

罗布麻 EMS 突变体库构建及黄酮变异突变体筛选

任婷婷¹, 任宏伟², 杜海娜³, 张成省¹, 李义强¹, 高 婷², 徐宗昌¹

(¹ 中国农业科学院烟草研究所 / 海洋农业研究中心, 青岛 266101; ² 青岛农业大学生命科学院 /

山东省植物生物技术重点实验室, 青岛 266109; ³ 青岛农业大学农学院, 青岛 266101)

摘要: 罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 突变体的获得是人工创新种质资源的有效途径,也是开展品种选育、功能基因组研究的基础。本研究以采自东营野生罗布麻种子作为材料,预试验结果表明 0.7% 的甲基磺酸乙酯 (EMS, ethylmethylsulfone) 溶液诱变罗布麻种子 13 h 能够达到半致死剂量。在此浓度和处理时间下构建了一个 1452 株的突变体群体,对获得的 M₁ 植株进行农艺性状和总黄酮含量性状筛选,初步获得 125 份农艺性状突变材料,其中包括 8 株白化植株、23 株叶型变异株、16 株叶色黄纹突变体、32 株苗期分枝植株以及 46 株叶位变异突变体,突变频率分别为 0.55%、1.6%、1.1%、2.2% 和 3.2%。此外,还筛选到 2 株总黄酮含量明显高于野生型和 1 株低于野生型的材料。在突变群体中对黄酮代谢途径中编码黄酮-3-羟化酶的基因 (*F3H*, flavanone 3-hydroxylase gene) 进行测序鉴定,结果鉴定到 3 株 *F3H* 基因的突变体。本研究构建的罗布麻突变体库表型丰富且突变位点可以鉴定,是罗布麻新种质筛选、品种选育以及基因功能研究的良好材料。

关键词: 罗布麻; 甲基磺酸乙酯; 诱变育种; 突变体库; 总黄酮

Construction of EMS Mutant Library and Screening of Total Flavonoid Content Mutants of *Apocynum venetum* L.

REN Ting-ting¹, REN Hong-wei², DU Hai-na³, ZHANG Cheng-sheng¹,

LI Yi-qiang¹, GAO Ting², XU Zong-chang¹

(¹Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Marine Agriculture Research Center, Qingdao 266101;

²College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University/ Shandong Provincial Key Laboratory of Plant Biotechnology,

Qingdao 266109; ³College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266101)

Abstract: The acquisition of *Apocynum venetum* L. mutant library is an effective way to innovate germplasm resources artificially, and it is also the basis of varieties breeding and functional genome research. In this study, wild *A. venetum* L. seeds collected in Dongying were used to construct mutant library. Pre-experiment results indicated that 0.7% ethylmethylsulfone (EMS) solution was the LD₅₀ for seeds of *A. venetum* L. treated for 13 h. A mutant library of 1452 individual plants was constructed with the treatment in this concentration and duration. The agronomic traits and total flavonoid contents of the M₁ population were screened. A total of 125 plants with abnormal agronomic traits were obtained, including 8 albinos, 23 leaf form variants, 16 yellow-striped leaf variants, 32 branching seedling variants, and 46 leaf position variants. The mutation frequencies were 0.55%, 1.6%, 1.1%, 2.2% and 3.2%, respectively. Moreover, the total flavonoids in two plants were significantly higher and in one plant was lower than that in the wild type. The flavanone 3-hydroxylase gene (*F3H*) involved in the flavone metabolism pathway was sequenced in the mutant library. The results showed that one in every 6.7 plants appeared as an *F3H* gene mutant. The mutant library of *A. venetum* L. constructed in this study showed abundant

收稿日期: 2019-09-03 修回日期: 2019-10-08 网络出版日期: 2019-11-04

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190903001>

第一作者研究方向为农学, E-mail: renting1222@126.com

通信作者: 高婷, 研究方向为药用植物资源学, E-mail: gt_kelly@163.com

徐宗昌, 研究方向为罗布麻种质资源创新, E-mail: xuzc1110@163.com

基金项目: 山东省自然科学基金博士基金项目 (ZR2019BC073); 国家自然科学基金青年基金项目 (31900276)

Foundation project: Doctor Foundation of Shandong (ZR2019BC073), National Natural Science Foundation of China (31900276)

phenotypic variations, which provided good materials for selection of new germplasm, varieties breeding and gene function research in *A. venetum* L..

Key words: *Apocynum venetum* L.; EMS; mutagenic breeding; mutant library; total flavonoids

罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 又称茶棵子、红柳子, 1753 年由植物分类学家林奈首次描述定名, 分布在欧洲、亚洲和美洲等多个国家。在我国北方省份均有分布^[1]。罗布麻是一种多年生灌木, 可通过根蘖和种子进行繁殖, 抗逆能力突出, 能够在盐碱沙滩等地生长, 具有良好的改良水土作用, 也可以当作观赏植物种植^[1]。同时, 罗布麻还是一味名贵的传统中药, 具有降血压、抗氧化、预防动脉硬化以及抗抑郁等作用^[2-4]。1972 年被纳入“药食同源目录”后, 罗布麻健康产业产品如罗布麻茶、饮料等发展迅速, 在国内、东亚各国甚至美洲都有销售^[5]。除此之外, 罗布麻还是一种优异的纤维作物, 其纤维具有良好的回潮率、热稳定性以及抗菌抑菌活性^[6], 因此具有“野生纤维之王”的美誉, 在家居纺织领域应用广泛。

然而, 目前关于罗布麻原材料的应用基本上都是以采集野生罗布麻为主, 没有相关产业的专用型品种品系产生。由于大量采挖, 罗布麻生境遭到破坏, 野生资源也呈逐年递减的趋势^[1]。专用品种的缺失严重制约着罗布麻相关产业的发展。突变体库的构建是植物功能基因研究的重要基础, 同时也是种质资源创新和筛选及培育新品系品种的有效工具。罗布麻产业化利用价值突出, 但功能基因组学研究滞后, 目前国内外都没有突变体库构建及筛选应用的报道。因此, 构建罗布麻突变体库并针对不同产业需要筛选目标突变体植株进行繁种培育, 是解决罗布麻无专用品种, 限制产业化发展的有效途径。

目前植物突变体库的构建方式主要有理化诱变、T-DNA 插入法、转座子法等^[7]。其中, 化学诱变因具有操作简单、诱变作用专一性强、突变性状稳定等优点而被广泛地应用于突变体库的创建。EMS 是目前应用最为广泛的一种化学诱变剂, 其操作流程相对简便, 诱变频率高; 突变能够涵盖整个基因组, 没有突变热点, 突变范围广; 并且 EMS 产生的突变大多为 G/C 到 A/T 的单碱基突变, 染色体畸变少, 能够产生稳定遗传的显性突变^[8]。因此 EMS 是构建罗布麻突变体库的理想诱变剂。

本研究采用 EMS 诱变方法初步构建罗布麻突变体库, 用以丰富罗布麻种质资源, 分析突变群体的表型变异特点并筛选总黄酮含量变异突变体, 旨在为罗

布麻功能基因组研究、遗传改良及育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料罗布麻种子为野生材料, 2018 年 9 月采自山东省东营市广北农场二分厂。野生罗布麻多通过根蘖进行无性繁殖, 因此自然野生群落多为少数亲本繁衍而成。为保证构建的突变体库个体遗传背景一致, 在直径 5 m 范围以内的罗布麻种群里采集种子^[9]。种子脱粒后清除杂质, 剔除不饱满的种子备用。

1.2 罗布麻基因组大小评估

创建突变体库群体的大小受基因组大小影响较大, 因此首先对罗布麻基因组大小进行评估。为避免环境中病菌基因组对试验结果的影响, 参考 Xu 等^[10]的方法对罗布麻种子进行表面消毒。方法略经修改, 具体步骤如下: 种子先用 10% 浓度的 NaClO 溶液消毒 5 min, 再用 70% 的酒精迅速冲洗 3 遍, 置于超净台中灭菌滤纸上, 晾干后点播在 1/2 MS 固体培养基中生长。约 1 个月后取 30 余株全株混合后提取 DNA, 在武汉菲沙基因信息有限公司构建基因组大小评估测序文库, 并经 Illumina HiSeq xTen 平台进行高通量测序。从经质控筛选后的 Clean Reads 中挑选 10000 对在 NCBI 核苷酸数据库中进行 BLAST 比对, 排除鉴定文库的外源污染。利用 K-mer 算法对基因组大小、杂合率以及重复序列等进行评估^[11-12]。

1.3 罗布麻突变体库构建

EMS 诱变通常以半致死剂量 (LD_{50}), 即诱变后植株存活一半的剂量作为突变体库创制的诱变条件^[13]。对不同物种、不同诱变材料, 半致死剂量需要经过预试验确定。称取 12 份颗粒饱满、大小基本一致的罗布麻种子, 每份 0.05 g (约 100 粒), 置于水中浸泡 24 h, 吸胀。配制 0.5%、0.7% 和 0.9% EMS 溶液, 纯水作为对照。吸胀后的种子置于 50 mL 离心管中, 加入 6 mL EMS 溶液, 每个处理设置 3 个重复。将离心管倾斜 45° 角固定在摇床上, 在 220 r/min、28 °C 条件下摇动处理 13 h。处理后的种子, 用 ddH₂O 充分冲洗 10 次, 以去除残留的 EMS 溶液。冲洗完成后, 将种子倒在滤纸上, 过夜晾干。每个处理取 70 粒种子点播在培养皿中, 置于温度为 24 ±

2 ℃、光照强度为 2000 lx、光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗的恒温培养箱中培养,每个处理均设 3 次重复。分别在第 3 天和第 6 天时统计种子的萌发率,在第 10 天时统计成苗率。采用预试验中得出的罗布麻 EMS 诱变半致死量浓度,按相同方法批量处理罗布麻种子,构建突变体库。种子处理完晾干后按粒点播在育种苗盘中,进行常规管理。

1.4 罗布麻表型突变体筛选

罗布麻幼苗生长 6 周后进行出苗率、白化苗比率调查。待幼苗群体生长至 6 叶期时,调查记录变异性状,主要包括叶色、叶型和分枝等。

1.5 总黄酮含量差异突变体筛选

罗布麻突变体植株长到 8 周时,取长势基本一致的突变体材料 100 份和 20 份对照材料相同叶位的新鲜叶片,参照 Zhang 等^[14]的方法进行总黄酮含量测定。方法略经修改,具体步骤如下:鲜叶置于 60 ℃ 恒温鼓风干燥箱中干燥至恒重,经研钵研磨后过 40 目筛,精密称取 50 mg 干粉加入 3 mL 80% 的甲醇,95 ℃ 水浴过夜提取 12 h。以芦丁标准品作为当量剂,依次配制浓度梯度为 0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 和 0.05 mg/mL 的标准溶液。样品和标准溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后取 25 μL 加入 110 μL NaNO₂ (0.066 mol/L) 溶液中,室温反应 5 min 后,再加入 15 μL AlCl₃ (0.75 mol/L) 溶液室温反应 6 min。之后混合液再加入 100 μL NaOH (0.5 mol/L) 溶液轻微晃匀,在 510 nm 处测定吸光度。以芦丁标准品构建标准曲线,计算各植株总黄酮含量(以芦丁当量计算)。

1.6 黄烷酮-3-羟化酶基因突变体筛选

黄烷酮-3-羟化酶基因(*F3H*, flavanone 3-hydroxylase gene)是罗布麻黄酮生物合成途径中的一个关键合成酶基因,能够催化柚皮素生成二氢山奈酚,圣草酚生成二氢槲皮素和二氢五羟黄酮生成二氢杨梅酮等的反应^[15-16]。我们前期通过参考其他物种 *F3H* 基因序列,利用 RACE 技术获得了罗布麻 *F3H* 基因编码区序列,全长 1092 bp。通过基因特异引物对突变体单株进行扩增,对获得的基因片段进行测序鉴定突变位点,筛选突变体。

2 结果与分析

2.1 罗布麻基因组评估

罗布麻基因组 DNA 经过建库和高通量测序后,对质控过滤后的 10000 对罗布麻基因组 Clean Reads 进行 BLAST 比对,结果发现有 2.44%、1.6% 和 0.97% 的数据比对在与其同为夹竹桃科的植物大

花假虎刺 *Carissa macrocarpa* (Eckl.) A. DC.、*Rhazya stricta* Decne. 和 *Oncinotis tenuiloba* Stapf 上;而有 2.67% 和 1.53% 的数据则比对在非夹竹桃科植物 *Gynochthodes nanlingensis* (Y. Z. Ruan) Razafim. & B. Bremer 和葡萄 *Vitis vinifera* L. 上。比对在其他物种上的罗布麻基因组序列比例很低,并且没有明显的物种偏性,证明建库没有外源物种污染。经 K-mer 分析和计算得出罗布麻基因组大小为 283.94 Mb,杂合率为 0.45%,重复序列比例为 50.21% (图 1)。

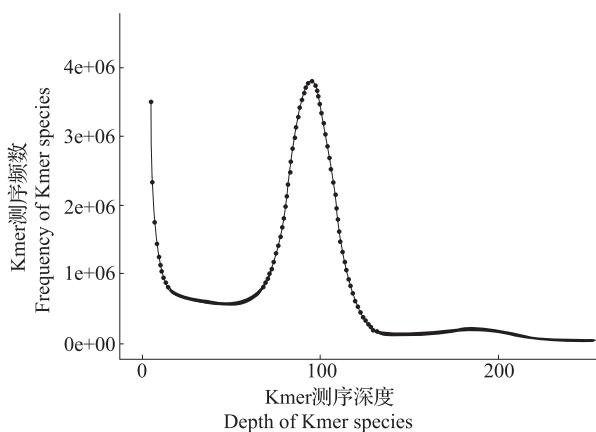


图 1 罗布麻基因组 Kmer 分析深度分布图

Fig. 1 Kmer depth distribution analysis map of *Apocynum venetum* L. genome

2.2 EMS 突变体库的构建

对预试验 3 个 EMS 浓度处理的罗布麻种子发芽率和成苗率进行统计分析,结果发现不同浓度 EMS 处理对罗布麻种子萌发和植株生长具有显著的抑制作用,具体表现为随着 EMS 浓度的升高罗布麻种子萌发率和成苗率均呈逐渐降低的趋势(表 1)。第 3 天时,不同浓度 EMS 处理的罗布麻种子各个重复之间萌发率波动较大;但第 6 天时,同一浓度处理的各个重复之间发芽率基本一致,波动较小,这表明 EMS 处理在萌发开始阶段对罗布麻种子的生理生长造成了严重的扰动,个体之间差异很大;但是随着时间的延长,这种扰动效应逐渐减小。统计结果表明,虽然种子在第 6 天时萌发率都达到了 50% 以上,但是不同浓度 EMS 处理的成苗率却要明显低于萌发率(表 1)。本试验发现 EMS 处理过的种子有很多萌发后在胚根位置出现黑色条带且无根毛产生(图 2),这类种子逐渐死亡,导致成苗率降低。在当前处理条件下,只有 0.7% EMS 处理成苗率在 50% 左右,接近半致死剂量,因此确定以此浓度进行罗布麻突变体库的构建,初步构建了一个约 1500 株的罗布麻突变体库。

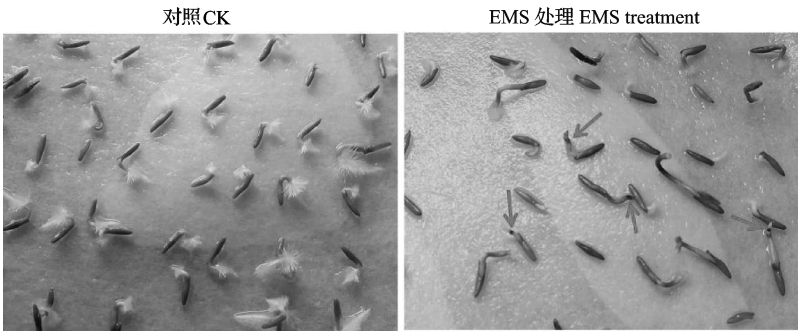
表 1 不同浓度 EMS 处理罗布麻种子萌发率和成苗率统计
Table 1 Seed germination rates and seedling rates of *Apocynum venetum* L. treated by EMS with different concentrations

项目 Item	EMS 浓度 (%) EMS concentration			
	0	0.5	0.7	0.9
第 3 天萌发率 Germination rate on the third day	0.77 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.22 ^b	0.38 ± 0.28 ^c	0.09 ± 0.09 ^d
第 6 天萌发率 Germination rate on the sixth day	0.99 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.03 ^b	0.87 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.09 ^c
第 10 天成苗率 Seedling rate on the 10th day	0.98 ± 0.01 ^a	0.64 ± 0.09 ^b	0.57 ± 0.10 ^c	0.25 ± 0.11 ^d

不同小写字母表示差异显著
Different lowercase letters represented significant

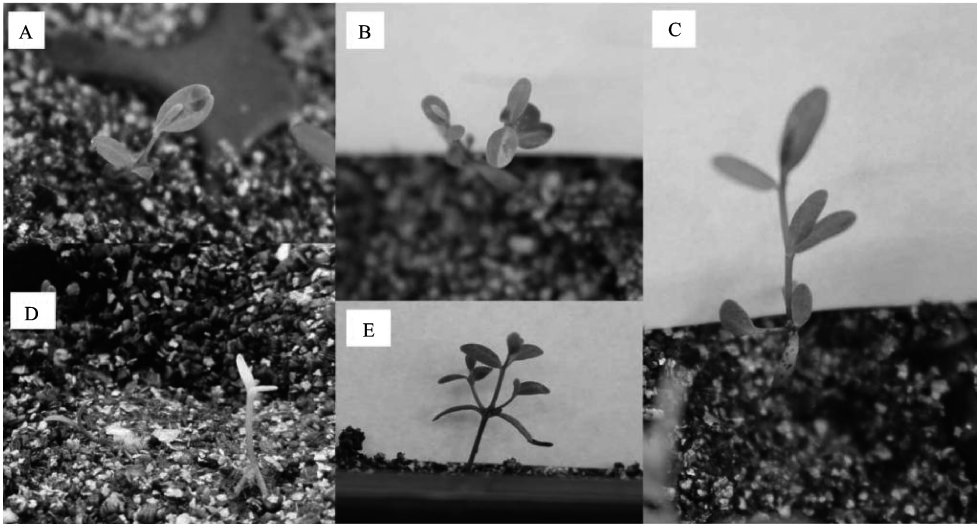
2.3 突变体苗期表型调查

第 6 周时对罗布麻突变体成苗率进行调查, 结果发现播种 3200 株, 出苗 1452 株, 出苗率为 45.4%, 同预试验结果基本一致。对 1452 株突变体幼苗植株进行突变性状调查, 发现 M₁ 群体中苗期性状主要表现为白化(8 株)、叶型变异(23 株)、叶色黄纹(16 株)、苗期分枝(32 株) 以及叶位变异(46 株) 等类型(图 3), 变异频率分别为 0.55%、1.60%、1.10%、2.20% 和 3.20%, 总变异频率为 8.65%, 苗期变异性状丰富。在苗期变异性状中, 植株白化变异最少, 其植株可以存活 1 个月左右, 之后逐渐脱水枯萎致死; 叶位性状变异最多, 由自然状态下的对生状态变异为同侧生长, 但不同突变体变异程度有所差异; 叶型和叶色变异多只在苗期植株



箭头指示的为种子萌发后胚根处的黑带。有黑带的无法长出根毛, 后逐渐死亡
The arrow indicates the black belt at the radicle of *A. venetum* L. seeds after germination.
Seeds with this black belt could not grow root hairs, and gradually died

图 2 EMS 处理后罗布麻种子萌发根系生长情况
Fig. 2 Root growth of *Apocynum venetum* L. seeds after EMS treatment



A: 叶型突变体; B: 叶色突变体; C: 叶位突变体; D: 白化苗; E: 分枝突变体
A: Leaf type mutant, B: Leaf color mutant, C: Leaf position mutant, D: Albino seedling, E: Branching mutant

图 3 罗布麻突变体库 M₁ 群体苗期变异性状
Fig. 3 Variation traits of *Apocynum venetum* L. M₁ individuals of the mutant library at seedling stage

最初生长的几片叶子上出现,随着植株生长,未见新叶出现类似变异现象;但分枝突变体在植株生长一段时间后仍可从高位腋芽处长出分枝。

2.4 突变体总黄酮含量测定

对 100 个 M_1 代罗布麻突变个体和 20 个对照植株进行总黄酮含量测定,结果发现对照群体总黄酮含量平均值为 47.15 mg/g,极差为 7.6;突变体群体总黄酮含量平均值为 48.05 mg/g,极差为 27.5,鉴定到 2 株总黄酮含量明显高于对照和 1 株低于对照的突变体植株,图中突变体的离散点即为鉴定到的总黄酮含量变异突变体(图 4)。总黄酮含量突变体变异率在 3% 左右。

2.5 黄酮代谢途径 *F3H* 基因碱基突变检测

为了进一步检测 EMS 诱变在罗布麻 DNA 水平上的影响,取 2.4 中鉴定到的 3 株总黄酮含量差异突变体和另外 17 株突变体植株对 *F3H* 基因进行突变位点鉴定。测序结果发现,在 *F3H* 基因中鉴定到一个 G/T 杂合位点(图 5A),此杂合位点在群体中有两种存在形式,一是个体植株以 GG 或 TT 纯合个体存在,另外一种则在同一个体中以 G/T 杂合形态存在。此外,还鉴定到 3 个植株 *F3H* 基因中存在碱基突变。由于测序引物是 *F3H* 基因的反向引物,鉴定到的 3 个碱基突变分别位于 *F3H* 基因 926 碱基处 G → A 的突变

(图 5B)、904 处 T → G 的突变(图 5C)和 480 处 A → C 的突变(图 5D),在氨基酸水平分别导致了 Gly → Glu、Tyr → Asp 和 Gln → His 的变化。这些碱基变异可以在后代中分离筛选出纯合的突变体材料。并且,图 5D 所鉴定的植株就是 2.4 中鉴定到的总黄酮含量显著降低的突变体材料,另外 2 株高黄酮含量突变体并未在 *F3H* 基因中产生突变。

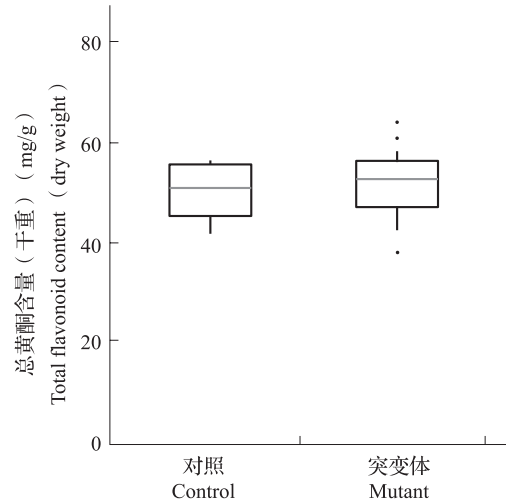


图 4 罗布麻突变体总黄酮含量
Fig. 4 Total flavonoid contents in the mutant of *Apocynum venetum* L.

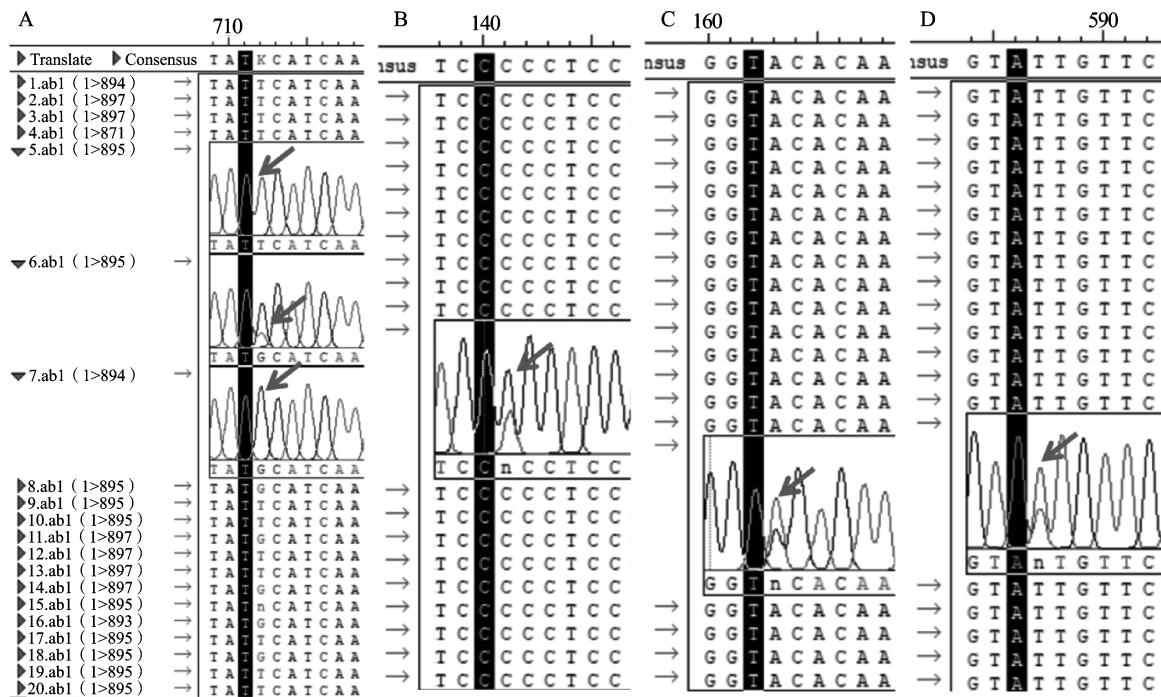


图 5 突变体 *F3H* 基因突变位点检测

Fig. 5 Detection of *F3H* gene mutational sites in *Apocynum venetum* L. mutants

3 讨论

罗布麻是一种优异的药食同源资源,并且还在纤维纺织等方面具有重要的利用价值,但是缺少专用性种质(品种)一直是制约罗布麻相关产业发展的瓶颈因素^[1]。目前,利用诱变技术人工创制突变体筛选目标性状的单株、群体等是种质创新的重要途径。利用 EMS 诱变技术已经在拟南芥^[17]、水稻^[7]、陆地棉^[18]、高粱^[19]、花生^[20]、大豆^[21]、小麦^[22-23]、糜子^[24]和番茄^[25]等植物中成功构建了突变体库并且筛选到了目的突变体植株。比如, Xin 等^[19]在 1600 余株高粱 EMS 诱变突变体中鉴定到了两个编码咖啡酸甲基转移酶(caffeic acid methyltransferase)基因的突变体; Kuraparthi 等^[23]对一个二倍体小麦进行 EMS 诱变,在突变群体中成功筛选到了单分蘖的突变体;朱翠翠等^[26]利用 EMS 诱变,在林木青檀中鉴定到了多个彩叶突变体。这些结果充分说明利用 EMS 进行突变体库构建筛选是获得目标性状突变体植株的一种有效手段。本研究报道了首个罗布麻突变体库并对其进行初步评估。

突变群体的大小是获得目标性状突变体的一个重要限制因素。群体越大,突变效率越高,获得目标性状突变体的概率也就越大。然而,考虑到试验条件、用工用地、后续筛选等工作,突变体库也不能无限制扩大,一个合理大小的突变体库是进行有效筛选的必然选择。而基因组的大小则是影响物种诱变群体大小的一个重要因素。因此,在构建罗布麻突变体库之前本研究利用 Survey 技术初步估算了罗布麻基因组大小为 283.94 Mb,并且罗布麻基因组杂合率比较低,只有 0.45%。根据前人在其他物种上的研究结果,如 Xin 等^[19]构建的高粱 EMS 突变体库有 1600 余个单株,而高粱基因组大小 730 M^[27];大豆基因组为 915.4 M^[28], Tsuda 等^[21]构建的 EMS 突变体库也只有 1536 个植株;胡鑫等^[29]在基因组大小为 4.79 Gb 的大麦^[30]上构建的 EMS 群体也只有 2154 个植株,并且都筛选到了目的性状突变体。因此,对于罗布麻而言本研究初步构建的含有 1452 个单株的 EMS 诱变群体理论上可以筛选出符合预期的突变体植株。事实上,本研究也筛选到了总黄酮含量具有差异的突变体植株(图 4),突变效率达到 3% 左右,并且也筛选到了很多叶型、分枝等突变体(图 3)。

突变体库群体的大小除受基因组大小影响之

外,诱变材料、EMS 诱变时间、温度和诱变剂量等都会对诱变效率产生影响^[31],从而影响饱和突变体库的群体大小。EMS 浓度越高、诱变时间越长对植物组织造成的伤害越大,产生的突变也会越多,但植物也会因为损伤过度从而死亡;反之,诱变剂量和时间不够则会导致突变减少,构建饱和突变体库需要的群体就会增大,增加成本降低了筛选效率。不同植物对 EMS 耐受程度不同,因此在利用 EMS 构建突变体库时需要 EMS 的用量和诱变时间进行筛选^[32]。诱变剂量和诱变时间的确定一般以诱变后植株存活一半的剂量即半致死剂量(LD₅₀)作为常用标准^[13]。虽然诱变时间和诱变剂量都对诱变效果有影响,但单独调整诱变剂量或时间也能取得基本一致的效果。在本试验中,考虑到诱变处理、换处理液、冲洗等试验操作的时间问题,我们预设了诱变时间为 13 h,只通过剂量调整达到预期目的,筛选到 0.7% 的 EMS 处理罗布麻种子,其成苗率在 57% 左右(表 1),接近半致死剂量,因此在该浓度下进行了突变体库的构建。

前人研究指出,EMS 产生的突变群体中大约 5% 是无义突变,30% 是沉默突变,65% 是错义突变^[8]。本研究对突变体库中 *F3H* 基因进行测序,鉴定到 3 个碱基位点发生突变,但这 3 个位点都导致氨基酸发生改变(图 5)。其中图 5D 鉴定的总黄酮含量显著降低的突变体植株恰好在 *F3H* 基因处发生了碱基突变,导致 *F3H* 蛋白 160 位氨基酸处发生了 Gln → His 的变化;而另外 2 株总黄酮含量明显升高的植株并未在 *F3H* 基因中鉴定到突变发生。总黄酮包含槲皮素、芸香甙类、黄酮甙类等多种物质,*F3H* 基因参与多种黄酮类物质的代谢过程^[15-16],而氨基酸的改变很有可能导致蛋白功能发生异常,因此导致植株总黄酮含量的降低。另一方面,正是由于总黄酮物质种类繁多参与调控的基因复杂,因此突变位点也很可能发生其他编码合成酶的基因或者调控基因上,从而提高植株中总黄酮的含量。因此,这些突变体材料的获得对后续研究总黄酮代谢调控具有重要意义。

目前报道的利用 EMS 进行诱变筛选突变体大多应用于小麦、高粱、陆地棉、水稻、大豆、糜子、番茄、拟南芥^[7, 17-19, 21-25]等一年生自交繁殖后代的植物上。其原因主要在于此类植物通过种子繁殖,且种子体积小,种子无特殊覆盖物,易渗透,可以进行大量诱变;自交结实, M₁ 代出现的显/隐性性状大多可以在 M₂ 代获得纯合突变材料,便于后续应用。

因此这些植物 EMS 突变体的筛选也大多在 M_2 代进行。但有研究认为 M_1 代群体中也会发生显性突变, 在 M_1 代积极筛选也能够获得变异丰富的突变体。王长里等^[33] 在小麦 EMS 诱变群体的 M_1 代中鉴定出了早熟、矮秆、大穗等显性突变体; 夏曾润等^[34] 在 1039 个苜蓿 M_1 代突变体中也鉴定到了叶色、分枝数、株高、株型以及开花时间变异等诸多突变体, 只不过自交分离后仍需在 M_2 代中进行筛选。但对于有性繁殖周期长的众多木本植物或多年生植物而言, 在 M_1 代进行筛选是加速突变体鉴定和利用的必然选择。慎家辉等^[35] 在杜梨种子诱变后直接对 M_1 代种苗进行筛选, 获得了株高变异突变体; 朱翠翠等^[26] 在青檀 M_1 代中筛选到了叶型叶色变异突变体; 陈丽等^[36] 也在杨树 M_1 代群体中鉴定到了耐盐植株。因此, 本研究也在罗布麻 M_1 代群体中进行突变体筛选, 并且获得了类型丰富的突变体植株(图 3~图 5)。另外, 由于罗布麻可以通过根蘖繁殖, 在 M_1 代筛选得到的突变体植株可以通过无性繁殖等方式进行快速扩繁, 避免在后续世代中产生分离。

本研究进行罗布麻突变体库的构建和总黄酮含量变异突变体的筛选, 丰富了罗布麻种质资源, 筛选到的突变材料可直接进行罗布麻专用型品种培育; 并且也是后续开展相关基因功能研究的重要材料, 是罗布麻功能基因组学研究中不可缺少的重要组成部分。

参考文献

- [1] 徐宗昌, 周金辉, 张成省, 李义强. 我国罗布麻种质资源研究利用现状. 植物学报, 2018, 53(3): 382-390
Xu Z C, Zhou J H, Zhang C S, Li Y Q. Review of current research and utilization status of *Apocynum venetum* germplasm in China. Chinese Bulletin of Botany, 2018, 53(3): 382-390
- [2] Barreras A, Gurk-Turner C. Angiotensin II receptor blockers. Pharmacology Notes, 2003, 16: 123-126
- [3] Kuo C, Kwan C, Gong C, Tsai M, Nishibe S, Tatsuzaki J, Leung Y. *Apocynum venetum* leaf aqueous extract inhibits voltage-gated sodium channels of mouse neuroblastoma N2A cells. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 136(1): 149-155
- [4] Rabiei Z, Rabiei S. A review on antidepressant effect of medicinal plants. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2017, 12(1): 1-11
- [5] Xie W, Zhang X, Wang T, Hu J. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Apocynum venetum* L. (Luobuma): A review. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 141(1): 1-8
- [6] 马琳, 孙卫国. 精干罗布麻纤维性能测试与研究. 纺织科技进展, 2009(5): 50-57
Ma L, Sun W G. The research and test on properties of degummed *Apocynum venetum* fiber. Advances in Textile Science and Technology, 2009(5): 50-57
- [7] Till B J, Cooper J, Tai T H, Colowit P, Greene E A, Henikoff S, Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC Plant Biology, 2007, 7: 19
- [8] McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeted screening for induced mutations. Nature Biotechnology, 2000, 18: 455-457
- [9] Xu Z, Wang M, Zhou J, Liu H, Zhang C, Li Y. Identification and validation of stable reference genes for gene expression analysis in sword-leaf dogbane using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2018, 143(6): 508-517
- [10] Xu Z, Wang M, Shi D, Zhou G, Niu T, Hahn M G, O'Neill M A, Kong Y. DGE-seq analysis of *MUR3*-related *Arabidopsis* mutants provides insight into how dysfunctional xyloglucan affects cell elongation. Plant Science, 2017, 258: 156-169
- [11] Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. Genome Research, 2014, 24(8): 1384-1395
- [12] Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, Li Y, Li S, Shan G, Kristiansen K, Li S, Yang H, Wang J, Wang J. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. Genome Research, 2010, 20(2): 265-272
- [13] Jander G, Baerson S R, Hudak J A, Gonzalez K A, Gruys K J, Last R L. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. Plant Physiology, 2003, 131(1): 139-146
- [14] Zhang B, Deng Z, Ramdath D D, Tang Y, Chen P X, Liu R, Liu Q, Tsao R. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on alpha-glucosidase and pancreatic lipase. Food Chemistry, 2015, 172: 862-872
- [15] Singh B, Kumar A, Malik A K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 2017, 38(6): 820-832
- [16] Pandey A, Misra P, Trivedi P K. Constitutive expression of *Arabidopsis* MYB transcription factor, *AtMYB11*, in tobacco modulates flavonoid biosynthesis in favor of flavonol accumulation. Plant Cell Report, 2015, 34(9): 1515-1528
- [17] Greene E A, Codomio C A, Taylor N E, Henikoff J G, Till B J, Reynolds S H, Enns L C, Burtner C, Johnson J E, Odden A R, Comai L, Henikoff S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. Genetics, 2003, 164: 731-740
- [18] 陈煜, 霍雪寒, 宋章强, 张传云, 杜召海, 周娟, 张景霞, 王芙蓉, 张军. 陆地棉 EMS 诱变体系的优化及种子和纤维发育异常突变体的鉴定. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 911-919
Chen Y, Huo X H, Song Z Q, Zhang C Y, Du Z H, Zhou J, Zhang J X, Wang F R, Zhang J. Optimization of EMS mutagenesis condition in upland cotton and screening of mutant for abnormal seed and fiber development. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 911-919
- [19] Xin Z, Wang M L, Barkley N A, Burow G, Franks C, Pederson G, Burke J. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping

- analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 103
- [20] 王允, 张幸果, 李贺敏, 宋佳静, 崔党群, 殷冬梅. 花生 EMS 诱变后代的农艺性状与品质分析. *植物遗传资源学报*, 2015, 16(4): 914-919
Wang Y, Zhang X G, Li H M, Song J J, Cui D Q, Yin D M. Agronomic traits and quality analysis of peanut EMS mutation progeny. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(4): 914-919
- [21] Tsuda M, Kaga A, Anai T, Shimizu T, Sayama T, Takagi K, Machita K, Watanabe S, Nishimura M, Yamada N, Mori S, Sasaki H, Kanamori H, Katayose Y, Ishimoto M. Construction of a high-density mutant library in soybean and development of a mutant retrieval method using amplicon sequencing. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1014
- [22] Mishra A, Singh A, Sharma M, Kumar P, Roy J. Development of EMS-induced mutation population for amylose and resistant starch variation in bread wheat (*Triticum aestivum*) and identification of candidate genes responsible for amylose variation. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 217
- [23] Kuraparthi V, Sood S, Dhaliwal H S, Chhuneja P, Gill B S. Identification and mapping of a tiller inhibition gene (*tin3*) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(2): 285-294
- [24] 张彬, 王喆, 陈利青, 禾璐, 李红英, 乔治军, 韩渊怀. 糜子 EMS 突变体库构建和突变体筛选. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 370-376
Zhang B, Wang Z, Chen L Q, He L, Li H Y, Qiao Z J, Han Y H. Construction of EMS-treated mutant library and mutant phenotypic analysis in broomcorn millet. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 370-376
- [25] Garcia V, Bres C, Just D, Fernandez L, Tai F W, Mauxion J P, Le Paslier M C, Berard A, Brunel D, Aoki K, Alseekh S, Fernie A R, Fraser P D, Rothan C. Rapid identification of causal mutations in tomato EMS populations via mapping-by-sequencing. *Nat Protocols*, 2016, 11(12): 2401-2418
- [26] 朱翠翠, 张林, 王峰, 聂硕, 孙忠奎, 王长宪. 利用 EMS 进行青檀彩叶植株诱变研究. *北方园艺*, 2016(12): 57-61
Zhu C C, Zhang L, Wang F, Nie S, Sun Z K, Wang C X. The colorful plant mutation of *Pteroceltis tatarinowii* by EMS treatment. *Northern Horticulture*, 2016(12): 57-61
- [27] Paterson A H, Bowers J E, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti A K, Chapman J, Feltus F A, Gowik U, Grigoriev I V, Lyons E, Maher C A, Martis M, Narechania A, Otiillar R P, Penning B W, Salamov A A, Wang Y, Zhang L, Carpita N C, Freeling M, Gingle A R, Hash C T, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann M C, Ming R, Peterson D G, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer K F, Messing J, Rokhsar D S. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, 2009, 457(7229): 551-556
- [28] Kim M Y, Lee S, Van K, Kim T H, Jeong S C, Choi I Y, Kim D S, Lee Y S, Park D, Ma J, Kim W Y, Kim B C, Park S, Lee K A, Kim D H, Kim K H, Shin J H, Jang Y E, Kim K D, Liu W X, Chaisan T, Kang Y J, Lee Y H, Kim K H, Moon J K, Schmutz J, Jackson S A, Bhak J, Lee S H. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107: 22032-22037
- [29] 胡鑫, 齐新丽, 吕波, 吴佳洁, 付道林. 大麦 TILLING 体系在抗病基因研究中的应用. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2012, 43(1): 1-6
Hu X, Qi X L, Lv B, Wu J J, Fu D L. TILLING-based analysis of disease resistance genes in barley. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science*, 2012, 43(1): 1-6
- [30] Mascher M, Gundlach H, Himmelbach A, Beier S, Twardziok S O, Wicker T, Radchuk V, Dockter C, Hedley P E, Russell J, Bayer M, Ramsay L, Liu H, Haberer G, Zhang X Q, Zhang Q, Barrero R A, Li L, Taudien S, Groth M, Felder M, Hastie A, Simkova H, Stankova H, Vrana J, Chan S, Munoz-Amatriain M, Ounit R, Wanamaker S, Bolser D, Colmsee C, Schmutzer T, Aliyeva-Schnorr L, Grasso S, Tanskanen J, Chailan A, Sampath D, Heavens D, Clissold L, Cao S, Chapman B, Dai F, Han Y, Li H, Li X, Lin C, McCooke J K, Tan C, Wang P, Wang S, Yin S, Zhou G, Poland J A, Bellgard M I, Borisjuk L, Houben A, Dolezel J, Ayling S, Lonardi S, Kersey P, Langridge P, Muehlbauer G J, Clark M D, Caccamo M, Schulman A H, Mayer K F X, Platzer M, Close T J, Scholz U, Hansson M, Zhang G, Braumann I, Spannagl M, Li C, Waugh R, Stein N. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 2017, 544(7651): 427-433
- [31] 刘翔. EMS 诱变技术在植物育种中的研究进展. *激光生物学报*, 2014, 23(3): 197-201
Liu X. Progresses on EMS mutagenesis in plant breeding. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 23(3): 197-201
- [32] Maple J, Moller S G. Mutagenesis in *Arabidopsis*. *Methods of Molecular Biology*, 2007, 362: 197-206
- [33] 王长里, 付晶, 杨学举. EMS 诱导小麦突变体的研究及展望. *安徽农业科学*, 2008, 36(19): 8038-8039
Wang C L, Fu J, Yang X J. Study and prospect of EMS induction on wheat mutants. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2008, 36(19): 8038-8039
- [34] 夏曾润, 杜凤凤, 李德, 张吉宇, 刘勇, 霍雅馨, 孔令芳. 紫花苜蓿 EMS 突变体库的构建和形态学性状鉴定. *草业学报*, 2014, 23(2): 215-222
Xia Z R, Du F F, Li C, Zhang J Y, Liu Y, Huo Y X, Kong L F. Construction of an EMS induced mutant library and identification of morphological characteristics in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(2): 215-222
- [35] 慎家辉, 秦安, 李甲明, 刘伦, 吴俊. 甲基磺酸乙酯诱变杜梨种子突变的鉴定与分析. *浙江农林大学学报*, 2014, 31(6): 892-897
Shen J H, Qin A, Li J M, Liu L, Wu J. Identification and analysis of EMS-induced seed mutants in *Pyrus betulifolia*. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2014, 31(6): 892-897
- [36] 陈丽, 董举文, 唐寅, 陈明亮, 宋学孟. EMS 诱变处理定向筛选杨树耐盐突变体研究. *上海农业学报*, 2007, 23(3): 86-91
Chen L, Dong J W, Tang Y, Chen M L, Song X M. Selection of salt-tolerant mutants from ethyl methanesulfonate-mutagenized poplar embryonic calli. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2007, 23(3): 86-91