

EMS 处理对大白菜种子和幼苗活力的影响及 M₂ 表型变异分析

卢 银, 刘梦洋, 王超硕, 汪 珊, 赵建军, 王彦华, 罗双霞, 陈雪平, 申书兴
(河北农业大学园艺学院/河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室, 保定 071001)

摘要: 大白菜突变体的获得是种质创新的有效途径,也是开展功能基因组研究的基础。本研究选取自交亲和、易进行小孢子培养的大白菜自交系‘A03’作为构建突变体库的野生型材料。分析 EMS 种子处理对 M₁、M₂ 种子和幼苗活力及生理特性的影响,确定适宜诱变方案并构建突变体库,并针对突变体库 M₂ 群体结球期、收获期和生殖生长阶段表型性状变异进行了分析。结果表明,以浓度 0.4% 的 EMS 浸泡种子 16 h,以及连续对两代种子进行诱变处理,均可以构建大白菜突变体库。突变体库 M₂ 群体植株在结球期、收获期和生殖生长阶段表型变异丰富,变异频率分别为 21.65%、22.40% 和 25.65%。

关键词: 大白菜;EMS;突变体库;诱变育种

Effects of EMS Mutagenesis on Seed and Seedling Vigor and Phenotypic Variation of M₂ Population in Chinese Cabbage

LU Yin, LIU Meng-yang, WANG Chao-shuo, WANG Shan, ZHAO Jian-jun,
WANG Yan-hua, LUO Shuang-xia, CHEN Xue-ping, SHEN Shu-xing
(Key Laboratory for Vegetable Germplasm Innovation and Utilization of Hebei/College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Abstract: Creating mutants is an effective way for germplasm innovation and provides material for functional genomics research in Chinese cabbage. In this study, the inbred line ‘A03’ of Chinese cabbage was selected as wild genotype for constructing mutant library because of its self-compatibility and easy microspore culture. The influences of EMS treatments on vigor and some physiological property of M₁ and M₂ seeds and seedlings were investigated in order to determine the appropriate mutagenesis method. Then the mutant library of Chinese cabbage was constructed. The variation in phenotypic traits of M₂ population at heading, harvest, and reproductive growth stages was further investigated and analyzed. The results showed that the most suitable scheme of creating mutants was considered to soak seeds with EMS 0.4% for 16 h. The way of continuous treatments with EMS on seeds of two generations could be used in constructing mutant library of Chinese cabbage. Within the obtained mutant population, there was wide variation in phenotypic traits of M₂ individuals at heading, harvest, and reproductive growth stage, with mutation frequencies of 21.65%, 22.40% and 25.65%, respectively.

Key words: Chinese cabbage; EMS; mutant library; mutation breeding

大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 原产于我国,属十字花科芸薹属蔬菜作物,是重要的蔬

收稿日期:2014-05-06 修回日期:2014-05-13 网络出版日期:2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1640.012.html>

基金项目:河北省杰出青年科学基金(C2013204118);“十二五”农村领域国家科技计划课题(2012AA100202-5);高等学校博士学科点专项基金(20121302110006);农业科研杰出人才培养计划

第一作者研究方向蔬菜遗传育种。E-mail: luagzoujidong@163.com

通信作者:申书兴,研究方向蔬菜遗传育种。E-mail: shensx@hebau.edu.cn

菜作物之一。近年来,随着人民生活水平的提高,蔬菜种植结构的变化,春夏季栽培大白菜日益受到重视。对大白菜品种的生态气候类型也提出了新的要求,比如苗用类型生产面积逐年提升,仅京津两地年种植面积已逾 4000 hm²[1]。生产上对品种需求趋于多样化,但育种实践中存在遗传背景狭窄、缺乏突破性的优异种质资源等问题。构建一定规模的突变体库,获得大量变异材料,是培育新品种和开展遗传研究的有效方法。

以甲基磺酸乙酯(EMS, ethyl methane sulfonate)作为诱变剂获得突变体,具有操作简便、突变频率高、染色体畸变少、易于筛选等多重优点,是构建饱和突变体库的理想诱变方法[2-4]。EMS 突变体库的构建在水稻[5]、小麦[6-7]等多种作物中均有报道。在芸苔属作物中,利用 EMS 诱变方法构建不同品种的突变体库已有报道。N. Wang 等[8-9]构建了甘蓝型油菜的 EMS 突变体库,获得了与种子芥酸含量相关的 *FAEI* 基因的点突变类型。2009 年英国 John Innes Centre 构建了油用白菜基因型 R-O-18 的 EMS 突变体库,并进行了多方面研究[10-11]。目前,国内尚无大白菜突变体库构建的相关报道[12]。

本研究以大白菜自交系‘A03’为材料,通过分析不同 EMS 处理对种子和幼苗活力及主要生化指标的影响,确定适宜的诱变方案,并构建大白菜突变体库。进一步针对突变体库 M₂ 群体结球期、收获期和生殖生长阶段等表型变异进行了分析。调查性状具有数量性状遗传特征,遗传基础复杂,在同一背景下创造筛选表型变异有利于发掘相关优异基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要试剂

本试验选取二倍体大白菜自交系‘A03’作为构建突变体库的野生型材料。‘A03’自交亲和、抗性较强、配合力高、适于进行小孢子培养,为抗热早熟品种“夏阳”×“光辉”杂交后代的双单倍体(DH)系,由河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室提供。

EMS 诱变剂为美国 Sigma 生产,以 pH=7 的磷酸缓冲液稀释配制。以 5% 硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)作为终止和解毒剂,化学试剂均为分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 EMS 诱变处理对种子活力的影响 选取‘A03’饱满种子 3000 粒,分 5 个处理,每个处理设 3 组重复,每组 200 粒,用于 EMS 一次处理试验;另随机选取经过 0.4% EMS 种子诱变植株自交获得的饱

满种子 600 粒,设为第 6 个处理 3 组重复,用于 EMS 2 次处理试验。室温浸种 2 h 后,分别用 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、0.4% 两代的 EMS 诱变剂处理 16 h,期间每隔 1 h 震荡摇匀 1 次,处理完毕后弃去 EMS,清水冲洗 2 h 后自然回干。M₂ 种子为 M₁ 植株自交收获的种子,常温浸种 20 h 后回干。将上述种子置于铺有润湿的双层滤纸的培养皿内培养,每天适当的补充水分并观察统计发芽情况。

发芽势(%) = 7 d 发芽数/供试种子数 × 100;

发芽率(%) = 14 d 发芽数/供试种子数 × 100;

发芽指数(Gi): $G_i = \sum G_t / Dt$ (G_t: t 时间种子的发芽个数;Dt 相应发芽试验时间);

活力指数(Vi): $V_i = S(cm) \times G_i$ (S 为发芽 t 时间时胚根及胚轴的总长度)。

1.2.2 EMS 诱变处理对幼苗活力的影响 在上述种子萌发试验的 14 d,将不同处理的材料称重后研磨提取粗酶液,按李合生[14]的方法对超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)酶活性以及丙二醛(MDA)含量进行测定。

SOD 的活力测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测量,以抑制 NBT 光还原 50% 为 1 个酶活性单位(U),另设 2 个以 PBS 代替粗提酶液的试管,其中一管光照处理并测量 A560 作为最大光还原值,另一管避光存放作为测量调零管;POD 活力的测定采用愈创木酚法,通过测定 A470 计算获得。以 A470 每 min 增加 0.01 为 1 个酶活性单位(U);CAT 活力测量采用紫外吸收法,通过测定 A240 计算获得。以 1 min 内 A240 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位(U);MDA 含量的测定采用巴比妥酸法,通过测量反应液 A450、A532 和 A600 的值计算获得,按照公式计算 MDA 含量。

SOD 总活性(U/g · FW) = $[(Ack - AE) \times V] / (1/2 Ack \times W \times Vt)$;

POD 活性(U/g · FW) = $(\Delta A470 \times V) / (W \times Vt \times 0.01 \times t)$;

CAT 活性(U/g /min · FW) = $(\Delta A240 \times V) / (W \times Vt \times 0.01 \times t)$;

MDA 含量(μmol/g · FW) = $[6.45 \times (A532 - A600) - 0.56 \times A450] \times V / W$;

式中 Ack 为光照对照管 560 nm 的吸光度;AE 为样品管 560 nm 的吸光度;V 为样品液总体积(mL);Vt 为测定时的酶液用量(mL);W 为样品鲜重(g);t 为反应时间(min);ΔA 表示反应时间内吸光度的变化。通过 DPS 数据处理系统进行差异显著性分析。

1.2.3 EMS 花蕾诱变结合小孢子培养 在‘A03’

进入盛花期时,选取纵径长度为 2.0~2.5 mm、花瓣与花药长度比为 1/2~2/3 的花蕾,以 0.05% EMS 分别震荡处理 5 min、10 min、15 min,终止反应后进行分离纯化小孢子并进行游离小孢子培养,基本操作按申书兴等^[13]方法并稍做修改。对小孢子组培苗进行生根培养,然后经锻炼和低温春化后,定植于温室内并单株自交收获种子,每单株收获的种子为一个家系。

1.2.4 大白菜突变体库及 M₂ 群体的构建 通过 EMS 种子诱变和 EMS 花蕾诱变结合小孢子培养的方法构建大白菜“ A03”的突变体库,获得 M₁ 家系的群体。并对所获得 M₁ 群体进行单株套袋处理,单株收获种子构成突变体库的种子库。在种子库中,每个家系选择 2~6 粒饱满种子进行育苗,选择 1~2 株幼苗定植。与同期种植的 700 株野生型种子苗,共同定植于 6 个不同分区,其中 1~4 区为露地栽培,5~6 区为塑料大棚栽培,进行标准化管理。

1.2.5 M₂ 群体结球期及收获期表型变异的分析 对 M₂ 群体结球期和收获期部分表型性状进行调查和研究,主要性状指标见表 1。在结球期,随机选取 M₂ 群体的 544 个单株作为对象,主要调查株型(结球初期)、外叶数、叶形、叶柄形状和颜色、结球情况、球顶包含方式和形状;在收获期,主要调查叶球相关性状,包括叶球形状和颜色、中心柱形状(即沿叶球顶部中线垂直切开,在纵切面观察中心柱形状)、根系发育情况。

表 1 大白菜突变体库 M₂ 群体结球期及收获期性状调查标准

Table 1 Traits investigated at heading and harvest stage of M₂ individuals in Chinese cabbage mutant library

性状	描述	调查时期
Character	Description	Investigation period
株型	直立、半直立、平展	结球初期
Plant type		
外叶数	多、少	结球后期
No. of outer leaves		
叶形	近圆、宽倒卵、倒卵、长倒卵、长圆	结球后期
Leaf shape		
叶柄形状	平、中、鼓	结球后期
Petiole shape		
叶柄色	白、绿白、浅绿、绿	结球后期
Petiole colour		
结球情况	结球、未结球	结球后期
Heading condition		
球顶包含方式	舒心、拧抱、合抱、叠抱	收获期
Clathration status of top head		

表 1(续)

性状	描述	调查时期
Character	Description	Investigation period
球顶部形状	平、圆、尖	收获期
Top head shape		
球形	球形、头球形、筒形、长筒形、炮弹形	收获期
Head shape		
叶球色	白、浅黄、浅绿、绿	收获期
Head colour		
中心柱形状	扁圆、圆、长圆、锥形	收获期
Central axis shape		
根系	发育正常、发育畸形	收获期
Root		

1.2.6 M₂ 群体生殖生长时期表型变异的分析 对经冬储、移栽成活的 1251 个单株构成的 M₂ 群体,进行生殖生长性状调查,包括抽薹性、叶色和叶片变异,盛花期花蕾大小和颜色、花瓣颜色和数量、雄蕊数量、花枝和花序发育以及种荚的发育情况。调查指标参考农业部大白菜 DUS,调查中以同期同环境下野生型植株为对照。

2 结果与分析

2.1 不同 EMS 诱变处理对种子活力及幼苗发育生理特性的影响

2.1.1 不同 EMS 处理对种子活力的影响 观察发现,野生型种子在培养 3 d 时,发芽势已经达到最大,为 92.7%。由于 EMS 诱变作用使 M₁ 和 M₂ 种子出现了不同程度的萌发滞后现象,诱变处理 7 d 时发芽势达到最大。

由表 2 可知,EMS 诱变处理 1 次时,随着 EMS 浓度的增加,M₁ 和 M₂ 种子的活力指数及发芽势、发芽率均降低。诱变浓度为 0.2% 时,EMS 对种子活力影响较小,M₂ 种子活力指数高达 52.5,较野生型稍有提高;浓度为 0.6% 时,M₁ 种子发芽势、发芽率分别为 51.7% 和 56.2%,虽然发芽率接近 50%,但其发芽指数和活力指数分别为 14.8 和 18.2,并且 M₂ 发芽率仅为 79.0%;浓度达到 0.8% 时,M₁ 和 M₂ 种子活力均受到影响,M₂ 发芽率仅为 72.8%,且观察到大量畸形胚胎;而 EMS 浓度为 0.4% 时,M₁ 种子各指标及 M₂ 种子发芽势、发芽指数均显著低于野生型。M₂ 种子活力指数达到 47.4,与野生型相差不大,发芽率高达 93.3%,能够保证 M₂ 群体的获得。

因此,以浓度 0.4% 的 EMS 连续诱变两代种子,所获得的 M₁ 及 M₂ 群体种子活力情况符合构建突变体库的要求。

表 2 不同 EMS 处理对 M_1 和 M_2 种子和幼苗活力及主要生化指标的影响Table 2 Effects of different EMS treatments on seeds and seedlings vigor and some biochemical indexes of M_1 and M_2 individuals

不同 EMS 处理方案	发芽势 (%)	发芽指数	活力指数	发芽率 (%)	SOD	POD	CAT	MDA
Different EMS treatments	Gr	Gi(7 d)	Vi(7 d)	Gr	(U/g · FW)	(U/g · FW)	(U/g/min · FW)	($\mu\text{mol/g}$)
0	100.0 a	28.6 a	51.0 a	100.0 a	28.3 e	69.7 gh	0.4 de	0.4 f
0.2% M_1	84.2 cd	24.0 cd	45.3 ab	85.3 c	35.1 de	106.3 cde	0.7 cd	0.7 e
0.4% M_1	57.7 ef	16.5 ef	22.6 c	62.0 f	60.6 ab	137.4 ab	1.6 a	1.1 d
0.6% M_1	51.7 f	14.8 f	18.2 cd	56.2 g	55.9 b	123 bc	1.8 a	2.9 b
0.8% M_1	29.3 g	8.4 g	3.8 e	31.5 h	26.6 e	53.0 h	0.2 e	3.9 a
0.4% 两代 M_1	50.8 f	14.5 f	19.0 cd	58.7 fg	67.5 a	154.6 a	1.9 a	2.7 b
0.2% M_2	95.2 ab	27.2 ab	52.5 a	95.5 b	30.5 e	72.7 gh	0.5 de	0.7 ef
0.4% M_2	89.0 bc	25.4 bc	47.4 ab	93.3 b	42.0 cd	87.0 efg	0.7 cd	1.1 d
0.6% M_2	77.2 d	22.0 d	39.9 b	79.0 d	43.6 c	84.6 fg	0.7 cd	1.3 d
0.8% M_2	61.8 e	17.7 e	12.5 d	72.8 e	46.8 c	93.5 def	1.0 bc	2.0 c
0.4% 两代 M_2	79.2 d	22.6 d	40.0 b	91.0 b	47.9 c	108.1 cd	1.1 b	1.3 d

不同字母为差异达显著水平 ($P \leq 5\%$)

The differences of the values followed by different letters in the column are significant at $P \leq 5\%$

2.1.2 不同 EMS 诱变处理对幼苗发育生理特性的影响 将不同 EMS 处理的 M_1 和 M_2 种子培养至 14 d 后,提取粗酶液分别进行 SOD、POD、CAT 酶活性及 MDA 含量的测定,对测量数据进行差异显著性分析(表 2)。

结果表明,对于诱变处理 1 次的 M_1 种子,随着 EMS 浓度的升高,SOD、POD、CAT 酶活力均表现为先升高后降低,而 MDA 含量逐渐增加。EMS 浓度为 0.4% 时,SOD 和 POD 酶活力达到最高,分别为 $60.6 \text{ U/g} \cdot \text{FW}$ 和 $137.4 \text{ U/g} \cdot \text{FW}$,MDA 含量为 $1.1 \mu\text{mol/g}$;EMS 浓度为 0.6% 时,CAT 酶活力最高,为 $1.8 \text{ U/g/min} \cdot \text{FW}$,MDA 开始大量积累,含量高达 $2.9 \mu\text{mol/g}$,是 0.4% 处理 MDA 含量的 2.64 倍;EMS 浓度继续升高,3 种抗氧化酶的酶活均呈下降趋势,EMS 浓度达到 0.8% 时,3 种酶的酶活力均下降至与野生型无显著差异的水平,同时 MDA 积累多达 $3.9 \mu\text{mol/g}$ 。

0.4%EMS 连续两代种子诱变处理后所获得的 M_1 和 M_2 群体,3 种抗氧化酶活性较一次处理酶活性更大, M_1 的 MDA 含量 (2.7 mol/g) 介于 0.4% 和 0.6% 两处理之间。虽然 MDA 积累较多,但酶活性表达水平更高,且幼苗长势及发育较 0.6% EMS 一次诱变的效果好。

综合分析不同 EMS 诱变处理对种子活力和幼苗发育的影响,以 0.4% 浓度的 EMS 诱变种子 16 h 为较适宜的处理方案,EMS 0.4% 浓度连续两代诱变种子,所获得的 M_1 及 M_2 群体各项指标均符合构建突变体库的要求。

2.2 突变体库 M_2 群体的构建

通过 EMS 种子诱变和花蕾诱变结合小孢子培养方法获得了 4253 个 M_1 家系的突变群体,单株套袋自交后收获种子构建成种子库,对每个家系的种子进行播种、育苗和定植后,共获得了 4004 个家系的 7756 个成活的 M_2 单株,构成 M_2 待检测群体。其中,种子诱变的 4158 个 M_1 家系中获得的 3909 个 M_2 植株,共成活 7667 株;花蕾诱变结合小孢子培养方法获得的 95 个家系中,共有 89 个家系的 89 株成活。

2.3 大白菜突变体库 M_2 表型变异的分析

2.3.1 M_2 群体结球期性状的分析 以野生型 ‘A03’ 为对照,对 M_2 群体的 1677 株进行结球期表型变异的分析。共发现 363 株明显变异材料,包含多种类型,变异频率达 21.65% (表 3,图 1)。

野生型 ‘A03’ 结球期为:株型半直立,最大外叶为长倒卵形,叶柄绿白色,叶球黄色,球形筒形,叶球包含方式舒心(图 1-1、1-7)。 M_2 变异类型包括:株型变异 166 株,变异频率为 9.90%;叶形变异 38 株,变异频率为 2.27%;叶柄颜色变异株 56 株,变异频率为 3.34%;叶球色变异 38 株,变异频率为 2.27%,包括叶球色浅黄(图 1-2)、白(图 1-3)、浅绿(图 1-4);球形变异类型为头球形(图 1-5)及炮弹形(图 1-6),共 15 株,变异频率为 0.89%;球顶部包含状态的变异类型为合抱(图 1-9、1-10)、叠抱(图 1-11)及拧抱(图 1-12),共 40 株,变异频率为 2.39%。另外,包含程度较野生型明显密实、球顶部状态仍为舒心的变异株(图 1-8)。

表 3 大白菜突变体库 M₂ 部分群体结球期性状变异统计

Table 3 Trait variation of some individuals of M₂ population at heading stage in Chinese cabbage mutant library

性状	描述	株数	总株数	频率(%)
Character	Description	No. of plants	Total number of plants	Frequency
株型	直立	16	1677	0. 95
	平趴	132	1677	7. 87
	大	2	1677	0. 12
	小	16	1677	0. 95
叶形	近圆	4	1677	0. 24
	长圆	34	1677	2. 03
叶柄色	白	15	1677	0. 89
	浅绿	41	1677	0. 24
叶球色	白	2	1677	0. 12
	浅黄	30	1677	1. 79
	浅绿	6	1677	0. 36
球形	头球形	10	1677	0. 60
	炮弹形	5	1677	0. 30
叶球包合方式	拧抱	1	1677	0. 06
	合抱	34	1677	2. 03
	叠抱	5	1677	0. 30

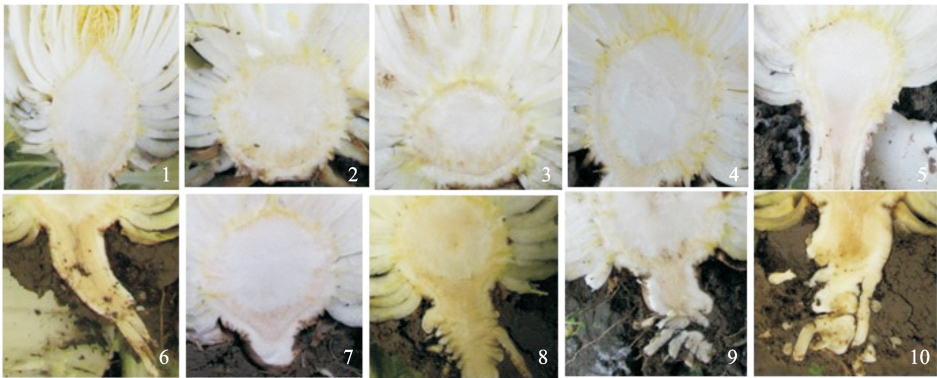


1:野生型,叶球黄色,球形筒形;2:叶球浅黄色;3:叶球白色;4:叶球浅绿色;
5:球形头球形;6:球形炮弹形;7:野生型叶球包合不严,球顶部包合为舒心;
8:叶球包合密实;9~10:球顶部包合为合抱;11:球顶部包合为叠抱;12:球顶部包合为拧抱
1: Wild type head, head colour was yellow, head shape was cylinder, 2: Head colour was pale yellow,
3: Head colour was white, 4: Head colour was green, 5: Head shape was head bulb-shaped,
6: Head shape was projectile-shaped, 7: The clathration of the wild type head was loose and the clathration status of head top was unfold,
8: The clathration of the head was compact, 9-10: The clathration status of head top was hug,
11: The top of clathration status was reclinate, 12: The top of clathration status was twist

图 1 大白菜突变体库 M₂ 群体部分单株结球期性状变异

Fig. 1 Traits variation of parts of individuals of M₂ population at heading stage in Chinese cabbage mutant library

2.3.2 M_2 群体结球期切面性状的分析 对 EMS 诱变处理 1 次的 M_2 群体中随机挑选的 544 个单株进行叶球及剖开切面调查,共发现 121 株变异材料,变异频率达 22.4% (表 4,图 2)。野生型‘A03’叶球纵切面中心柱形状为锥形(图 2-1),根系为直根系(图 2-6)。中心柱变异单株为 99 株,占调查株数的 18.20%,其中中心柱为圆形的 26 株(图 2-2)、扁圆形 18 株(图 2-3)及长圆形 55 株(图 2-4)。此外还有倒锥形变异(图 2-5),该类型未统计到变异类型中。其他变异类型株 22 株,占调查株数的 4.04%,其中叶柄切面变异株 11 株;根系异常株 9 株,包括主根极小而须根发达的变异(图 2-7),侧根发达变异株(图 2-8、2-9)及主根畸形变异株(图 2-10)。



1:野生型中心柱纵切面为锥形;2:中心柱纵切面为圆形;3:中心柱纵切面为扁圆;4:中心柱纵切面为长圆;5:中心柱纵切面为倒锥形;6:野生型根系,由主根和须根构成;7:主根短小;8~9:侧根发达;10:主根畸形

1:The longitudinal section of central axis of wild type was taper,2:The longitudinal section of central axis was round, 3:The longitudinal section of central axis was oblate,4:The longitudinal section of central axis was oval, 5:The longitudinal section of central axis was inverse taper,6:The root system of wild type consisted of taproot and fibrous root, 7:Taproot was short,8-9:Lateral root was luxuriant,10:Taproot was malformed

图2 大白菜突变体库 M_2 群体部分单株结球期切面性状变异

Fig.2 Section traits variation of some M_2 individuals at heading stage in Chinese cabbage mutant library

2.3.3 生殖生长阶段表型变异类型 对 M_2 群体的 960 个单株进行了生殖生长阶段变异性状的调查,发现变异类型丰富,包括整株变异和部分变异(仅发生在特定期或部位),共计 230 株,变异频率为 23.96%。

在开花前或开花初期,叶片变异以叶色变异为主(图 3)。野生型叶色为绿(图 3-1),变异株包括:整株叶色浅绿无光泽(图 3-2)、整株叶色深(图 3-3)、整株叶色黄绿(图 3-4)、整株叶色白绿(图 3-5)、整株叶色白(图 3-6)、整株叶色浅黄(图 3-7)、叶色黄白相间(图 3-8)、叶色黄绿相间(图 3-9)、叶色黄白绿相间(图 3-10、3-11)、基生叶片为绿色新生叶片为黄色(图 3-12)、基生叶片为黄色新生叶片为绿色(图 3-8、3-10)。此

表 4 大白菜突变体库 M_2 群体部分单株结球期切面性状变异

Table 4 Variation in head section of some individuals of M_2 population at heading stage in Chinese cabbage mutant library

性状	描述	株数(株)	调查总株数(株)	频率(%)
Character	Description	No. of plant	Total number of plants	Frequency
中心柱形状	扁圆	18	544	3.31
	圆	26	544	4.78
	长圆	55	544	10.11
叶柄形状	中	11	544	2.02
Petiole shape	鼓	2	544	0.37
根系	变异	9	544	1.65
Root				

外,还出现其他叶片变异类型,如叶形变异、叶缘变异、褶皱程度变异和叶脉变异等(图 3-13、3-16)。

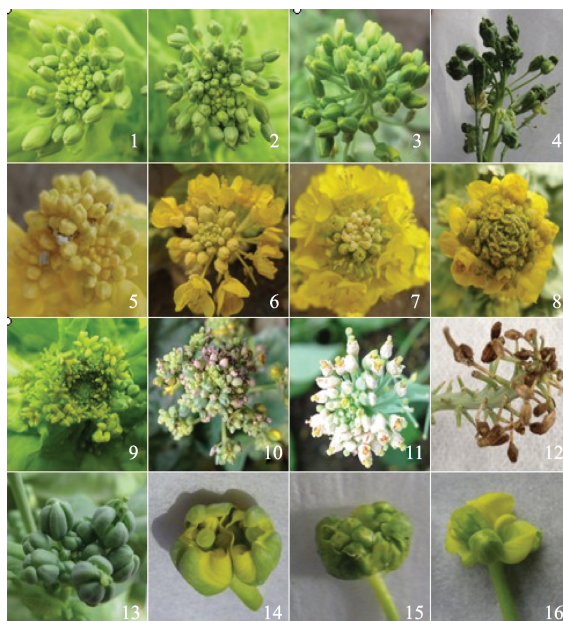
盛花期后, M_2 群体中出现多株花蕾变异株(图 4)。野生型花蕾为绿色、饱满、稍有露头现象(图 4-1)。变异类型包括花蕾颜色深绿(图 4-2)、花蕾颜色翠绿(图 4-3)、花蕾颜色墨绿且不饱满(图 4-4)、白色花蕾(图 4-5)、黄色花蕾(图 4-6)、新生花蕾变黄(图 4-7)、花蕾颜色黄绿紧凑生长且全部露头(图 4-8)、花蕾整个张开(图 4-9)、花蕾部分坏死(图 4-10)、花蕾坏死(图 4-11)、花蕾发黑(图 4-12)、花蕾颜色深(图 4-13)、两花蕾并生(图 4-14)、花蕾张开后直接生出新花序(图 4-15)、花蕾自花朵伸出(图 4-16)等。



1:野生型绿叶;2:叶色浅绿且无光泽;3:叶色深绿;4:叶色黄绿;5:叶色白绿;6:叶色全白;7:叶色全黄;8~11:叶色不均匀;
12:基生叶为绿色,新生叶为黄色;13:叶缘卷曲;14:叶缘锯齿变异;15:叶面褶皱变异;16:叶形变异
1: Wild type with green leaf, 2: Light green and lackluster, 3: Dark green, 4: Yellow green, 5: White green,
6: All leaves was albino, 7: All leaves was yellowish, 8-11: Variegated colour, 12: Green basal leaves with yellow new ones,
13: Curly leaf, 14: Leaf margin variant, 15: The drape degree variant, 16: Leaf shape variant

图3 大白菜突变体库 M_2 群体部分单株生殖生长阶段叶性状变异

Fig. 3 Variation in leaf traits of some M_2 individuals at reproductive stage in Chinese cabbage mutant library



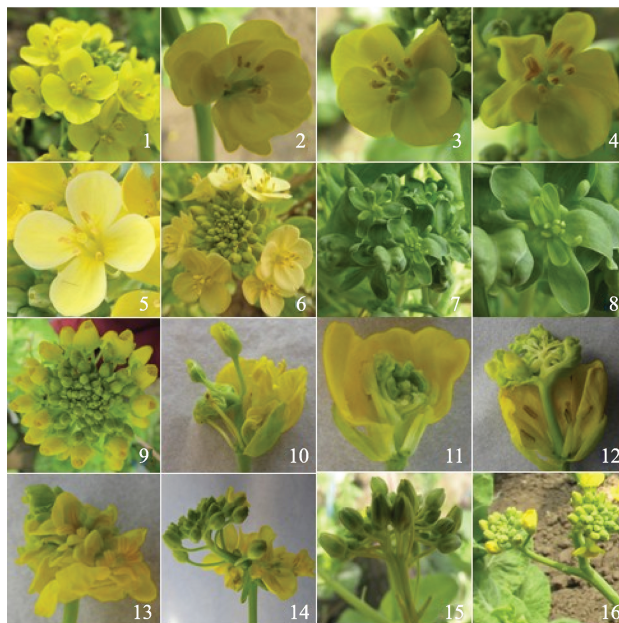
1:野生型花蕾;2:深色花蕾;3:花蕾颜色翠绿;4:花蕾颜色墨绿;5:花蕾白化;6:花蕾黄化;7:新生花蕾黄化;8:花蕾黄绿色且全部露头;9:全部花蕾打开;
10:部分花蕾坏死;11:花蕾坏死但雌蕊正常且露头;12:花蕾全部发黑坏死;13:花蕾形状变异;14:两花蕾共生;15:花序从花蕾中生出;16:花蕾从花朵中生出
1: Alabastrum of wild type, 2: The colour of alabastrum was dark, 3: The colour of alabastrum was viridity, 4: The colour of alabastrum was jasper,
5: The colour of alabastrum was albino, 6: The colour of alabastrum was yellowish, 7: The colour of new alabastrum was yellowish,
8: All of the alabastrum was yellow green and outcropping, 9: All of the alabastrum came to bloom, 10: Parts of the alabastrum was necrosis,
11: All of the necrosis was necrosis but pistil normal and outcropping, 12: All of the necrosis was black and necrosis, 13: The shape of alabastrum was variant,
14: Two alabastrum was intercrossence, 15: Inflorescence grew from the alabastrum, 16: Alabastrum grew from the flower

图4 大白菜突变体库 M_2 群体部分单株生殖生长阶段花蕾变异

Fig. 4 Variation in buds of some M_2 individuals at reproductive stage in Chinese cabbage mutant library

盛花期花器官也出现了多种变异(图 5)。以野生型花为对照(图 5-1),出现花瓣数量变异(图 5-2)、雄蕊数量变异(图 5-3)、雄蕊并生变异(图 5-4)、花色变异(图 5-5、5-8)、整株花瓣不张开

(图 5-9)、花序自花朵伸出(图 5-10、5-11)、雌蕊发育成花序(图 5-12)、多花并生(图 5-13)、花发育畸形(图 5-14)、两花序并生(图 5-15、5-16;图 6-11)几种类型。



1:野生型花序;2:花瓣数量变异;3:雄蕊数量变异;4:两雄蕊并生;5~6:花颜色变异;7~8:整个花器官绿色;
9:花瓣闭合不开放;10~11:花序从花中生出;12:雌蕊发育成花序;13:多花并生;14:花器官发育畸形;15~16:两花序并生
1: Inflorescence and flowers of wild type, 2: The number of petal was variant, 3: The number of stamen was variant,
4: Two stamen was intercrossing, 5-6: The colour of petal was variant, 7-8: Whole flower organs was green,
9: Petal was closed, 10-11: Inflorescence grew from the flower, 12: Pistil developed into inflorescence,
13: Multi-flowers was intercrossing, 14: Whole flower organs grew malformed, 15-16: Two inflorescences was intercrossing

图 5 大白菜突变体库 M_2 群体部分单株生殖生长阶段花器变异

Fig. 5 Variation in flower of some individuals of M_2 population at reproductive stage in Chinese cabbage mutant library

除上述变异类型外,发现了包括种荚变异在内的其他类型(图 6):种荚形状、颜色、着生部位(图 6-2、6-7),耐抽薹变异(图 6-10)和早抽薹变异,叶片着生部位变异(图 6-11),叶片数变异(图 6-15)。

3 讨论

3.1 大白菜突变体库构建的选材

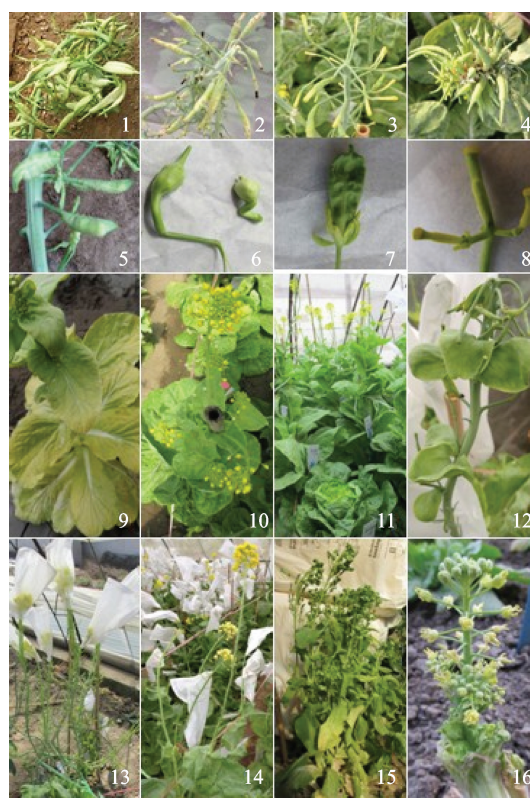
EMS 诱变种子获得的突变体虽含有大量点突变,但难以快速获得含有纯合突变基因并能够稳定遗传的材料。自交授粉是纯化和促使变异稳定遗传的有效途径。通过 EMS 诱变的方法构建突变体库,群体数量大,且每个单株都可能存在差异。大白菜属二年生异花授粉作物,其单株自交时必须严格与其他花粉源隔离,因此在大白菜突变体库构建的选材上,需选择花期自交亲和性好、便于自交获得后代材料,保证得到足够多的可遗传后代。

本试验所选构建突变体库的材料为‘A03’,该

试材为二倍体自交系、遗传背景纯合,便于分析;其花期自交亲和性好,在规模化群体构建过程中,可保证大规模突变群体的获得;其配合力较高,有利于突变株在遗传育种实践中的应用;此外,该基因型易于进行小孢子培养,适于通过 EMS 与小孢子培养相结合的方法进行诱变。

3.2 EMS 种子处理对突变体种子活力及苗期生理特性的影响

为了高效构建规模化突变体库,除了要求突变丰富以外,还需获得足够数量成活的可用于进一步研究的突变后代,种子活力可直接反应诱变后代植株的成活及发育情况,抗氧化酶的活性表达和 MDA 的积累能够作为判断诱变后代苗期生理状态的重要指标。本研究注重 EMS 诱变浓度的筛选,综合分析了 M_1 和 M_2 两代种子活力和芽率,并深入研究幼苗抗氧化酶等抗逆性指标,最终通过优化诱变方案获得含高突变的成规模突变群体。



1:野生型种子荚;2~3:种子荚颜色变异;3:种子荚生长位置异常;4~7:种子荚形状变异;8:多种子荚并生;
9:基生叶黄色新生叶绿色;10:整株花朵不开花;11:晚抽薹变异;12:叶片生长位置异常;13:整株所有花序均为两花序并生;
14:同一植株出现部分白花花序部分黄花花序;15:整株发育畸形;16:少叶片变异

1:Pods of wild type,2:The colour of pod was variant,3:Growth position of pod was anomaly,4-7:The shape of pod was variant,
8:Multi-pods was intercence,9:The basal leaves was yellow and the new ones was green,10:All of petals was closed,
11:Bolting late,12:Growth position of leaf was anomaly,13:All of inflorescences was grown as two-intercence,
14:Flowers grew from some inflorescence was yellow and from others was white,15:Whole plant grew malformed,16:Less leaves variant

图6 大白菜突变体库 M_2 生殖生长阶段的其他变异

Fig. 6 Other variations of M_2 population at reproductive stage in Chinese cabbage mutant library

EMS 的毒害作用对种子发育及幼苗生长产生类似于逆境的作用,抗氧化酶的表达即为幼苗对逆境的应对反应。EMS 浓度过大时,可能直接破坏种子的抗性机能,使幼苗无法正常发育从而致死,也可能引起非基因突变引起的表型变异。MDA 的含量能够在一定程度上反应有害物质的积累。在本试验中,选取 0.4% 为适宜的诱变浓度,诱变植株能够在发育中启动抗性机能应对 EMS 残留的毒害,易于存活;EMS 浓度为 0.6% 时,MDA 含量的突然增加,可能是因为幼苗经诱变后有害物质增加且代谢能力丧失导致的,这与观察到的幼苗发育迟缓或部分畸形的情况相一致。

EMS 诱变种子后,种子内不同细胞携带了多种变异谱,胚胎顶端分生组织的细胞团将突变携带至下一代,花原基在产生配子的过程中携带含有不同

突变等位基因的细胞团,从而产生含有不同突变的后代。在这一基础上再次进行诱变,必然能够使群体携带更多的变异。通过浓度 0.4% EMS 连续两代诱变种子获得的突变群体中, M_1 和 M_2 表达了更高的抗氧化酶活性,可能是由于基因突变造成的,也可能是上一代 EMS 诱变产生了一定的耐药性,出现了选择性进化等原因。为了提高突变效率,以辐射结合化学诱变方法获得突变体的报道并不罕见。与之相比,EMS 连续诱变,在保留完整染色体的同时,提高了突变密度,更适于突变体库构建。

3.3 大白菜突变体库表型性状调查

本研究对 M_2 群体进行了严格的标准化栽培管理;将 7756 个 M_2 突变单株种植在露地和大棚 2 个不同环境下,并在不同位置种植了 700 株的野生型材料,减少外因对表型性状的影响;此外,对每个单

株不同时期进行了拍照,以照片库形式保存了表型变异以便于进一步研究。

对成熟期结球纵切面的调查发现,变异类型以中心柱形状改变为主,变异频率占调查总数的 18.2%,占总变异量的 81.25%,这一性状有可能是单(或少)基因控制的;而生殖生长阶段变异以叶色变异及花瓣数量的变异为主,部分叶色变异在营养发育阶段就已经存在了,部分变异进入生殖阶段后开始出现,而花瓣数量的变异多发生在植株的部分花枝上。此外,EMS 诱变花蕾结合小孢子培养的 DHM₂ 中发现了一株纯合的花瓣不张开的植株。Y. L. Lu 等^[15] 在甘蓝型油菜中也发现了类似变异,认为是甘蓝型油菜中控制 RINGv E3 泛素连接酶的同源基因突变产生的结果;营养生长阶段的苗期和莲座期表型变异也十分丰富,变异频率高达 37.62% 和 26.33%;本研究还进行了抗寒筛选试验,初步获得了 382 株抗寒性较强的突变后代。张凤启等^[16] 也对其 EMS 诱变甘蓝型油菜后的 M₂ 性状进行了分析,调查群体数量达 4.8 万株,但仅源于 758 个有效的 M₁ 家系,总的变异频率低于本研究所构建的突变体库。

本研究所构建的突变体库 M₂ 群体在各个时期均表现出丰富变异类型,为功能基因组学研究及新种质选育奠定了基础。目前,正在针对 M₂ 群体以高分辨率溶解曲线(HRM, high resolution melting)技术进行突变体的筛选,在基因碱基序列的变异水平上对所构建突变体库进行评价。

参考文献

- [1] 罗智敏,张斌,闻凤英,等. 苗用型大白菜品种应用现状及展望[J]. 中国蔬菜,2014(4):1-3
- [2] Chawade A, Sikora P, Bräutigam M, et al. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10:86-98
- [3] Harloff H J, Lemcke S, Mittasch J, et al. A mutation screening platform for rapeseed(*Brassica napus* L.) and the detection of sinapine biosynthesis mutants[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124: 957-969
- [4] Silué S, Diarrassouba N, Fofana I J, et al. Description of *Phaseolus vulgaris* L. aborting embryos from ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenized plants[J]. Biotechnol Agron Soc, 2013, 17(4):563-571
- [5] Wang L, Zheng J, Luo Y Z, et al. Construction of a genome wide RNAi mutant library in rice[J]. Plant Biotechnol J, 2013, 11(8):997-1005
- [6] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, et al. A reverse genetic, no transgenic approach to wheat crop improvement by TILLING[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(1):75-81
- [7] Rawat N, Sehgal S K, Joshi A, et al. A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics[J]. BMC Plant Biol, 2012, 12:205-215
- [8] Wang N, Wang Y J, Tian F, et al. A functional genomics resource for *Brassica napus*; development of an EMS mutagenized population and discovery of FAE1 point mutations by TILLING[J]. New Phytol, 2008, 180:751-765
- [9] Wang N, Shi L, Tian F, et al. Assessment of FAE1 diversity in three *Brassica* species and their association to seed erucic acid content with EcoTILLING[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10:137
- [10] Stephenson P, Baker D, Girin T, et al. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*[J]. BMC Plant Biol, 2012, 10:62-71
- [11] Lochlainn S Ó, Amoah S, Graham N S, et al. High Resolution Melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes[J]. Plant Methods, 2012, 7:43-51
- [12] 卢银,刘梦洋,赵建军,等. 大白菜突变体库的构建及 M₂ 叶片表型变异的研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(8):1609-1619
- [13] 申书兴,赵前程,刘世雄,等. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定[J]. 园艺学报, 1999, 66(4):232-237
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000
- [15] Lu Y L, Arnaud D, Belcra H, et al. A Dominant point mutation in a RINGv E3 ubiquitin ligase homoeologous gene leads to cleistogamy in *Brassica napus*[J]. Plant Cell, 2012, 24:4875-4891
- [16] 张凤启,黄永娟,杨甜甜,等. EMS 诱变甘蓝型油菜 M₂ 代群体的表型突变研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6):760-765