

苦荞突变体库构建与突变体中芦丁 合成相关基因表达分析

孙朝霞¹, 侯思宇¹, 郝彦蓉¹, 王东航¹, 高 豪¹, 韩渊怀¹, 李红英¹, 刘龙龙², 周美亮³

(¹ 山西农业大学农学院, 太谷 030801; ² 山西省农业科学院农作物品种资源研究所, 太原 030031;

³ 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 苦荞是重要的小杂粮作物之一, 营养物质丰富, 是天然芦丁的重要来源。突破苦荞育种难题, 创制苦荞新种质是目前研究的重要方面。本试验利用甲基磺酸乙酯 (EMS) 构建了黑丰 1 号苦荞突变体库, 明确了当 EMS 浓度为 1.2% 时, 诱变效果较好。通过对 M₁ 突变株表型观察统计, 共获得叶色、叶型、株型、粒型变异单株 102 株, 突变率为 3.85%; 高效液相色谱技术 (HPLC) 测定 1000 株 M₃ 材料, 获得高芦丁含量突变株系 2 个和低芦丁突变体株系 5 个; qRT-PCR 对芦丁含量突变体株系中芦丁代谢关键酶基因 (*CHS*、*F3H*、*4CL*、*FLS*、*UGT*) 进行表达量分析, 发现不同株系中上述基因的表达量与芦丁含量相关性不明显, 但个别基因如 *FtFLS* 基因表达量在高芦丁含量突变体中达到对照的 4.55 倍。通过突变体的筛选丰富了苦荞基因资源, 创新了苦荞新种质, 也为苦荞芦丁代谢的分子基础研究提供了材料保证与技术支持。

关键词: 苦荞; 突变体; 芦丁; 基因表达

EMS-assisted Mutagenesis of Tartary Buckwheat and Expression Analysis of Rutin Biosynthesis Genes in Selected Mutants

SUN Zhao-xia¹, HOU Si-yu¹, HAO Yan-rong¹, WANG Dong-hang¹, GAO Hao¹, HAN Yuan-huai¹,

LI Hong-ying¹, LIU Long-long², ZHOU Mei-liang³,

(¹ School of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; ² Institute of Germplasm Resources, Shanxi Academy of Agriculture Science, Taiyuan 030031; ³ Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Tartary buckwheat is one of minor grain crops in China, which has rich nutrition and is an important source of natural rutin. It is an important aspect of present research to break through of breeding and create new germplasm in tartary buckwheat. The mutation library was constructed in “Heifengyihao” by EMS. The half lethal treatment of EMS mutagenesis was 1.2%, the effect of plentiful phenotype was recorded in M₁ generation. 102 plants with obvious phenotypic variation, including leaf color, leaf shape, plant type and grain sizes, were obtained from M₃ materials and the mutation rate was 3.85%. The rutin content of 1000 plants in mutants' library was determined by HPLC, 2 mutant lines with high (rutin content >16 mg/g) and 5 lines of low rutin (rutin content <10 mg/g) were obtained respectively. Comparison of rutin synthesis-related genes through qRT-PCR showed a relative weaker relationship between *FtCHS*, *FtF3H*, *Ft4CL*, *FtUGT* transcripts and rutin

收稿日期: 2019-04-25 修回日期: 2019-05-23 网络出版日期: 2019-07-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190425002>

第一作者研究方向为荞麦分子育种, E-mail: 18636071356@163.com

通信作者: 周美亮, 研究方向为荞麦种质资源与品质代谢调控, Email: zhumeiliang@caas.cn

刘龙龙, 研究方向为燕麦育种, E-mail: lllong781211@sina.com

基金项目: 国家重点研发计划中欧政府间合作项目 (2017YFE0117600); 国家燕麦产业体系 (CARS-07-A-2); 山西省应用基础研究项目 (201801D221296); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2017-069); 国家自然科学基金青年项目 (31301385)

Foundation project: National Key R&D Program of China (2017YFE0117600), China Agriculture Research System (CARS-07-A-2), Shanxi Youth Science and Technology Research Fund (201801D221296), Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (2017-069), National Natural Science Foundation of China (31301385)

content mutation lines. However, it also found that *FtFLS* showed the higher expression level in line with higher rutin content, which reached 4.55 times of control. The screening of mutants enriched the resources of tartary buckwheat, innovated the new germplasm of tartary buckwheat, and provided material guarantee and technical support for the molecular basis research of tartary buckwheat metabolism.

Key words: tartary buckwheat; mutants; rutin; gene expression

荞麦作为中国的传统栽培作物,是一种药食兼用的杂粮作物和优质农产品原料,也是天然芦丁的重要来源^[1]。而芦丁具有抗氧化、抗肿瘤、辅助治疗糖尿病和高血脂等功效,因此苦荞具有较高的开发应用潜力^[2]。日本、俄罗斯、中国等国是荞麦消费大国,同时中国的荞麦产量和出口量均居世界前列。

中国拥有最丰富的荞麦种质资源^[3],但荞麦育种尤其是苦荞育种一直较为滞后。近年来,人们通过杂交选育^[4]、系谱育种、诱变育种和染色体加倍等方法育成多个荞麦品种,其中,82%的品种通过选择育种培育而成,14%利用诱变育种培育而成,染色体加倍选育的品种仅占4%,而杂交选育品种未见报道。目前培育的荞麦品种主要有:“西农系列”^[5-6]、“晋荞系列”^[7-10]、“凉苦系列”^[11]等,但品质优良的荞麦品种仍十分缺乏,不能满足中国荞麦市场对良种的需求。

通过物理和化学的方法,诱变后筛选获得良种,是较为成熟的创制新种质的方法^[12-13]。甲基磺酸乙酯(EMS)以其诱变材料选择范围广、效率高、突变位点多为显性,筛选效率高等优点在植物领域得到广泛应用。目前,在拟南芥^[14-15]、水稻^[16]、小麦、玉米^[17]和油菜^[18]等植物上均有大规模的突变体库产生,从中筛选出了诸如高抗旱玉米^[19]、矮化小麦^[20]和矮化水稻^[21]等在生产上利用价值较高的品系或品种。我们利用EMS诱变山西主栽优良苦荞品种黑丰1号,获得了表型丰富的突变体库,经过多代($M_2 \sim M_5$)持续筛选,获得了多个矮秆、种壳开裂、丛生枝等有潜在利用价值的株系;这些材料丰富了苦荞基因资源,加速了荞麦育种进程,为荞麦种质的创新利用与分子生物学研究提供了良好的材料基础。

芦丁代谢属于苯丙烷类代谢途径中的次级代谢分支,是由许多关键酶基因催化完成的,包括查尔酮合成酶(CHS)、黄酮醇-3'-脱氢酶(F3H)、4-香豆酸-COA连接酶(4CL)、黄酮醇合成酶(FLS)、UDP-糖基转移酶(UFGT)等^[22]。前期研究表明,不同组织芦丁含量与芦丁代谢关键酶基因之间存在相关性,且受转录因子调控^[23]。我们利用EMS诱

变定向筛选出高、低芦丁突变体株系,对其花、叶、籽粒中芦丁合成关键酶基因进行表达分析,以期解析新种质中造成芦丁含量差异的分子机理,为芦丁代谢及调控分子机制的研究提供材料和研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用山西省主栽品种黑丰1号为诱变材料,诱变试剂为甲基磺酸乙酯(EMS, CAS: 62-50-0、sigma M0880)。

1.2 试验方法

1.2.1 EMS浓度梯度试验 设置4个EMS诱变剂浓度梯度,分别加入EMS溶液5 mL、8 mL、10 mL、12 mL至1000 mL磷酸缓冲液中,溶液密度为1.2g/mL,故其浓度分别为0.6%、0.96%、1.2%和1.4%。将配置好的EMS溶液加入三角瓶中,300 r/min震荡过夜(16~18 h),用0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中和,反复冲洗晾干备用。设置磷酸缓冲液为对照,每个培养皿放置50粒种子,3 d后统计出苗数,计算发芽势;7 d后计算发芽率;每个处理3个生物学重复。

发芽势=3 d内种子发芽数/种子总数;

发芽率=7 d内种子发芽数/种子总数。

1.2.2 突变材料种植与田间观察 按照上述方法筛选得到的最佳处理浓度对黑丰1号种子约5000粒进行诱变,2015年5月25日播种于山西省晋中市太谷县山西农业大学农作站,播种方式为机械条播,行距30 cm;播种7~10 d田间统计突变体出苗数,计算出苗率;统计黄化苗、叶色异常、叶型异常植株,计算其发生频率;40~60 d观察突变体株系变异、花期变异、花型变异的植株;60~75 d观察籽粒颜色、形态变异;当代植株种子混收,获得 M_1 种子。

出苗率(%)=突变体出苗数/种子总数×100%;

黄化率(%)=黄化苗株数/出苗总株数×100%;

突变率(%)=观察到的变异株数/出苗总株数×100%。

1.2.3 芦丁含量测定与材料筛选 2016-2017 年持续种植 $M_1 \sim M_2$ 种子,单株收获 $M_2 \sim M_3$ 突变体材料进行编号;随机选取 M_3 单株 1000 个,参考郭彬等^[24]方法,采用高效液相色谱法(HPLC)进行芦丁含量测定,从中筛选出高芦丁及低芦丁含量株系。

1.3 荧光定量 PCR 检测基因表达

取 0.1 g 新鲜苦荞叶片、花序、籽粒材料于预冷的研钵中,利用液氮研磨成粉末状,使用植物 RNA 试剂盒提取各组织中 RNA(天恩泽基因有限公司,北京),DNase I(宝生物大连有限公司)消化处理总 RNA,最后将提取好的 RNA 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用,并合成 cDNA 第一链,其总反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$,其中 $1\text{ }\mu\text{L}/\mu\text{g}$ 总 RNA $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\times$ Prime Script RT Master Mix $5\text{ }\mu\text{L}$ (包含 10 mmol/L dNTP 混合

液、 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ Oligo dT 引物和 200 U 反转录酶),无 RNA 酶水 $4\text{ }\mu\text{L}$ 补足体系。

通过 primer 5 设计 *FtCHS*、*FtF3H*、*Ft4CL*、*FtFLS-like*、*FtUFGT* 和 *FtHis* 引物(表 1),以苦荞的花序、叶、籽粒 cDNA 第一链为模板进行 qRT-PCR 分析,每个样品设置 3 个生物学重复,2 个技术重复。

采用 Ultra SYBR Mixture 试剂盒,PCR 反应体系为 $10\text{ }\mu\text{L}$: $2\times$ Ultra SYBR 混合液 $5\text{ }\mu\text{L}$, $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 无 RNA 酶水 $3\text{ }\mu\text{L}$, 扩增程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , 40 个循环。以内参基因 *FtHis* 的 Ct 值作为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量,所用荧光定量试剂购置于宝生物(大连)有限公司。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 The primer sequences using in the experiment

引物 Primers	Genbank 登录号 Genbank ID	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	引物 Primers	Genbank 登录号 Genbank ID	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
<i>FtCHS-Q</i>	KJ139980	F: GCCGACTACCCCGACTACTAC R: TGAGGATCTCCTCGGTTAGGT	<i>FtUFGT-Q</i>	MF817442	F: GGTTTTCAACCACGCATATG R: GCCTCTAACTAAGCAGCACAA
<i>FtF3H-Q</i>	HM587134	F: TAGAGGCACCAATCACCTTTG R: CTTTGCCTTGTCGAGATTCTG	<i>FtFLS-like-Q</i>	GU388434	F: CAAGACTCCGAAGTGGAAGC R: TCCCGTTGCTCATAATCTCC
<i>Ft4CL-Q</i>	KM362863	F: GTGAGGTTCTGTGGCATT R: TTGCGTGAACGAAGTACACC	<i>FtHis-Q</i>	JF769134	F: ATTCCAGAGGCTTGTTCTGTG R: TGTCTTCGAACAATCCCACA

1.4 数据统计与分析

所有数据图表用 Excel 2017 软件完成。基因表达值与芦丁含量相关性分析,采用 R 语言程序包 Heatmap(X, Rowv=NA, Colv=NA, scale="column", distfun=dist, hclustfun=hclust, RowSideColors=rc, ColSideColors=cc, margins=c(5, 10)),利用 Pearson 相关系数及欧式层次聚类方法,绘制相关性热图。

2 结果与分析

2.1 突变剂量选择

随着 EMS 浓度的增加,苦荞种子的发芽率和发芽势均有显著下降。在不添加 EMS 的磷酸缓冲液中,黑丰 1 号种子发芽势为 95%,发芽率可达 100%。当 EMS 浓度为 $0.6\% \sim 0.96\%$ 时,种子发芽势由 78% 降低至 65%,发芽率由 84% 降低至 67%;而接近半致死率的 EMS 浓度为 1.2% ,持续增加 EMS 浓度(1.4%),发芽率和发芽势均下降很快,仅

为 25% 和 23%(图 1)。因此,采用 1.2% EMS 为后续突变体库构建处理浓度。

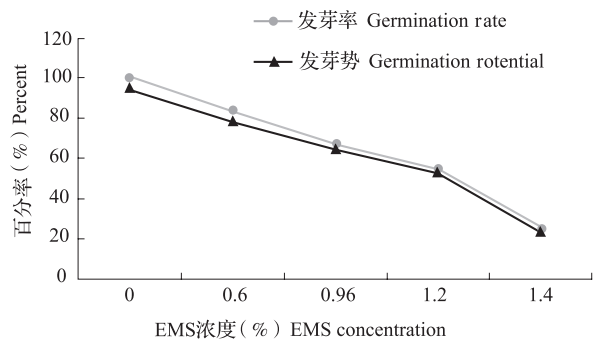


图 1 不同浓度 EMS 对苦荞种子发芽率及发芽势影响

Fig.1 The effects of EMS of different concentrations on germination rate and germination potential of Tartary Buckwheat seeds

2.2 突变表型观察

经 EMS 诱变后,苦荞 M_1 共成苗 2652 株,出苗

率为 53%。对其进行不同阶段的表型调查及统计, 获得了丰富的表型变异(表 2)。黄化苗是反映突变发生的一个重要表型特征, 根据调查出现黄化苗 65 株, 黄化率为 2.45%(图 2A); 叶色突变中得到叶色变黄或浅绿植株 5 株, 占成苗植株的 0.19%(图 2B)。叶型变异则出现了叶片卷曲、皱缩, 叶片变窄等现象, 共有 11 株归属这一类型, 整体占突变株数的 0.42%(图 2C)。



A: 黄化苗; B: 叶色突变; C: 叶卷曲; D: 多分支; E: 矮化突变; F: 花型突变; G: 花期提前。E 图中左侧为正常植株, 右侧为矮化突变植株, 红色线条表示高度差
A: Etiolated seedling, B: Leaf color mutant type, C: Curved leaves, D: Multi-branches, E: Dwarf mutant type, F: Abnormal flower, G: Early flowering. Picture E: the normal height plant showed in left, the dwarf mutant showed in right, the red line revealed the height different

图 2 黑丰 1 号突变体田间表型(部分)
Fig. 2 The field phenotype of “Heifeng 1” mutant(Partial)

黑丰 1 号植株高度为 160~180 cm, 侧枝数 9~10 个, 主茎节数 24~26 个, 而 M_1 植株旺盛生长期, 农艺性状调查株型变异包括矮化和多分支、丛生 2 种突变表型各 3 株; 丛生突变型分支数与对照相比最高达到 30 个以上, 生物量明显增加, 主茎伸长变得不明显(图 2D); 矮化突变体最低株高仅为对照品种的 1/3, 即 65~80 cm(图 2E)。苦荞为总状花序, 每个叶腋处可抽出 1~3 个花序, 黑丰 1 号单株花序数可达 50~80 个, 其花期一般为播种后 45 d 现蕾,

55 d 达到盛花期, 突变体中发现“花变叶”植株 2 株, 即本应开花的主茎及侧枝顶端位置由细小的叶片占据, 无雄蕊、雌蕊分化(图 2F); 花期提前 5 株, 即在播种后 35 d 左右已观察到盛开花(图 2G)。成熟期后, 又观察到籽粒颜色变浅单株 5 株。整体来看, 突变体从苗期至营养生长再至生殖生长每一个阶段都有突变表型出现, 共观察到突变单株 102 株, 突变率为 3.85%。

表 2 黑丰 1 号苦荞 M_1 表型突变类型统计
Table 2 The statistical analysis of the representational mutation types of Tartary Buckwheat M_1 “Heifeng 1”

变异类型	表型	突变株数	突变率
Variation types	Phenotype	Mutant plants	Mutant ratio
叶色 Leaf color	黄化	65	2.45
	叶色浅绿	5	0.19
叶型 Leaf shape	叶片卷曲	5	0.19
	叶变窄	6	0.23
株型 Plant structure	矮化	3	0.11
	多分支, 丛生	3	0.11
花型和花期	花变叶	2	0.08
	花期提前	5	0.19
粒型 Grain shape	籽粒变圆, 种壳开裂	3	0.11
	浅灰	5	0.19
粒色 Grain color			
总计 Total		102	3.85

2.3 芦丁含量差异突变体筛选

M_2 材料种植分为 20 个小区, 每个小区种植 100 株, 共计 2000 个单株。 M_2 突变体群体单株收获后(即 M_3 种子), 每个小区随机选取 50 株进行芦丁含量测定, 共计 1000 个单株。与对照相比, 芦丁含量有高低变化, 将高于黑丰 1 号芦丁含量 10%(即达到 16 mg/g 及以上)定义为高芦丁含量株系; 含量不高于 10 mg/g 的株系定义为低芦丁含量株系。筛选得到低芦丁材料 2-6、4-16、4-36、1-7、6-14 共 5 个株系, 其中 2-6 和 4-16 含量明显减低; 高芦丁材料为 2-15、2-18; 其他为中等芦丁材料, 即 10mg/g< 芦丁含量 <16mg/g 的单株(图 3)。

2.4 突变体芦丁代谢关键基因表达分析

选取高芦丁突变株系 2-15、2-18, 低芦丁显著突变株系 2-6、4-16, 中等芦丁突变株系 1-20、17-2, 与对照品种黑丰 1 号芦丁含量及其芦丁代谢关键酶基因表达水平相关性进行热图展示(图 4)。结果表明, 高芦丁含量株系整个代谢途径中相关基因

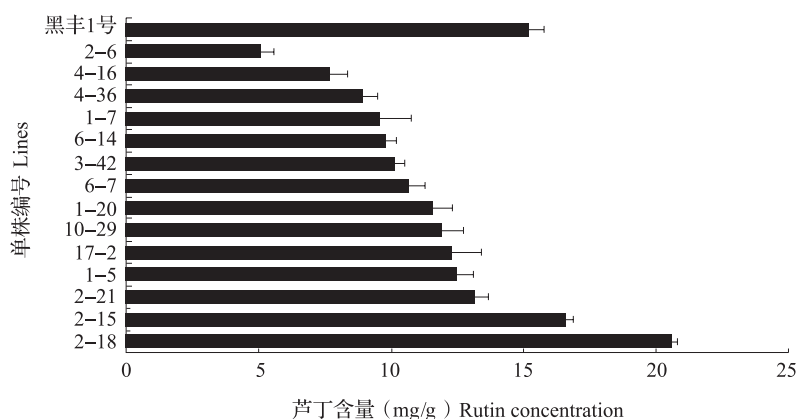
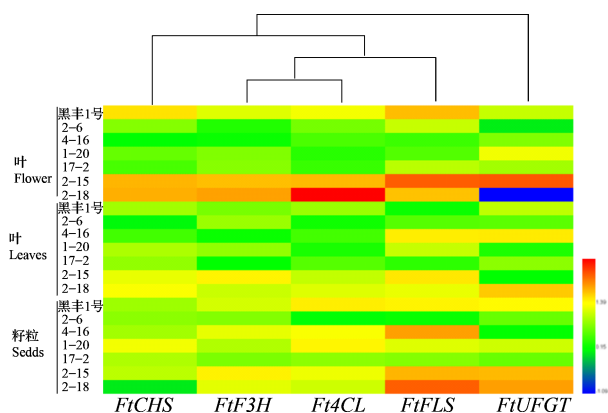


图3 突变株系芦丁含量检测

Fig. 3 The detection of rutin content in mutant lines

表达水平明显高于低芦丁和中等芦丁含量株系;尤其是花组织中,检测了 2-15 株系中 5 个基因表达水平,发现其表达量达到了对照品种的 1.2~2.1 倍,如 *FtUGT* 表达量由 2.14 倍增加至 4.66 倍,同时也发现,该基因在另一高芦丁突变体 2-18 中,表达量却降低至 0.47 倍。而 *FtFLS* 基因,相较于芦丁代谢途径上游基因,如 *FtCHS*、*FtF3H*、*Ft4CL*,该基因表达量均呈现上升趋势,其中以花组织的表达量上升规律最为明显。在籽粒中,基因表达量最高是 2-18 株系中的 *FtFLS*,达到对照的 4.55 倍;在叶组织中,各基因表达量变化差异不明显,仅在 4-16 (低芦丁单株) 中 *FtFLS* 基因表达量最高 (2.9 倍)。



CHS: 查尔酮合成酶; F3H: 黄酮醇 3 脱氢酶; 4CL: 4- 香豆酸 COA 连接酶; FLS: 黄酮醇合成酶; UFGT: UDP- 黄酮醇 - 转移酶
CHS: Chalcone synthase, F3H: Flavone 3-hydroxylase, 4CL: 4-coumaroyl CoA ligase, FLS: Flavonol synthase, UFGT: UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase

图4 芦丁代谢途径关键酶基因表达量热图

Fig. 4 The calorimetric map of gene expression of key enzymes in rutin metabolic pathway

3 讨论

苦荞因其丰富的营养价值成为“药食同源”作物的代表,由于严格自交的特性,苦荞育种方法还停留在效率较低的传统选育上,大大限制了苦荞产业的发展。虽然经过科研人员的努力,苦荞种质创新方面出现了杂交米苦荞、多年生大粒苦荞等新型栽培种,但仍存在产量较低、落粒性强、品质差及优良遗传特征无法长期保持等问题,无法满足国内外市场对高品质荞麦的需求。利用 EMS 诱变可产生丰富表型的后代,方便筛选鉴定。EMS 浓度是决定诱变效果的最直接因素,针对不同物种,由于其遗传背景差异,EMS 诱变达到半致死率的浓度及处理时间也不尽相同。拟南芥一般在 1.2% EMS 溶液中,处理 12~24 h 效果较好^[25];而甜菜种子最适处理浓度达到了 2.5%^[26]。目前,中国对荞麦 EMS 诱变剂浓度的选择报道较少,本试验从低至高共设置了 4 个浓度梯度,发现当 EMS 浓度达到 1.2% 时,出苗率约为 50%,即达到半致死剂量,因此将其设置为苦荞诱变处理的最适浓度。

EMS 诱变主要是由于烷基化的作用,使 G/C 碱基对被 A/T 碱基所取代,从而造成错配突变,而有些突变发生在终止密码子处,造成了无义突变^[27]。EMS 诱变多以单碱基突变为主,在正向遗传学领域,用于功能缺失或获得突变体的分析,也可用于特定氨基酸残基在蛋白质中的功能分析^[28];与传统育种方式相比,其具有后代表型丰富,嵌合体少,遗传相对稳定等特点^[29];而当我们利用离体材料进行诱变时,可不受环境影响,节省大量人工。突变体库表型筛选是突变体库利用的重要内容,一般在 M₁ 观察黄化苗出现频率,此类型突变在后代表型可能遗传,可能恢复表型,也可能致死,因此连续多代统计

突变表型是十分必要的。在黑丰 1 号苦荞突变体库中,共发现了叶色、叶型、株型、粒型等不同类型的突变体共 102 个单株,其中致死突变 38 株;在 M_2 表型观察中,又观察到株型突变等多个突变类型;在寻找芦丁含量突变单株过程中,又发现了高芦丁株系 2 个和低芦丁株系 5 个。张以忠等^[30]分析苦荞突变体过程中也发现突变株系中黄酮含量、叶绿素含量等指标有高于对照的趋势。

黄酮代谢是苯丙烷类代谢的重要分支,Gurdon 等^[31]在莴苣 EMS 黄酮类突变体库的筛选中获得了 CHI 和 F3' H 基因突变体,发现 CHI 突变导致叶片黄绿,积累大量山奈酚,而 F3' H 突变导致粉绿表型,积累糖苷,这证实了黄酮代谢关键酶影响着代谢通路中各分支产物的形成。为了进一步解释突变发生的机理,对芦丁代谢关键酶基因进行了表达分析,发现在高、低芦丁突变株系中基因表达量有一定规律可循,存在潜在的相关性,但并不绝对吻合。尤其是芦丁代谢下游基因,*FtFLS* 和 *FtUGT* 基因在高芦丁株系中表达量升高,而在低芦丁株系中表达量下降。虽然有关芦丁代谢关键酶基因及其调控机制研究报道较多,但在突变体中对芦丁含量及其代谢关键酶基因关系的研究还不够深入。因此,利用突变体材料,创制苦荞新种质的同时也为芦丁代谢机理与基因定位的研究提供了良好的试验材料与基础。

参考文献

- [1] Kim K H, Lee K W, Kim D Y, Park H H, Kwon I B, Lee H J. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (15): 1709-1712
- [2] Gullón B, Lú-Chau T A, Moreira M T, Lema J M, Eibes G. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 67: 220-235
- [3] 范昱,丁梦琦,张凯旋,杨克理,唐宇,张宗文,方洵,严俊,周美亮. 荞麦种质资源概况. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (4): 813-828
Fan Y, Ding M Q, Zhang K X, Yang K L, Tang Y, Zhang Z W, Fang W, Yan J, Zhou M L. Germplasm resource of the genus *Fagopyrum* Mill. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (4): 813-828
- [4] 陈庆富. 荞麦生产状况及新类型栽培荞麦育种研究的最新进展. *贵州师范大学学报: 自然科学版*, 2018, 36 (3): 1-7
Chen Q F. The status of buckwheat production and recent progresses of breeding on new type of cultivated buckwheat. *Journal of Guizhou Normal University: Natural Sciences*, 2018, 36 (3): 1-7
- [5] 次仁卓嘎,陈宏伟. 西藏荞麦良种选育试验概况. *西藏农业科技*, 2012, 34 (3): 14-17
Ci R Z G, Chen H W. Overview about tibet buckwheat breeding. *Tibetan Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 34 (3): 14-17
- [6] 赵建栋,李秀莲,陈稳良,史兴海,高伟. 我国荞麦育种成就、问题及对策. *种子*, 2017, 36 (4): 67-71
Zhao J D, Li X L, Chen W L, Shi X H, Gao W. Problems and countermeasures of buckwheat breeding in China. *Seed*, 2017, 36 (4): 67-71
- [7] 赵建东. 晋荞麦 (甜) 1 号简介. *作物杂志*, 2002 (3): 40
Zhao J D. The brief introduction of Jinqiaomai (sweet) No.1. *Crops*, 2002 (3): 40
- [8] 张春明,李秀莲,张耀文. 晋荞麦 (甜) 3 号的选育及高产栽培. *山西农业科学*, 2011, 39 (4): 316-318
Zhang C M, Li X L, Zhang Y W. Selection of Jinbuckwheat (sweet) 3 and its cultivation techniques. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2011, 39 (4): 316-318
- [9] 郝志萍,吕慧卿,曹昌林,张琼姝,彭之东,张建华,史丽娟. '晋荞麦 (苦) 5 号' 的栽培技术. *中国农学通报*, 2016, 32 (30): 79-81
Hao Z P, Lv H Q, Cao C L, Zhang Q S, Peng Z D, Zhang J H, Shi L J. Cultivation technique of 'Jinqiao No.5'. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32 (30): 79-81
- [10] 郝志萍,吕慧卿,高翔,刘秀红. 晋荞麦 (甜) 8 号的选育及栽培技术. *山西农业科学*, 2016, 44 (10): 1437-1439
Hao Z P, Lv H Q, Gao X, Liu X H. Breeding and cultivation techniques of jinqiao 8. *Journal of shanxi Agricultural Sciences*, 2016, 44 (10): 1437-1439
- [11] 尚宏. 苦荞在内蒙古呼和浩特地区引种试验研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011
Shang H. Study on species introduction of tartary buckwheat in the Hohhot area inner Mongolia, Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011
- [12] 廉立坤. 苦荞四倍体诱导及其遗传变异研究. 贵阳: 贵州师范大学, 2009
Lian L K. Induction of tetraploid tartary buckwheat and their genetic variation. Guiyang: Guizhou Normal University, 2009
- [13] 马名川,刘龙龙,张丽君,周建萍,崔林. 荞麦育种研究进展. *山西农业科学*, 2015, 43 (2): 240-243
Ma M C, Liu L L, Zhang L J, Zhou J P, Cui L. Research progress of buckwheat breeding. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2015, 43 (2): 240-243
- [14] Kim Y S, Schumaker K S, Zhu J K. EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 323: 101-103
- [15] Atanasov K E, Liu C X, Tiburcio A F, Alcázar R. Generation of EMS-mutagenized populations of *Arabidopsis thaliana* for polyamine genetics. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1694: 343-346
- [16] Henry I M, Nagalakshmi U, Lieberman M C. Efficient genome-wide detection and cataloging of EMS-induced mutations using exome capture and next-generation sequencing. *The Plant Cell*, 2014, 26 (4): 1382-1397
- [17] 姜昱,李毅丹,刘相国,郝文媛,王浩,金峰学,林秀峰. EMS 诱变技术在我国玉米育种中的研究与应用 (综述). *吉林农业科学*, 2012, 37 (6): 21-24

- Jiang Y, Li Y D, Liu X G, Hao W Y, Wang H, Jin F X, Lin X F. Researches and application of EMS mutagenesis in maize breeding in China. *Journal of Jilin Agricultural Sciences*, 2012, 37(6): 21-24
- [18] 张凤启, 黄永娟, 杨甜甜, 陈健美, 管荣展, 张红生. EMS 诱变甘蓝型油菜 M_2 代群体的表型突变研究. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(6): 760-765
- Zhang F Q, Huang Y J, Yang T T, Chen J M, Guan R Z, Zhang H S. Research on phenotypic mutation in M_2 population derived from EMS treatment in *brassica napus* L.. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(6): 760-765
- [19] 谭义川, 柯永培, 何雪萍, 余学杰, 徐敏, 石海春. 19 份玉米 EMS 诱变系的抗旱性评价. *干旱地区农业研究*, 2016, 34(2): 152-156
- Tan Y C, Ke Y P, He X P, Yu X J, Xu M, Shi H C. Comprehensive evaluation on draught resistance of 19 maize inbred lines by EMS mutagenesis. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2016, 34(2): 152-156
- [20] Zhu Q, Smith T A, Yang L, Chaluvadi S R, Ayele M, Jogi A. High-throughput discovery of mutations in *tef* semi-dwarfing genes by next-generation sequencing analysis. *Genetics*, 2012, 192(3): 819-829
- [21] 王迪, 王健, 李刚, 程保山, 徐卫军, 袁彩勇. 水稻矮秆小粒突变体 *dsg7* 的图位克隆. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(5): 1247-1254
- Wang D, Wang J, Li G, Cheng B S, Xu W J, Yuan C Y. Map-based cloning of dwarf and small grain mutant *dsg7* in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(5): 1247-1254
- [22] 孙朝霞, 侯思宇, 郭彬, 令狐斌, 黄可盛, 许冬梅, 韩渊怀. 苦荞查尔酮合成酶基因序列特征及分子进化分析. *分子植物育种*, 2014, 12(4): 772-779
- Sun Z X, Hou S Y, Guo B, Linghu B, Huang K S, Xu D M, Han Y H. Characterize of sequences and molecular evolution analysis of chalcone synthase in *Fagopyrum Tartaricum*. *Molecular Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(4): 772-779
- [23] 孙朝霞, 侯思宇, 令狐斌, 刘荣华, 王丽, 杨武德, 韩渊怀. 苦荞全生育期芦丁积累与其生物合成途径相关基因表达分析. *中国农业科学*, 2017, 50(18): 3473-3481
- Sun Z X, Hou S Y, Linghu B, Liu R H, Wang L, Yang W D, Han Y H. Correlation analysis on rutin accumulation and gene expression of rutin synthetic enzymes and MYBs in the whole developmental stage of *Fagopyrum tataricum*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(18): 3473-3481
- [24] 郭彬, 韩渊怀, 黄可盛, 路阳, 侯思宇. HPLC 法测定 30 个荞麦品种芦丁含量的研究. *山西农业科学*, 2013, 41(1): 26-29, 42
- Guo B, Han Y H, Huang K S, Lu Y, Hou S Y. Researched on rutin contents among 30 buckwheat cultivars by HPLC. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2013, 41(1): 26-29, 42
- [25] Koornneef M, Dellaert L W M, Veen J H V D. EMS- and relation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1982, 93(1): 109-123
- [26] 姜莉, 李卫华, 王维成, 李蔚农. 不同浓度 EMS 对甜菜种子诱变致死率的影响. *中国糖料*, 2013(1): 28-29
- Jiang L, Li W H, Wang W C, Li W N. Effect of different concentration EMS on mutagenic fatality rate of sugar beet seed. *Sugar Crops of China*, 2013(1): 28-29
- [27] Kim Y, Schumaker K S, Zhu J K. EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods Molecular Biology*, 2006, 323: 101-103
- [28] Henikoff S, Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 375-401
- [29] 臧辉, 任卫波. EMS 诱变在植物育种中的研究与应用. *分子植物育种*, 2018, 16(17): 5782-5788
- Zang H, Ren W B. Research and application of EMS mutation in plant breeding. *Plant Molecular Breeding*, 2018, 16(17): 5782-5788
- [30] 张以忠, 卯光耀, 邓琳琼. 遮荫条件下赤霉素处理对半夏农艺性状及品质性状的影响. *现代农业科技*, 2018(23): 71-72, 75
- Zhang Y Z, Mao G Y, Deng L Q. Effects of shading and gibberellin treatments on agronomic traits and quality traits of *pinellia ternata*. *Xiandai Nongye Keji*, 2018(23): 71-72, 75
- [31] Gurdon C, Poulev A, Armas I, Satorov S, Raskin I. Genetic and phytochemical characterization of lettuce flavonoid biosynthesis mutants. *Scientific Reports*, 2019, 9: 3305