DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.02.007

苦荞 EMS 突变体库的构建及 SCoT 标记筛选分析

方小梅[1]，　杨文娟[1,2]，　王于栋[1]，　唐恬[1]，
吴银环[1]，　陶建波[1]，　王艺钢[1]，　王俊珍[3]，
朱剑锋[3]，　张建[1]，　易泽林[1]

1. 西南大学 农学与生物科技学院/重庆市荞麦产业体系创新团队，重庆 400715；
2. 青岛市即墨区金口镇农业农村服务中心，山东 青岛 266000；
3. 凉山彝族自治州农业科学研究院，四川 西昌 615000

摘要：苦荞属于蓼科荞麦属 1 年生草本植物，药食两用，营养价值丰富. 该研究以苦荞测序品种“品苦 1 号”为试验材料，利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变技术构建苦荞突变体库，并利用形态观察及目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记对突变体进行了筛选分析，主要研究结果为：① 0.6% EMS 处理 12 h 为“品苦 1 号”最佳诱变处理；② 构建了包含 966 个株系的苦荞突变体库，M_2 代 11 个主要农艺性状主成分分析得到包括籽粒大小因子、籽粒形状因子、植株产量因子、植株表型因子的 4 大主成分因子；聚类分析将 M_2 代群体按农艺性状的差异分为 4 大类；③ 利用 26 条 SCoT 引物对“品苦 1 号”诱变 M_2 代群体进行 PCR 扩增，共得到 263 条清晰稳定的条带；诱变 M_2 代与野生型之间的遗传距离在 0.003 8～0.324 5 之间，其中 PKM_2-803 和对照“品苦 1 号”(CK)间的遗传距离最大，PKM_2-097 和 CK 间的遗传距离最小；聚类分析将 966 份材料分为 4 大类，与表型分类相似，表明 EMS 诱变导致苦荞在表型性状及 DNA 分子水平均发生了变异.

关　键　词：苦荞；甲基磺酸乙酯诱变；突变体库；目标起始密码子多态性分子标记

中图分类号：S517　　**文献标志码**：A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

文 章 编 号：1673－9868(2023)02－0054－12

Construction of EMS Mutant Library of *Fagopyrum tataricum* and SCoT Marker Screening Analysis

FANG Xiaomei[1]，　YANG Wenjuan[1,2]，　WANG Yudong[1]，
TANG Tian[1]，　WU Yinhuan[1]，　TAO Jianbo[1]，　WANG Yigang[1]，
WANG Junzhen[3]，　ZHU Jianfeng[3]，　ZHANG Jian[1]，　YI Zelin[1]

收稿日期：2022－05－25

基金项目：中国博士后科学基金资助项目(2017M622944)；重庆市农委荞麦技术产业体系项目(20210249)；重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0394).

作者简介：方小梅，副教授，硕士研究生导师，主要从事荞麦重要性状基因挖掘及遗传解析研究.

通信作者：易泽林，教授，硕士研究生导师.

1. *College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University/Chongqing Buckwheat Industry System Innovation Team, Chongqing 400715, China;*
2. *Qingdao Jimo District Jinkou Town Agricultural and Rural Service Center, Qingdao Shandong 266000, China;*
3. *Agricultural Sciences Research Institute of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang Sichuan 615000, China*

Abstract: Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*), belongs to Polygonaceae, *Fagopyrum*, and is an annual herb with rich nutritional value and medicinal value. In this study, Tartary buckwheat variety "Pinku 1" was used as the experimental material for constructing mutant library by ethyl methane sulfonate(EMS) mutagenesis technology. The mutants were screened and analyzed by morphological observation and start codon targeted polymorphism(SCoT) molecular marker technology. 0.6% of EMS was selected as the most suitable concentration of EMS in this study. A mutant library of tartary buckwheat "Pinku 1" was constructed with 966 plant lines. Based on the principal component analysis of 11 main agronomic traits in M_2 population, four principal component factors including grain size, grain shape, plant yield and plant phenotypic were extracted. Likewise, the mutants of M_2 population were grouped into four categories by cluster analysis. 26 SCoT primers were used for PCR amplification of M_2 population, and 263 clear and stable bands were obtained. The genetic distance between the materials of M_2 population and wild type was between 0.003 8 and 0.324 5. The genetic distance between PKM2-803 and CK was the largest, and the genetic distance between PKM2-097 and CK was the smallest. Based on UPGMA cluster analysis with SCoT molecular markers, 966 materials were divided into four categories, which was similar to the classification based on the phenotypic traits, showing that EMS induced changes both in phenotypic traits and DNA molecular level in tartary buckwheat.

Key words: Tartary buckwheat; EMS mutagenesis; mutant library; SCoT marker

苦荞又称鞑靼荞麦，生育期短，适应性广，抗逆性强，自花授粉率高，是很好的填闲补荒作物，社会效益显著[1]. 苦荞营养价值很高，富含蛋白质、维生素 B 和膳食纤维以及黄酮类生物活性成分，是一种潜在的"功能性食品"[2]. 苦荞独特的药食两用特性，使其具有重要的应用价值和开发潜力，市场需求不断扩大. 然而，由于苦荞的产量不稳，品种退化较严重、更新速度慢和品种间品质参差不齐等问题，严重阻碍了苦荞的生产及发展[3]. 苦荞属于小宗作物，基础研究开始较晚，遗传育种研究也相对滞后[4]. 因此，加快苦荞种质资源创新，挖掘与利用优良基因已经成为我国苦荞产业研究和发展的重点[5-9].

植物的自然突变频率很低，要想获得足够多有价值的突变材料，可通过人工诱变的方法来提高突变频率，创制筛选出更多、更有价值的突变体[10]. 突变体库主要的构建方法有插入诱变、物理诱变、化学诱变等. 化学诱变相较于其他诱变有着简单、经济、易突变、无需遗传转化的特点，已成为突变体库创建的一种重要技术手段[11]. 其中甲基磺酸乙酯(EMS)诱变因其诱变范围广、效率高、操作简便、成本低廉、产生的染色体畸变很少、对处理材料生物损伤小、主要发生 DNA 分子上的点突变(且大多是显性突变)、利于筛选工作的进行等优势而被认为是使用最广、效果最明显的诱变剂[12]，已在玉米[13]、高粱[14]、黄瓜[15]、番茄[16]等植物上成功构建了 EMS 突变体库，获得了不同的新种质资源，大大加快了育种进程，并有助于新的等位基因鉴定和功能基因组学研究. 在苦荞育种研究方面，利用化学方法对苦荞的诱变研究陆续有相关报道出现. 温日宇等[17]研究了不同浓度 EMS 对晋荞麦 4 号种子发芽的影响，认为其 EMS 诱变的半致死百分比为 1.7%，处理时间为 12 h. 邓琳琼等[18]利用 EMS 对贵州地方栽培苦荞品种进行处理，对其突变体进行筛选和鉴定，获得了叶片肥大、早熟、晚熟、小粒、矮秆和黄化 6 种稳定遗传的突变体. 马名川等[19]利用 EMS 对苦荞地方资源材料刺荞进行处理，对其 M_2 代突变体进行筛选和鉴定，获得了抗倒、矮秆、籽粒多棱、大粒等突变体，初步创建了刺荞突变体库. 孙朝霞等[20]利用 EMS 诱变苦荞品种"黑丰 1 号"，获得了矮杆、种壳开裂、丛生枝等突变株系，并筛选出高低芦丁突变体

株系，对芦丁合成关键酶基因进行了表达分析.

目标起始密码子多态性(SCoT)分子标记是2009年由Collard等[21]新开发的一种基于翻译起始位点而设计的新型单引物扩增反应目的基因分子标记. 有研究表明，SCoT分子标记可以根据植物的性状突变进行初步鉴定. 岳庆春等[22]利用SCoT分子标记技术对经137Cs-γ射线处理"醉金香"葡萄种子得到的变异单株进行遗传变异及多样性分析，实现了葡萄变异材料的早期鉴定；王俏君等[23]对经形态学观察筛选到的彩叶芋表型突变体进行SCoT分子标记分析检测，发现在DNA分子水平上发生了变异的4株表型突变体；白邦琴等[24]将3种草坪草作为试验材料进行EMS诱变后，对诱变M_2代植株进行了SCoT分子标记分析，在SCoT-PCR扩增结果电泳条带中出现了较丰富的多态性条带，表明筛选的突变体发生了分子水平的遗传变异.

本研究利用EMS诱变剂对苦荞测序品种"品苦1号"进行浸种诱变处理，创建一个表型变异丰富的苦荞突变体库，并对M_2进行形态学和SCoT分子标记的筛选和鉴定，以期丰富苦荞基因资源，加快苦荞遗传育种进程，并为苦荞品种选育及功能基因组学的研究提供优良的基础材料.

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料为已完成测序的苦荞品种"品苦1号"[25]，由山西省农业科学院作物研究所提供.

1.2 苦荞EMS诱变百分比的筛选

选取籽粒饱满均匀的"品苦1号"种子2 400粒，每200粒种子为一组，设0,0.2%,0.6%,1.0%，共4个百分比梯度处理，每个处理3次重复. 将种子清水浸种12 h后，用pH=7.0的磷酸缓冲液作为溶剂，配制百分比为0(磷酸钠缓冲液作为对照),0.2%,0.6%,1.0%的EMS诱变液(上海麦克林生化有限公司)处理"品苦1号"苦荞种子，并置于摇床上在通风橱中避光处理12 h，然后以浓度为0.1 mol/L的硫代硫酸钠为终止剂，终止诱变反应，然后用流水持续冲1 h. 吸干水分晾干后，于田间进行种植. 每个百分比处理种植1个小区(行长2 m，行距0.33 m)，设3次重复，播种后记录各小区播种量(S)，并对田间出苗和成苗情况进行调查统计. 于苦荞的2叶期，调查出苗数(E)，计算各小区出苗率(X)：$X=E/S\times100\%$. 于苦荞的4叶期，调查成苗数(F)，计算各小区成苗率(Y)：$Y=F/S\times100\%$.

1.3 M_2突变体库的构建

选取饱满均匀的"品苦1号"种子4 000粒，先在清水中浸种12 h，然后用筛选出的适宜百分比的EMS溶液对浸泡好的4 000粒种子进行诱变处理，以未处理的"品苦1号"为对照，于2019年3月将其播种在西南大学科研基地实验田，每个小区(行长2 m，行距0.33 m)种200粒籽粒，对M_1代植株做好田间管理，进行田间突变体及农艺性状的调查统计，成熟后按单株收获籽粒. 于2019年9月种成M_2代株行(每株行种10粒籽粒)，并对定植的M_2代单株进行田间突变体及农艺性状调查统计，成熟后将定植的M_2代植株按单株收获，其余单株按株行收获作为株系对照. 诱变材料各世代田间管理均采用常规育种方式.

1.4 田间突变体性状调查

突变体统计：对M_2代植株全生育期调查，每3～5 d进行1次田间调查，根据《荞麦种质资源描述规范和数据标准》，观察记载植株的叶片、茎秆、株高、分枝、株型、籽粒、育性、生育期等表型性状，筛选出各种表型突变体. 在形态学调查过程中筛选出各种表型性状变异材料，同时分类记录各种表型变异性状，对变异性状进行拍照留存，并进行单株编号. 于成熟期，收获种子前测量株高(cm)：用直尺测量从地面至主茎花序顶端的距离；一级分枝数(个)：主茎上从基部至顶端的有效分枝数；主茎节数(个)：主茎基部至顶端的总节数. 籽粒成熟单株脱粒收获后，将籽粒置于37 ℃烘箱烘干，并去除空瘪籽粒，采用万深SC-G型种子数粒仪及千分之一天平测量单株粒数(粒)、单株粒质量(g)、千粒质量(g)、籽粒面积(mm^2)、籽粒周长(mm)、籽粒长(mm)、籽粒宽(mm)及籽粒长宽比. 最后，取3个单株的性状平均值

作为该品种的表型值.

1.5　基因组 DNA 的提取

待 M_2 代幼苗正常生长后，分别采集每株定植植株 0.1 g 新鲜叶片于离心管，经液氮速冻后，放入磁力打样机(LC-DMS-H 型)(30 s，50 Hz)粉碎至粉末. 参照改良后的 CTAB 法提取苦荞种质资源的 DNA[26]，采用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行质量检测，并利用 Nano Drop 2000 仪器检测样本的 DNA 质量浓度，用已灭菌的 ddH_2O 将 DNA 稀释到 50 ng/μL，−20 ℃低温保存待用.

1.6　SCoT 分子标记分析

参考 Collard 等[21]的方法设计并合成了 36 条 SCoT 引物，以野生型“品苦 1 号”DNA 为模板，对 36 条引物进行筛选，其中 26 条引物可扩展出稳定性好，可重复的清晰条带(表 1).

表 1　SCoT 分子标记引物信息

引物	序列	GC 百分比/%	*Tm* 值	最适退火温度/℃
SCoT 1	CAACAATGGCTACCACCA	50	54	49
SCoT 2	CAACAATGGCTACCACCC	55	56	51
SCoT 3	CAACAATGGCTACCACCG	55	56	51
SCoT 6	CAACAATGGCTACCACGC	55	56	51
SCoT 7	CAACAATGGCTACCACGG	55	56	49
SCoT 9	CAACAATGGCTACCAGCA	50	54	49
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA	50	54	49
SCoT 12	ACGACATGGCGACCAACG	61	58	52
SCoT 13	ACGACATGGCGACCATCG	61	58	52
SCoT 14	ACGACATGGCGACCACGC	66	60	54
SCoT 15	ACGACATGGCGACCGCGA	66	60	55
SCoT 16	ACCATGGCTACCACCGAC	61	58	51
SCoT 18	ACCATGGCTACCACCGCC	66	60	54
SCoT 19	ACCATGGCTACCACCGGC	66	60	53
SCoT 21	ACGACATGGCGACCCACA	61	58	53
SCoT 22	AACCATGGCTACCACCAC	55	56	51
SCoT 24	CACCATGGCTACCACCAT	55	56	50
SCoT 26	ACCATGGCTACCACCGTC	61	58	52
SCoT 28	CCATGGCTACCACCGCCA	66	60	55
SCoT 29	CCATGGCTACCACCGGCC	72	62	54
SCoT 30	CCATGGCTACCACCGGCG	72	62	55
SCoT 32	CCATGGCTACCACCGCAC	66	60	54
SCoT 33	CCATGGCTACCACCGCAG	66	60	55
SCoT 34	ACCATGGCTACCACCGCA	61	58	52
SCoT 35	CATGGCTACCACCGGCCC	72	62	55
SCoT 36	GCAACAATGGCTACCACC	55	56	51

注：*Tm* 值表示 DNA 解链温度.

PCR 总反应体系为 20 μL，其中苦荞基因组 DNA 1.0 μL，引物各 1.0 μL，buffer 1.0 μL，2×Taq PCR Master Mix 10 μL，ddH2O 6 μL. 2×Taq PCR Master Mix 购自诺唯赞生物科技有限公司. SCoT-

PCR初始基本扩增程序为：先94 ℃下预变性4 min，然后进行94 ℃变性30 s，53 ℃退火30 s，72 ℃延伸90 s，35个循环程序，最后在72 ℃下进行7 min延伸. PCR扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳分离，于凝胶成像系统拍照保存，并根据电泳图像读取条带数据，分析诱变材料与野生型之间的差异.

1.7 数据分析

利用Excel 2016统计各突变类型的突变数目及突变率，计算苦荞植株和籽粒各主要农艺性的平均值、最小值、最大值、极差、标准差，进而计算各农艺性状的变异系数、遗传多样性指数，同时绘制相应图表. 利用SPSS 24软件对诱变M_2代的各主要农艺性状进行相关性分析、主成分分析、聚类分析，并利用DPS软件处理体系优化正交实验的方差分析及多重比较.

电泳结果采用0/1赋值，强带记1，弱带反复出现记1，弱带出现但不重复记0，无带记0，建立引物扩增的“0/1”分子数据矩阵，利用Power Marker软件[27]计算遗传距离，并利用MEGA 7.0软件[28]进行UPGMA聚类分析，利用Fig Tree软件对聚类图进行美化编辑.

2 结果分析

2.1 EMS诱变百分比的筛选

本研究将0,0.2%,0.6%,1.0%共4种EMS百分比梯度处理后的种子于田间播种，播种后于2叶期统计出苗率及相对出苗率，于4叶期统计成苗率及相对成苗率(表2). 研究发现，经EMS处理的苦荞品种“品苦1号”种子的田间出苗率和成苗率均随着EMS百分比的增加而逐渐下降. 其中0.6% EMS处理的“品苦1号”种子，与对照相比其相对出苗率为51.92%，相对成苗率为46.19%. 在EMS诱变的研究中，一般以半致死剂量LD_{50}作为EMS诱变处理的适宜百分比标准，半致死剂量即相对出苗率为50%时的EMS剂量，此时诱变处理产生的材料，其单碱基突变的频率最高. 经综合分析后，本研究最终选定0.6% EMS为适宜“品苦1号”批量诱变的诱变剂量.

表2 EMS百分比对“品苦1号”苦荞种子出苗的影响 %

EMS百分比	出苗率	相对出苗率	成苗率	相对成苗率
0.00	34.67	100.00	32.83	100.00
0.20	22.17	63.94	21.33	64.97
0.60	18.00	51.92	15.17	46.19
1.00	9.00	25.96	8.17	24.87

2.2 M_2代植株表型性状变异分析

田间播种经0.6% EMS处理12 h的“品苦1号”苦荞种子4 000粒，2叶期出苗数为1 076株，出苗率为26.90%；4叶期成苗数为991株，成苗率为24.78%；同年5月底收获M_1代植株971株. M_1自交后单株收获M_2代965份材料. 对野生型“品苦1号”和965个M_2代株行进行突变调查(图1)，结果表明苦荞品种“品苦1号”经过EMS诱变后，在M_2代观察到了丰富的表型变异突变体，且在所调查的叶片性状、茎秆性状、籽粒性状及生育期等表型性状中均发现了突变位点. 其中，部分植株表现出两种或两种以上表型性状的复合突变. 共计发现486个突变位点在M2代272个单株上(366个突变植株中，复合突变植株仅计数1次)，M_2代表型突变频率为28.19%. 各类型突变率为叶片8.60%，茎秆11.50%，籽粒14.20%，其他类型为4.56%(表3).

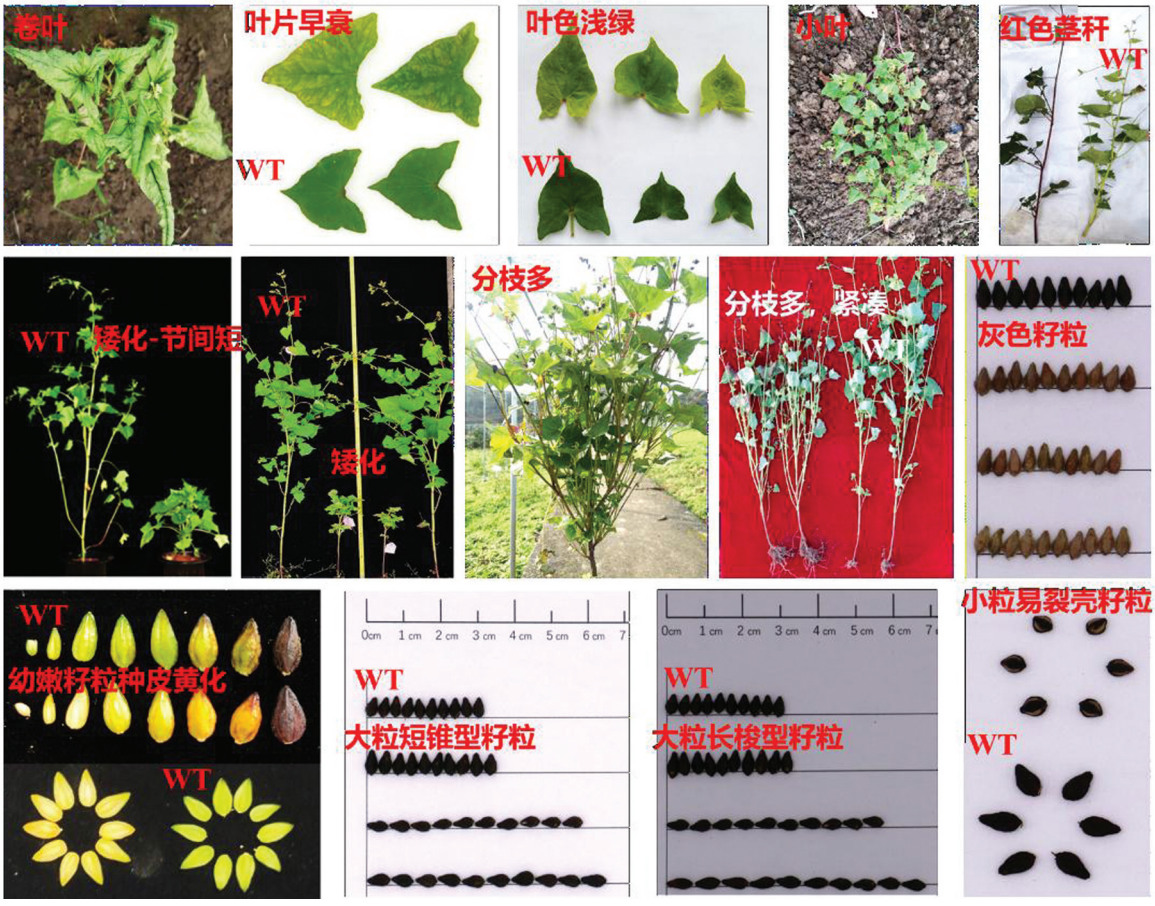


图 1　M_2 代部分突变体

表 3　诱变 M_2 代群体各突变类型突变情况统计表

突变器官	突变类型	突变位点数	突变株数	突变率/%
叶片突变	叶片颜色	44	83	8.60
	叶片形状	29		
	叶片大小	13		
	叶脉	2		
	叶缘	4		
	叶柄	1		
	叶片簇生	6		
	叶片厚	1		
株型突变	茎秆	28	111	11.50
	分枝	40		
	节间	15		
	株高	31		
	分枝角度	50		

续表3

突变器官	突变类型	突变株数	突变株数	突变率/%
籽粒突变	籽粒形状	49	137	14.20
	籽粒大小	37		
	籽粒颜色	57		
	结实率	16		
	千粒质量	12		
	不育	3		
	穗萌	13		
生育期	早熟	25	35	3.63

2.3 M_2 代主要农艺性状的遗传多样性分析

本研究对“品苦1号”苦荞诱变M_2代材料和野生型对照的主要农艺性状进行了调查测量及统计分析(表4). 11个主要农艺性状的变异系数变化范围介于4.12%～53.88%之间，遗传多样性指数在1.46～2.02之间，平均值为1.87，各性状的遗传多样性指数从大到小依次为单株粒质量(单株粒数)、株高(籽粒周长)、籽粒面积、籽粒长、千粒质量、籽粒宽、籽粒长/宽、主茎节数、一级分枝数，表明“品苦1号”诱变M_2代苦荞材料各主要农艺性状之间存在较大的差异，产生了较丰富的性状变异.

表4 诱变M_2代材料主要农艺性状表现

性状	均值	最小值	最大值	极差	标准差	遗传多样性指数 H'	变异系数 CV/%	CK变异系数 CV/%
株高/cm	80.84	19.00	118.00	99.00	14.49	1.98	17.93	9.51
一级分枝数	6.96	2.00	12.00	10.00	1.08	1.46	15.58	12.82
主茎节数	14.55	8.00	21.00	13.00	1.36	1.61	9.35	10.07
单株粒数	257.22	3.00	824.00	821.00	134.33	2.02	52.23	51.82
单株粒质量/g	4.90	0.03	16.84	16.81	2.64	2.02	53.88	52.28
千粒质量/g	18.78	1.69	29.78	28.09	2.47	1.90	13.16	8.43
籽粒长/mm	6.32	4.49	7.55	3.06	0.32	1.95	5.06	2.34
籽粒宽/mm	3.33	1.98	4.32	2.34	0.14	1.83	4.32	1.65
籽粒长宽比	1.91	1.17	3.30	2.14	0.13	1.80	6.69	2.68
籽粒周长/mm	16.61	13.35	19.70	6.35	0.68	1.98	4.12	1.88
籽粒面积/mm^2	14.81	9.10	20.10	11.00	0.99	1.97	6.69	2.98

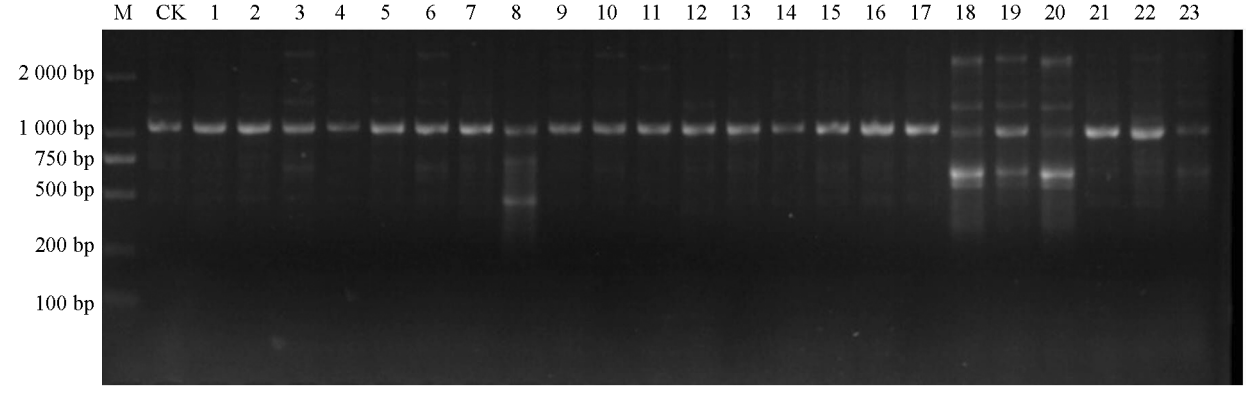
将诱变M_2代材料的11个主要农艺性状进行主成分分析，结果表明所有主成分构成中特征值大于1的有4个主成分(表5). 其中，第1主成分的的特征值为3.433，贡献率为31.209%；第2主成分的特征值为3.109，贡献率为28.262%；第3主成分的特征值为1.935，贡献率为17.587%；第4主成分的特征值为1.027，贡献率为9.333%；前4个主成分累积贡献率达86.391%. 根据累积贡献率大于(等于)85.00%的标准，表明本研究提取的4个主成分基本可以反映诱变M_2代的11个主要农艺性状的因子信息，可以很好地解释表型的变异.

表 5　诱变 M_2 代材料主要农艺性状主成分特征值与贡献率

主成分	初始值			提取平方载荷总和			旋转平方载荷总和		
	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.433	31.209	31.209	3.433	31.209	31.209	3.150	28.635	28.635
2	3.109	28.262	59.471	3.109	28.262	59.471	2.420	22.000	50.635
3	1.935	17.587	77.058	1.935	17.587	77.058	1.989	18.086	68.722
4	1.027	9.333	86.391	1.027	9.333	86.391	1.944	17.670	86.391
5	0.600	5.451	91.842						
6	0.451	4.100	95.942						
7	0.382	3.472	99.414						
8	0.029	0.264	99.678						
9	0.021	0.191	99.868						
10	0.010	0.088	99.956						
11	0.005	0.044	100.000						

2.4　M_2 代的 SCoT 分子标记分析

利用 26 条 SCoT 引物对“品苦 1 号”诱变 M_2 代群体进行 PCR 扩增，共得到 263 条清晰稳定的条带，各 SCoT 引物扩增出的条带在 4～16 条之间，平均为每条引物扩增出 10.12 条电泳条带. 对比野生型“品苦 1 号”和诱变 M_2 代材料 SCoT-PCR 产物的电泳条带，发现诱变 M_2 代与野生型之间存在较丰富的条带差异，包括条带增加和条带缺失，这些条带差异证明 EMS 诱变方法导致苦荞在 DNA 分子水平上发生了变异(图 2).



CK：野生型“品苦 1 号”；1～23：23 份 M_2 代材料；M：代表 2 000 bp 的 DNA 分子质量标准.

图 2　部分诱变 M_2 代材料 SCoT-PCR 电泳条带

基于 SCoT 分子标记电泳条带数据，将对照的野生型“品苦 1 号”在内的 966 份材料两两组合进行分析，共得到 466 095 个遗传距离，分布在 0.003 8～0.324 5 之间，平均值为 0.093 5，其中 PKM_2-148 和 PKM_2-566 间的遗传距离最大，为 0.324 5；CK 和 PKM_2-097 间的遗传距离最小，为 0.003 8. 以 0.015 为组间距进行频数分布分析，96.23%的遗传距离分布在 0.045～0.180 之间(图 3a). 965 个诱变材料与对照材料“品苦 1 号”间的遗传距离平均为 0.056 2. 其中 CK 和 PKM_2-803 间的遗传距离最大，为 0.203 8；CK 和 PKM_2-097 间的遗传距离最小，为 0.003 8.

根据 SCoT 分子标记数据，利用非加权组平均法(UPGMA)构建聚类图(图 3b)，结果 966 个材料被分

为4类(CI-CIV). 对4个类群的农艺性状进行统计分析(表6)发现：CI由256个材料组成，包括对照在内的256个材料间的遗传距离在0.003 8～0.271 7之间，平均遗传距离为0.066 9，显著小于其他类群，植株与籽粒的主要农艺性状均适中. CII由145个材料组成，145个材料间的遗传距离在0.015 1～0.230 2之间，平均遗传距离为0.088 7，主要农艺性状中株高偏低、单株产量较高，千粒质量偏小、籽粒偏大偏长. CIII由210个材料组成，210个突变材料的遗传距离在0.007 5～0.249 1之间，平均遗传距离为0.106 7，显著大于其他类群，主要农艺性状中主茎节数和分枝较少、单株产量低. CⅣ由355个突变材料组成，355个突变材料间的遗传距离在0.007 5～0.222 6之间，平均遗传距离为0.094 2，主要农艺性状中株高偏高，主茎节数偏多，千粒质量偏大，籽粒较小.

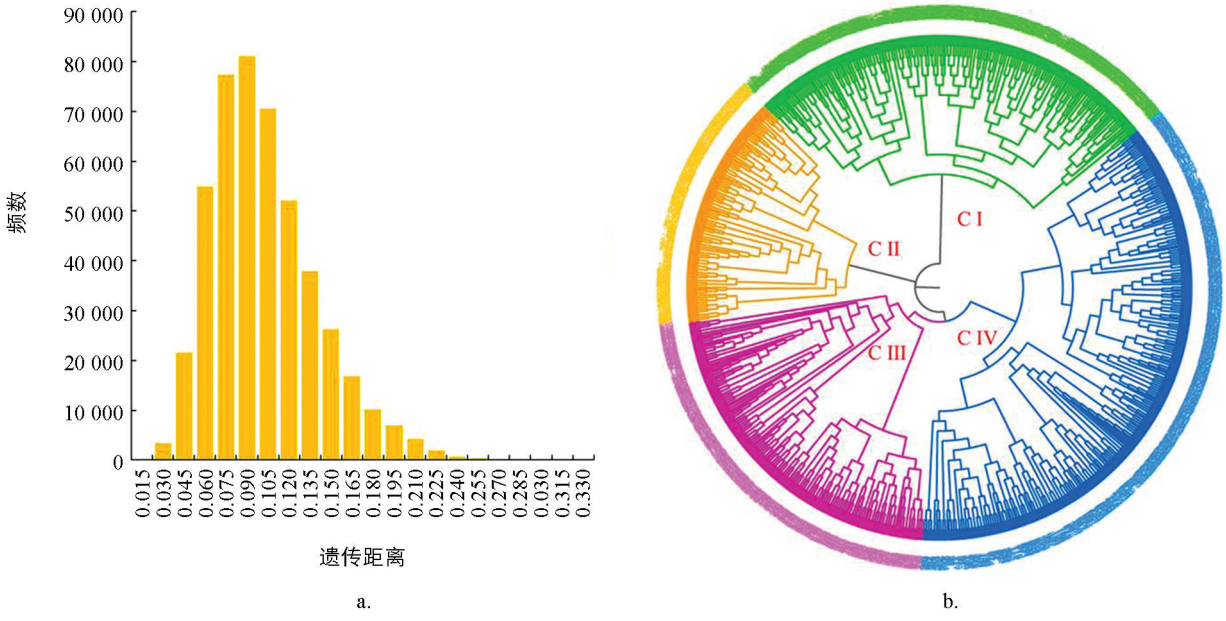


图3 诱变M_2代材料间遗传距离的频数(a)和聚类图(b)

表6 诱变M_2代材料基于SCoT分子标记聚类的4大类群主要农艺性状差异

类群	CⅠ	CⅡ	CⅢ	CⅣ
数目	256	145	210	355
株高	80.27a	80.14a	80.25a	81.88a
一级分枝数	6.89a	7.04a	6.85a	7.04a
主茎节数	14.59a	14.56ab	14.32b	14.65a
单株粒数	262.30a	266.12a	231.16b	265.35a
单株粒质量	4.97a	5.12a	4.39b	5.07a
千粒质量	18.72a	18.52a	18.74a	18.96a
籽粒长	6.33ab	6.38a	6.34ab	6.28b
籽粒宽	3.32a	3.32a	3.34a	3.33a
籽粒长宽比	1.92ab	1.94a	1.91b	1.90b
籽粒周长	16.61ab	16.69a	16.68a	16.54b
籽粒面积	14.81a	14.91a	14.85a	14.74a
平均遗传距离	0.0669d	0.0887c	0.1067a	0.0942b

3　讨论

3.1　EMS 诱变百分比的筛选

EMS 诱变结果具有不确定性，诱变对象不同，EMS 的诱变效率也不同，而且前人研究结果表明，最佳 EMS 处理条件通常是接近半致死剂量的处理条件，原因是半致死剂量下的突变效率较高，获得的突变体较多，待选群体基数适中[24]. 影响 EMS 诱变效果的主要因素是 EMS 百分比和诱变处理时间长短[29]. 温日宇等[17]对苦荞种子 EMS 诱变效应的研究结果表明，不同诱变时间的处理结果差异不显著，且处理 8 h 以上才会对种子发芽率产生明显的影响，苦荞 EMS 诱变的半致死百分比为 1.7%. 孙朝霞等[20]的研究结果显示，“黑丰 1 号”苦荞种子的 EMS 诱变半致死剂量为 1.2%. 本研究对测序品种“品苦 1 号”采用 0，0.2%，0.6%，1.0%共 4 种 EMS 诱变百分比对苦荞种子进行浸种诱变处理 12 h，最终选定 0.6% EMS 诱变百分比为最适宜的诱变剂量. 本研究结果与前人研究最适诱变剂量的结论存在差异，可能是不同品种对诱变剂的敏感程度不同，亦有可能是处理后环境条件(播种地土壤、大气温度和湿度等)差异所致.

3.2　EMS 突变体库的构建

诱变 M_2 群体是突变体表型调查最为关键的时期[30]. 本研究通过对 966 个 M_2 代单株进行田间突变表型调查发现，苦荞品种“品苦 1 号”经过 EMS 诱变的 M_2 代产生了丰富的表型变异突变体，共发现 486 个突变位点在 M_2 代 272 个单株上，M_2 代表型突变频率为 28.19%. 在所调查的 M_2 代叶片性状、茎秆性状、株型及生育期等表型中均发现了突变，比马名川等[19]、孙朝霞等[20]在 EMS 诱变苦荞研究中的突变率要高，可能原因在于：与其他研究相比，本研究采用的苦荞品种不同，不同品种的材料对 EMS 的适应程度不同，因此可能造成的突变率不同；EMS 诱变百分比及诱变剂品牌不同，产生的诱变效率会有所差异；植株生长环境不同也会导致田间表型调查的突变率不同. 本研究对突变群体田间表型调查采取的是单株逐一调查的方式，单株收获籽粒后进行了单株烤种，对籽粒表型进行了细致的鉴定，初步筛选的突变数量较多，因此突变比例也相对较高，但是在突变的稳定性上实验室后续还会进一步地筛选和鉴定.

统计发现，在 M_2 代苦荞突变体库中产生最多的突变性状包括黄化叶片、矮化植株、紧凑株型、籽粒表型等，此外还有一些突变单株存在多个变异性状一起出现的现象，如矮化的植株节间短，株型紧凑的植株分枝多，丛生植株籽粒会比较早熟等等，这些现象的出现应证了前人提出的 EMS 诱变会导致基因点突变率增加，且突变的基因之间可能会存在连锁表达效应的说法[31-32].

3.3　M_2 代主要农艺性状的遗传多样性分析

遗传多样性指数是反映性状遗传多样性的一个重要指标，遗传多样性指数越高，表明农艺性状的多样性越丰富. 近年来，已有文献报道了较多苦荞株高、分枝数、节数、单株产量、籽粒表型等主要农艺性状的遗传变异研究[33-35]. 而本研究的 M_2 代突变体主要农艺性状遗传多样性指数在 1.46～2.02 之间，平均值为 1.87，其中最高的是单株粒质量和单株粒数，说明经 EMS 诱变后的 M_2 代群体间主要农艺性状的多样性变异丰富，包含的变异类型多，具有很高的研究价值.

聚类分析已广泛应用于苦荞的遗传多样性分析，吕丹等[36]基于农艺性状对苦荞资源材料进行聚类分析，将 213 个苦荞种质资源分为 6 类，其中的高产类群可以作为苦荞品种选育的亲本材料. 本研究基于 11 个主要农艺性状进行聚类，将诱变 M_2 代材料分为 4 大类群，方便对优良性状进行筛选和鉴定，为苦荞育种工作提供丰富的基础材料，加快育种进程.

3.4　M_2 代的 SCoT 分子标记分析

SCoT 分子标记与传统 DNA 分子标记相比具有灵敏度高、稳定性好、引物设计简单、通用性强；DNA 用量少且质量要求低、操作简单、成本低廉、遗传信息丰富、条带的多态性高等优点[37]. 本研究以诱变 M_2

代与野生型“品苦1号”为PCR扩增的DNA模板，进行SCoT-PCR扩增，发现诱变M_2代与野生型之间存在条带差异，包括条带增加和条带缺失，这些条带差异证明EMS诱变方法导致苦荞在DNA分子水平上发生了变异，与王俏君[23]的研究结论相似，但各突变株变异位点的碱基序列信息、突变性状能否稳定遗传等问题还需后续进一步地研究.

将基于M_2代农艺性状的聚类结果与基于M_2代SCoT分子标记的聚类结果进行对比分析，发现诱变苦荞品种“品苦1号”的诱变M_2代在两种不同方式下的聚类结果有所不同，虽然两种方式都聚成了4个类群，但每个类群在综合农艺性状变现过程中有所不同，且每个类群的材料分布也不尽相同. 两种聚类方式结果有所差异的现象也出现在其他许多植物的研究中[38-40]，造成这些差异的主要原因是农艺性状聚类的作用是揭示植株表型性状的差异，而基于SCoT分子标记的聚类结果揭示的主要是M_2代材料在DNA分子水平上的差异. 同时，两种聚类方式无论是性状测量，还是电泳条带读取在数据统计时都存在统计人员主观因素及仪器设备误差的影响. 因此，将农艺性状分析与分子标记分析结果相结合，在突变体研究工作中可以根据既定目标进行综合筛选和分析，有利于提高突变体鉴定和筛选的效率和准确性，同时也说明将分子标记技术与常规育种手段有机地结合起来，能有效缩短育种年限，加快作物育种进程.

4 结论

EMS诱变百分比梯度试验结果表明“品苦1号”在重庆最适宜的EMS诱变百分比为0.6%；M_2代966个株系产生了丰富的表型变异突变体；主成分分析得到包括籽粒大小因子、籽粒形状因子、植株产量因子、植株表型因子的4大主成分因子；基于SCoT分子标记的UPGMA聚类分析将966个材料分为4大类，SCoT-PCR扩增结果表明EMS诱变导致苦荞在DNA分子水平上发生了变异. 该突变体库的构建及初步筛选分析，将为苦荞功能基因组学研究和分子育种提供表型多样的种质资源.

参考文献：

[1] 赵钢，陕方. 中国苦荞[M]. 北京：科学出版社，2009.

[2] 赵钢，唐宇，王安虎. 苦荞的成分功能研究与开发应用[J]. 四川农业大学学报，2001，19(4)：355-358，368.

[3] 熊德珍，毛金祥. 浅析我国苦荞资源的前景[J]. 农业科技与信息，2016(11)：21.

[4] 杨丽娟，陈庆富. 荞麦属植物遗传育种的最新研究进展[J]. 种子，2018，37(4)：52-58.

[5] 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[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版)，2018，36(3)：1-7，131.

[6] 高安静，刘婷婷，周美亮，等. 外源褪黑素对干旱胁迫下苦荞幼苗生长及生理特性的影响[J]. 南方农业学报，2021，52(11)：3003-3012.

[7] 段迎，杨晓琳，蔡苏云，等. 苦荞FtCAD-1和FtCAD-2基因克隆及组织表达分析[J]. 南方农业学报，2021，52(12)：3340-3349.

[8] 王强，向达兵，魏威，等. 赤霉素对苦荞生长、结实和产量的影响[J]. 南方农业学报，2022，53(2)：441-450.

[9] 蔡齐宗，王佳蕊，陈庆富，等. 苦荞全基因组SSR位点鉴定及分子标记开发[J]. 河南农业大学学报，2022，56(3)：392-400.

[10] UCHIDA N，SAKAMOTO T，KURATA T，et al. Identification of EMS-Induced Causal Mutations in a Non-Reference Arabidopsis Thaliana Accession by Whole Genome Sequencing[J]. Plant and Cell Physiology，2011，52(4)：716-722.

[11] 郭建秋，雷全奎，杨小兰，等. 植物突变体库的构建及突变体检测研究进展[J]. 河南农业科学，2010，39(6)：150-155.

[12] KIM Y S，SCHUMAKER K S，ZHU J K. EMS Mutagenesis of Arabidopsis[M]. Clifton：Humana Press，2006.

[13] 黎杰强，陈舜权，严维，等. 甜玉米EMS突变体资源共享库的构建及初步鉴定[J]. 植物遗传资源学报，2020，21(3)：616-624.

[14] 王春语，朱振兴，李丹，等. 高粱EMS诱变及突变体筛选、鉴定[J]. 生物技术通报，2014(9)：78-83.

[15] 齐晓花，李倩倩，叶思佳，等. 黄瓜 EMS 诱变突变体库的构建 [J]. 分子植物育种，2019，17(18)：6066-6072.
[16] 张萍，姜景彬，杨欢欢，等. 番茄 EMS 突变体库的构建及表型分析 [J]. 北方园艺，2019(7)：1-9.
[17] 温日宇，郭耀东，刘建霞，等. 不同浓度 EMS 对甜荞种子发芽的影响 [J]. 陕西农业科学，2014，61(1)：12-13，21.
[18] 邓琳琼，张以忠. 苦荞 EMS 诱变群体的创建及农艺性状分析 [J]. 湖北农业科学，2015，54(14)：3343-3347.
[19] 马名川，刘龙龙，张丽君，等. EMS 诱变刺荞的形态突变体鉴定与分析 [J]. 作物杂志，2019(3)：37-41，197.
[20] 孙朝霞，侯思宇，郝彦蓉，等. 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 [J]. 植物遗传资源学报，2020，21(2)：402-408.
[21] COLLARD BC Y，Mackill D J. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism：A Simple，Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants [J]. Plant Mol Biol Rep，2009，27(1)：86-93.
[22] 岳庆春，章辰飞，汪庆昊，等. 基于 SCoT 分析'醉金香'葡萄及其突变体遗传多样性 [J]. 分子植物育种，2020，18(13)：4417-4426.
[23] 王俏君. 彩叶芋 EMS 诱变材料的 SCoT 分子标记鉴定及抗寒性分析 [D]. 重庆：西南大学，2018.
[24] 白邦琴. 三种草坪草的 EMS 诱变及其突变体的初步筛选与鉴定 [D]. 重庆：西南大学，2018.
[25] ZHANG L，LI X，MA B，et al. The Tartary Buckwheat Genome Provides Insights into Rutin Biosynthesis and Abiotic Stress Tolerance [J]. Molecular Plant，2017，10(9)：1224-1237.
[26] ZHANG Z S，XIAO Y H，LUO M，et al. Construction of a Genetic Linkage Map and QTL Analysis of Fiber-Related Traits in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Euphytica，2005，144(1/2)：91-99.
[27] LIU K J，MUSE S V. Power Marker：an Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis [J]. Biology and Evolution，2005，21(9)：2128-2129.
[28] KUMAR S，STECHER G，LI M，et al. MEGA X：Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms [J]. Molecular Biology and Evolution，2018，35(6)：1547-1549.
[29] 崔霞，梁燕，李翠，等. 化学诱变及其在蔬菜育种中的应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2013，41(3)：205-212.
[30] 卢银，刘梦洋，赵建军，等. 大白菜突变体库的构建及 M_2 叶片表型变异的研究 [J]. 园艺学报，2014，41(8)：1609-1619.
[31] 李文慧. 番茄基因组文库及突变体库的构建与分析 [D]. 北京：中国农业大学，2014.
[32] 张晓勤，薛大伟，周伟辉，等. 用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变的大麦浙农大 3 号突变体的筛选和鉴定 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，2011，37(2)：169-174.
[33] 汪灿，胡丹，杨浩，等. 苦荞主要农艺性状与产量关系的多重分析 [J]. 作物杂志，2013(6)：18-22.
[34] 贾瑞玲，马宁，魏立平，等. 50 份苦荞种质资源农艺性状的遗传多样性分析 [J]. 干旱地区农业研究，2015，33(5)：11-16，89.
[35] 杨学乐，张璐，李志清，等. 苦荞种质资源表型性状的遗传多样性分析 [J]. 作物杂志，2020(5)：53-58.
[36] 吕丹，黎瑞源，郑冉，等. 213 份苦荞种质资源主要农艺性状分析及高产种质筛选 [J]. 南方农业学报，2020，51(10)：2429-2439.
[37] 朱尚明，吴则东，兴旺，等. 利用 SCoT 对甜菜种质资源的鉴定及遗传多样性分析 [J]. 中国农学通报，2020，36(18)：119-123.
[38] 王洋洋. 美洲南瓜种质资源的遗传多样性研究 [D]. 哈尔滨：东北农业大学，2016.
[39] 王丰丰. 基于植物学性状和 SCoT 标记分析籽用南瓜的遗传多样性及南瓜砧木资源的初步筛选 [D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2018.
[40] 张曼. 朝天椒种质遗传多样性的分析 [D]. 贵阳：贵州大学，2020.

责任编辑　夏娟