

## EMS 创建香蕉抗寒种质及筛选研究

许竹叶<sup>1,2</sup>, 王安邦<sup>2</sup>, 李羽佳<sup>2</sup>, 王笑一<sup>2</sup>, 魏卿<sup>2</sup>, 许奕<sup>2</sup>, 唐粉玲<sup>2</sup>, 李敬阳<sup>1,2,3\*</sup> (1. 海南大学园艺学院, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院海口实验站, 海南海口 571101; 3. 海南省香蕉健康种苗繁育工程技术研究中心, 海南海口 571101)

**摘要** 利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)处理“巴西蕉”无菌增殖芽, 突变体通过 L-羟脯氨酸(HYP)定向筛选, 经低温胁迫筛选出抗性较强的突变体。利用形态观察、生理生化指标等手段鉴定突变体。结果表明, EMS 诱变处理“巴西蕉”无菌增殖芽适宜的浓度和时间组合为 1.5%+3 h; 经 HYP 筛选的突变体在低温胁迫后, 其叶片脯氨酸含量提高、丙二醛含量降低、过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性增强; 诱变后的表型突变主要包括叶片颜色、叶片性状和株型的变异。该研究为高效诱变香蕉提供技术参考及后期选育优良品种提供材料。

**关键词** 香蕉; 甲基磺酸乙酯(EMS); 抗寒突变体; 羟脯氨酸(L-HYP)

中图分类号 S668.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)19-0041-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.19.011



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Establishment and Screening of Banana Cold-resistant Germplasm by EMS

XU Zhu-ye<sup>1,2</sup>, WANG An-bang<sup>2</sup>, LI Yu-jia<sup>2</sup> et al (1. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 571101; 2. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract** The chemical mutagens ethyl methanesulfonate (EMS) were used to treat the aseptic propagation buds of Baxijiao, and then mutants were obtained through L-hydroxyproline (L-HYP) directed screening, and more resistant mutants were screened out through low temperature stress. Morphological observation, physiological and biochemical indicators were used to identify mutants. The results showed that the suitable concentration and time combination for EMS mutagenesis to treat the aseptic proliferation shoots of Baxijiao was 1.5%+3 h; after low temperature stress, the mutants screened by HYP have increased proline content, decreased malondialdehyde content, increased peroxidase and catalase activities; the phenotypic mutation of surviving plants after mutation mainly included the variation of leaf color, leaf traits and plant type. This research provides technical reference for high-efficiency mutagenesis of bananas and materials for later selection of elite varieties.

**Key words** Banana; Ethyl methanesulfonate(EMS); Cold resistance mutant; L-hydroxyproline(HYP)

香蕉是一种重要的热带水果, 被世界粮农组织(FAO)认定为发展中国家仅次于水稻、玉米和小麦的第四大粮食作物(food and agriculture organization, FAO)。然而, 香蕉作为一种热带作物, 容易受到寒害的影响, 导致栽培面积逐年减小, 果实品质下降、产量降低, 甚至绝收, 造成严重经济损失。因此培育出高产、优质同时又具有抗寒特性的香蕉品种, 对香蕉产业的可持续发展尤为重要。目前香蕉新品种选育方法有杂交育种、分子育种和诱变育种等。香蕉杂交育种技术对于香蕉而言, 具有很大的难度且育种周期长; 现代分子育种具有快速、准确、不受环境干扰的特点, 但技术要求较高, 并在一些国家受制于法律约束; 而诱变育种在较短时间内获得有价值的突变体, 且具有操作简单、成本低、诱变后代易稳定遗传、突变范围广等特点。

诱变育种分为化学诱变和物理诱变。物理诱变是通过物理辐射能处理植物材料, 改变植物遗传物质, 获得多种变异类型, 丰富遗传资源<sup>[1]</sup>。物理诱变实现基因重组, 具有丰富种质资源、保持优良特性、改良个别不良特性和育种年限短等特点, 物理诱变主要有 X 射线、 $\gamma$  射线、 $\beta$  射线、中子、激光、紫外线等。化学诱变育种是指使用化学诱变剂使植物遗传物质发生改变, 将具有优良农艺性状的变异材料选育成新品种的方法。相对于物理诱变而言, 化学诱变具有操作简

单、成本低、诱变后代易稳定遗传、突变范围广、诱变效应在 M1 中表现明显和获得有益变异概率高等特点, 但突变频率低。化学诱变剂包括烷化剂、碱基类似物及有关化合物、叠氮化物、抗生素、吡啶、羟胺等。其中烷化剂甲基磺酸乙酯(EMS)是较为常用的化学诱变剂, 具有高效率和低毒性、诱导等位基因发生点突变的特点。目前, 利用 EMS 已经成功构建了油菜、柑橘、白桦、黄瓜、木豆、麻风树等植物的突变体库<sup>[2-8]</sup>。何慧怡等<sup>[9]</sup>采用 EMS 诱变处理甘蔗茎尖, 得到了“粤糖 9-159”“新台糖 22”这 2 个新品系。孙慧<sup>[10]</sup>利用 EMS 诱变技术对海滨木槿种子进行诱变, 获得了抗寒性较强的新品系。杨宁<sup>[11]</sup>采用 EMS 诱变技术对番茄“Heinz 1706”进行诱变处理, 获得了矮化突变体。这些研究表明植物经 EMS 诱变筛选可获得具有目标性状的突变体, 为后面选育新品种奠定了基础。研究表明, 在化学诱变过程中, 以羟脯氨酸(L-HYP)作为选择压进行定向筛选, 可获得抗性较强的突变体材料<sup>[12-14]</sup>。

笔者利用“巴西蕉”无菌增殖芽为外植体, 进行 EMS 诱变并结合羟脯氨酸(L-HYP)压力筛选, 进而定向筛选获得抗寒性较强的“巴西蕉”变异体, 利用形态观察、生理生化指标等手段鉴定突变体, 揭示通过化学诱变及 L-HYP 筛选可影响其抗寒能力, 为香蕉的抗性育种提供参考。

### 1 材料与方

**1.1 试验材料** “巴西蕉”(Musa acuminata, subgroup Cavendish)品种, 来自中国热带农业科学院海口实验站儋州试验基地香蕉资源圃, 采用健康笋芽, 以此为外植体, 建立无性再生系, 获得无菌增殖芽。

**基金项目** 现代农业产业体系专项资金(CARS-31-02); 海南省科技厅重点研发计划(ZDYF2016054)。

**作者简介** 许竹叶(1994—), 女, 海南文昌人, 硕士研究生, 研究方向: 热带园艺与种苗。\* 通信作者, 副研究员, 硕士, 从事作物遗传育种研究。

**收稿日期** 2021-04-21; **修回日期** 2021-06-03

## 1.2 方法

**1.2.1 EMS 溶液及磷酸缓冲液的制备。**磷酸缓冲液的配制参照任雪羽<sup>[15]</sup>的方法改进,配制 0.1 mol/L 的 A 液和 B 液;称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  71.64 g 溶解于蒸馏水中,定容到 1 L 配成 A 液;称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  31.21 g 溶于蒸馏水中,定容到 1 L 配成 B 液。取 0.46 L 的甲液和 0.305 L 的 B 液,蒸馏水定容到 1 L,配制成 pH 5.9 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液,高温灭菌备用。

EMS 溶液的配制:EMS 抽取过滤法,用 0.1 mol/L、pH 5.9 的磷酸缓冲液依次配制浓度为 0、0.2%、0.4%、0.6%、1.0%、1.5%、2.0% 7 个梯度的 EMS 溶液。

**1.2.2 EMS 诱变处理。**采取浸摇法进行诱变。选取生长基

本一致、健壮的不菌增殖香蕉芽置于不同浓度的诱变液中,之后放入 25 °C、120 r/min 的摇床内分别浸摇 2、3、4 h,随后丢弃 EMS 溶液,再用灭菌后冷却至室温的蒸馏水清洗 5~6 遍,不菌增殖芽放在滤纸上吸干水分后接在增殖培养基上进行培养,20 d 后记录不菌增殖芽的存活率、分化率及增殖系数。确定合适的诱变组合后,将全部存活的不菌芽转接至生根培养基中培养 25 d 并记录根长及茎高,将根部的培养基洗净后进行移栽,移栽在椰糠与蛭石比为 1:1 的混合基质中。等其长至五叶一心时进行观察,并记录变异性状。增殖培养基和生根培养基配制配方见表 1。

表 1 培养基配制配方

Table 1 Media preparation formula

培养基 Medium	MS//mL/L				6-BA mL/L	NAA mL/L	蔗糖 Sucrose g/L	琼脂 Agar g/L	活性炭 Activated carbon//g/L
	大量 (20x)	微量	有机	铁盐 (200x)					
增殖培养基 Proliferation medium	50	5	5	5	3	0.4	30	7	0
生根培养基 Rooting medium	25	5	5	5	0	0.1	30	8	1

**1.2.3 羟脯氨酸(HYP)定向筛选。**利用适宜的 EMS 诱变组合重新诱变大量的不菌增殖芽苗用于 HYP 筛选。将 EMS 诱变处理后存活的不菌芽转接到含 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 HYP 培养基上,未经诱变的“巴西蕉”不菌芽转接到含有不同浓度的 HYP 培养基中作为对照,培养 25 d 计算不菌增殖芽的成活率,每组处理 30 株,重复 3 次,然后筛选出适宜的选择压。将存活不菌增殖芽继续转接到含 HYP 选择压浓度的继代培养基中培养 20 d,再将存活的不菌增殖芽接入不含 HYP 的继代培养基中培养 20 d,反复 2 次,最后存活下来的不菌芽用于后续鉴定。

**1.2.4 低温诱导及诱变植株抗寒性生理生化性检测。**将经 HYP 定向筛选后存活的不菌芽,依次在 13、10、7、4 °C 的低温胁迫下各处理 8 h,以未经 EMS 及 HYP 处理的不定芽作为对照,同一位置的叶片进行脯氨酸含量、丙二醛含量(MDA)、过氧化物酶活性(POD)、过氧化氢酶活性(CAT)生

理指标测定。

**1.3 数据统计** 试验数据采用 SAS、SigmaPlot 12.0 和 Graphpad prism7.0 软件完成。

致死率=(死亡株数/接种株数)×100%

分化率=(分化株数/接种株数)×100%

增殖系数=有效芽数/接种株数

变异率=(变异株数/移栽株数)×100%

## 2 结果与分析

**2.1 EMS 浓度和诱变时间对“巴西蕉”不菌增殖芽的影响** 根据 2 种不同因素水平,对其影响不菌增殖芽的致死率进行 Two-way ANOVA 方差分析。由表 2 和表 3 可知,EMS 浓度和处理时间均对不菌增殖芽的致死率与分化率有极显著的影响( $P < 0.01$ )。因此不菌增殖芽的致死率、分化率与 EMS 浓度和处理时间有关。

表 2 2 种因素对 EMS 诱变不菌增殖芽致死率方差分析

Table 2 Analysis of variance of two factors on the mortality rate of aseptic multiplication bud induced by EMS

变异来源 Source of variation	平均和 Average sum	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	显著性 Significance
EMS 浓度 EMS concentration	29 742.463	6	4 957.077	953.981	0.000
处理时间 Treatment time	8 151.879	2	4 057.939	784.407	0.000
误差 Error	218.240	42	5.196		

表 3 2 种因素对 EMS 诱变不菌增殖芽分化率方差分析

Table 3 Analysis of variance of two factors on differentiation rate of sterile bud induced by EMS

变异来源 Source of variation	平均和 Average sum	自由度 Freedom	均方 Mean square	F	显著性 Significance
EMS 浓度 EMS concentration	56 330.421	6	9 388.404	1 256.815	0.000
处理时间 Treatment time	5 228.218	2	2 614.109	349.948	0.000
误差 Error	313.740	42	7.470		

根据“巴西蕉”不菌增殖芽的生长状态与 EMS 浓度和处理时间的极显著相关性。从表 4 可以看出,“巴西蕉”不菌增

殖芽致死率随着 EMS 浓度的增大及处理时间的延长逐渐上升,EMS 浓度愈高,诱变浸泡处理时间愈长,对不菌增殖芽致

死亡率的影响越大。对照组(0.0%EMS)各处理时间无菌增殖芽的致死率无显著差异。当 EMS 为高浓度时(1.0%~2.0%),每个处理时间无菌增殖芽的致死率均呈显著差异( $P<0.05$ )。当 EMS 浓度为 2.0%,诱变处理时间为 4 h,无菌增殖芽致死率高达 93.94%。浓度为 1.0%,诱变处理时间为 4 h 时,无菌增殖芽致死率为 48.48%。其中 1.0%EMS+4 h 和 1.5%+3 h 组合的致死率均接近 50%,分别为 48.48%和 46.29%。

无菌增殖芽分化率和增殖系数均随着 EMS 浓度的升高和处理时间的加长而呈逐渐下降的趋势。当 EMS 在较高浓度时(1.0%~2.0%),每个处理时间无菌增殖芽的分化率均呈显著差异( $P<0.05$ )。各个浓度的处理时间之间无菌增殖芽的增殖系数均呈显著差异( $P<0.05$ )。当 EMS 浓度提高到 2.0%,诱变处理时间为 4 h 时,无菌增殖芽分化和增殖能力极弱,分化率和增殖系数分别为 0.76%和 0.045。说明高浓度的诱变剂和长的处理时间,对无菌增殖芽的分化生长有抑制作用。1.0%EMS+4 h 和 1.5%EMS+3 h 组合无菌增殖芽的致死率、分化率和增殖系数均无显著差异。因筛选 EMS 诱变半致死量时外植体的致死率需在 40%~60%及 EMS 浓度比处理时间的影响大,使用高浓度的诱变剂获得变异突变体概率大<sup>[2]</sup>。故 EMS 诱变处理“巴西蕉”无菌增殖芽适宜条件为 1.5%EMS+3 h。

表 4 EMS 浓度和诱变时间对“巴西蕉”无菌增殖芽的影响

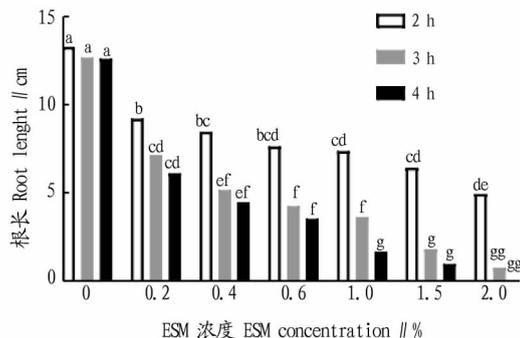
Table 4 Effects of EMS concentration and mutagenesis time on sterile propagation bud of “Baxijiao”

EMS 浓度 EMS concentration//%	处理时间 Treatment time//h	处理量 Treatment amount 株	致死率 Fatality rate//%	分化率 Differentiation rate//%	增殖系数 Multiplication coefficient
0(CK)	2	34	0.00 a	97.06 mn	3.676 n
	3	40	0.00 a	99.17 o	3.508 m
	4	36	0.00 a	96.30 mn	3.204 l
0.2	2	44	3.03 ab	93.94 mn	3.053 k
	3	40	6.67 b	87.50 kl	2.883 j
	4	44	13.64 cd	84.09 k	2.491 hi
0.4	2	40	5.83 b	90.00 lm	2.925 jk
	3	36	12.96 cd	78.71 j	2.426 h
	4	44	21.21 gf	65.15 h	1.674 f
0.6	2	40	11.67 cd	72.50 i	2.592 i
	3	44	16.67 ed	68.19 hi	2.159 g
	4	44	34.09 i	41.67 e	1.371 e
1.0	2	40	18.33 ef	59.17 g	2.392 h
	3	44	25.74 h	51.70 f	1.402 e
	4	44	48.48 j	25.76 c	1.091 d
1.5	2	36	23.12 gh	35.18 d	1.778 f
	3	36	46.29 j	28.71 c	0.972 d
	4	44	77.27 l	9.09 b	0.288 b
2.0	2	40	35.00 i	29.17 c	1.500 e
	3	40	67.50 k	7.50 b	0.433 c
	4	44	93.94 n	0.76 a	0.045 a

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercases in the same column indicated significant difference between different treatments at 0.05 level

2.2 EMS 浓度和诱变时间对诱变株系根长和茎高的影响 经 EMS 诱变处理后的“巴西蕉”无菌增殖芽,转入生根培养基培养 25 d 后,记录其根长和茎高。由图 1~2 可知,EMS 处理可以影响“巴西蕉”无菌苗的根长及茎高。随着 EMS 浓度的增加和处理时间的延长,“巴西蕉”无菌苗的根越来越短,生长愈缓慢。对照组(0%EMS)3 个时间处理的根长及茎高均无显著差异,且均高于其余浓度。EMS 浓度为 0.2%~2.0%时,处理 2 h,根长显著高于其他处理( $P<0.05$ )。当 EMS 诱变浓度为 2.0%,处理时间为 2 h 时,其根长为 5.93 cm,处理时间为 3 和 4 h 时,根长分别 0.77 和 0.03 cm。诱变浓度为 0、1.5%、2.0%的 ESM,处理 3 与 4 h,根长无显著差异。诱变浓度为 2.0%,处理 4 h 时,无菌苗无根生长。诱变浓度为 0 时,3 个处理时间的茎高均无显著差异。浓度为 1.0%时,处理时间 2、3 和 4 h 存在显著差异( $P<0.05$ ),3 和 4 h 的茎高无显著差异,茎高分别为 3.51、2.19 和 1.88 cm。说明过高的 ESM 浓度和处理时间过长,对植物细胞造成一定的伤害,抑制了根的生长和株高。

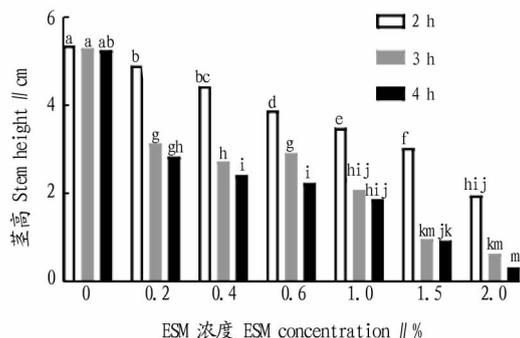


注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图 1 EMS 浓度和处理时间对诱变株系根长的影响

Fig. 1 The effect of EMS concentration and treatment time on the root length of the mutagenized plant



注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图 2 EMS 浓度和处理时间对诱变株系茎高的影响

Fig. 2 The effect of EMS concentration and treatment time on the stem height of the mutagenized plant

2.3 EMS 诱变对植株表型的影响 EMS 处理对“巴西蕉”无菌增殖芽造成损伤,明显抑制了无菌增殖苗的生长。与未经 EMS 诱变相比,诱变处理整体表现为无菌增殖芽分化时

间推迟(图 3A、B),幼苗植株矮小及根短(图 3C)。与对照相比,诱变组培苗开始出现特殊性状,如叶片细小,植株矮化,叶片向下卷曲(图 3D、F)。

当植株长至五叶一心时,突变体主要表现为叶色突变、叶型突变和株型突变等表型。统计 1.5%+3 h EMS 诱变处理的“巴西蕉”株系,由表 5 可知,植株矮化或半矮化率为 16.67%,个别植株极矮小。叶型突变株出现叶缘褶皱、叶片卷曲和窄长叶,其中叶缘褶皱率为 13.33%,叶片卷曲率为

5.00%,窄长叶率为 10.00%,椭圆叶为 5.00%。叶片上有黄条纹和亮绿叶,其中出现黄条纹率为 8.33%,亮绿叶率为 6.67%。窄长叶、叶片卷曲和植株矮小在组培苗期表型比较明显,其中窄长叶和叶片卷曲在后期生长过程中突变表型出现逐渐减弱现象。可能是 EMS 诱变对外植体产生的诱变作用在后期生长中被环境影响,其生理损失出现修复或减弱现象(图 4)。



注:A~B. 对照与处理无菌增殖芽培育 7 d 时的生长状态;C. 对照与处理生根培育 25 d 时无菌增殖芽生长状态;D~F. 对照与处理在组培苗时的性状差异

Note:A-B. Growth status of control and treatment aseptic multiplication buds when cultivated for 7 days;C. Control and treatment growth status of aseptic multiplication buds when rooting for 25 days;D-F. Difference in traits between control and treatment in tissue culture seedlings

图 3 对照与诱变处理的组培苗对比

Fig. 3 Comparison of control and mutagenic tissue cultured seedlings

表 5 1.5%+3 h EMS 诱变“巴西蕉”M1 突变类型的统计

Table 5 Statistics of M1 mutants of “Baxijiao” induced by 1.5%+3 h EMS

突变体分类 Mutant classification	变异表型 Variant phenotype	变异率 Variation rate/%
颜色突变 Color mutation	黄条纹	8.33
	茎秆变红	5.00
	亮绿叶	6.67
叶型突变 Leaf type mutation	窄长叶	10.00
	椭圆叶	5.00
	叶缘褶皱	13.30
	卷叶	5.00
株型突变 Plant type mutation	矮化或半矮化	16.67

2.4 不同浓度的 HYP 对无菌苗存活率的影响 由表 6 可知,在对照组中,当 HYP 浓度小于 0.6 mmol/L 时,无菌增殖芽的存活率为 68.9%,说明“巴西蕉”无菌增殖芽可以耐受一定浓度的 HYP。当浓度增加到 1.2 mmol/L 时,无菌增殖芽存活率仅为 5.6%。在同一浓度下,处理组无菌增殖芽的存活率显著高于对照组( $P < 0.05$ ),当 HYP 浓度为 1.0 mmol/L 时,处理组无菌增殖芽的存活率为 29%,对照组的存活率为 11.0%。可能是 EMS 诱变可以使植物细胞发生突变且抗 HYP 基因得到表达,所以能在高浓度的 HYP 环境中生存下来。当 HYP 浓度为 0.8 mmol/L 时,组培苗的存活率为 55.6%,而当 HYP 浓度为 1.0 mmol/L 时,无菌芽的存活率为 29.0%,HYP 浓度继续增加到 1.2 mmol/L 时,存活率为 17.8%,

为了较大概率筛选到抗性突变体,且保证有足够数量的无菌苗 进行后续试验,故把 1.0 mmol/L 的 HYP 作为选择压。



注:A.矮化,B.叶缘褶皱,C.茎高变红,D.向下卷叶,E.窄长叶和亮绿叶,F.椭圆叶

Note:A. Dwarfing, B. Folding of leaf margins, C. Stem height turns red, D. Rolling leaves downward, E. Narrow and long leaves and bright green leaves, F. Oval leaves

图 4 EMS 诱变对“巴西蕉”苗期形态的影响

Fig. 4 The effect of EMS mutation on the seedling stage of “Baxijiao”

表 6 HYP 筛选对无菌芽存活率的影响

Table 6 The effect of HYP screening on the survival rate of sterile buds

样品 Sample	HYP 浓度 HYP concentration mmol/L	接种数 Number of inoculations 株	存活数 (平均株数) Survival number	存活率 Survival rate %
对照组 (未经 EMS 处理) Control group	0.2	30	29.3	97.8 a
	0.4	30	25.7	85.6 b
	0.6	30	15.3	51.1 c
	0.8	30	7.3	24.3 e
	1.0	30	3.3	11.0 g
	1.2	30	1.7	5.6 g
处理组 (EMS 处理) Treat- ment group	0.2	30	30.0	100.0 a
	0.4	30	29.7	98.9 a
	0.6	30	26.7	88.9 b
	0.8	30	16.7	55.6 c
	1.0	30	8.7	29.0 d
	1.2	30	5.3	17.8 f

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercases in the same column indicated significant difference at 0.05 level

## 2.5 EMS 诱变材料经 HYP 筛选后获得的抗寒突变体对低温胁迫的生理响应

### 2.5.1 不同低温胁迫对 CAT、POD 活力的影响。低温胁迫

会导致植物细胞内自由基的产生和清除失去平衡,积累过多的活性氧,细胞膜的结构和功能会被累积过量的活性氧给破坏<sup>[16]</sup>,而 POD、CAT 是清除活性氧主要酶。由图 5 可知,处理组 POD、CAT 的活性均比对照组高。CAT 的活性随着胁迫温度的降低呈先增加而后降低的趋势,7 °C 时达到最高。在 13 °C 时,2 组 CAT 活性相差不大,而在 7 °C 时,处理组的 CAT 活性比对照组高 11.72%。POD 活性随着温度的下降呈逐渐上升的趋势,在各个低温胁迫时,处理组的 POD 活性比对照组高。在 7 °C 时,对照组 POD 含量为 467.13 U/(min·g),处理组为 734.6 U/(min·g)。在 4 °C 时 POD 活性最高,处理组是对照组的 2.03 倍。表明 EMS 诱变经 HYP 筛选后得到的诱变植株清除活性氧的能力比对照株强,说明 EMS 诱变经 HYP 筛选后得到的诱变植株具有较强的抗寒力。

### 2.5.2 不同低温胁迫对 MDA、脯氨酸含量的影响。

MDA 是植物遭受氧化损伤时产生的膜脂质过氧化产物,反映膜受损的程度,可作为抗寒能力的指标<sup>[17]</sup>。由图 6 可知,MDA 含量随着胁迫温度的降低而逐渐增加,处理组 MDA 的含量始终低于对照组,在 4 °C 时 MDA 含量最高,处理组为 199.14 μg/g,对照组为 148.63 μg/g。说明 EMS 诱变筛选后的诱变株细胞膜的受损程度比对照组小。

脯氨酸是植物重要的渗透调节物质。在逆境条件下,植

物中脯氨酸含量会明显增加,其含量的增加量在一定程度上反映了植物的抗逆性。因此,脯氨酸的增加量可作为抗逆育种的生理指标之一。由图6可知,随着温度的下降,脯氨酸的含量呈逐渐上升的趋势,处理组脯氨酸含量明显高于对

照组,处理组在4℃时脯氨酸含量最高,为3.043 μg/g,明显高于对照组的1.51 μg/g。说明在低温胁迫下,EMS 诱变筛选后的“巴西蕉”诱变株可以提高脯氨酸的积累量,抗逆能力比对照株强。

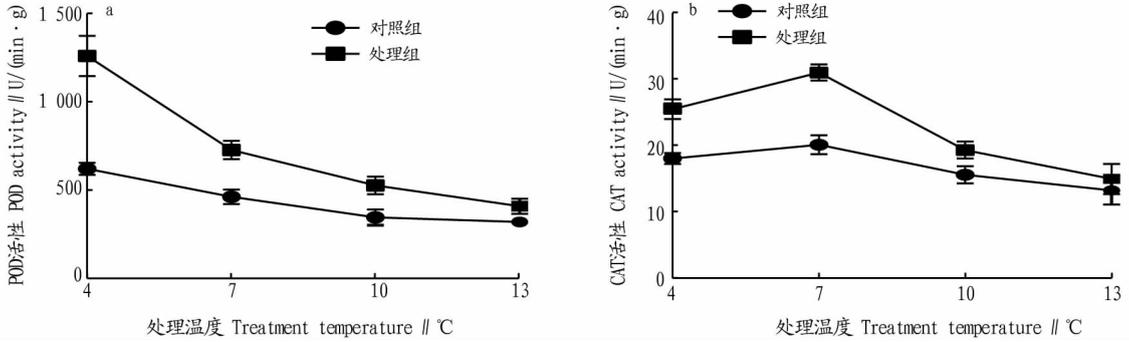


图5 不同低温胁迫下对CAT、POD活力的影响

Fig. 5 Effects of Different Low Temperature Stress on the Activity of CAT and POD

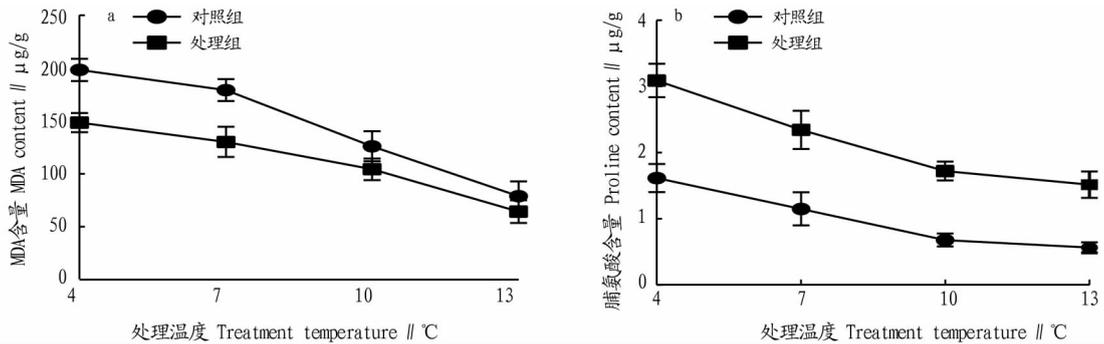


图6 不同低温胁迫对MDA和脯氨酸含量的影响

Fig. 6 The influence of different low temperature stress on the content of MDA and proline

### 3 结论与讨论

香蕉是典型的热带亚热带果树,喜高温怕低温,低温是香蕉生产中的主要限制性因素之一。因此选育香蕉抗寒品种是解决香蕉寒害问题的根本出路。目前香蕉新品种选育方法有杂交育种、现代生物技术育种和诱变育种等。而大部分栽培品种香蕉是多倍体,具有亲本高度不育的特点,因此通过传统杂交育种方式培育和改良香蕉品种相对比较困难且育种周期较长。另外现代分子育种虽具有快速、准确、不受环境干扰的特点,但技术要求较高且操作程序复杂,并在一些国家受制于法律约束。而诱变育种可在较短时间内获得有价值的突变体,且具有操作简单、成本低、诱变后代易稳定遗传、突变范围广的特点。该试验采用“巴西蕉”无菌增殖芽作为外植体,利用不同浓度的EMS 诱变剂和诱变时间诱导变异,诱变后的外植体经过不同浓度的L-HYP 定向筛选,可获得抗寒突变体。

**3.1 EMS 诱变适宜条件的确定** 以经一定浓度诱变剂及时间处理的材料的半致死率作为筛选标准,是为了获得较高的突变率及保证有一定数量的诱变材料。因此,选择诱变浓度和时间极为重要,但不同的处理材料,其适宜的诱变浓度和处理时间也不同。尚静等<sup>[18]</sup>研究EMS 诱变茄子种子时,确定了0.5%EMS 处理6 h和1.0%EMS 处理4 h为半致死量,其致死率均接近50%。齐晓花等<sup>[19]</sup>研究EMS 诱变构建

黄瓜突变体库时,确定了黄瓜“YZ-01”的半致死量为1.5%。刘艳萌等<sup>[20]</sup>研究发现EMS 溶液处理草莓离体叶片适宜处理条件为0.2%+2.0 h和0.4%+1.0 h,EMS 诱变愈伤组织的适宜条件为0.1%+1.5 h和0.2%+1.0 h。孙慧<sup>[10]</sup>利用1.5%EMS+4 h对海滨木槿种子进行诱变,获得了抗寒性较强的新品系。该试验中,2.0%的EMS 处理4 h时,其无菌增殖芽达到完全褐化死亡状态,可能是由于EMS 浓度过高和时间过长导致诱变剂对无菌增殖芽的毒害作用过强。当EMS 的诱变条件为1.5%EMS+3 h和1.0%EMS+4 h,无菌增殖芽的致死率分别为45.37%和46.97%,虽两者都不是半致死剂量,但致死率均接近半致死率。祁伟<sup>[2]</sup>研究表明,诱变剂浓度比处理时间的影响大,使用高浓度的诱变剂获得变异突变体概率大。同时考虑分化率因素,该试验确定EMS 诱变“巴西蕉”无菌增殖芽的适宜条件为1.5%EMS+3 h,为后期选育优良的香蕉品种提供材料。同时为EMS 诱变“巴西蕉”无菌增殖芽提供参考。

**3.2 HYP 对无菌苗成活的影响** L-HYP 定向筛选香蕉无菌苗的文献尚未见报道。L-HYP 是脯氨酸类似物,HYP 是脯氨酸的类似物,它可以与脯氨酸竞争,反馈和抑制脯氨酸合成过程中的谷氨酸激酶,对植物组织造成损害,植物组织需要产生大量的脯氨酸来降低HYP 的比例才能生存。因此

(下转第77页)

**3.2 废弃物制作栽培基质腐熟过程方面** 基质材料的选择和粉碎过程是至关重要的,选择容易粉碎的废弃物其腐熟程度会提升,容易粉碎的玉米秆和蘑菇渣的温度影响较高,腐熟程度较好;而树枝和芦苇的温度变化较小。在延庆区5月初温度基本已经稳定通过0℃,在这个日期进行废弃物腐熟基本在45d可以完成。

**3.3 废弃物不同比例配比基质的物理性状和化学性状方面** 废弃物经过微生物的发酵降解,将木质素、纤维素等分解,同时也形成了与草炭不同的物理结构和化学结构。在通气和持水方面,废弃物的不同配比基质均与草炭基质有显著差异,表现为通气空隙增加,持水孔隙减小的特点。其主要原因可能是玉米秆的腐熟物容重较大引起,让废弃物配比的基质在整体上和草炭基质相比有极显著差异。化学性状方面,废弃物配比的基质在酸碱度方面比草炭基质有所升高,最大的pH在8.33属于碱性基质,也处于DB11/T 770—2010要求的正常范围内。另外,在以往研究中,农业有机废弃物堆腐后有效氮、磷、钾等主要营养元素和微量元素的含量可以得到提高<sup>[12-13]</sup>,该研究中废弃物配比的基质在氮、磷、钾、钙、镁离子及电导率均明显增加,其主要原因可能是微生物在降解过程中将一部分矿质元素分离出来,这些养分一部分会被植物吸收,一部分会在栽培前经过淋洗作用过滤掉,同

(上接第46页)

通过L-HYP进行筛选,可以获得抗性较强的变异体。李红等<sup>[21]</sup>利用HYP作为选择压筛选叠氮化钠诱变的愈伤组织,得到高抗脯氨酸的突变体。赵明霞等<sup>[22]</sup>以L-HYP作为选择压,筛选出耐旱性较强的花生单株。崔克强等<sup>[14]</sup>研究发现,经EMS诱变的彩叶凤梨继代苗,以7mmol/L的L-HYP作为选择压,筛选出的诱变株具有较强的抗寒性。该试验表明,随着L-HYP浓度的提高,无菌苗的致死率愈高。对照组在1.2mmol/L时存活率仅为5.6%,而经EMS诱变后的无菌苗,存活率高于对照组,说明经EMS诱变后的无菌苗已发生突变,能在高浓度的L-HYP条件下存活。且经L-HYP筛选存活下来的诱变株,经低温胁迫后其POD、CAT活性随着温度的降低而上升且始终高于对照组。MDA和脯氨酸的含量随温度的降低而升高,但MDA含量低于对照组,而诱变组脯氨酸的含量高于对照组。因此,说明香蕉无菌增殖芽经EMS诱变后的突变体通过L-HYP定向筛选,可获得抗寒突变体。为了更全面及系统地鉴定香蕉无菌苗的抗寒突变体,还需在分子水平上进一步对变异体进行鉴定。

#### 参考文献

- [1] 王安邦. 香蕉抗寒种质创新、筛选及鉴定[D]. 海口:海南大学,2013.
- [2] 祁伟. 红掌离体化学诱变技术的研究[D]. 苏州:苏州大学,2016.
- [3] 曲高平,孙妍妍,庞红喜,等. 甘蓝型油菜EMS突变体库构建及抗除草剂突变体筛选[J]. 中国油料作物学报,2014,36(1):25-31.
- [4] MALLICK M, AWASTHI O P, SINGH S K, et al. Physiological and biochemical changes in pre-bearing mutants of Kinnow mandarin (*C. nobilis* Lour×*C. deliciosa* Tenora) [J]. Scientia horticulturae, 2016, 199: 178-185.
- [5] 詹亚光,郝爱平,唐敬轩. 白桦愈伤组织化学诱变[J]. 植物学通报, 2007, 42(5): 642-648.

时淋洗作用也适当地降低了基质中的电导率水平。

#### 参考文献

- [1] 延庆统计年鉴委员会. 延庆区统计年鉴 2019[M]. 北京:北京市延庆区统计局,2019.
- [2] KIM S, DALE B E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues [J]. Biomass and bioenergy, 2004, 26(4): 361-375.
- [3] 余高,陈芬,谢英荷,等. 农业有机废弃物资源化利用潜力与安全性评价[J]. 河南农业科学,2020,49(3):79-87.
- [4] 刘宇虹. 湖北农作物秸秆资源分布及其综合利用政策研究[D]. 武汉:华中师范大学,2018.
- [5] 黎榕,宋倩,陈碧露,等. 园林废弃物复合基质对绿萝生长的影响[J]. 现代农业科技,2019(24):112-113,118.
- [6] 赵佳颖,周晚来,戚智勇. 农业废弃物基质化利用[J]. 绿色科技,2019(22):232-234,241.
- [7] 孟宪民,王忠强. 我国泥炭资源属性、特征与保护利用[C]//第三届全国绿色环保肥料新技术、新产品交流会论文集. 广州:中国腐植酸工业协会,2003.
- [8] 索琳娜,金茂勇,张宝珠. 农林有机废弃物生产花木栽培基质技术和前景[J]. 北方园艺,2009(4):108-112.
- [9] 王中. 中国泥炭基质生产跌入低谷[J]. 中国花卉园艺,2004(4):20-21.
- [10] 索琳娜. 几种农林生物质废弃物再利用生产无土栽培基质技术及应用[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [11] 韦阳连,欧阳勤森,钟卫东,等. 农林有机废弃物生产轻型育苗基质研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(32):15628-15630.
- [12] VÁZQUEZ M A, SOTO M. The efficiency of home composting programmes and compost quality [J]. Waste management, 2017, 64: 39-50.
- [13] AZIM K, SOUDI B, BOUKHARI S, et al. Composting parameters and compost quality: A literature review [J]. Organic agriculture, 2018, 8(2): 141-158.
- [6] 王晶,姜群峰,魏庆镇,等. 长春密刺黄瓜突变体库的构建和部分性状分析[J]. 核农学报,2015,29(8):1479-1486.
- [7] POUDEL P P, SINGH R S, SINGH M N, et al. EMS induced variability, frequency and spectrum of chlorophyll mutations in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) [J]. Environment & ecology, 2017, 35(2): 666-670.
- [8] 樊双虎,郭文柱,路小铎,等. 玉米EMS突变体库构建及突变体初步鉴定[J]. 安徽农业科学,2014,42(11):3162-3165,3185.
- [9] 何慧怡,樊丽娜,齐永文,等. EMS诱变甘蔗茎尖分生组织的初步研究[J]. 中国农学通报,2016,32(6):55-60.
- [10] 孙慧. EMS诱变海滨木槿及抗寒突变体筛选的初步研究[D]. 济南:山东师范大学,2019.
- [11] 杨宁. 'Heinz 1706' 番茄EMS诱变矮化突变体分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [12] DHAKSHANAMOORTHY D, SELVARAJ R, CHIDAMBARAM A. Utility of RAPD marker for genetic diversity analysis in gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS)-treated *Jatropha curcas* plants [J]. Complex rendus biologiques, 2015, 338(2): 75-82.
- [13] 迟慧梅. 芦荟抗寒变异系的筛选及其特性的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
- [14] 崔克强,王彦尊,史华平,等. 离体筛选彩叶凤梨耐羟脯氨酸变异体的研究[J]. 山西农业科学,2018,46(9):1455-1457,1487.
- [15] 任雪羽. 木槿种子的秋水仙素和EMS诱变与鉴定[D]. 长沙:中南林业科技大学,2019.
- [16] SUZUKI N, MITTLER R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction [J]. Physiologia plant, 2006, 126(1): 45-51.
- [17] 林定波,刘祖祺. 冷驯化和ABA对柑桔膜稳定性的影响及膜特异蛋白质的诱导[J]. 南京农业大学学报,1994,17(1):1-5.
- [18] 尚静,张会,王圣洁,等. EMS诱变对茄子种子萌发、幼苗生长和抗氧化系统的影响[J]. 江西农业学报,2020,32(2):33-37.
- [19] 齐晓花,李倩倩,叶思佳,等. 黄瓜EMS诱变突变体库的构建[J]. 分子植物育种,2019,17(18):6066-6072.
- [20] 刘艳萌,张学英,葛会波,等. 草莓离体诱变及耐盐筛选技术初探[J]. 河北农业大学学报,2008,31(6):26-29,39.
- [21] 李红,李波,王丽玲,等. 紫花苜蓿耐羟脯氨酸变异体的筛选及抗性研究[J]. 草业科学,2008,25(10):29-33.
- [22] 赵明霞,孙海燕,隋炯明,等. 离体筛选花生抗逆突变体及其后代特征特性研究[J]. 核农学报,2012,26(8):1106-1110,1124.