

# 大白菜突变体库的构建及 $M_2$ 叶片表型变异的研究

卢 银, 刘梦洋, 赵建军, 王彦华, 罗双霞, 轩淑欣, 代双燕, 王超硕, 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, 河北保定 071001)

**摘 要:** 利用不同浓度甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变大白菜自交系 ‘A03’ 种子, 根据  $M_1$  代植株发芽率、成活率、育性及  $M_2$  代成活率, 筛选出适宜的 EMS 诱变浓度为 0.4%。采取 EMS 种子诱变 1 次、EMS 种子诱变 2 次及 EMS 花蕾诱变结合小孢子培养的方法构建了含有 4 253 个家系及相应自交  $M_2$  代种子的大白菜突变体库。在该突变体库  $M_2$  群体中分别对苗期 6 404 株幼苗及莲座期 7 756 个单株的叶片性状进行了形态学调查, 总的表型变异频率高达 37.62% 和 26.33%。

**关键词:** 大白菜; EMS; 突变体库; 诱变

**中图分类号:** S 634.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 08-1609-11

## Construction of One Mutant Library and Research on Phenotypic Variation of $M_2$ Population Leaves in Chinese Cabbage

LU Yin, LIU Meng-yang, ZHAO Jian-jun, WANG Yan-hua, LUO Shuang-xia, XUAN Shu-xin, DAI Shuang-yan, WANG Chao-shuo, and SHEN Shu-xing\*

(Key Laboratory for Vegetable Germplasm Enhancement and Utilization of Hebei, College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** Seeds of the Chinese cabbage inbred line ‘A03’ were treated by EMS with different concentrations in this study. The suitable EMS concentration for seed mutagenesis was determined as 0.4% by studying the germination rate, survival rate, fertility of  $M_1$  plants and survival rate of  $M_2$  individuals. By three ways of one time seeds treatment with EMS, two times of seeds treatment with EMS, and buds treatment with EMS combined with microspore culture, the Chinese cabbage mutant library contained 4 253  $M_1$  families and their selfing seeds of  $M_2$  was constructed. For  $M_2$  individuals in the mutant library, leaf phenotypic traits of 6 404 seedlings at seedling stage and 7 756 plants at rosette stage were investigated, resulting in total mutant frequency of 37.62% and 26.33%, respectively.

**Key words:** *Brassica rapa*; EMS; mutant library; mutagenesis

收稿日期: 2014 - 04 - 29; 修回日期: 2014 - 07 - 28

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

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@hebau.edu.cn)

随着大量生物基因组序列的公布,发现新基因和认知基因的功能成为当前功能基因组学研究的紧迫任务 (Lin et al., 2013; Tsai et al., 2013)。正向和反向遗传学方法对基因组进行分析是功能基因组学研究的两种有效途径 (Chantreau et al., 2013)。正向遗传学着眼于表型或性状的改变,进而找到对应的突变基因,并揭示其功能;反向遗传学则是从基因的变化出发,鉴定突变类型,最终确定该基因的功能 (Gilchrist et al., 2013)。然而无论采用何种途径和方法,都离不开基因的变异,突变体作为功能基因组学研究的重要材料,愈发受到重视 (Rigola et al., 2009)。突变体库的建立使突变尽可能覆盖所研究作物的整个基因组,从而结合已知序列信息对基因功能进行规模化、系统化研究 (Tee & Wong, 2013)。

通过直接理化诱变能够高效迅速地获得更多有价值的突变材料 (Kuroyanagi et al., 2013)。甲基磺酸乙酯 (Ethyl methane sulfonate, EMS) 是目前应用最广泛的化学诱变剂之一 (Shiwa et al., 2012), 可以通过与核苷酸中的嘌呤、嘧啶反应直接改变 DNA 结构诱发点突变 (Kurowska et al., 2011)。EMS 诱变操作简便, 高效, 突变范围广, 能够产生无义突变、错义突变、剪接突变和顺势调控突变等多种变异类型, 且这些变异多为能够稳定遗传的显性突变, 无需遗传转化, 染色体畸变相对较少, 是当前构建大规模饱和突变体库的理想诱变方法 (Chawade et al., 2010; Lochlainn et al., 2011; Harloff et al., 2012; Silué et al., 2013)。

大白菜 (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* L.) 与模式植物拟南芥同属十字花科, 基因组存在高度相似性 (Trick et al., 2009; Navabi et al., 2013)。大量的拟南芥基因功能信息的阐明, 为白菜功能基因组的研究架起了桥梁 (Lloyd & Meinke, 2012)。2011 年, 大白菜全基因组测序顺利完成 (Wang et al., 2011), 随后 BRAD (*Brassica* Database, <http://brassicadb.org/brad/>) 数据库成功构建 (Cheng et al., 2011), 如何合理利用这些有效资源深入系统研究大白菜功能基因成为研究热点, 构建一定规模的大白菜突变体库是当前最有效的手段。目前在英国有成功构建油用白菜 ‘R-O-18’ 突变体库的报道 (Stephenson et al., 2012), 国内尚无相关报道。本研究中以优质大白菜自交系为材料, 通过 EMS 诱变的方法构建大白菜突变体库, 分析突变群体的表型变异特点, 旨在拓宽大白菜遗传背景, 为大白菜功能基因组研究和新品种选育提供基础材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

供试材料 ‘A03’ 是二倍体大白菜纯合自交系, 为抗热早熟品种 ‘夏阳’ × ‘光辉’ 杂交一代的 DH 系 (即小孢子后代), 该基因型自交亲和, 抗性较强, 配合力高, 适于进行小孢子培养, 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 公司生产, 以 pH 7 的磷酸缓冲液稀释配制。

### 1.2 EMS 诱变处理剂量筛选

选取 ‘A03’ 饱满种子 1 000 粒, 为  $M_0$  代, 分 5 组, 每组 200 粒, 常温浸种 2 h 后, 分别用 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 的 EMS 诱变剂浸泡处理 16 h, 期间每隔 1 h 震荡摇匀 1 次, 处理完毕后弃去 EMS 诱变剂, 清水冲洗 2 h, 自然晾干, 为  $M_1$  代种子。

于 2012 年 1 月播种至河北农业大学试验基地温室内育苗, 经低温春化后, 3 月底定植于温室。5 月初盛花期套袋, 单株收获  $M_2$  代种子, 统计种子收获情况并计算花期亲和指数 (单株收获种子数/单株套袋内花蕾个数), 每株  $M_1$  收获的种子为 1 个家系。每个家系选取种子 100 粒, 于 2012 年 8

月播种育苗，观察 M<sub>2</sub> 代种子的萌发情况，7 d 统计发芽率，30 d 统计成活率。

1.3 M<sub>1</sub> 群体及 M<sub>2</sub> 种子库的构建

1.3.1 EMS 种子诱变

2013 年 1 月，以 0.4% EMS 诱变剂分别处理未经诱变处理的饱满种子 1 200 粒(1 次 EMS 处理)，2012 年经 0.4% EMS 诱变处理 16 h 后成活植株所收获饱满种子 12 000 粒(2 次 EMS 处理)，处理时间为 16 h，方法同上。将处理后的种子播种至穴盘内进行育苗，3 月初定植于大棚内，共成活 5 396 个单株，构成大白菜突变体库 M<sub>1</sub> 代群体。盛花期对该群体所有植株进行套袋使其自然结籽，单株收获种子，共得到 4 253 份种子(每份 10~300 粒)，构成突变体库的种子库。

1.3.2 EMS 花蕾诱变结合小孢子培养

2012 年 5 月，选取‘A03’盛花期处于单核中期至双核期的花蕾，浸泡于 0.05% EMS 诱变剂中，分别震荡处理 5~15 min，用无菌水冲洗若干次后进行小孢子培养(申书兴等，1999)，20~25 d 调查出胚率(出胚数/诱变处理的花蕾数)，待胚发育成子叶型，光照培养 48~72 h，并转接至固体培养基内进行植株再生培养，统计成苗率(成苗数/出胚数)。12 月，将成活的小孢子苗移栽入营养钵内，经低温春化后，与 2013 年 2 月底定植于温室内，构成 DHM<sub>1</sub> 代群体。该群体由 122 个不同胚胎发育成的植株组成，并入突变体库 M<sub>1</sub> 群体，盛花期套袋，单株收获 DHM<sub>2</sub> 代种子，并入突变体库种子库。

1.4 M<sub>2</sub> 单株的营养生长阶段叶片性状调查

每个家系选择 2~6 粒饱满的种子，2013 年 8 月中旬播种，9 月初定植，共定植于 6 个分区内，每区 12~140 畦不等，每隔 7 畦种 1 畦亲本作为对照。其中种子诱变后代每个家系选取 2 株健康植株(部分家系仅存活 1 株或无成活株)，DH 后代每个家系选取 1 株，最终共成活 7 756 株，构成突变体库 M<sub>2</sub> 代群体，种植野生型对照 700 株。采取标准化和规范化的田间管理，避免病虫害的侵蚀。

参考农业部大白菜 DUS 标准，以野生型‘A03’为对照，对营养生长阶段叶片性状变异进行调查，因部分突变表型为非标准性状而稍作修改，主要调查项目有：苗期子叶及第 1~3 片真叶的叶片性状、莲座期莲座叶相关性状。其中，苗期调查对象为突变体库 M<sub>2</sub> 群体中 3 575 个家系的 6 404 株幼苗，莲座期叶片调查对象为所有 M<sub>2</sub> 成活株。

2 结果与分析

2.1 EMS 种子诱变剂量

如表 1 所示，随着 EMS 浓度的增加，大白菜 M<sub>1</sub> 种子的发芽率、成活率、育性、花期亲和指数

表 1 不同浓度 EMS 处理对大白菜种子对后代成活率及育性的影响  
Table 1 Effects of different EMS concentrations on survival rate and fertility of offsprings

| EMS/% | M <sub>1</sub>            |                        |  |   | M <sub>2</sub> 成活率/%<br>Survival rate of M <sub>2</sub> |
|-------|---------------------------|------------------------|--|---|---|
|       | 发芽率/%<br>Germination rate | 成活率/%<br>Survival rate | 结籽植株所占比例/%<br>Rate of seed-setting plant | 平均花期亲和指数<br>Average index of flowering affinity |   |
| 0     | 98.5                      | 98.5                   | 100.0                                    | 16.10   | 100.0   |
| 0.2   | 83.0                      | 83.0                   | 100.0                                    | 11.70   | 100.0   |
| 0.4   | 55.5                      | 51.0                   | 90.2                                     | 6.90  | 98.7  |
| 0.6   | 48.5                      | 32.5                   | 67.6                                     | 1.11  | 70.0  |
| 0.8   | 26.0                      | 18.5                   | 73.0                                     | 0.13  | 51.9  |

及 M<sub>2</sub> 植株成活率都有所下降,发育速度逐渐变慢。表明,EMS 诱变不仅可使诱变当代部分致死,还会因其所产生的可遗传变异影响 M<sub>2</sub> 植株活力,正常开花结籽收获种子的能力和花期自交的亲和指数等。虽然结果中 EMS 浓度为 0.6%时,M<sub>1</sub> 种子发芽率接近半致死,但成活率仅为 32.5%,不利于突变体 M<sub>2</sub> 群体的构建。综合比较,最终选择 EMS 0.4%为建突变体库的适宜处理浓度。

2.2 大白菜突变体库

用 0.4% EMS 诱变处理 13 200 粒种子(包括 EMS 诱变 1 次种子 12 000 粒和未处理种子 1 200 粒),最终获得 5 396 个 M<sub>1</sub> 单株,平均成活率为 40.9%,4 158 个 M<sub>1</sub> 单株自交获得 M<sub>2</sub> 种子,占成活株的 77%。其中,1 次种子诱变处理的成活率和结籽植株比例分别为 52%和 89.1%,连续诱变种子 2 次,成活率、结籽植株比例及 M<sub>2</sub> 成活率均有所下降(表 2),表明连续 EMS 诱变可能产生更多的机械损伤和致死突变从而影响成活和结籽情况。

通过 EMS 诱变花蕾后结合小孢子培养的方法获得突变体,小孢子出胚率为 4.9 胚/蕾、胚胎成苗率为 15.9%,远低于对照的出胚率(12.4 胚/蕾)和成苗率(78.2%),且出现大量畸形胚和畸形苗,可见 EMS 诱变花蕾使小孢子受到一定的生物学损伤并直接影响了小孢子的发育。DHM<sub>1</sub> 中可正常开花产粉的 122 个单株中,有 95 株获得了饱满的 DHM<sub>2</sub> 种子,结籽比率仅为 77.9%(表 2),且其中 26 个家系获得的种子数均不足 10 粒。

本试验通过 EMS 种子诱变及花蕾诱变结合小孢子培养的方法构建了含有 4 253 个家系的大白菜突变体库及种子库。在 M<sub>2</sub> 代群体的构建中,共获得了 4 004 个家系的 7 756 个 M<sub>2</sub> 单株(表 2)。

表 2 突变体库构建过程中不同处理下 M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub> 成活率及育性  
Table 2 Survival rate and fertility of different treatments on M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> during the construction of mutant library

| EMS 处理方式<br>EMS treating  | 种子粒数<br>Number of seed | M <sub>1</sub>                 |                       |                                       |                         |                                  |                                    | M <sub>2</sub> 成活株<br>Number of M <sub>2</sub> survive |
|---|------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--|
|   |                        | 成活株<br>Number of survive plant | 成活率/%<br>Survive rate | 结籽株比例/%<br>Rate of seed-setting Plant | 家系数<br>Number of family | 成活家系<br>Number of survive family | 成活家系比例/%<br>Survive rate of family |  |
| 种子诱变 1 次<br>Once seeds treatment  | 1 200                  | 624                            | 52.0                  | 89.1                                  | 556                     | 534                              | 96.0                               | 1 025  |
| 种子诱变 2 次<br>Twice seeds treatment   | 12 000                 | 4 772                          | 39.8                  | 75.5                                  | 3 602                   | 3 381                            | 85.9                               | 6 642  |
| 花蕾诱变结合<br>小孢子培养<br>Buds treatment<br>combined with<br>microspore<br>culture | -                      | 122                            | -                     | 77.9                                  | 95                      | 89                               | 93.7                               | 89   |
| 总数<br>Total number  | 13 200                 | 5 518                          | -                     | 77.1                                  | 4 253                   | 4 004                            | 94.1                               | 7 756  |

2.3 大白菜突变体库 M<sub>2</sub> 群体叶片表型变异

2.3.1 苗期叶片表型变异

对突变体库部分 M<sub>2</sub> 植株苗期叶片性状进行调查,野生型‘A03’子叶为两片心形,真叶为倒卵形,叶色绿(图 1, 1)。



图 1 大白菜突变体库  $M_2$  群体苗期叶片性状变异

1: 野生型; 2: 子叶黄化; 3: 子叶部分黄化; 4: 子叶白化; 5: 子叶部分白化; 6: 单子叶; 7: 三子叶; 8: 四子叶; 9: 五子叶; 10: 椭圆形子叶; 11: 三瓣子叶; 12: 四瓣子叶; 13: 五瓣子叶; 14: 六瓣子叶; 15: 七瓣子叶; 16~20: 子叶畸形; 21: 真叶白化; 22: 真叶部分白化; 23: 真叶黄化; 24: 真叶部分黄化; 25: 真叶叶色不均匀; 26、27: 真叶叶色浅; 28: 真叶叶色深; 29: 真叶细长; 30、31: 真叶缺刻; 32、33: 连叶; 34: 真叶卷曲; 35~37: 真叶畸形; 38: 无真叶; 39: 真叶外生; 40: 真叶坏死。

Fig. 1 Variation in leaf traits at seedling stage of  $M_2$  individuals in mutant library

1: Wild type; 2: Yellowish cotyledon; 3: Partially yellowish cotyledon; 4: Albino cotyledon; 5: Partially albino cotyledon; 6: Monocotyledon; 7: Tricotyledon; 8: Tetracotyledon; 9: Pentacotyledon; 10: Oval cotyledon; 11: Trivalve cotyledon; 12: Tetravalve cotyledon; 13: Pentavalve cotyledon; 14: Hexavalve cotyledon; 15: Heptavalve cotyledon; 16 - 20: Malformed cotyledon; 21: Albino euphylla; 22: Partially albino euphylla; 23: Yellowish euphylla; 24: Partially yellowish euphylla; 25: Variegated euphylla; 26, 27: Light colored euphylla; 28: Dark colored euphylla; 29: Slender euphylla; 30, 31: Incision euphylla; 32, 33: Cotermious euphylla; 34: Curly euphylla; 35 - 37: Malformed euphylla; 38: Euphyllaless; 39: Euphylla growth and cotyledon growth points are not in the same position; 40: Euphylla necrosis.



M<sub>2</sub> 群体中苗期子叶性状变异主要表现为黄化（图 1，2、3）、白化（图 1，4、5）、叶片数量变异（图 1，6~9）、和叶片形状变异（图 1，10~20）。其中，子叶全部白化的幼苗有 8 株，后期仅存活 1 株且真叶颜色正常，子叶全部黄化的幼苗 29 株，后期存活 11 株，其中 10 株真叶叶色正常，1 株真叶叶色浅绿且不均匀（图 1，27）。真叶突变性状以叶色（图 1，21~28）和叶形变异（图 1，29~37）为主，还出现了无真叶（图 1，38）、真叶外生（真叶与子叶从不同生长点生出，图 1，39）和子叶正常真叶枯死（图 1，40）的变异株。其中真叶全部白化的共 12 株，全部为子叶颜色正常植株。此外，M<sub>2</sub> 群体苗期生长不整齐，出苗时间比较一致，但幼苗大小不一，开始抽生真叶的时间最长相差 6 d。

调查结果表明，该群体中 1 677 个家系的 2 409 个植株的子叶或真叶出现表型变异，总变异频率高达 37.61%（表 3）。

表 3 大白菜突变体库 M<sub>2</sub> 群体苗期叶片变异统计  
Table 3 Variation in leaf of the M<sub>2</sub> individuals at seedling stage in Chinese cabbage mutant library

| 性状<br>Character           | 描述<br>Description   | 株数<br>Number of<br>plant | 调查总株数<br>Total number | 频率/%<br>Frequency |
|---------------------------|---|--------------------------|-----------------------|-------------------|
| 子叶颜色<br>Cotyledon colour  | 白化或部分白化 Albino or partially albino                            | 20                       | 6 404                 | 0.31              |
|                           | 黄化或部分黄化 Yellowish or partially yellowish                      | 42                       | 6 404                 | 0.66              |
| 子叶叶片数<br>Cotyledon number | 1 片 Monocotyledon   | 356                      | 6 404                 | 5.56              |
|                           | 3 片 Tricotyledon  | 769                      | 6 404                 | 12.01             |
|                           | 4 片 Tetracotyledon  | 14                       | 6 404                 | 0.22              |
|                           | 5 片 Pentacotyledon  | 1                        | 6 404                 | 0.02              |
| 子叶形状<br>Cotyledon shape   | 椭圆形 Oval  | 22                       | 6 404                 | 0.34              |
|                           | 3 瓣 Trivalve  | 935                      | 6 404                 | 14.60             |
|                           | 4 瓣 Tetra valve   | 296                      | 6 404                 | 4.62              |
|                           | 5 瓣 Penta valve   | 77                       | 6 404                 | 1.20              |
|                           | 6 瓣 Hexa valve  | 25                       | 6 404                 | 0.39              |
|                           | 7 瓣 Hepta valve   | 4                        | 6 404                 | 0.06              |
|                           | 子叶畸形 Malformed  | 19                       | 6 404                 | 0.30              |
| 真叶颜色<br>Euphylla colour   | 白化或部分白化 Albino or partially albino                            | 22                       | 6 404                 | 0.34              |
|                           | 黄化或部分黄化 Yellowish or partially yellowish                      | 62                       | 6 404                 | 0.97              |
|                           | 浅 Light-colored   | 3                        | 6 404                 | 0.05              |
|                           | 深 Dark-colored  | 6                        | 6 404                 | 0.09              |
|                           | 不均匀 Variegated  | 5                        | 6 404                 | 0.08              |
| 真叶形状<br>Euphylla shape    | 细长 Slender  | 5                        | 6 404                 | 0.08              |
|                           | 连叶 Cotermious   | 20                       | 6 404                 | 0.31              |
|                           | 缺刻 Incision   | 6                        | 6 404                 | 0.09              |
|                           | 卷曲 Curly  | 4                        | 6 404                 | 0.06              |
|                           | 畸形 Malformed  | 22                       | 6 404                 | 0.34              |
| 其他<br>Others              | 无真叶 Euphyllaless  | 5                        | 6 404                 | 0.08              |
|                           | 真叶外生 Euphylla and cotyledon growth in different growing point | 30                       | 6 404                 | 0.47              |
|                           | 真叶枯死 Euphylla necrosis  | 4                        | 6 404                 | 0.06              |
| 总数 Total number           | 苗期叶片变异 Variation in leaves at seedling stage                  | 2 409                    | 6 404                 | 37.61             |

2.3.2 莲座期叶片表型变异

以野生型‘A03’为对照，对突变体库 M<sub>2</sub> 群体的 7 756 株大白菜进行莲座期叶片表型变异的调查，共发现 2 042 株明显变异材料，包含多种变异类型（图 2，表 4）。

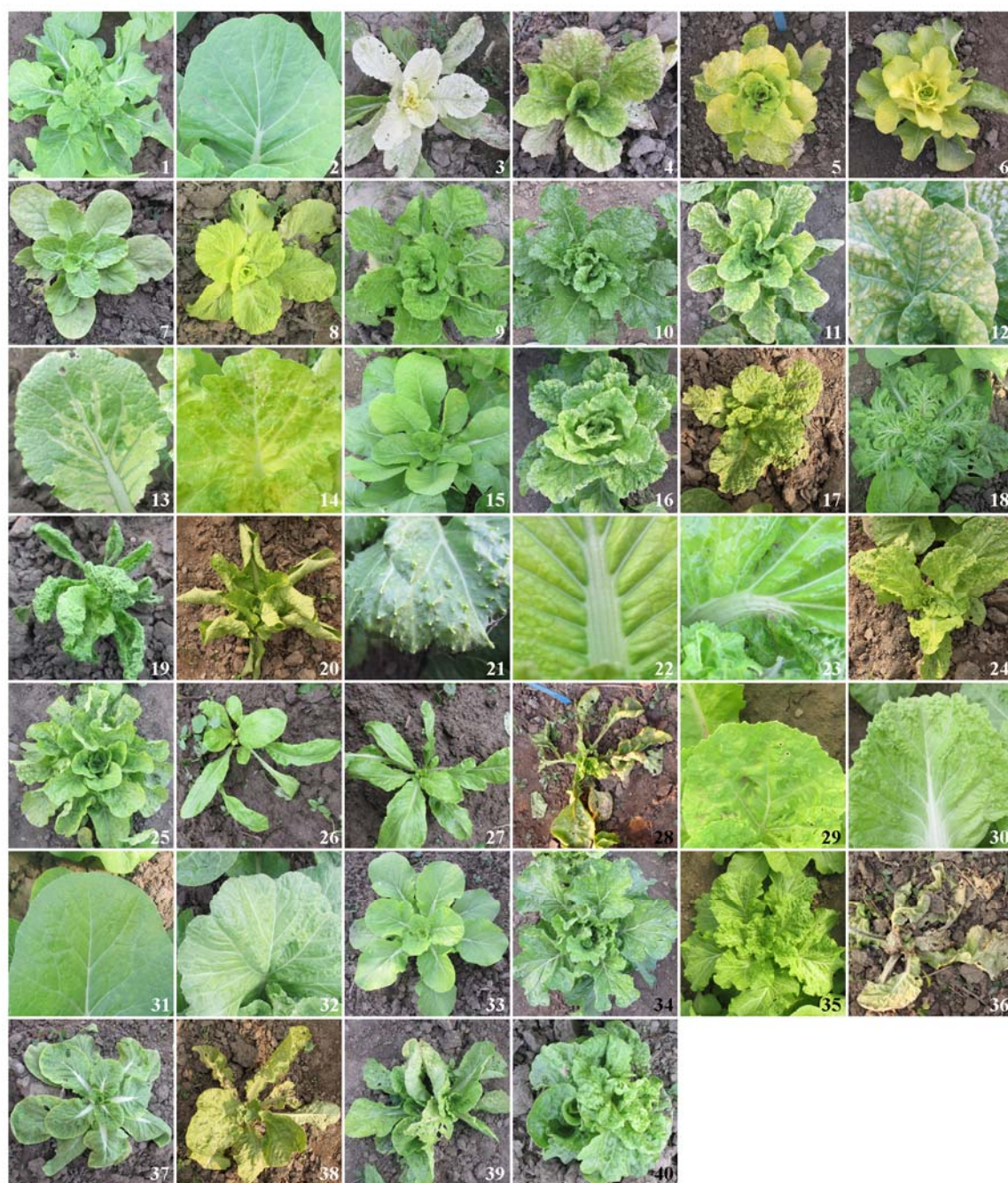


图2 大白菜突变体库  $M_2$  群体莲座期叶性状变异

1、2: 野生型; 3: 叶片白化; 4: 叶片部分白化; 5: 叶片黄化; 6: 叶片部分黄化; 7: 叶色浅; 8: 叶色黄绿; 9、10: 叶色深; 11~14: 叶色不均匀; 15: 叶面平; 16: 叶面多皱; 17: 叶面泡皱; 18、19: 叶片皱缩; 20: 叶片卷曲; 21: 茸毛变异; 22、23: 叶脉变异; 24: 叶片数少; 25: 叶片数多; 26、27: 叶形变异; 28: 叶片畸形; 29: 叶缘单锯齿; 30: 叶缘复锯齿; 31: 叶缘全缘; 32: 叶缘缺刻; 33: 叶缘无波; 34: 叶缘中波; 35: 叶缘小波; 36: 叶片枯死; 37: 叶片萎蔫; 38: 无生长点; 39、40: 双生长点。

Fig. 2 Variation in leaf traits in the rosette period of  $M_2$  individuals in mutant library

1: Wild type; 2: Leaf of wild type; 3: Albino leaf; 4: Partially albino leaf; 5: Yellowish leaf; 6: Partially yellowish leaf; 7: Light colored leaf; 8: Yellow green leaf; 9, 10: Dark colored leaf; 11~14: Variegated leaf; 15: Foliar smooth; 16: Foliar rugose; 17: Foliar vesicular corrugation; 18, 19: Crimple leaf; 20: Curly leaf; 21: Mutation of pubescence; 22, 23: Mutation of vein; 24: Less leaf mutation; 25: More leaf mutation; 26, 27: Mutation of phylliform; 28: Malformed leaf; 29: Serrated leaf margin; 30: Multiple serrated leaf margin; 31: Entire leaf margin; 32: Leaf margin incision; 33: Leaf margin without wavy; 34: Leaf margin with medium wavy; 35: Leaf margin with small wavy; 36: Necrosis; 37: Wilting; 38: Meristem deletion; 39, 40: Multi-meristem.

‘A03’野生型莲座期叶片表型为：叶色绿，稍皱，叶缘钝锯、大波（图2，1、2）。突变体库中叶片变异以叶色（图2，1~15）和叶面变异为主，变异株数分别为667株和900株，此外还有茸毛（图2，21）、叶脉（图2，22、23）、叶片厚度、叶片数量（图2，24、25）、叶形（图2，26、27）、叶缘（图2，29~35）变异及其他变异类型（图2，36~40）。其中，叶色变异类型丰富，如白化株中有全白化株、最外层叶绿色其余叶片白化株（图2，3）、外叶白化新生叶逐渐正常的植株（图2，4）及叶片出现白斑、白边等植株；黄化株除上述不同位置黄化外，还表现为深浅不同的黄色（图2，5、6）；叶色黄绿（图2，8）、浅（图2，7）、深（图2，9、10）的变异株也有多种不同颜色；叶色不均匀表现则更为多样化，有绿色与桔黄（图2，11、12）、深浅绿（图2，13）、绿与黄绿（图2，14）等多种变异类型。

表 4 M<sub>2</sub>群体莲座期叶片变异统计  
Table 4 Variation in leaf of the M<sub>2</sub> individuals at rosette stage

| 性状<br>Character        | 描述<br>Description                             | 株数<br>Number of plant | 调查总株数<br>Total number | 频率/%<br>Frequency |
|------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 叶色<br>Leaf color       | 白化或部分白化 Albino or partially albino            | 38                    | 7 756                 | 0.49              |
|                        | 黄化或部分黄化 Yellowish or partially yellowish      | 226                   | 7 756                 | 2.91              |
|                        | 浅 Light-colored                               | 180                   | 7 756                 | 2.32              |
|                        | 深 Dark-colored                                | 98                    | 7 756                 | 1.26              |
|                        | 黄绿 Yellow green                               | 79                    | 7 756                 | 1.02              |
|                        | 不均匀 Variegated                                | 39                    | 7 756                 | 0.50              |
|                        | 叶光泽变异 Leaf gloss variation                    | 17                    | 7 756                 | 0.22              |
| 叶面<br>leaf surface     | 泡皱 Vesicular corrugation                      | 116                   | 7 756                 | 1.50              |
|                        | 多皱 Rugose                                     | 300                   | 7 756                 | 3.87              |
|                        | 平 Smooth                                      | 239                   | 7 756                 | 3.08              |
|                        | 严重皱缩 Leaf crimple                             | 6                     | 7 756                 | 0.08              |
|                        | 叶片卷曲 Leaf cruly                               | 239                   | 7 756                 | 0.31              |
| 茸毛<br>Pubescence       | 茸毛多 Multi-pubescence                          | 11                    | 7 756                 | 0.14              |
|                        | 茸毛少或无茸毛 Less or non-pubescence                | 35                    | 7 756                 | 0.46              |
|                        | 茸毛畸形 Pubescence malformed                     | 3                     | 7 756                 | 0.04              |
| 叶脉 Leaf vein           | 叶脉变异 Leaf vein variation                      | 12                    | 7 756                 | 0.15              |
| 叶片厚度<br>Leaf thickness | 厚 Thick                                       | 28                    | 7 756                 | 0.36              |
|                        | 薄 Thin  | 3                     | 7 756                 | 0.04              |
| 叶片数量<br>Leaf number    | 叶片数多 More leaf mutation                       | 61                    | 7 756                 | 0.79              |
|                        | 叶片数少 Less leaf mutation                       | 88                    | 7 756                 | 1.13              |
| 叶形<br>Phylliform       | 叶形变异 Mutation of phylliform                   | 16                    | 7 756                 | 0.21              |
|                        | 叶片畸形 Malformed leaf                           | 40                    | 7 756                 | 0.52              |
| 叶缘<br>Leaf margin      | 叶缘单锯 Serrated leaf margin                     | 8                     | 7 756                 | 0.10              |
|                        | 叶缘复锯 Multiple serrated leaf margin            | 1                     | 7 756                 | 0.01              |
|                        | 叶缘全缘 Entire leaf margin                       | 101                   | 7 756                 | 1.30              |
|                        | 叶缘无波 Leaf margin without wavy                 | 312                   | 7 756                 | 4.02              |
|                        | 叶缘中波 Leaf margin with medium wavy             | 92                    | 7 756                 | 1.19              |
|                        | 叶缘小波 Leaf margin with small wavy              | 112                   | 7 756                 | 1.44              |
| 其他<br>Others           | 叶片枯萎 Leaf wither                              | 76                    | 7 756                 | 0.98              |
|                        | 虫咬严重 Insect bites seriously                   | 45                    | 7 756                 | 0.58              |
|                        | 多生长点 Multi-meristem                           | 23                    | 7 756                 | 0.30              |
|                        | 无生长点 Meristem deletion                        | 28                    | 7 756                 | 0.36              |
| 总数<br>Total number     | 莲座期叶片变异<br>Variation in leaf at rosette stage | 2 042                 | 7 756                 | 26.33             |



### 3 讨论

#### 3.1 大白菜突变体库构建方法的选择

目前利用 EMS 诱变已经成功构建拟南芥 (Chiu et al., 2007)、水稻 (Wang et al., 2013)、大豆 (Cooper et al., 2008)、大麦 (Caldwell et al., 2004)、小麦 (Slade et al., 2005)、花生 (Knoll et al., 2011)、玉米 (Till et al., 2004)、画眉草 (Zhu et al., 2012)、番茄 (Minoia et al., 2010)、油菜型甘蓝 (Wang et al., 2008)、梨 (Liu et al., 2012) 等突变体库, 在这些作物功能基因组的研究上发挥了巨大的作用。

通过 EMS 诱变获得突变体的报道中, 多以发芽率达到半致死作为选择适宜浓度的标准。为了保证一定规模突变体库的构建, 除了尽可能增加浓度提高诱变频率外, 还必须保证得到足够多的可遗传后代和足够用于进一步研究和筛选的种子 (Rawat et al., 2012)。本试验中综合考虑上述因素, 确定了大白菜突变体库构建的适宜 EMS 处理浓度为 0.4%。Stephenson 等 (2012) 建立的油用白菜 ‘R-O-18’ 突变体库即以 0.3% 和 0.4% 的 EMS 浓度分别构建了数量为 3 464 株和 1 564 株的  $M_1$  诱变群体, 本试验中所选 0.4% 的浓度与其一致。

在本研究中, 将 EMS 诱变植株所获得的种子再次进行诱变, 新的突变不受限于已携带的突变, 且可以进一步增加突变频率, 尽可能实现饱和突变体库的构建。

以种子进行诱变处理得到的  $M_1$  植株是复杂的突变嵌合体, 因此对  $M_1$  一般不进行选择。 $M_2$  植株一般不继承  $M_1$  生物学损伤, 且所携带的可遗传变异会在这一代表现出最大范围的分离。因此, 在突变体库表型调查中主要针对  $M_2$  群体。若将 EMS 诱变与小孢子培养结合, 诱变后代所含突变均为纯合的突变, 因此  $DHM_1$  代表型变异即可直接作为变异材料保存记录。通过无性组织培养方法获得突变体的报道很多, 但是以该方法构建突变体库尚无报道 (Prem et al., 2012)。该方法可以得到纯合的突变群体, 有益于基因功能研究的快速开展。但受限于作物基因型, 小孢子培养技术流程、操作及 EMS 诱导的未知生物学损伤等多种因素, 不利于高效、稳定有计划地构建大规模突变群体, 因此以该方法单独大规模构建突变体库的技术仍需进一步摸索。

#### 3.2 大白菜突变体库 $M_2$ 表型变异的调查与固定

为了尽可能避免环境因素产生的影响, 本试验中播种的方法采用了直播和育苗两种方法, 且将 7 756 个  $M_2$  单株分别种植于露地及塑料大棚两种环境下, 进行标准化管理; 且共种植了近 700 株野生型植株作为调查的对照, 同时, 在调查过程中, 若出现群发性表型差异 (即某一区域内植株均出现同一变异性状), 则不作为变异类型进行统计。在性状调查中, 苗期性状调查主要针对育苗的部分材料开展, 调查发现, 苗期子叶与真叶变异相关性不大, 仅有 3 个单株出现了相同的叶色变异 (图 1, 2, 5), 其他变异均无相互干扰。此外, 本研究中对苗期和莲座期叶片性状的调查为两个独立的试验过程, 将两个调查结果进行对比分析发现, 在莲座期, 仅 5 株叶色变异株, 1 株极端皱缩变异株 (图 1, 34; 图 2, 19) 与苗期真叶表型一致, 其他表型变异均无明显关联性。此外, 本试验还继续对  $M_2$  群体结球期及生殖生长阶段等各时期多种性状进行了调查汇总, 结球期各种表型变异总频率为 21.65%, 生殖生长阶段为 23.9%。由此可见, 本试验构建了一个表型变异丰富的突变体库。

为了更好地固定各种变异材料, 除了妥善保存  $M_2$  各家系种子库, 及对部分  $M_2$  植株自交授粉收获了  $M_3$  种子外, 还对每个  $M_2$  单株进行了取样冻存, 并在各个时期性状调查的同时逐一进行拍照, 形成了各个时期的照片库, 实现了叶片 DNA、性状调查数据及各时期照片的一一关联, 为进一步研究奠定了基础。

## References

- Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer G J, Marshall D F, Waugh R. 2004. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley. *The Plant Journal*, 40 (1): 143 – 150.
- Chantreau M, Grec S, Gutierrez L, Dalmais M, Pineau C, Demailly H, Leroux C P, Tavernier R, Trouvé J P, Chatterjee M, Guillot X, Brunaud V, Chabbert B, Wuytswinkel O V, Bendahmane A, Thomasset B, Hawkins S. 2013. PT-Flax (phenotyping and TILLING of flax): Development of a flax (*Linum usitatissimum* L.) mutant population and TILLING platform for forward and reverse genetics. *BMC Plant Biology*, 13: 159 – 173.
- Chawade A, Sikora P, Bräutigam M, Larsson M, Vivekanand V, Nakash M A, Chen T, Olsson O. 2010. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and  $\beta$ -glucan biosynthesis genes. *BMC Plant Biology*, 10: 86 – 98.
- Cheng F, Liu S Y, Wu J, Fang L, Sun S L, Liu B, Li P X, Hua H, Wang X W. 2011. BRAD, the genetics and genomics database for *Brassica* plants. *BMC Plant Biology*, 11: 136 – 141.
- Chiu W H, Chandler J, Cnops G, Lijsebettens M V, Werr W. 2007. Mutations in the *TORNADO2* gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 63 (6): 731 – 744.
- Cooper J L, Till B J, Laport R G, Darlow M C, Kleffner J M, Jamai A, Mellouki T E, Liu S M, Ritchie R, Nielsen N, Bilyeu K D, Meksem K, Comai L, Henikoff S. 2008. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology*, 8: 9.
- Gilchrist E J, Sidebottom C H D, Koh C S, MacInnes T, Sharpe A G, Haughn G W. 2013. A mutant *Brassica napus* (Canola) population for the identification of new genetic diversity via TILLING and next generation sequencing. *PLoS ONE*, 8 (12): e84303.
- Harloff H J, Lemcke S, Mittasch J, Frolov A, Wu J G, Dreyer F, Leckband G, Jung C. 2012. A mutation screening platform for rapeseed (*Brassica napus* L.) and the detection of sinapine biosynthesis mutants. *Theoretical and Applied Genetics*, 124: 957 – 969.
- Knoll J E, Ramos M L, Zeng Y, Holbrook C C, Chow M, Chen S, Maleki S, Bha, ttacharya A, Akins P O. 2011. TILLING for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (*Arachis hypogaea* L) . *BMC Plant Biology*, 11: 81.
- Kurowska M, Golec A D, Gruszka D, Marzec M, Szurman M, Szarejko I, Maluszynski M. 2011. TILLING- a shortcut in functional genomics. *Journal of Applied Genetics*, 52: 371 – 390.
- Kuroyanagi M, Katayama T, Imai T, Yamamoto Y, Chisada S I, Yoshiura Y, Ushijima T, Matsushita T, Fujita M, Nozawa A, Suzuki Y, Kikuchi K, Okamoto H. 2013. New approach for fish breeding by chemical mutagenesis: Establishment of TILLING method in fugu (*Takifugu rubripes*) with ENU mutagenesis. *BMC Genomics*, 14: 786 – 799.
- Lin H, Miller M L, Granas D M, Dutcher S K. 2013. Whole genome sequencing identifies a deletion in Protein phosphatase 2A that affects its stability and localization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Genetics*, 9 (9): e1003841.
- Liu Y J, Du Y M, Xu L F, Hu M, Li Z H. 2012. A suppression subtractive hybridization library construction for red skin mutant of ‘Zaosu’ pear and MYBR gene analysis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40 (2): 87 – 101, 42.
- Lloyd J, Meinke D. 2012. A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 158: 1115 – 1129.
- Lochlainn S Ó, Amoah S, Graham N S, Alamer K, Rios J J, Kurup S, Stoute A, Hammond J P, Østergaard L, King G J, White P J, Broadley M R. 2011. High resolution melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. *Plant Methods*, 7: 43 – 51.
- Minoia S, Petrozza A, Onofrio O D, Piron F, Mosca G, Sozio G, Cellini F, Bendahmane A, Carriero F. 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes*, 3: 69.
- Navabi Z K, Huebert T, Sharpe A G, Neill C M O, Bancroft I, Parkin I A P. 2013. Conserved microstructure of the *Brassica* B genome of *Brassica nigra* in relation to homologous regions of *Arabidopsis thaliana*, *B. rapa* and *B. oleracea*. *BMC Genomics*, 14: 250 – 254.
- Prem D, Gupta K, Agnihotri A. 2012. Harnessing mutant donor plants for microspore culture in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss]. *Euphytica*, 184: 207 – 222.
- Rawat N, Sehgal S K, Joshi A, Rothe N, Wilson D L, McGraw N, Vadlani P V, Li W L, Gill B S. 2012. A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. *BMC Plant Biology*, 12: 205 – 215.
- Rigola D, Oeveren J V, Janssen A, Bonne A, Schneiders, Poel H J A V D, Orsouw N J V, Hogers R C J, Both M T J D, Eijk M J T V. 2009.

- High-throughput detection of induced mutations and natural variation using Key Point™ technology. *PLoS ONE*, 4 (3): e4761.
- Shen Shu-xing, Zhao Qian-cheng, Liu Shi-xiong, Zhang Cheng-he, Li Zhen-qiu. 1999. Obtaining and ploidy identification of microspore plant in tetraploid Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 66 (4): 232 – 237. (in Chinese)
- 申书兴, 赵前程, 刘世雄, 张成合, 李振秋. 1999. 四倍体大白菜小孢子植株的获得与倍性鉴定. *园艺学报*, 66 (4): 232 – 237.
- Shiwa Y, Tanaka S F, Kasahara K, Takayuki H, Yoshikawa H. 2012. Whole-genome profiling of a novel mutagenesis technique using proofreading-deficient DNA polymerase  $\delta$ . *Journal of Evolutionary Biology*: 860797.
- Silué S, Diarrassouba N, Fofana I J, Muhovski Y, Toussaint A, Mergeai G, Jacquemin J M, Baudoin J P. 2013. Description of *Phaseolus vulgaris* L. aborting embryos from ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenized plants. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*, 17 (4): 563 – 571.
- Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, Steine M N, Facciotti D. 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology*, 23 (1): 75 – 81.
- Stephenson P, Baker D, Girin T, Perez A, Amoah S, King G J, Østergaard L. 2012. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology*, 10: 62 – 71.
- Tee K L, Wong T S. 2013. Polishing the craft of genetic diversity creation in directed evolution. *Biotechnology Advances*, 31: 1707 – 1721.
- Till B J, Reynolds S H, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo C A, Enns L C, Odden A R, Greene E A, Comai L, Henikoff S. 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology*, 4: 12.
- Trick M, Kwon S J, Choi S R, Fraser F, Soumpourou E, Drou N, Wang Z, Lee S Y, Yang T J, Mun J H, Paterson A H, Town C D, Pires J C, Lim Y P, Park B S, Bancroft I. 2009. Complexity of genome evolution by segmental rearrangement in *Brassica rapa* revealed by sequence-level analysis. *BMC Genomics*, 10: 539 – 554.
- Tsai H, Missirian V, Ngo K J, Tran R K, Chan S R, Sundaresan V, Comai L. 2013. Production of a high-efficiency TILLING population through polyploidization. *Plant Physiology*, 161: 1604 – 1614.
- Wang L, Zheng J, Luo Y Z, Xu T, Zhang Q X, Zhang L, Xu M Y, Wan J M, Wang M B, Zhang C Y, Fan Y L. 2013. Construction of a genomewide RNAi mutant library in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 11 (8): 997 – 1005.
- Wang N, Wang Y J, Tian F, King G J, Zhang C Y, Long Y, Shi L, Meng J J. 2008. A functional genomics resource for *Brassica napus*: Development of an EMS mutagenized population and discovery of FAE1 point mutations by TILLING. *New Phytologist*, (180): 751 – 765.
- Wang X W, Wang H Z, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S Y, Bai Y Q, Mun J H, Bancroft I, Cheng F, Huang S, Li X X, Hua W, Wang J Y, Wang X Y, Freeling M, Pires J C, Paterson A H, Chalhoub B, Wang B, Hayward A, Sharpe A G, Park B S, Weisshaar B, Liu B H, Li B, Liu B, Tong C B, Song C, Duran C, Peng C F, Geng C Y, Koh C, Lin C Y, Edwards D, Mu D S, Shen D, Soumpourou E, Li F, Fraser F, Conant G, Lassalle G, King G J, Bonnema G, Tang H B, Wang H P, Belcram H, Zhou H L, Hirakawa H, Abe H, Guo H, Wang H, Jin H, Parkin I A P, Batley J, Kim J S, Just J, Li J W, Xu J H, Deng J, Kim J A, Li J P, Yu J Y, Meng J L, Wang J P, Min J M, Poulain J, Wang J, Hatakeyama K, Wu K, Wang L, Fang L, Trick M, Links M G, Zhao M X, Jin M N, Ramchiary N, Drou N, Berkman P J, Cai Q L, Huang Q F, Li R Q, Tabata S, Cheng S F, Zhang S, Zhang S J, Huang S M, Sato S, Sun S L, Kwon S J, Choi S R, Lee T H, Fan W, Zhao X, Tan X, Xu X, Wang Y, Qiu Y, Yin Y, Li Y R, Du Y C, Liao Y C, Lim Y, Narusaka Y, Wang Y P, Wang Z Y, Li Z Y, Wang Z W, Xiong Z Y, Zhang Z H. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics*, 43: 1035 – 1139.
- Zhu Q, Smith S M, Ayele M, Yang L, Jogi A, Chaluvadi S R, Bennetzen J L. 2012. High-throughput discovery of mutations in tef semi-dwarfing genes by next-generation sequencing analysis. *Genetics*, 192 (3): 819 – 829.