

# 利用 EMS 进行青檀彩叶植株诱变研究

朱翠翠<sup>1</sup>, 张林<sup>2</sup>, 王峰<sup>2</sup>, 聂硕<sup>1</sup>, 孙忠奎<sup>3</sup>, 王长宪<sup>2</sup>

(1. 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271000; 2. 泰安市泰山林业科学研究院, 山东 泰安 271000;

3. 泰安时代园林科技开发有限公司, 山东 泰安 271000)

**摘要:**以济南灵岩寺青檀种子为试材, 采用体积百分比浓度(v/v)甲基磺酸乙酯 1.2%、1.5%、1.8%对青檀种子进行诱变处理, 以期获得青檀优良品种。结果表明:在诱变青檀叶色变异方面, 以 1.2%~1.5%浓度的 EMS 处理青檀幼苗生长点 48 h 为宜;诱变后代主要表现为生长缓慢, 叶片局部或全部黄化、白化, 且高度、粗度及分枝数较对照组显著降低;使用 AFLP 技术共检测到了 15 个变异位点, 对筛选青檀变异后代提供可靠依据。

**关键词:**青檀;甲基磺酸乙酯(EMS);化学诱变育种

**中图分类号:**S 687 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)12-0057-05

青檀 (*Pteroceltis tatarinowii* Maxim.) 属榆科 (Ulmaceae) 青檀属 (*Pteroceltis*) 落叶乔木, 又名翼朴, 是中国的特有植物。在中国植物红皮书中被列入国家三级重要保护对象, 是中国特有的纤维树种和钙质土壤的重要指示植物<sup>[1]</sup>。青檀作为我国重要的乡土树种和绿化树种, 在城建过程中, 与乔、灌、草巧妙结合, 不仅可以美化环境, 还可以改善城市小气候、维持城市生态系统的平衡, 其叶可作为高级营养型饲料添加剂, 其檀皮制作的宣纸一直被书法家和画家视作珍品, 具有很高的应用价值<sup>[2-4]</sup>。目前, 国内对青檀的研究主要集中在遗传多样性<sup>[5-6]</sup>、栽培繁殖<sup>[7]</sup>、发展应用<sup>[8]</sup>、抗性试验<sup>[9]</sup>等方面, 对青檀新品种育种报道相对较少, 目前仅有泰安市泰山林业科学研究院张林所长研究了秋水仙素育种, 青檀育种仍处于初级阶段, 因此, 选育优良青檀品种具有十分重要的实践和科学意义。

目前, 育种方法主要有杂交育种、多倍体育种、诱变育种及基因工程育种。其中化学诱变育种方法是一种新型、周期短、效果明显的育种方法, 采用化学药剂人为诱导植物发生突变, 再通过选择和鉴定, 可培育出较好的新品种。甲基磺酸乙酯 (ethyl methane sulfonate, EMS) 是一种烷化剂, 主要是通过诱导碱基从 C 到 T 的

突变, 从而引起碱基从 C:G 到 T:A 的转换突变, 进而产生基因突变。甲基磺酸乙酯是目前使用最广泛、效果最明显的诱变剂之一<sup>[10-11]</sup>, 其诱变后代的突变频率高, 变异范围广, 目前已成功应用于杜梨<sup>[12]</sup>、杉木<sup>[13]</sup>等植物, 但在青檀上尚未见应用。该研究采用不同体积百分比浓度(v/v)的 EMS 溶液处理青檀种子, 通过对死亡率以及幼苗生长进程变化等检测, 筛选最有价值的变异植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

灵岩寺位于泰山西北部, 隶属长清区万德镇, 北纬 36°21'41.2"~36°21'48.3", 东经 116°58'32.7"~116°58'49.9", 气候属暖温带季风气候类型, 年均气温 12.8℃, 年降水量 715 mm;成土母岩为钙质页岩和石灰岩, 青檀主要分布在灵岩寺内和灵岩寺外道路两旁, 海拔高度 287~319 m。

### 1.2 试验材料

以 2014 年 9 月下旬在济南灵岩寺采集的青檀种子为供试材料。采种母树位于灵岩寺南院, 树龄 1 000 年左右。采集收回来的种子在泰安市泰山林业科学研究院实验室内处理, 发芽后栽植到泰安市夏张育苗基地, 基地土壤为棕壤, pH 6.0。

EMS 药剂由美国 Sigma 公司生产。使用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.0 的磷酸缓冲液配置 EMS 溶液, 各组 EMS 的体积百分比浓度(v/v)依次为 0(CK)、1.2%、1.5%、1.8%。

### 1.3 试验方法

药剂处理种子采用 3 种方法, 即未萌发种子处理、

**第一作者简介:**朱翠翠(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。E-mail: zhucui@163.com

**责任作者:**王长宪(1959-), 男, 研究员, 硕士生导师, 现主要从事园林植物等研究工作。E-mail: changxianwang@163.com

**基金项目:**2014 年山东省农业良种工程资助项目(鲁科字[2014]96 号)。

**收稿日期:**2016-02-15

萌发种子处理以及幼苗生长点处理。

1.3.1 青檀未萌发种子处理 将种子阴干后去掉种翅,室温避光下用不同浓度 EMS 溶液浸泡,处理完成后使用常温温水清洗 2~3 次,然后使用沙藏法层积,翌年播种。每个浓度处理 500 粒种子,3 次重复,处理时间为 3 d。

1.3.2 青檀萌发种子处理 将种子阴干后沙藏,在种子有 75% 左右露白时即可使用 EMS 溶液进行处理。将河沙洗净后移至培养皿中进行药剂诱变处理,每个浓度选用 500 粒萌发种子,3 次重复,处理时间 1 h。诱变完成后用常温温水清洗,然后移栽于穴盘内。

1.3.3 青檀幼苗生长点处理 将种子沙藏萌发后,于 4 月初栽于穴盘内。待长出茎尖后开始处理,放少量脱脂棉在生长点上,分别滴不同浓度 EMS 溶液,每株每次滴至药棉浸透为止,用药后需持续保湿并遮光。早晚处理 2 次,持续滴药 2 d,试验每个组合处理 500 株苗,3 次重复。

#### 1.4 项目测定

青檀幼苗在田间定植后,调查统计种子发芽率、成活率,定期记录苗木变异情况,并测量高度、粗度等,记录变异苗木及对照苗木的形态变化。于 9 月中上旬采集变异植株嫩叶,提取 DNA,利用 AFLP 标记方法检测遗传变异位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 死亡率分析

2.1.1 采集种子质量检测 种子采回后阴干,然后沙藏催芽,在正常条件下进行一次质量检测,由表 1 可知,种子的平均发芽率在 47.38% 左右,这与方升佐等<sup>[14]</sup>对山东青檀种子活力测定的结果一致。青檀种子发芽后,点播到试验苗圃后,30 d 后统计出苗率,平均达 92.39%。

表 1 采集种子活力

Table 1 The seeds germination rate and seedling emergence rate

编号 Number	种子数 Number of seeds	发芽数 Number of germination	发芽率 Germination rate/%	出苗数 Number of emergence	出苗率 Emergence rate/%
1	500	247	49.33	231	93.52
2	500	238	47.60	217	91.18
3	500	226	45.20	209	92.47
平均 Mean	500	237	47.38	219	92.39

2.1.2 诱变处理死亡率分析 在利用 EMS 诱变青檀萌发种子的过程中,虽然时间不长,仅 1 h,但是在浸泡过程中出现了一定程度的胚轴软化、褐化现象。在青檀幼苗定植田间 30 d 后,存活数基本稳定。因此以栽植或处理 30 d 后所统计的数据作为试验分析数据。由表 2 可知,死亡率为萌发种子处理>幼苗生长点处理>未萌发种子处理,根据比较可知未萌发种子处理

死亡率与对照相似,说明此种处理方法基本没有起到诱变作用,未萌发种子处理不适合化学诱变。而萌发种子处理>幼苗生长点处理可能与种子浸泡时间过长出现胚轴软化褐化现象有关。同时,表 2 结果显示,萌发种子与幼苗生长点处理均降低了青檀的发芽率。随着 EMS 处理浓度的升高,死亡率随之增加,其中,萌发种子 1.2% 和 1.5% EMS 处理后的死亡率分别为 37.66% 和 61.33%,幼苗生长点处理 1.2% 和 1.5% EMS 处理后的死亡率分别为 34.67% 和 56.33%,诱变育种中一般采用植株半致死剂量作为诱变的最佳浓度<sup>[15-16]</sup>,所以萌发种子和幼苗生长点处理最佳诱变浓度均在 1.2%~1.5%。

表 2 诱变处理死亡率分析

Table 2 The mortality rate after treatment of *Pteroceltis tatarinowii*

处理方法 Method	浓度 Concentration /%	时间 Time /h	处理数 Number of treatment	死亡数 Number of mortality	死亡率 Mortality rate/%
未萌发种子处理 Ungerminated seed treatment	0(CK)	72	500	263	52.67±0.577 3e
	1.2	72	500	257	51.45±0.357 9e
	1.5	72	500	262	52.34±0.259 8e
萌发种子处理 Germinated seed treatment	1.8	72	500	243	48.59±0.277 1e
	0(CK)	1	500	23	4.67±0.450 3h
	1.2	1	500	188	37.66±0.398 3f
幼苗生长点处理 Growth point treatment	1.5	1	500	307	61.33±0.854 4c
	1.8	1	500	372	74.33±0.773 6a
	0	48	500	0	0i
幼苗生长点处理 Growth point treatment	1.2	48	500	173	34.67±0.473 4g
	1.5	48	500	282	56.33±0.611 9d
	1.8	48	500	69	69.33±0.750 5b

注:表中数据为平均值±标准误,不同小写字母表示显著差异检验( $P<0.05$ )。下同。

Note: The data in the table are the average and standard error, and different lower-case letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same below.

### 2.2 EMS 处理后叶色变异情况观测

各浓度 EMS 对未萌发种子处理没有起到诱变作用,只对萌发种子和生长点处理起到诱变作用。在 EMS 对青檀萌发种子和生长点的处理中,青檀表型变异主要表现在叶色上,有 3 种变异情况,一是整个叶片变成金黄色,但黄化程度有所变化;二是白化,表现为真叶变白,也有局部变白的情况;三是叶片局部变黄,特点是青檀叶子存在不同程度的黄化情况,有的表现为金边,有的表现为半绿半黄,甚至有的表现为斑叶。图 1、表 3 为不同浓度 EMS 处理后叶色变异结果。

随着 EMS 浓度升高,青檀叶色变异情况有所差异。其中,1.2%、1.5% 浓度的 EMS 处理萌发种子 1 h 叶色变异率为 1.0%、1.2%,诱变效果最佳;1.2%、1.5% 浓度的 EMS 处理生长点形态变异率为 1.2%、1.6%,诱变效果最好。过高或过低浓度的 EMS 处理对诱变青檀效果均有较大的影响。同时,结果显示生长点处理变异率大于萌发种



图 1 青檀变异情况  
Fig. 1 Variation of *Pteroceltis tatarinowii*

表 3 青檀 EMS 处理后叶色变异情况

The leaf color variation statistics of <i>Pteroceltis tatarinowii</i> after EMS treatment					
处理方法 Method	浓度 Concentration/%	时间 Time/h	处理数量 Number of seeds	叶色变异数 Leaf color variation	叶色变异率 Leaf color variation rate/%
萌发种子处理 Germinated seed treatment	0(CK)	1	500	0	0c
	1.2	1	500	5	1.0±0.115 5b
	1.5	1	500	6	1.2±0.115 5ab
	1.8	1	500	1	0.2±0.057 7c
幼苗生长点处理 Growth point treatment	0(CK)	48	500	0	0c
	1.2	48	500	6	1.2±0.173 2ab
	1.5	48	500	8	1.6±0.230 9a
	1.8	48	500	2	0.4±0.057 7c

子处理,因此在 EMS 诱变青檀叶色变异方面,以1.2%~1.5%浓度的 EMS 处理青檀幼苗生长点 48 h 为宜。

但在调查的过程中发现,有的叶色变异在后期逐渐转为正常,或死亡。由表 4 可知,随着变异植株生长,有部分变异尚不稳定,特别是 8 月底之前有些植株又变为绿色或死亡,从 9 月到落叶,变异逐渐趋于稳定。EMS 处理后总共出现 28 棵叶色变异植株,随着变异植株生长,最后仅剩 3 棵叶色变异植株,其中 2 棵黄叶变异植株、1 棵斑叶变异植株,稳定率仅为 10.71%。

2.3 变异植株形态特征

经甲基磺酸乙酯处理的青檀幼苗一段时间后,待长出 2 对真叶时,逐渐产生变异,诱变植株主要表现为 2 种类型。一是黄叶植株,主要特征为树皮浅绿色或浅灰色;枝条黄绿色逐渐转为浅灰色,初有细毛,后脱落。叶纸质,黄色;卵形,上面光滑或有短硬毛,脉腋有簇毛;边缘有不整齐的锯齿;叶柄无毛。较正常青檀主要区别为生长缓慢,叶黄色。二是斑叶植株,与黄叶植株主要区别在叶色上,其它特征相似,主要特征为树皮淡绿色或浅灰色;小枝黄绿色,干时转为浅灰色,初有细毛,后逐渐脱落;叶纸质,黄色、白色、绿色相间,形成斑叶;叶卵形,光滑,脉腋有簇毛;边缘有不整齐的锯齿;叶柄无毛。相对正常植株主要区别为变异植株生长缓慢、矮小,叶片表现为斑叶。

2.4 诱变后代生长量分析

不同浓度甲基磺酸乙酯处理后的幼苗定植田间后,定期测量变异植株和对照组青檀苗植株高度、粗度、分

枝数,并计算均值。从表 5 可以看出,5 月中旬二者相差不大,之后逐渐明显,到了 8 月,已经能够明显看出二者之间的变化。黄叶和斑叶变异植株株高、地径以及分枝

表 4 青檀生长期叶色变异稳定性调查

The results of leaf color variation in growing period				
时间 Time /(年-月-日)	叶色变异总数 Total number of leaf color variation	叶片全黄 Yellow leaves	斑叶 Variegated leaves	叶片白化 White leaves
2015-05-18	28	17	7	4
2015-06-04	26	15	7	4
2015-06-27	18	3	4	2
2015-07-13	12	8	3	1
2015-08-08	6	4	2	0
2015-09-10	3	2	1	0
2015-09-22	3	2	1	0
2015-10-09	3	2	1	0

表 5 变异单株生长量分析

The growth rate analysis of mutant plant				
时间 Time/(年-月-日)	处理 Treatment	高度 Height/m	地径 Diameter/cm	分枝数 Branches
2015-05-18	对照	0.108±0.012	0.315±0.015	2±0.8
	黄叶变异	0.048±0.006	0.197±0.074	1±0.1
	斑叶变异	0.057±0.021	0.245±0.065	1±0.2
2015-08-08	对照	1.045±0.176	0.954±0.126	24±3.6
	黄叶变异	0.678±0.058	0.433±0.034	10±2.5
	斑叶变异	0.834±0.034	0.534±0.122	15±3.4
2015-09-10	对照	1.686±0.217	1.198±0.022	42±7.3
	黄叶变异	0.912±0.121	0.668±0.007	18±4.8
	斑叶变异	1.084±0.314	0.767±0.013	25±5.6



数明显低于对照组。9月,对照组分别高于黄叶和斑叶变异植株 0.774、0.602 m,叶色变异植株明显生长缓慢,

可能与黄叶、斑叶影响其光合作用有关。图 2、3 为变异植株生长进程。



图 2 黄色变异单株生长进程

Fig. 2 The growth process of yellow leaf mutants



图 3 斑叶变异单株生长进程

Fig. 3 The growth process of plants with variegated leaves

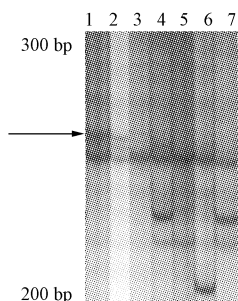
## 2.5 AFLP 技术检测青檀黄叶变异植株的 DNA 变异

利用 AFLP 技术对黄叶变异植株的样本 DNA 进行鉴定分析,结果表明,6 组 AFLP 引物共检测到 15 个突变位点,多出现在 100~300 bp 大小区间内。由此可知,

EMS 处理使青檀产生了可以鉴定的点突变。图 4 为引物 E86M85 检测对照组与黄叶变异植株幼苗的 AFLP 图谱,可见在 200~300 bp 产生了变异位点。通过重复试验,可以确定鉴定得到的突变位点是稳定可靠的。

## 3 结论与讨论

该研究采用的是 EMS 处理青檀种子或生长点,由于青檀是木本植物,生长周期长;青檀种皮坚硬,诱变效率低,必须花费大量的时间和处理才能得到一定数量的稳定遗传的变异单株,该试验时间短,虽已观测到部分叶色变化,但还不能确定得到的这些叶色变异是否稳定可遗传,还有待于进一步观测。该研究仅统计叶色变异情况,其它变异情况如叶形、枝干变化等均未统计,变异率为 0.4%~1.6%,变异率偏低,其它变异类型还需要进一步统计和观测。另外该研究仅检测了黄叶变异植株 DNA 变异,并未对斑叶变异植株进行 AFLP 技术分析,只能得到黄叶变异与对照组的区别,尚未见斑叶植株与对照、黄叶与斑叶植株的区别,还须进一步试验检测。诱变育种中一般采用植株半致死剂量作为诱变的



注:1、2 为对照组,3、4、5、6、7 为变异植株,箭头处表示变异位点。

Note: No. 1 and No. 2 are the control group, 3-7 indicate the variation of the plant, and the arrow indicates the mutation site.

图 4 引物 E86M85 检测对照组与变异植株遗传图谱

Fig. 4 The genetic map of the control group and the variation plant with primer E86M85

最佳体积分数。该研究通过 EMS 处理后死亡率、变异率分析初步确定了合适的时间、浓度等因素,但并不能完全排除植物自然生理变化、环境和人为因素等的偶然结果,还有待于进一步试验验证。该研究通过甲基磺酸乙酯处理青檀萌发种子或生长点获得优良变异单株,但未对其进行光合作用测量、抗性试验、核型分析等,还不能确定甲基磺酸乙酯影响叶色的机理、是否影响植株的核型以及其它生理特性,这些都需要进一步试验。

该研究使用不同浓度的 EMS 诱变青檀种子后,得到了 3 株明显区别于对照组的变异植株,其中黄叶 2 株、斑叶 1 株,诱变率 0.02%。变异植株在株高、粗度及分枝数上明显低于对照组,形态上变化明显,在 8 月底至 9 月下旬观赏效果最好。该研究在 EMS 对青檀萌发种子和生长点的处理中,通过死亡率及变异率分析可以确定在 EMS 诱变青檀叶色变异方面,以 1.2%~1.5% 浓度的 EMS 处理青檀幼苗生长点 48 h 为宜。甲基磺酸乙酯是一种可以诱发点突变的烷化诱变剂<sup>[17]</sup>,使用分子标记的方法可以有效地检测出变异位点。AFLP 快速、稳定、高效,并且 DNA 用量少,检测效率高。该研究中,使用的 6 对 AFLP 随机引物共检测到了 15 个变异位点,对选择有价值的变异后代提供可靠依据。EMS 是一种使用广泛、效果明显的诱变剂,其产生的变异类型较多<sup>[18-20]</sup>。文献显示,甲基磺酸乙酯诱变后变化最多的是形态特征的变化,大多以矮化效果为主。该试验中,使用不同浓度的 EMS 处理后,不仅显示矮化效果,还表现出了黄化效果,出现黄叶、花叶变异植株,这对观赏植物的育种具有重要的影响。

### 参考文献

- [1] 张兴旺,张小平.珍稀植物青檀的生物学特性及栽培技术[J].中国林副特产,2006(6):36-38.
- [2] 张天麟.园林树木 1 600 种[M].北京:中国建筑工业出版社,

1988;115.

- [3] 陈有民.园林树木学[M].北京:中国林业出版社,2002;328.
- [4] 张林,王峰,孙忠奎,等.青檀多倍体诱变试验初报[J].中国农学通报,2015,31(13):1-4.
- [5] 李晓红,张慧,王德元,等.我国特有植物青檀遗传结构的 ISSR 分析[J].生态学报,2013,33(16):4892-4901.
- [6] 李建华,李雪松,田春元,等.大贵寺国家森林公园野生青檀居群的遗传多样性[J].生态环境学报,2011,20(12):1799-1804.
- [7] 狄香香,方升佐.青檀种子休眠机理及发芽条件的探讨[J].植物资源与环境学报,2002,11(1):9-13.
- [8] 方升佐,李光友.经营措施对青檀人工林生物量及檀皮质量的影响[J].南京林业大学学报,2001,25(1):21-24.
- [9] 侯嫦英,方升佐,薛建辉,等.干旱胁迫对青檀等树种苗木生长及生理特性的影响[J].南京林业大学学报,2003,27(6):103-106.
- [10] BIRD R, MCK M, NEUFFER G. Induced mutations in maize[M]// JANICK J. Plant Breeding Reviews(5). New York: Van Nostrand Reinhold, 1987:139-180.
- [11] 马惠平,赵永亮,杨光宇.诱变技术在作物育种中的应用[J].遗传,1998,20(6):41-43.
- [12] 慎家辉,秦安,李甲明,等.甲基磺酸乙酯诱变杜梨种子突变的鉴定与分析[J].浙江农林大学学报,2014,31(6):892-897.
- [13] 颜志勤.三种化学诱变剂在杉木育种中的应用研究[D].福州:福建农林大学,2013.
- [14] 方升佐,朱梅,唐罗忠,等.不同种源青檀种子的营养成分及种子活力的差异[J].植物资源与环境,1998,7(2):16-21.
- [15] 王园珍.甘蓝型油菜不同诱变方式诱变后代的遗传变异评价[D].武汉:华中农业大学,2007.
- [16] 陈学林,李卫峰,王丹,等.我国菊花核技术诱变育种研究进展[J].福建林业科技,2007,34(4):259-263.
- [17] 全妙华,陈东明,蒋向辉,等.四棱豆的化学诱变及矮化突变性状初步分析[J].江苏农业科学,2010(6):219-221.
- [18] 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.
- [19] 王长里,付晶,杨学举.EMS 诱变小麦突变体的研究及展望[J].安徽农业科学,2008,36(19):8038-8039.
- [20] KL MARK G. Differential response to mutagens as studied by the *Neurospora* reverse mutation test[J]. Hereditas, 1953, 39: 270-276.

## The Colorful Plant Mutation of *Pteroceltis tatarinowii* by EMS Treatment

ZHU Cuicui<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>, NIE Shuo<sup>1</sup>, SUN Zhongkui<sup>3</sup>, WANG Changxian<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271000; 2. Taishan Forestry Science Institute, Tai'an, Shandong 271000; 3. Tai'an Shidai Technology Development Limited Company, Tai'an, Shandong 271000)

**Abstract:** To get excellent germplasm variations in this study, *Pteroceltis tatarinowii* seeds which was picked in Lingyan Temple, was treated to be mutagenized, by using the volume percentage concentration(v/v) ethyl methyl sulfone(0(CK), 1.2%, 1.5%, 1.8%) respectively. The results showed that, in color-leaf mutagenic variation of *Pteroceltis tatarinowii*, the optimal EMS concentrations inducing *Pteroceltis tatarinowii* seeds mutations ranged from 1.2% to 1.5% by 48 hours. Mutation progeny grew slowly, and the partial or total leaf was yellow or whiten, and the height, roughness and the number of branches were significantly lower than those of the control group; the 15 loci were detected by using AFLP markers, providing a reliable basis on screening in variant progenies of *Pteroceltis tatarinowii*.

**Keywords:** *Pteroceltis tatarinowii*; EMS; chemical mutation breeding