时,99-2种子和幼苗的MDA含量迅速增加,此后增加趋势趋于缓和;津育80种子MDA含量在EMS浓度为0.6%~0.8%时迅速增加,而幼苗MDA含量的增加趋势整体比较缓和。表明EMS处理对大白菜种子的作用效应高于幼苗,而且老化的、生理状态弱的种子受毒害时其体内有害物质的积累也高于新的、生理状态好的种子。

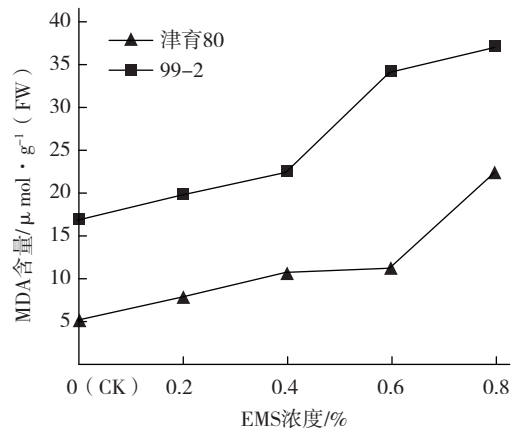


图4 不同浓度EMS处理对大白菜种子MDA含量的影响

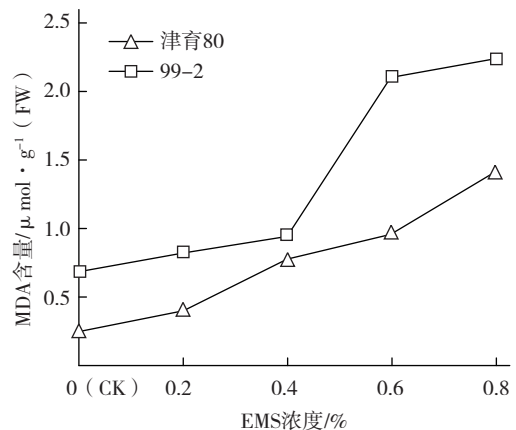


图5 不同浓度EMS处理对大白菜幼苗MDA含量的影响

3 结论与讨论

高秀华等(2006)用0.2%~0.5%的EMS处理盐芥种子,发现随着EMS浓度增加M₁发芽率逐渐降低,黄化嵌合苗数量也随之增加。王幼平等(1999)用EMS处理海甘蓝种子,发现低剂量EMS促进种子萌发和幼苗生长,而较高剂量EMS则降低种子发芽势和发芽率。本试验结果表明,EMS处理对两种大白菜种子萌发和幼苗发育都产生了抑制作用,且随着EMS浓度增加抑制作用增强。两份供试材料的生态型相似,但对EMS浓度

反应存在差异, 津育 80 对 EMS 的耐受性明显优于 99-2, 这可能与两份材料的生理状态有关, 99-2 种子存放了 5 a, 老化程度加剧, 种子活力减弱。

突变剂引发遗传物质的变化, 存在一个吸收能量的阈值, 一般多以植株存活一半的剂量即半致死剂量 (LD_{50}) 作为引变敏感性指标 (王长里等, 2008)。本试验中, 99-2 和津育 80 种子发芽成活率约为 50% 时的 EMS 浓度分别为 0.4% 和 0.6%, 同时, 0.4% 和 0.6% 也分别是这两份材料种子 SOD、POD 活性达到最大、MDA 含量迅速增加时的 EMS 浓度。因此, 在大白菜种子诱变育种中, EMS 处理的适宜浓度为 0.4%~0.6%, 处理时间为 4 h。

EMS 处理诱发了细胞内一系列生理生化反应, 产生超氧阴离子自由基等有害大分子, 而 SOD、POD 作为保护性酶可有效地清除这些有害物质。本试验发现, 种子的 POD、SOD 活性及 MDA 含量均远远高于幼苗。一方面可能是由于 EMS 的作用在种子发育成幼苗的过程中逐渐被机体代谢掉, 导致其对幼苗的影响远远不及种子; 另一方面, 幼苗较种子单位质量内含有更多的蛋白质和糖等物质, 质量基数较大。Smith 和 Berjak (1995) 认为, 种子生命力的丧失与自由基的伤害有关, 陈种子在保存过程中必然会产生并积累一定量的自由基, 自由基作用于脂质发生过氧化反应, 氧化终产物即为 MDA。本试验中, 相同浓度 EMS 处理, 99-2 无论是种子还是幼苗的 MDA 含量均高于津育 80, 发芽势、发芽率及成活率均低于津育 80, 褐化情况也更为严重。此外, 99-2 种子的 SOD、POD 活性基本上高于津育 80, 可能就是由于机体为应对高浓度自由基等有害物质, 需要产生更多的保护酶并表现出更高的活性所致。

参考文献

高秀华, 孔祥强, 赵彦修, 张慧. 2006. 盐芥 EMS 突变体创制的探讨. 安徽农业科学, 34 (20): 5189-5190, 5193.
和江明, 王敬乔, 陈薇, 李根泽, 寸守铤. 2004. EMS 对甘蓝型油

菜离体小孢子胚胎发生能力的影响. 西南农业学报, 17 (6): 690-693.
李合生. 1999. 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社: 67-69.
毛培胜, 常淑娟, 王玉红, 廉佳杰. 2008. 人工老化处理对羊草种子膜透性的影响. 草业学报, 17 (6): 66-70.
王长里, 付晶, 杨学举. 2008. EMS 诱导小麦突变体的研究及展望. 安徽农业科学, 36 (19): 8038-8039.
王幼平, 徐晓霞, 高宏波, 蓝乐夫. 1999. EMS 和 ^{60}Co 对海甘蓝种子萌发及其 M_1 代农艺性状的影响. 木本植物研究, 19 (1): 64-67.
原小燕, 李加纳, 刘列钊. 2010. EMS 对油菜种子萌发的影响. 西南师范大学学报: 自然科学版, 35 (3): 217-221.
张志良. 2000. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社: 123-124.
赵世杰, 许长成, 邹琦, 孟庆伟. 1991. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 30 (3): 207-210.
Feiz L, Beecher B S, Martin J M, Giroux M J. 2009a. In planta mutagenesis determines the functional regions of the wheat puroindoline proteins. Genetics, 183 (3): 853-860.
Feiz L, Martin J M, Giroux M J. 2009b. Creation and functional analysis of new puroindoline alleles in *Triticum aestivum*. Theoretical and Applied Genetics, 118 (2): 247-257.
Ferre A M R, Taylor D C, Mackenzie S L, Rakow G, Raney W A. 2008. Microspore mutagenesis of *Brassica* species for fatty acid modifications: a preliminary evaluation. Plant Breeding, 127: 501-506.
Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, Steine M N, Facciotti D. 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. Nature Biotechnology, 23 (1): 75-81.
Smith M T, Berjak P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation tolerant and sensitive seeds// Kigel J, Galili G. Seed Development and Germination. New York: Marcel Dekker Inc: 701-704.
Stephenson P, Baker D, Girin T, Perez A, Amoah S, King G J, Østergaard L. 2012. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*. BMC Plant Biology, 10: 62.
Wang N, Wang Y J, Tian F, King G J, Zhang C Y, Long Y, Shi L, Meng J J. 2008. A functional genomics resource for *Brassica napus*: development of an EMS mutagenized population and discovery of FAE1 point mutations by TILLING. New Phytologist, 180 (4): 751-765.

Effects of EMS Treatment on Germination and Biochemical Characteristics of Chinese Cabbage Seed

LU Yin, LIU Meng-yang, WANG Yan-hua, LUO Shuang-xia, XUAN Shu-xin, ZHAO Jian-jun, SHEN Shu-xing*

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China)

不同灌溉模式对日光温室西瓜产量和品质的影响

李 阳¹ 李友丽² 田永强¹ 张振贤¹ 高丽红^{1*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 设施蔬菜生长发育调控北京重点实验室, 北京 100193; ² 北京市农林科学院农业信息技术研究中心, 北京 100097)

摘 要: 为探究适宜中国西北地区日光温室西瓜稳产优质栽培的灌溉模式, 以武威市当地传统灌溉模式为对照, 设置了两个处理: T₁, 控制各个生育期不同的土壤相对含水率下限、上限; T₂, 仅控制土壤相对含水率上限, 研究西瓜产量和品质对不同灌溉模式的响应。结果表明: 在 3 个茬口的栽培中, 在伸蔓期和成熟期控制土壤相对含水率下限 (70%、65%) 可在不显著降低西瓜产量的同时显著提高水分利用效率, 与对照相比, 控制土壤相对含水率下限和上限的 T₁ 处理全年水分利用效率提高了 21.85%; 同时, 控制土壤相对含水率能够明显提高西瓜主要风味物质可溶性糖的含量。

关键词: 日光温室; 西瓜; 灌溉水利用效率; 果实品质

武威市位于甘肃石羊河流域河西走廊东部, 该地区丰富的光热资源和较大的昼夜温差为生产品质高、风味佳的西瓜创造了得天独厚的条件。近年来, 随着武威地区日光温室栽培面积不断扩大及栽培技术和栽培模式的创新, 当地农户实现了日光温室西瓜一年多茬的高效栽培。这不仅提高了农民收

入, 同时也实现了西瓜的周年生产, 保证了市场供应 (张丽萍, 2011)。但是, 西瓜栽培需水量相对较大, 而石羊河流域年均降雨量小 (约 150 mm) 且蒸发量大 (可达 2 600 mm), 是我国西北水资源最为紧缺的地区之一, 因此研究该地区一年多茬栽培模式下的西瓜耗水规律和水分高效管理模式, 提高水分生产效率, 是实现石羊河流域农业节水提质增效的战略目标。根据已有的研究, 85%~90% 的土壤相对含水率为作物适宜的灌溉上限指标 (王宝英和张学, 1996), 而作物适宜的土壤相对含水率下限指标对不同作物和同一作物的不同生育期有较大区别。目前, 关于作物需水规律的研究多集中于番茄、辣椒和甜瓜等作物, 而有关西瓜的适宜土壤

李阳, 男, 硕士研究生, 专业方向: 设施环境与无土栽培, E-mail: lyrip@cau.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 高丽红, 女, 教授, 博士生导师, 专业方向: 温室土壤修复与化肥高效利用, E-mail: gaohl@cau.edu.cn

收稿日期: 2014-01-16; 接受日期: 2014-05-30

基金项目: 水利部公益性行业科技项目 (201001061), 现代农业产业技术体系和北京果类蔬菜建设专项 (CARS-25-C12), 2012 星火计划项目 (GA600002)

Abstract: Taking Chinese cabbage 'Jinyu 80' and '99-2' as experimental material, studied the effect of different EMS concentration treatments on seed germination, seedling growth, and major biochemical indexes of both seed and seedling. The results showed that within the scope of 0-1.0% concentration, the germination potential and germination rate of Chinese cabbage seeds were decreased, the seedling root tip and cotyledon edge gradually turned to brown. The seedling surviving rate was decreased gradually, and the conductivity value of seed leachate and MDA contents in seed and seedling were all increased gradually. The EMS effect on SOD and POD activities of seed and seedling were expressed as low concentration with promotion, and high concentration with inhibitor. The optimal EMS concentration for Chinese cabbage seed treatment was ranged from 0.4%-0.6%.

Key words: Chinese cabbage; EMS; Germination rate; SOD; POD; MDA