

平阳霉素诱变与 NaCl 定向筛选对花生 后代产量和品质性状的影响

王 亚¹, 乔利仙¹, 武秀玲², 胡晓辉³, 王晶珊¹, 隋炯明¹

(1. 青岛农业大学 生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东 青岛 266109;

2. 诸城市农业局, 山东 诸城 262200; 3. 山东省花生研究所, 山东 青岛 266100)

摘要:为拓宽花生的耐盐基因资源,前期以平阳霉素为诱变剂进行了花生离体诱变,并在培养基中添加 NaCl 进行定向筛选,获得了一批 NaCl 耐性苗及其后代。对 NaCl 耐性植株 M₃ 个体的荚果产量进行了测定,结果表明,有 5 个原始再生植株产生了 3 个以上大于 60 g 荚果重的 M₃ 单株。用近红外仪对 M₄ 种子的各品质性状进行测定,结果发现,其在蛋白质、油酸、亚油酸及脂肪含量发生了广泛变异,有 7 份变异材料的蛋白质含量超过 30%,11 份变异材料的脂肪含量超过 55%。结合 M₄ 种子在 0.7% 盐溶液中的发芽情况,筛选出几个综合了高产、高油、耐盐多个优良性状的个体。证明 PYM 离体诱变、NaCl 定向筛选与近红外技术的有效结合,在花生中是一条新的有效的育种途径。

关键词:花生;平阳霉素;定向筛选;近红外技术;品质

中图分类号:S565.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)01-00202-05

doi:10.7668/hbxb.2015.01.034

Effect of *in vitro* Mutagenesis with Pingyangmycin and NaCl-directed Screening on Production and Quality of Offspring in Peanut

WANG Ya¹, QIAO Li-xian¹, WU Xiu-ling², HU Xiao-hui³, WANG Jing-shan¹, SUI Jiong-ming¹

(1. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao 266109, China; 2. Zhucheng Agriculture Bureau, Zhucheng 262200, China;

3. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

Abstract: To expand the salt-tolerant gene resources of peanut, we conducted *in vitro* mutagenesis with pingyangmycin (PYM) as the mutagen and directed screening on a medium containing NaCl in the previous experiment. In this study, pods of M₃ individual plants from those original NaCl-tolerant plants were collected and weighted after harvest and sun drying and the results indicated that 5 original HYP-tolerant, regenerated plants produced ≥ 3 offspring with over 60 g/pods per plant. M₄ seeds were tested for quality by Near Infrared Spectroscopy, and the results indicated that there was substantial variation in the protein content, oleic acid, linoleic acid content, and oil content, including seven with higher protein content ($>30\%$) and 11 individuals with higher oil content ($>55\%$). According to the results of pod weight per plant and quality traits combined with a germination test with a 0.7% NaCl solution of M₄ seeds, we screened a few individuals with high yield, oil content and salt tolerance. We concluded that the use of PYM-based *in vitro* mutagenesis in combination with directed screening with NaCl and Near Infrared Spectroscopy technology is a new effective pathway for breeding of peanut.

Key words: Peanut; Pingyangmycin (PYM); Directed screening; Near infrared spectroscopy technology; Quality

花生是重要的油料作物和经济作物,在我国农业生产中具有重要地位。盐碱等胁迫会抑制植株的

生长,导致产量降低,同时影响荚果的品质^[1]。随着环境的不断恶化,盐碱等逆境胁迫已经成为世界

收稿日期:2014-12-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31301356);山东省科技发展计划项目(2014GNC110002);山东省农业良种工程项目;青岛农业大学大学生科技创新项目

作者简介:王 亚(1989-),男,山东菏泽人,在读硕士,主要从事植物基因工程研究。

通讯作者:隋炯明(1978-),男,山东诸城人,副教授,博士,主要从事作物分子育种研究。

性的问题,培育具有高产、优质、耐盐的作物新品种已成为广大育种家研究的主要目标之一^[2]。然而花生缺乏耐盐资源,利用常规杂交方法难以选育耐盐品种。

离体诱变与组培结合是获得新种质的有效手段,与常规诱变技术相比,离体诱变结合组培取材不受季节限制;在培养基中添加盐碱、PEG 等作筛选压进行定向选择,可增加选择几率,缩短育种年限。因此,在作物育种上具有广阔的应用前景^[3-7]。

青岛农业大学遗传教研室前期利用平阳霉素作为诱变剂添加于培养基中进行诱变处理,然后利用 NaCl 进行定向筛选,对适宜的诱变剂量、筛选浓度等进行了研究,并筛选出了一批 NaCl 抗性植株^[8-9],本研究对 NaCl 抗性植株后代的耐盐情况、产量和品质性状进行了测定和分析,为花生的高产、优质、耐盐育种的有效结合奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

花生品种花育 22 号(HY22)的成熟种子,由青岛农业大学遗传教研室种植保存。

1.2 试验方法

1.2.1 PYM 诱变处理及植株再生 将花育 22 号胚小叶外植体接种到添加 3.00 mg/L PYM 的体胚诱导培养基中,同时进行诱变和体胚诱导,处理 4 周后,转移到添加 15.00 mg/L NaCl 诱导培养基,筛选 4 周,在不添加 NaCl 诱导培养基上恢复培养 4 周后,转移到添加 20.00 mg/L NaCl 体胚萌发培养基上直至小苗再生。诱导培养基为添加 10.00 mg/L 2,4-D 的 MSB₅培养基(MS 无机盐 + B₅有机成分),萌发培养基为添加 4.00 mg/L BAP 的 MSB₅培养基。

1.2.2 再生苗的嫁接 为解决再生苗生根困难、根质量差的难题,本试验采用了无菌嫁接技术。用 2 cm 左右的再生苗为接穗,花育 23 号的幼苗下胚轴为砧木,在超净台内进行无菌嫁接,具体参考 Sui 等^[10]报道的方法。30 个再生植株中 26 个获得后代。

1.2.3 M₃ 个体的播种及单株荚果产量的测定 2013 年 M₃ 个体按单株种植,起垄覆膜,垄距 80 cm,每垄播种 2 行,株距 16.70 cm,单粒播种,以诱变亲本作对照。成熟收获后晒干称量单株荚果重。试验材料播种于青岛农业大学莱阳试验田,试验田为潮土,pH 值 6.80。

1.2.4 M₄ 种子各品种性状的测定 花生 M₄ 种子各品种性状采用德国布鲁克光谱仪器公司产 Matrix-E 型傅立叶变换近红外光谱仪,根据山东农科院花生

所建立的近红外分析模型测定。每个株系测定 1 株,每个材料测量 2 次,取平均值。数据统计和分析由 Excel 和 SPSS 软件完成。

1.2.5 诱变后代的耐盐分析 根据前期我们对 M₃ 种子的耐盐结果^[9],选取在 0.70% 盐溶液中的发芽率比对照显著提高的 2,6,10,19,20,24 号再生植株后代,在 0.70% 的盐溶液中进一步对上述再生植株的 M₄ 种子进行发芽测试。

2 结果与分析

2.1 M₃ 单株产量的测定

将平阳霉素诱变与 NaCl 定向筛选的 M₃ 材料按单株收获荚果(M₄),晒干后称量单株荚果重,将大于 40.00 g/株的株数列于表 1。诱变亲本花育 22 号单株荚果重平均为 43.10 g,由表 1 可以看出,26 个再生植株的后代中有 25 个单株荚果重大于 40.00 g 的单株,特别是 6,8,19,20,24 号再生植株后代中各有 4,4,3,4,3 个单株荚果重大于 60.00 g。

2.2 M₄ 种子各品质性状变异幅度分析

利用近红外仪对经平阳霉素离体诱变和 NaCl 定向筛选后的 155 份 M₄ 种子的蛋白质、油酸、亚油酸及脂肪含量进行测定。M₄ 种子蛋白质含量变化幅度为 25.58%~32.67%,脂肪含量变化幅度为 48.04%~57.17%,棕榈酸含量变异幅度为 7.38%~14.60%,亚油酸含量变异幅度为 24.05%~41.25%,油酸含量变异幅度为 38.59%~58.73%,油酸亚油酸比值变异幅度为 0.94~2.44(表 2、图 1)。

经平阳霉素离体诱变后筛选得到的 M₄ 种子,从中得到蛋白质含量在 30.00% 以上的变异材料 7 份,脂肪含量在 55.00% 以上的变异材料 11 份。

2.3 部分诱变后代的耐盐情况及主要品质性状分析

选取在 0.7% 的盐溶液中的发芽率比对照显著提高的 2,6,10,19,20,24 号再生植株后代,在 0.7% 的盐溶液中进一步对 M₄ 种子进行发芽测试,并结合上述单株的产量测定结果和主要品质性状的测定结果进行分析(表 3)。从表 3 可以看出,与对照相比,诱变后代 6-7-1 和 19-6-1 综合了高产、高油、耐盐多个优良性状;诱变后代 19-2-2、19-5-2、20-11-4、24-1-1、24-2-1 和 24-3-1 具有高产、耐盐优良性状,部分后代的蛋白质和棕榈酸含量也发生了明显变化;而 10 号再生植株的 2 个后代 10-5-2 和 10-7-2 在 0.7% 的盐溶液中的发芽率分别达到 30.00% 和 50.00%,但产量相对比较低。

表 1 花育 22 号再生植株的 M₃ 个体荚果 ≥ 40.00 g 的单株数

Tab.1 Number of M₃ individuals(derived from the NaCl-tolerant ,regenerated plants of HY22)
that produced ≥40.00 g of total pot weight per plant

原始再生植株的编号 The original regeneration plants number	产生 40.00 g 以上荚果的个体数 The number of M ₃ individuals that produced ≥40.00 g of total pot weight per plant				
	40.00 ~44.99 g	45.00 ~49.99 g	50.00 ~54.90 g	55.00 ~59.90 g	≥60.00 g
1	1	2	0	0	0
2	2	2	0	1	1
3	1	1	2	0	2
4	0	1	0	1	2
5	2	1	0	1	1
6	2	1	0	1	4
7	1	1	1	0	0
8	0	1	0	0	4
9	2	1	2	0	1
10	0	0	0	0	0
11	2	2	0	0	1
12	0	0	1	0	2
13	0	1	0	0	1
15	1	0	0	0	1
16	1	2	0	1	0
18	0	1	2	2	1
19	0	1	0	1	3
20	1	0	1	0	4
21	1	0	2	3	1
23	0	0	0	1	1
24	1	2	1	0	3
25	0	1	2	0	1
26	1	2	1	3	1
27	1	0	0	0	1
29	0	2	2	0	0
30	2	1	2	0	0

表 2 平阳霉素诱变及 NaCl 定向筛选后 M₄ 种子各品质性状的变异幅度

Tab.2 The variation range of quality characteristics of M₄ seeds after PYM-based
in vitro mutagenesis and directed screening with NaCl

品质指标 Quality characteristics	对照(花育 22 号) Control(HY22)	诱变材料 最高值 Maximum value	比对照 增值/百分点 Added value	诱变材料 最低值 Minimum value	比对照减值 /百分点 Decreased value
蛋白质含量 Protein content	28.34%	32.67%	4.33	25.58%	-2.76
脂肪含量 Fat content	53.68%	57.17%	3.49	48.04%	-5.30
油酸含量 Oleic acid content	49.17%	58.73%	9.56	38.59%	-10.58
亚油酸含量 Linoleic acid content	32.37%	41.25%	8.88	24.05%	-8.32
油酸/亚油酸 O/L ratio	1.52	2.44	0.92	0.94	-0.58
棕榈酸含量 Palmitic acid content	9.48%	14.60%	5.12	7.38%	-2.10

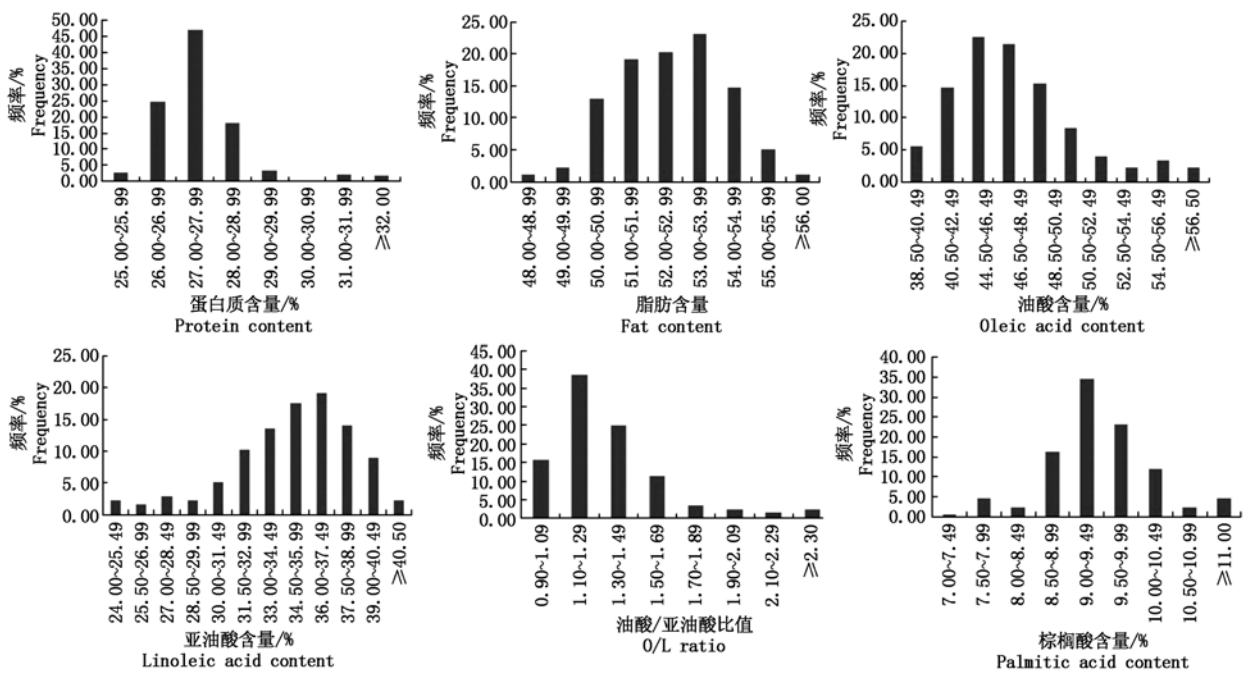


图 1 平阳霉素离体诱变及 NaCl 定向筛选后 M₄ 种子籽粒品质性状分布频率

Fig. 1 The frequency distributions of quality characteristics of M₄ seeds after
PYM-based *in vitro* mutagenesis and directed screening with NaCl

表 3 部分诱变后代的耐盐测定及主要品质性状分析

Tab. 3 Analysis on salt tolerance and main quality traits of partial M₃ offspring

原始再生 植株的编号 The original regeneration plants number	再生植株 后代的编号 The regeneration plants number	在 0.7% 盐溶液中 的发芽率/% Germination rate in a 0.7% NaCl solution	单株产量/g Yield per plant	脂肪含量/% Fat content	蛋白质含量/% Protein content	棕榈酸含量/% Palmitic acid content
花育 22 号 HY22	花育 22 号	10% ± 0.00	43.11	53.68 ± 0.21	28.34 ± 0.05	9.48 ± 0.21
2	2-2-1	20% ± 7.07	49.86	54.34 ± 0.20	27.39 ± 0.06 *	8.57 ± 0.12 *
	2-6-4	15% ± 0.00	55.62	55.01 ± 0.86 **	25.92 ± 0.40 **	10.28 ± 0.07 *
6	6-3-1	15% ± 7.07	49.83	51.68 ± 0.53 **	28.19 ± 0.01	9.26 ± 0.07
	6-4-1	20% ± 14.10	50.02	53.66 ± 0.29	26.76 ± 0.82 **	9.19 ± 0.24 *
	6-7-1	30% ± 0.00 **	76.54	57.17 ± 0.05 **	25.58 ± 0.52 **	9.97 ± 0.40
10	10-5-2	30% ± 7.07 **	35.93	50.52 ± 0.37 **	31.75 ± 0.20 **	14.60 ± 0.01 **
	10-7-2	50% ± 7.07 **	33.00	55.95 ± 0.05 **	27.25 ± 0.11 *	10.68 ± 0.51 **
19	19-2-2	30% ± 7.07 **	78.71	52.43 ± 0.10	27.41 ± 0.08 *	10.03 ± 0.33
	19-5-2	40% ± 14.10 **	60.03	53.83 ± 0.58	28.22 ± 0.09	10.92 ± 0.24 **
	19-6-1	40% ± 0.00 **	82.72	55.42 ± 0.35 **	26.29 ± 0.00 **	10.42 ± 0.72 *
20	20-5-1	20% ± 7.07	70.94	52.43 ± 0.50	28.12 ± 0.01	9.80 ± 0.01
	20-6-1	15% ± 0.00	72.83	53.96 ± 0.13	28.53 ± 0.24	9.68 ± 0.23
	20-9-1	15% ± 7.07	63.19	52.63 ± 0.42 *	28.31 ± 0.41	9.82 ± 0.31
	20-11-4	30% ± 0.00 **	86.28	48.04 ± 0.10 **	28.50 ± 0.61	9.99 ± 0.12
24	24-1-1	30% ± 7.07 **	61.64	53.16 ± 0.28	27.30 ± 0.14 *	10.46 ± 0.27 *
	24-2-1	40% ± 7.07 **	76.58	54.11 ± 0.05	26.77 ± 0.02 **	10.42 ± 0.32 *
	24-3-1	40% ± 0.00 **	64.11	54.47 ± 0.36	27.70 ± 0.058	9.76 ± 0.14
	24-4-2	30% ± 0.00 **	45.32	52.89 ± 0.04	26.71 ± 0.34 **	9.59 ± 0.03
	24-5-2	50% ± 7.07 **	30.89	51.13 ± 0.83 **	28.03 ± 0.41	9.82 ± 0.48
	24-7-5	50% ± 14.10 **	50.02	54.00 ± 0.16	28.41 ± 0.72	10.86 ± 0.51 **

注：* . 差异显著；** . 差异极显著。

Note: * and ** stand for significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

3 讨论

PYM 是一种具有安全、高效、诱变频率高、范围大等特点的抗生素,目前已在小麦、大豆、水稻和烟草等作物中得到应用。我们之前研究了 PYM 对花生体胚发生的影响,结果发现随着 PYM 浓度的增大,体胚诱导率显著下降,外植体褐化率急剧上升,PYM 对体胚发生有显著的抑制作用^[8]。

诱变产生大量突变体,而突变体的后续鉴定需要大量人力、财力和物力,诱变结合定向筛选可解决这一难题。用诱变与组培相结合创造新的种质资源已在多种植物上获得成功,在抗病性、抗逆性、产量、品质等方面获得了很多优良突变体。陈丽等^[11]应用 EMS 处理杨树胚性愈伤组织,经盐定向筛选后获得了耐盐植株。郭飞等^[12]利用 EMS 诱变与组培相结合从拟南芥中选育出一批抗 La 突变体。罗静等^[13]利用 EMS 诱变处理草莓愈伤组织并筛选得到抗灰霉病草莓植株。李红等^[14]采用 NaN_3 处理苜蓿愈伤组织,对诱变处理的愈伤组织进行碱胁迫处理,获得了耐碱的变异植株。王小华等^[15]利用 DES 诱变处理柱花草愈伤组织,之后与离体培养相结合筛选得到抗寒突变体。

花生离体诱变研究也有报道,但仅有少数获得突变体。Venkatachalam 等^[16]以 γ 射线辐照处理花生愈伤组织,在培养基添加黑斑病致病菌滤液进行定向筛选,后代中获得了抗黑斑病的突变体。Muthusamy 等^[17]诱变处理花生胚性愈伤组织后进行体胚诱导,再生后代在叶片形状、单株结果数、荚果重方面发生了明显提高。

前期研究中,通过 PYM 离体诱变与 NaCl 定向筛选,有 26 个原始的 NaCl 耐受性再生植株产生了后代,其中 23 个再生植株在生活力、生长习性、开花习性、荚果形状和种皮颜色等方面发生了变异,6 个再生植株的 M_3 种子在 0.7% 盐溶液中的发芽率显著高于对照^[4]。试验进一步研究发现,有 5 个再生植株产生了 3 个以上大于 60 g 荚果重的 M_3 单株。之后,又结合具有简单快捷、非破坏性测定花生种子品质性状的近红外技术,对 M_4 种子的各品质性状进行测定,结果发现其在蛋白质、油酸、亚油酸及脂肪含量发生了广泛变异,有 7 份变异材料的蛋白质含量超过 30%,11 份变异材料的脂肪含量超过 55%。

本研究通过 PYM 离体诱变、NaCl 定向筛选与近红外技术的有效结合,创造了一批突变体,并从中初步筛选出多个综合了高产、高油、耐盐多个优良性状的个体,为开拓花生新的育种途径提供了依据。

参考文献:

- [1] 禹山林. 中国花生品种及其系谱[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008.
- [2] Rai M K, Kalia R K, Singh R, *et al.* Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-an overview of the recent progress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 71(1): 89–98.
- [3] 吴伟刚, 刘桂茹, 杨学举. 诱变与组织培养相结合在植物育种中的应用[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(11): 197–201.
- [4] Patade V Y, Suprasanna P. An *in vitro* radiation induced mutagenesis-selection system for salinity tolerance in sugarcane[J]. *Sugar Tech*, 2009, 11(3): 246–251.
- [5] 赵锦慧, 郭 婕, 胡彦民. 应用诱变法筛选玉米抗草甘膦突变株系的研究[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(4): 49–52.
- [6] 高兰英, 马 庆. 诱变突变技术在小麦育种研究中的应用[J]. *山西农业科学*, 2009, 37(6): 7–12.
- [7] 张 旭, 杨兆顺. 诱变技术在玉米育种中的应用[J]. *天津农业科学*, 2004, 10(4): 25–27.
- [8] 赵明霞, 隋炯明, 王晓杰, 等. 平阳霉素对花生体细胞胚胎发生的影响[J]. *核农学报*, 2011, 25(2): 242–246.
- [9] Zhao M X, Sun H Y, Ji R R, *et al.* *In vitro* mutagenesis and directed screening for salt-tolerant mutants in peanut[J]. *Euphytica*, 2013, 193(1): 89–99.
- [10] Sui J M, Li R, Fan Q C, *et al.* Isolation and characterization of a stress responsive small GTP-binding protein AhRabG3b in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Euphytica*, 2013, 189: 161–172.
- [11] 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.
- [12] 郭 飞. 拟南芥抗 La 突变体的筛选及鉴定[D]. 合肥:安徽农业大学, 2010.
- [13] 罗 静, 周厚成, 王永清, 等. EMS 离体诱变及抗草莓灰霉病愈伤组织的筛选[J]. *核农学报*, 2009, 23(1): 90–94.
- [14] 李 红, 李 波, 赵洪波, 等. 诱变处理苜蓿愈伤组织抗碱性的研究[J]. *草业科学*, 2009, 26(7): 32–35.
- [15] 王小华, 庄南生, 王 英, 等. DES 诱变与离体培养结合筛选柱花草抗寒突变体的研究[J]. *草业学报*, 2010, 19(1): 263–267.
- [16] Venkatachalam P, Jayabalam N. Selection and regeneration of groundnut plants resistant to the pathotoxic culture filtrate of *Cercosporidium personation* through tissue culture technology[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 61(3): 351–364.
- [17] Muthusamy A, Vasanth K, Sivasankari D, *et al.* Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut[J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(3): 430–435.