

蒙秋伊, 罗 凯, 刘鹏飞, 等. 甘蔗离体抗旱突变体的筛选及生理特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 99–102.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.031

# 甘蔗离体抗旱突变体的筛选及生理特性

蒙秋伊, 罗 凯, 刘鹏飞, 张正学

(贵州省亚热带作物研究所, 贵州兴义 562400)

**摘要:**用 0.2% 甲基磺酸乙酯(EMS)处理黔糖 5 号甘蔗愈伤组织 4 h, 在 100 g/L PEG 胁迫下进行抗旱性突变体筛选, 得到抗旱诱变植株。在盆栽条件下对抗旱突变体进行干旱胁迫, 测定甘蔗幼苗叶片的质膜透性、叶绿素荧光参数等相关生理指标。结果表明, 突变株系的最大光化学效率( $F_v/F_m$ )增强, 游离脯氨酸含量、叶绿素含量维持高水平, 丙二醛(MDA)含量减少, 细胞膜透性减小。对抗旱指标叶绿素荧光参数、相对电导率、MDA 含量、脯氨酸含量、叶绿素含量等进行综合评价, 诱变植株 B1、B2、B5 各项抗旱指标靠前。说明经 EMS 诱变和 PEG 筛选得到的抗性植株在耐旱性方面比对照强, 筛选的甘蔗突变体比对照具有更强的抗旱性。

**关键词:**甘蔗; 诱变; 抗旱突变体; 生理特性; 愈伤组织; 叶绿素荧光参数

**中图分类号:** S566.103.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0099-04

贵州蔗区多为旱坡地, 缺乏灌溉条件, 旱灾频发, 严重制约产业发展和蔗农增收。培育节水抗旱、丰产优质的甘蔗新品种, 是解决干旱问题经济有效的手段之一。创造耐旱资源的方法很多, 除自然变异外, 还有太空诱变、射线诱变、化学诱变等<sup>[1]</sup>, 其中化学诱变由于技术简单, 引起的变异丰富, 受到育种界广泛关注。Nilan 等用硫酸二乙酯(DES)处理大麦种子, 育成了产量高、茎秆矮、抗倒伏的品种 Luther<sup>[2]</sup>。此后, 农作物化学诱变育种在世界各国得以推广, 到 1990 年为止, 利用化学诱变育成的新品种(系)有 106 个, 约占诱变育成品种(系)的 7%, 以禾谷类居多, 其中大麦 15 个、水稻 12 个、小麦 9 个、玉米 7 个<sup>[3]</sup>。付凤玲等用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线和叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )处理玉米愈伤组织, 经过 1.0% NaCl 高渗培养基筛选, 得到 1 个耐旱性与耐旱自交系 81565 接近的株系, 并从 M1 代株系中发现了 1 个细胞核隐性单基因控制的孢子体雄性不育的雄性不育株<sup>[4]</sup>。陈丽等通过甲基磺酸乙酯(EMS)处理杨树胚性愈伤组织定向筛选耐盐突变体, 获得耐盐性明显比对照高的突变体株系<sup>[5]</sup>。许莉萍等以磷酸盐为选择剂,

从高产低糖的甘蔗品种中筛选出稳定的磷酸盐抗性细胞系, 其再生植株群体含糖量较对照高<sup>[6]</sup>。甘蔗体细胞无性系耐旱突变体的研究结果如下, Yadav 等在不同 NaCl 浓度和聚乙二醇(PEG) 8000 作用下, 离体选择经辐射诱变的 CoC671 体细胞无性系, 得到耐盐性和抗旱性增强的突变体<sup>[7]</sup>。这些研究表明经过物理化学诱变后, 在一定的选择压力下可以从产生的变异体中筛选出抗旱性强的细胞系。本试验利用甘蔗离体培养, 结合 EMS 诱变和 PEG 定向筛选技术, 以期获得甘蔗育种的中间材料, 为以后选育抗旱性强的甘蔗新品种提供育种材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为黔糖 5 号甘蔗。化学诱变剂为美国 SIGMA 公司生产的甲基磺酸乙酯(EMS)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 取甘蔗茎梢幼叶为外植体, 用自来水洗净, 剥去几层, 留下长 7~8 cm、直径 1.5~2.0 cm 的嫩叶梢; 用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 3~5 次; 再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~5 次; 在无菌滤纸上吸干表面的水, 再切去两端, 剥去 2~3 层, 留下长 4~5 cm、直径 0.5~1.0 cm 的嫩叶梢, 横切成 0.5~1.0 mm 厚的圆形薄片, 接入诱导培养基培养。

收稿日期: 2016-07-29

基金项目: 贵州省科学技术基金[编号: 黔科合 J 字(2012)2255 号]。

作者简介: 蒙秋伊(1984—), 女, 广西贵港人, 硕士, 助理研究员, 从事植物细胞工程与生物技术育种研究。Tel: (0851) 83760836; E-mail: mengqiuyi006@163.com。

[3] 主楚杰, 王爱云. 基因工程技术在杨树抗逆境方面的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 10-13.

[4] 李照英, 刘继生, 黄世臣. 氮磷钾施用量对一年生杨树扦插苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 254-256.

[5] 于 雷, 张 妍. 杨树苗木繁育技术综述[J]. 防护林科技, 2013(3): 73-75.

[6] 孙士庆. 杨树硬枝扦插育苗技术[J]. 辽宁林业科技, 2007(3): 55-57.

[7] 潘瑞炽, 李 玲. 植物生长发育的化学控制[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1995: 52-60.

[8] 宫庆涛, 武海斌, 张坤鹏, 等. 10 种常用植物生长调节剂在我国的登记情况[J]. 河南农业科学, 2016, 45(2): 92-97.

[9] 何生根, 乔爱民, 肖桂深, 等. 吲哚丁酸处理对水栽黑美人根系生长的影响[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2002, 15(2): 1-4.

[10] 何生根, 覃广泉, 余土元, 等. 吲哚丁酸与萘乙酸混合处理对水栽皇皇后根系生长的影响[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2002, 15(4): 20-23.

[11] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 275.

[12] 杨世杰. 植物生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 110-114.

1.2.2 培养条件及培养基 诱导培养基为 MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉;分化培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KT + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉;生根培养基为 1/2MS + 2.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L PP<sub>333</sub> + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂粉。诱导愈伤组织在 25 ℃ 下暗培养,分化及生根培养温度为 25 ℃,光照时间 12 h/d,光照度为 1 500 lx。

1.2.3 甘蔗愈伤组织的 EMS 诱变处理 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)配制浓度为 0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 的 EMS 溶液,过滤灭菌,以不含 EMS 的磷酸缓冲液处理为对照。取黔糖 5 号甘蔗愈伤组织用 EMS 溶液浸泡,每个浓度下分别浸泡 2、4、6、8 h 后,无菌水冲洗,再接种于诱导培养基恢复,一共 24 个处理,每个处理 6 皿。愈伤组织接种于诱导培养基暗培养 3~5 d 后转入分化培养基诱导分化,25 d 统计分化率,确定 EMS 50% 致死剂量。

愈伤分化率 = 分化苗数/接种愈伤组织块数 × 100% ;

愈伤相对分化率 = 处理分化率/对照分化率 × 100% 。

1.2.4 选择剂 PEG 浓度的确定 采用 PEG 6000 模拟干旱胁迫,配制 PEG 浓度为 0、20、40、60、80、100 g/L 的 1/2 MS 培养基,以未经诱变处理的黔糖 5 号甘蔗分化苗为材料,每处理分别接种 50 株于上述培养基中,重复 3 次,培养 30 d 观察生根情况,确定 PEG 处理临界浓度。

生根率 = 生根的外植体数/接种的外植体数 × 100% 。

1.2.5 抗旱突变体的筛选 将经 EMS 处理后的突变体植株进行 PEG 胁迫,接种到含 100 g/L PEG 的 1/2MS 生根培养基中,进行抗旱筛选,25 ℃ 条件下培养 30 d,再观察其生根情况。根据根系发育情况判断其抗旱性强弱,其中根系生长势强的为抗旱植株,完全不生根的为不抗旱植株。

1.2.6 干旱胁迫处理 将黔糖 5 号甘蔗突变体株系移栽至盆钵,以同期分化出的未处理的组培再生苗为对照,定量供水保持土壤水分一致性,生长盛期时停止浇水,停止浇水前采样测定一次抗旱性生理指标;10 d 后土壤表面发白,甘蔗叶片部分卷曲,叶间部分枯萎,清晨无吐水现象,再次采样进行抗旱性生理指标测定。

1.2.7 抗旱突变体株系的生理生化鉴定 用 FMS-1 脉冲调制式荧光仪测定 +1 位叶最大光化学效率( $F_v/F_m$ ),采用电导率法<sup>[8]</sup>测定质膜透性,用硫代巴比妥酸法<sup>[9]</sup>测定丙二醛(MDA)含量,采用张宪政的方法<sup>[10]</sup>测定叶绿素含量,采用酸性茚三酮法测定脯氨酸含量。

1.2.8 数据处理 所有数据均用 Microsoft Office Excel 2007 整理,数据的统计分析均采用 SPSS 20.0 软件进行分析。抗旱性分析采用模糊数学中的隶属函数法,对抗性植株进行各种生理指标的综合评定,按照隶属函数加权值的高低评判抗旱性强弱。

若生理指标与抗旱性成正相关,隶属函数  $X = (X_i - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$ ;若生理指标与抗旱性成负相关,隶属函数  $X = 1 - (X_i - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$ 。式中: $X_i$  代表生理指标测定值; $X_{min}$  代表不同品种甘蔗各株系所对应生理指标的最小值; $X_{max}$  代表不同品种甘蔗各株系所对应生理指标的最大值。

2 结果与分析

2.1 EMS 处理对幼胚愈伤组织分化率的影响

表 1 表明,随着 EMS 浓度的增加、诱变处理时间的加长,甘蔗愈伤组织分化率逐渐降低。诱变处理时间为 8 h,EMS 浓度为 0.2% 时,甘蔗愈伤组织相对分化率降为 0,说明 EMS 处理时间对愈伤组织分化率影响很大。在 EMS 浓度为 0.2%~0.4%、处理时间为 4 h,以及 EMS 浓度为 0.4%、处理时间为 2 h 时,相对分化率为 50% 左右。

表 1 不同 EMS 处理的甘蔗愈伤组织相对分化率

处理时间 (h)	EMS 浓度 (%)	相对分化率 (%)
2	0	100
	0.1	92
	0.2	54
	0.4	45
	0.6	33
	0.8	29
4	0	100
	0.1	88
	0.2	50
	0.4	39
	0.6	34
	0.8	25
6	0	100
	0.1	72
	0.2	47
	0.4	33
	0.6	28
	0.8	20
8	0	100
	0.1	30
	0.2	0
	0.4	0
	0.6	0
	0.8	0

2.2 选择剂 PEG 浓度的确定

由图 1 可见,未经 EMS 处理的黔糖 5 号分化苗在生根培养基中的生根率随着 PEG 浓度升高而降低,当 PEG 浓度为 20 g/L 时,生根率在 85% 左右;PEG 浓度为 60 g/L 时,生根率降到 50%;PEG 浓度达到 80 g/L 时,生根率仅为 14.6%,甘蔗分化苗的根生长受到明显的抑制;当 PEG 浓度达到 100 g/L 时,

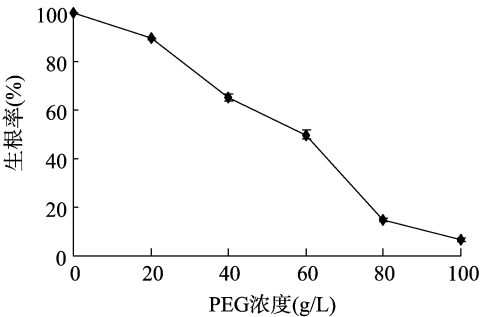


图 1 不同 PEG 浓度的生根培养基上外植体的生根率

生根率降到 10% 以下,表明外植体几乎不耐受 100 g/L PEG 的干旱胁迫。因此,可采用 100 g/L 作为筛选抗旱突变体的 PEG 浓度。

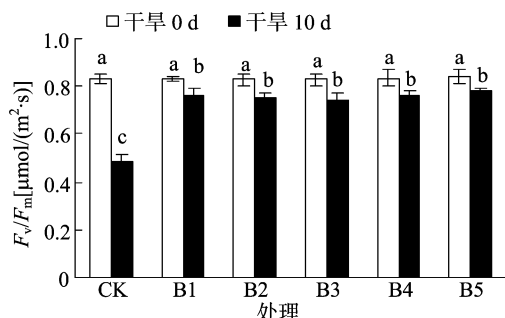
### 2.3 抗旱突变体的筛选

将经过 EMS 处理后的愈伤组织分化的 504 株分化苗接种到含 100 g/L PEG 的 1/2MS 生根培养基中筛选抗旱突变体,共得到生根的抗旱植株 5 株。在未经 EMS 处理的、仅为磷酸缓冲液处理的再生植株中,未获得抗旱植株。

### 2.4 抗旱突变体株系的生理指标鉴定

将黔糖 5 号甘蔗 5 株抗性突变体植株移栽,命名为 B1 ~ B5,对其进行生理指标测定,以无处理的同期移栽再生苗为对照。

**2.4.1 干旱胁迫对抗性植株叶绿素荧光参数的影响** 从图 2 可以看出,在未经干旱处理时,各植株最大光化学效率 ( $F_v/F_m$ ) 均在 0.83 左右,且无显著差异。在干旱处理后,各植株的  $F_v/F_m$  均有下降,抗性植株下降幅度较小,CK 下降幅度最大,其他株系仍维持高水平,显著高于 CK,这表明诱变甘蔗具有一定的抗旱适应性。



不同小写字母表示在 0.05 水平具有显著差异。下同  
图2 干旱胁迫对抗性植株叶绿素荧光参数的影响

**2.4.2 干旱胁迫对抗性植株相对电导率的影响** 由于在水分胁迫条件下植物细胞膜会受到损伤,电导率大小可衡量伤害程度<sup>[11]</sup>。如图 3 所示,在没有停水干旱处理时,各植株相对电导率维持在正常水平,相互间无显著差异。干旱处理后,CK 的相对电导率升至 62.7%,抗性植株则显著较低,其中 B5 最低,仅为 32.1%。这表明干旱胁迫下抗性植株的质膜受伤程度比 CK 轻,说明诱变甘蔗具有一定的抗旱性。

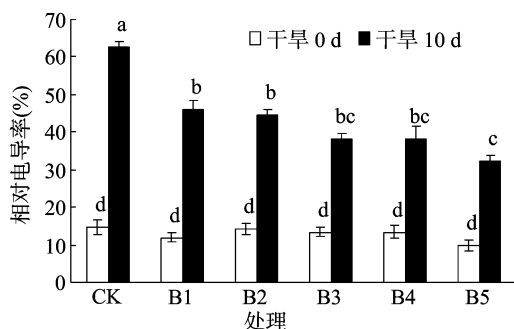


图3 干旱胁迫对抗性植株相对电导率的影响

**2.4.3 干旱胁迫对抗性植株 MDA 含量的影响** MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一,它的产生会加剧膜的损伤,因此在植物衰老生理和抗性生理研究中,MDA 含量是一个常用指标,可通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度,以间接测定膜系统

受损程度以及植物的抗逆性<sup>[11]</sup>。如图 4 所示,各参试株系的 MDA 含量在未停水干旱处理时均处于同一水平;干旱处理后 MDA 含量均大幅升高,尤其是 CK、B3 和 B5,这 3 株涨幅最大,而 B1、B2 和 B4 则涨幅最小,显著小于其他株。表明干旱胁迫引起甘蔗叶片的膜脂过氧化作用,多数抗性植株能有效降低膜脂过氧化和膜系统的伤害程度,比对照更能适应干旱环境,具有一定耐旱性。

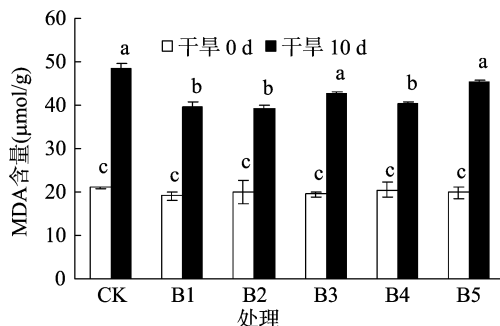


图4 干旱胁迫对抗性植株 MDA 含量的影响

**2.4.4 干旱胁迫对抗性植株游离脯氨酸含量的影响** 在干旱胁迫条件下,许多植物体内脯氨酸大量积累。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸<sup>[12]</sup>。如图 5 所示,各参试植株经过干旱胁迫处理后,游离脯氨酸的含量升高,B1、B2、B3、B5 显著高于 CK,B4 与 CK 差异不显著。所有参试株系在未干旱处理前脯氨酸含量几乎在同一水平,无显著差异,说明诱变甘蔗抗旱性有所提高。

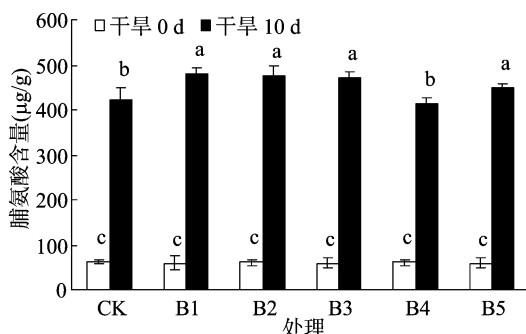


图5 干旱胁迫对抗性植株脯氨酸含量的影响

**2.4.5 干旱胁迫对抗性植株叶绿素含量的影响** 叶绿素含量的变化对光合作用产生直接影响,水分胁迫下叶绿素含量的变化可以指示植物对水分胁迫的敏感性,并直接影响光合产量。在控水未开始时,参试株的叶绿素含量无显著差异。干旱处理后,叶绿素含量下降,其中 B1、B5 的叶绿素含量显著高于 CK(图 6)。

**2.4.6 抗性植株抗旱性综合评价结果** 为了全面反映甘蔗 EMS 诱变株经 PEG 胁迫后的抗旱性,采用模糊数学中的隶属函数法,对抗旱指标叶绿素荧光参数、相对电导率、MDA 含量、脯氨酸含量、叶绿素含量等进行综合评价。隶属函数值即其加权值,加权值越大,表示耐旱性越好。如表 2 所示,B1、B2、B5 抗旱性排在前三位,可见经 EMS 诱变和 PEG 筛选得到的植株有较强的耐旱性。

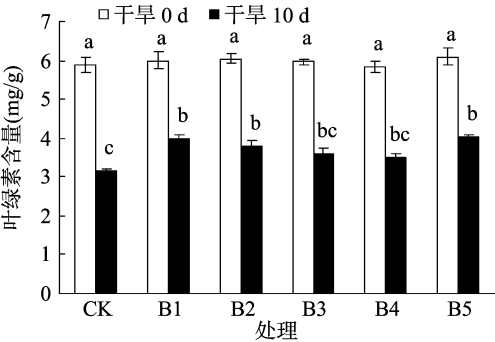


图6 干旱胁迫对抗性植株叶绿素含量的影响

表 2 不同抗性植株抗旱性综合评价结果

处理	隶属函数值					加权值	抗旱性排序
	$F_v/F_m$	相对电导率	MDA 含量	脯氨酸含量	叶绿素含量		
B1	0.93	0.55	0.96	1.00	0.95	4.39	1
B2	0.90	0.59	1.00	0.99	0.70	4.18	2
B5	1.00	1.00	0.33	0.58	1.00	3.91	3
B3	0.89	0.80	0.60	0.90	0.49	3.68	4
B4	0.93	0.80	0.88	0	0.37	2.98	5
CK	0	0	0	0.15	0	0.15	6

试验利用半致死剂量 EMS 处理甘蔗愈伤组织,并在 PEG 胁迫压力下筛选出甘蔗抗旱突变体 5 株,并进行生理指标鉴定,以无处理的同期移栽再生苗为对照。抗性植株干旱处理下仍具有较高的光系统Ⅱ活性,脯氨酸、叶绿素含量维持高水平,相对电导率、MDA 含量低于 CK,表明诱变甘蔗在干旱环境下,受伤害程度比较小,耐旱性得到提高。

常规育种是最主要的育种手段,虽然选育到的变异多能稳定遗传,但育种周期长、进程慢,难以获得突变性变异。化学诱变突变率相对较高,能诱发出各种有用的突变基因,能够在原有遗传背景基本不变的情况下在分子水平上使植物出现有用性状的变异。但诱发突变的方向和性质尚难掌握,突变后有利个体往往不多。本试验得到了一些抗旱性增强的甘蔗株系,仅在实验室条件下得到验证,是否属于基因水平上的变异、能否在大田栽培中有稳定的表现,仍需进一步研究。

参考文献:

[1]刘录祥,郭会君,赵林妹,等. 我国作物航天育种 20 年的基本成就与展望[J]. 核农学报,2007,21(6):589-592,601.  
[2]Nilan R A,Kleinhofs A,Konzak C F. The role of induced mutation in supplementing nature genetic variability[J]. The Genetic Basis of Epidemics in Agriculture,1977,287:367-384.  
[3]李清国,付 晶,钮力亚,等. 化学诱变及其突变体筛选在育种中的应用[J]. 河北农业科学,2010,14(5):68-72.  
[4]付凤玲,李晚忱,荣廷昭,等. 用  $\gamma$  射线和叠氮化钠诱变的玉米愈伤组织筛选耐旱和雄性不育材料[J]. 核农学报,2005,19(5):356-359,374.

3 结论与讨论

EMS 因其诱变效率高、诱变范围广而在诱变育种中得到广泛使用,EMS 不同浓度及不同处理时间对胚性愈伤组织的后效作用很明显。黔糖 5 号在 0.2%~0.4% EMS 下处理 2~4 h,胚性愈伤组织褐死率为 50% 左右,达半致死剂量。小麦花药愈伤组织用 EMS 溶液处理的较佳组合为 0.2% EMS 处理 2~6 h,幼胚愈伤组织为 (0.2%~0.4%) EMS 处理 24 h<sup>[13]</sup>。EMS 处理猕猴桃胚性愈伤组织较佳组合为 0.6% EMS 处理 2 h<sup>[14]</sup>。随着 EMS 浓度的升高和处理时间的延长,胚性愈伤组织褐死率呈上升趋势,增殖倍数和分化率呈下降趋势,这与前人的研究结果<sup>[15]</sup>相似。

[5]陈 丽,董举文,唐 寅,等. EMS 诱变处理定向筛选杨树耐盐突变体研究[J]. 上海农业学报,2007,23(3):86-91.  
[6]许莉萍,林俊芳. 甘蔗高产高糖细胞系筛选研究 I. 甘蔗抗磷酸盐变异系的筛选[J]. 福建农学大学学报,1997,26(2):143-146.  
[7]Yadav P,Suprasanna P,Gopalrao K,et al. Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerant regenerants of sugarcane [J]. Sugar Tech,2006,8:63-68.  
[8]Lu S,Guo Z,Peng X. Effects of ABA and S-3307 on drought resistance and antioxidative enzyme activity of turfgrass[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology,2003,78(5):663-666.  
[9]Liu X Z,Huang B R. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass[J]. Crop Science,2000,40(2):503-510.  
[10]张宪政. 植物叶绿素含量测定方法比较研究[J]. 沈阳农学院学报,1985,16(4):81-84.  
[11]孙 群,胡景江,曹翠玲,等. 植物生理学研究技术[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2006:22-25.  
[12]董喜存,李 岩,李文建,等. 聚乙二醇模拟干旱对甜高粱幼苗丙二醛、脯氨酸含量的影响[J]. 云南农业大学学报,2010,25(5):726-730,736.  
[13]王 瑾,刘桂茹,杨学举. EMS 诱变小麦愈伤组织选择抗旱突变体的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(12):190-193.  
[14]周立名,王 飞,王 佳. EMS 诱变处理定向筛选猕猴桃耐盐突变体研究[J]. 西北农业学报,2009,18(5):330-335,340.  
[15]覃柳兰. EMS 对甘蔗胚性细胞团的诱变效应及抗旱材料的初步筛选[D]. 南宁:广西大学,2013.