

## 甲基磺酸乙酯对蒲公英胚性细胞基因表达的影响

冯 薇, 孟 然, 李赵嘉, 吴 哲, 鲁雪林, 陈 悦, 王秀萍\*

河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北 唐山 063200

**摘要:** 目的 对甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate, EMS) 诱变下蒲公英 *Taraxacum mongolicum* 胚性细胞进行转录组测序, 探究 EMS 诱变对蒲公英基因表达的影响。方法 利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术对对照 (CK)、0.15% EMS 处理 8 h 后的蒲公英胚性细胞进行测序并建立 cDNA 数据库, 经拼接后得到 Unigene, 并进一步开展生物信息学分析。结果 共获得 Unigene 45 551 条, 分别有 32 954、12 923、21 752、28 115、9 764 条被非冗余数据库 (non-redundant protein sequence database, NR)、基因本体 (gene ontology, GO)、Swiss-Prot、eggNOG、京都基因与基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 等数据库注释, GO 富集分析发现, 蒲公英胚性细胞的 DEGs 在 GO 功能注释中主要集中于细胞过程、代谢过程、结合蛋白、氧化还原、催化活性等功能。KEGG 途径富集结果表明, EMS 诱变下 DEGs 显著富集在植物激素信号转导、光合作用、光合生物的固碳作用及光合作用-天线蛋白、胡萝卜素合成、不饱和脂肪酸代谢以及淀粉和糖代谢途径。EMS 诱变能引起蒲公英胚性细胞植物激素信号转导途径关键酶基因的表达上调, 响应胁迫。结论 通过转录组测序, 初步表明 EMS 诱变下蒲公英胚性细胞差异基因的表达, 并调控蒲公英胚性细胞中植物激素信号转导途径的相关酶基因, 以期从分子基因方面培育优质蒲公英提供参考和依据。

**关键词:** 蒲公英; 甲基磺酸乙酯; 转录组测序; 胡萝卜素; 植物激素信号转导途径

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)06-2111-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.023

## Effect of ethyl methylsulfonate on gene expression of embryogenic cells of *Taraxacum mongolicum*

FENG Wei, MENG Ran, LI Zhaojia, WU Zhe, LU Xuelin, CHEN Yue, WANG Xiuping

Institute of Coastal Agriculture Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tangshan 063200, China

**Abstract: Objective** Transcriptome sequencing was performed on *Taraxacum mongolicum* embryogenic cells induced by ethyl methanesulfonate to explore the effect of ethyl methanesulfonate mutagenesis on gene expression in *T. mongolicum*. **Methods** Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing technology was used to sequence embryogenic cells of *T. mongolicum* in 0% EMS (control) and 0.15% EMS treatments for 8 h and establish cDNA database. Unigene was obtained by splicing, and further biochemistry analysis was carried out. **Results** A total of 32 954, 12 923, 21 752, 28 115 and 9 764 Unigene were annotated by non-redundant protein sequence database (NR), gene ontology (GO), Swiss-Prot, eggNOG and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) databases, respectively. A total of 45 551 DEGs were screened. GO enrichment analysis revealed that the DEGs of dandelion embryonic cells were mainly concentrated in cellular processes, metabolic processes, binding proteins, redox and catalytic activity in GO functional annotation. The KEGG pathway enrichment results showed that DEGs were significantly enriched in plant hormone signal transduction, photosynthesis, carbon sequestration in photosynthetic organisms, photosynthesis antenna protein synthesis, carotenoid synthesis, unsaturated fatty acid metabolism, and starch and sugar metabolism pathways under EMS mutagenesis. EMS mutagenesis can induce upregulation of key enzyme genes in the plant hormone signaling pathway of *T. mongolicum* embryonic cells in response to stress. **Conclusion** Through transcriptome sequencing, it has been preliminarily demonstrated that EMS induces differential gene expression in *T. mongolicum* embryogenic cells and regulates the related enzyme genes of plant hormone signaling pathways in *T. mongolicum* embryogenic cells, in order to provide reference and basis for cultivating high-quality *T. mongolicum* from the molecular gene perspective.

**Key word:** *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.; ethyl methanesulfonate; transcriptome sequencing; carotene; plant hormone signaling pathway

收稿日期: 2024-09-15

基金项目: 河北省农林科学院基本科研业务费项目 (2023010101); 河北省重点研发项目 (21326312D-8); 河北省农林科学院科技创新专项课题资助 (2022KJCXZX-BHS-4)

作者简介: 冯 薇 (1994—), 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为药用植物遗传育种及应用研究。

Tel: 15830573205 E-mail: fengwei522106@163.com

\*通信作者: 王秀萍, 研究员, 研究方向为药用植物开发利用方面的研究。Tel: 13931562282 E-mail: bhswxp@163.com

蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 又名婆婆丁、黄花地丁、黄花三七等, 始载于《唐本草》, 是一种历史悠久的药食同源作物<sup>[1]</sup>。蒲公英植株可分离出酚酸类、黄酮类、多糖类、萜醇类等药用活性物质, 具有抑菌消炎、保肝利胆、抗肿瘤、保护肠胃、利尿、改善皮肤病等多种功效<sup>[2]</sup>, 在中医中有“天然抗生素”和“草药皇后”之称<sup>[3]</sup>。目前, 已开发出多种蒲公英产品, 包括蒲公英根茶、蒲公英挂面和蒲公英酵素等, 市场需求量大<sup>[4]</sup>。但蒲公英种质资源良莠不齐, 其产量和质量难以稳定控制, 因此, 如何获得高品质的蒲公英新种质资源成为制约该产业发展的一个重要因子, 利用生物技术改良蒲公英种质资源成为研究的热点之一<sup>[5]</sup>。

诱变作为种质资源创新的有效手段, 已被广泛运用于育种和功能基因的分析研究<sup>[6]</sup>。其中, 化学诱变是通过化学诱变剂造成生物 DNA 的损伤和错误修复, 从而产生突变体的一种诱变方式, 因其操作简便、突变率高、短时间内可获得大量突变体, 已成为最常用的诱变育种方法之一<sup>[7]</sup>。自从 1953 年, Kölmark<sup>[8]</sup>首次报道了烷化剂双环氧丁烷可以有效地诱导物种突变, 作为烷化剂的甲基磺酸乙酯 (ethyl methanesulfonate, EMS) 开始被广泛应用到作物诱变育种中。当植物遭受干旱、高温、盐或诱变、辐射等非生物胁迫时, 体内部分代谢通路可能被激活响应多种生物和非生物胁迫, 从而激活激素应答信号, 参与调控植物的生长发育过程<sup>[9]</sup>。

近年来随着高通量转录组测序技术 (RNA sequencing, RNA-seq) 的快速发展, 通过量化基因的表达, 挖掘生物重要功能基因, 为培育物种优良性状提供支撑。目前, 依托 RNA-seq 探讨植物响应胁迫的分子机制已成为目前研究的热点<sup>[10]</sup>。EMS 是化学诱变中最常用的诱变剂, EMS 诱变具有单个碱基点突变率高、成本低、易操作等优点, 通过 EMS 诱变获得突变体可以为育种和基因功能研究提供有利的材料<sup>[11]</sup>。EMS 诱变对植物突变体筛选评价、突变体库构建、遗传多样性分析已有深入研究, 廖恩慧等<sup>[12]</sup>以 EMS 为化学诱变剂, 用不同体积分数 EMS 诱变处理黄蜀葵进行优株筛选, 结果表明, 体积分数 1.4% EMS 的诱变效果最佳得到黄蜀葵高花总黄酮产量的优株; 尹丽娟等<sup>[13]</sup>以甲基磺酸乙酯处理西瓜种子和幼苗, 表型观测, 得到 13 种变异类

型, 总突变率为 5.21%; EMS 溶液诱变处理广金钱草种子, 半致死剂量浓度为 0.6%, 处理时间为 4 h, 获得 759 份发生 1 个到多个性状变异的突变株, 初步构建 EMS 诱变广金钱草突变体库<sup>[14]</sup>; 孙明洋等<sup>[15]</sup>利用 1.8% 诱变剂 EMS 处理籽用美洲南瓜种子 15 h, 筛选到 242 个突变植株, 45 种表型变异, 总的突变频率达到 25.17%, 构建了籽用美洲南瓜突变体库。但 EMS 诱变对植物突变对代谢通路调控机制的研究还较少。

本研究以蒲公英为材料, 分别设置对照组和胁迫组, 利用转录组测序和差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析方法, 从转录组水平上揭示 EMS 诱变对蒲公英胚性细胞基因表达的影响, 为实际生产中蒲公英的分子育种提供理论依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

实验所用蒲公英种子于 2018 年采自河北省保定市安固市, 该资源叶片较大, 叶缘绿色、叶基紫色, 裂缘无具齿, 由河北省农林科学院王秀萍研究员鉴定为蒲公英 *T. mongolicum* Hand.-Mazz.。测序所用的蒲公英愈伤组织, 用叶片组织培养方式获得。

### 1.2 试剂与仪器

全能型植物 RNA 提取试剂盒 (DNaseI)、HiFi-Scriptc DNA Synthesis Kit 反转录试剂盒, 康为世纪生物科技有限公司; Ultra SYBR Mixture (LowROX) 试剂盒, 康为世纪生物科技有限公司。UV5Nano 型超微量分光光度计 (METTER TOLEDO 公司, 美国), ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

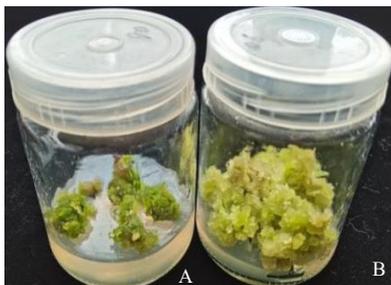
## 2 方法

### 2.1 样品处理

以蒲公英叶片为试材, 用流水冲洗 1 min 清除叶片表面污渍, 在超净工作台用 75% 的乙醇冲洗 15 s, 用无菌超纯水冲洗 3 次后, 用 0.1% 的氯化汞消毒 8~10 min, 接着用无菌超纯水冲洗 5 次, 最后用手术刀将蒲公英叶片切成 1 cm×1 cm 左右的小块; 将蒲公英叶片放在含不同浓度的植物生长调节剂 MS 培养基中诱导愈伤组织, 试验均为 (25±1) °C 培养 30 d。

愈伤组织试材浸泡在 0.15% EMS 处理液中, 处理期间放入摇床 100 r/min、25 °C 黑暗环境条件, 使溶液与愈伤组织均匀接触, 处理时间为 8 h; 处理

完毕后,用无菌水冲洗5次以上,去除毒性,吸干表面水分,将愈伤组织接种于继代培养基上恢复生长15~20 d,促进其生长,后转到含0.15% EMS的固体培养基中(图1-A),MS培养基中愈伤组织为对照(图1-B)。



A-含有0.15% EMS的固体培养基; B-含有MS的固体培养基。  
A-a solid medium containing 0.15% EMS; B-a solid medium containing MS.

图1 不同处理下蒲公英愈伤组织

Fig. 1 Callus tissue of *T. mongolicum* under different treatments

## 2.2 总RNA的提取与转录组测序

取蒲公英愈伤组织(蒲公英胚性细胞)在液氮中研成粉末,用康为世纪生物科技有限公司的全能型植物RNA提取试剂盒(DNaseI)提取总RNA,并用UV5Nano超微量分光光度计(METTER TOLED,美国)检测总RNA的纯度与浓度,每个处理3份生物学重复,对照组3份(CK-E1、CK-E2、CK-E3),EMS诱变组3份(E1、E2、E3)。委托北京百迈客生物科技有限公司构建测序文库,并使用Illumina HiSeq 2500测序平台进行转录组测序。

## 2.3 测序数据组装及Unigene功能注释

使用HISAT2将过滤后得到的高质量序列(clean data)比对到蒲公英参考基因组上,然后使用BLAST软件将Unigene序列与NR、Swiss-Prot、GO、eggNOG、KEGG数据库比对,获得注释基因数量。

## 2.4 mRNA差异表达分析

利用FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)法计算转录本表达量并进行统计。根据FPKM定量结果,进行热图绘制,计算出所有样品两两之间的相关性。

## 2.5 EMS胁迫下蒲公英胚性细胞差异表达基因GO富集与KEGG信号通路分析

使用FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)计算Unigene的表达量,并筛选差异表达基因(DEGs), $P < 0.05$ 和 $FC \geq 2$ 或 $\leq 0.5$ 。并对筛选出的DEGs进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析,KEGG分析主要生化代谢途径和信号转导途径,并根据注释结果将差异基因进行分类。

## 2.6 EMS胁迫下蒲公英胚性细胞实时荧光定量PCR验证

将不同处理下的蒲公英胚性细胞的总RNA用HiFi-Scriptc DNA Synthesis Kit反转录试剂盒合成cDNA后进行实时荧光定量PCR [康为世纪的Ultra SYBR Mixture (LowROX)试剂盒],ABI7500荧光定量PCR仪进行扩增。本实验选取内参基因<sup>[16]</sup>及4个Unigene进行表达量验证(表1)。反应程序为:95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃退火1 min, 72℃延伸32 s, 40个循环,根据各样品特定荧光阈值下的 $C_t$ 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因表达量,得到样本基因相对表达图谱。

## 3 结果与分析

### 3.1 测序数据与基因注释

为全面研究EMS转录组特征,构建蒲公英样本转录组文库6个(CK-E1、CK-E2、CK-E3、E1、E2、E3),测序获得45.21 Gb clean data,各样本的有效数据量分布在6.61~7.33 G,  $Q_{30}$ 碱基分布在95.98%~96.88%,平均GC含量为55.59%(表2)。说明测序结果准确度较高,可以用于后续分析。

表1 qRT-PCR扩增特异引物

Table 1 Specific primers of qRT-PCR amplification

| 基因名称                | 序列上游引物(5'→3')         | 序列下游引物(5'→3')         | 预期扩增长度/bp |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| <i>actin</i>        | AGCAGCTTCCATTCCGATCA  | GGTTACATGTTCCACCACCAC | 988       |
| <i>TbA03G008910</i> | ATGTGCTGCACATCTCAGTG  | CGAAGATCGATGCATGCTG   | 765       |
| <i>TbA03G045730</i> | ACATCCAACAGAACCTCGGC  | TGTGTGACCAGGGACAAGCA  | 1 122     |
| <i>TbA02G010390</i> | ATCAGACCCGAACCCGATGT  | GCGTTCAATGTCTCAGGCTTC | 1 233     |
| <i>TbA05G013450</i> | ACAACCTACCAAGACGCCATG | ACCGATAGGGTGGCCGAAGG  | 1 057     |

表 2 过滤后数据统计

Table 2 Statistics of filtered data

| 样本名   | 干净数据数目      | 高质量干净数据数目 (占比)       | Q <sub>30</sub> /% | GC/%  |
|-------|-------------|----------------------|--------------------|-------|
| CK-E1 | 106 873 366 | 105 489 648 (98.70%) | 96.77              | 55.89 |
| CK-E2 | 103 648 972 | 102 289 634 (98.68%) | 96.35              | 55.32 |
| CK-E3 | 104 679 835 | 103 247 681 (98.63%) | 96.06              | 55.63 |
| E1    | 87 946 351  | 86 753 128 (98.64%)  | 95.98              | 56.66 |
| E2    | 98 764 256  | 97 420 497 (98.63%)  | 95.96              | 55.48 |
| E3    | 75 645 280  | 74 606 986 (98.62%)  | 96.88              | 55.56 |

将拼接得到的 Unigene 注释到功能数据库，共注释到 45 551 条基因，结果见图 2。按照注释比例发现，注释到 NR 库基因最多，有 32 954 条(72.34%)，在 eggNOG、Swissprot 库分别有 30 068 条 (66%) 和 21 752 条 (47.75%) 基因显著匹配，在 GO 库中 12 923 条 (28.37%)；281 15 条 (61.72%) 基因注释到 eggNOG-Category；注释到 KEGG 库有 9 764 条 (21.43%) 基因。

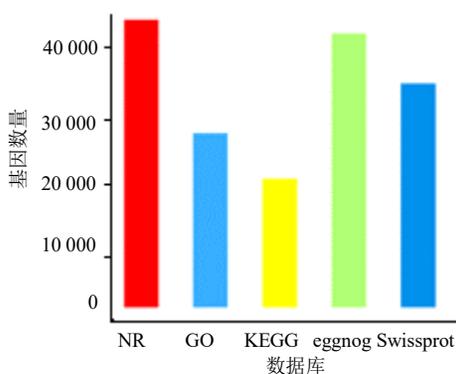


图 2 Unigene 的不同数据库功能注释

Fig. 2 Annotations on Unigene's different database functionality

### 3.2 mRNA 表达水平分析

样品间基因表达水平相关性是检验试验可靠性和样本选择是否合理的重要指标，相关系数越接近 1，表明样品表达模式的相似度越高。根据 FPKM 计算结果对转录本表达量进行计算，根据结果计算出各样品之间的相关性(图 3)。对照组(CK)相关性系数( $r^2$ )值为 1.00，EMS 诱导组的  $r^2$  为 1.00。表明其重复性高，数据准确且稳定。

### 3.3 EMS 诱变下蒲公英 mRNA 差异表达分析

mRNA 差异表达分析结果表明，EMS 诱变组织转录组相比于对照组转录组文库分析，共发现显著差异表达基因 6 759 个，其中上调基因 3 720 个，下调基因 3 039 个(图 4)。其中表达量最高且表达差异倍数较大的基因分别是  $\beta$ -葡萄糖苷酶

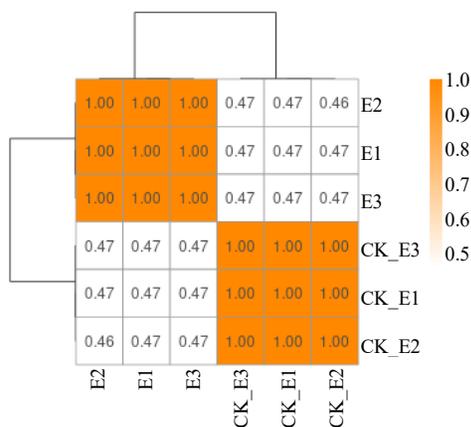


图 3 样品间表达量相关性热图

Fig. 3 Correlation heat map of gene expression level in samples

( $\beta$ -glucosidase 24-like) 与未被描述的新基因(TbA02G006950)。另外，一种存在于莴苣中未被命名的蛋白基因(unnamed protein product)、生长素外排组分 5(auxin efflux carrier component 5-like)、硫代磷酸转移酶 18 基因(thiosulfate sulfurtransferase 18-like isoform X2)、类果胶酯酶 2 基因(pectinesterase 2-like)、烯酰辅酶 A 还原酶(very-long-chain enoyl-CoA reductase-like)在 EMS 诱变组织转录组相比于对照组转录组表达量也较高，差异倍数较大。

对筛选出的差异表达本进行聚类分析，每列表代表一个样品，每行代表一个转录本，颜色越红表示表达量越高，颜色越蓝表示表达量越低。结果如图所示(图 5)。在纵向来看，对照组(CK)与诱导处理组(EMS)的 3 个生物学重复样本聚类在一起，说明生物学重复样品间具有很高的相关性。从纵向来看显著性差异基因可以分为上下 2 个基因簇，结果显示上调与下调基因的聚类是成功的，与筛选出的差异表达基因结果相符合，并且上调基因之间及下调基因间相关性均很高。

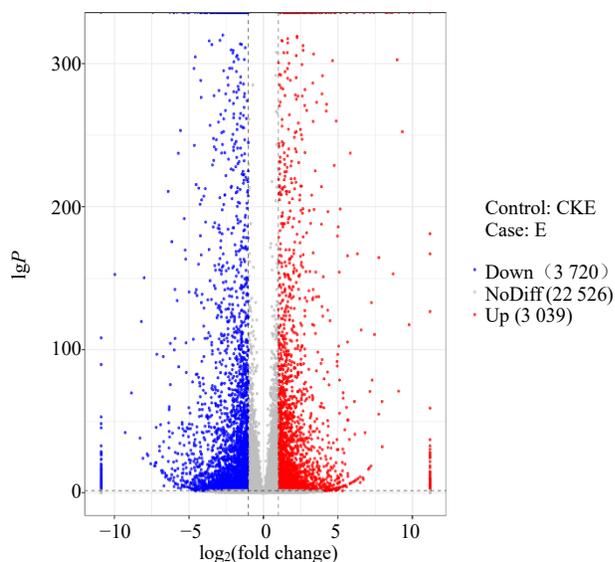


图4 差异表达基因火山图

Fig. 4 Volcano plot of differentially expressed genes

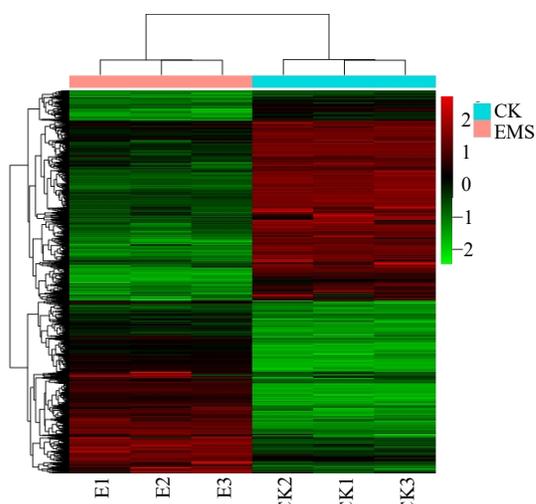


图5 差异表达基因聚类分析图热图

Fig. 5 Differential expression gene clustering analysis heat map

### 3.4 差异表达基因的GO富集分析

对蒲公英胚性细胞差异表达基因的GO富集结果进行分析,按照细胞组分 (cellular component, CC)、生物过程 (biological process, BP) 和分子功能 (molecular function, MF) 进行GO分类,挑选每个GO分类中P值最小即富集最显著的前10个GO term 条目进行展示 (图6)。与对照相比,EMS诱导处理时,CC主要包括基质类囊体、叶绿体类囊体、类囊体、基质类囊体膜、膜、叶绿体类囊体膜、光合膜、类囊体膜、细胞外围、质外体等;MF主要包括氧化还原酶活性、氧化还原酶活性,作用于

配对供体、单加氧酶活性、葡萄糖转移酶、氧化还原酶活性,作用于硫基团、UDP-葡萄糖基转移酶活性、转氨酶活性、含氮转移酶活性、跨膜转运蛋白活性等;BP主要包括响应化学物质过程、应激反应、氧化还原过程、光合作用、响应激素过程、次生代谢反应、次生代谢产物生物合成过程、对细胞分裂素的响应、对含氧化合物的反应、光吸收过程等。值得注意的是,光合作用 (photosynthesis) 相关DEGs在诱变中占比最高,表明EMS诱变下,光合作用可能在调节蒲公英代谢过程和抵御胁迫的生理过程中发挥重要作用。

### 3.5 差异表达基因的KEGG通路富集分析

将蒲公英胚性细胞的DEGs进行KEGG途径富集分析,  $P \leq 0.05$  的通路被定义DEGs显著富集的通路,见图7。EMS诱变下,蒲公英胚性细胞中显著富集到的KEGG途径分为3类,第1类为光合作用包括光合作用、光合生物的固碳作用及光合作用-天线蛋白,第2类为信号转导途径包括植物激素信号转导,第3类则是胡萝卜素合成、不饱和脂肪酸代谢以及淀粉和糖代谢途径,显著富集到的途径主要涉及到一些代谢过程,包括氨基酸、甘油酯类、淀粉和糖代谢以及苯丙烷类生物合成。并且由KEGG注释结果可知,EMS诱变可促进蒲公英胚性细胞中光合作用的一些关键酶基因表达,b6-f复合物家族中铁硫蛋白组中的细胞色素b6-f复合铁硫亚基 (TbA04G035670),在光合作用通路中上调表达的基因仅此1个,参与呼吸和光合电子转移。通过对全部差异Unigene (包括上调和下调) 进行KEGG功能富集,表中筛选出的差异代谢通路中Unigene受EMS诱变影响显著。

### 3.6 EMS诱变对蒲公英相关酶基因的调控

通过KEGG map分析EMS诱变下蒲公英胚性细胞基因表达的调控富集最显著的植物激素信号转导途径涉及的相关基因为296个,其次是苯丙烷生物合成途径涉及的相关基因204个,糖酵解途径涉及的相关基因158个,淀粉和蔗糖代谢相关基因150个,丙酮酸代谢涉及的相关基因123个 (表3),细胞富集的糖酵解及丙酮酸代谢、淀粉和蔗糖代谢途径等都是糖代谢相关途径。KEGG富集结果表明,蒲公英胚性细胞富集通路中其中一些基因可能对蒲公英的抵御EMS诱变胁迫发挥作用。因此挖掘富集最显著相关途径中关键酶基因对蒲公英新品种选育具有重要意义。

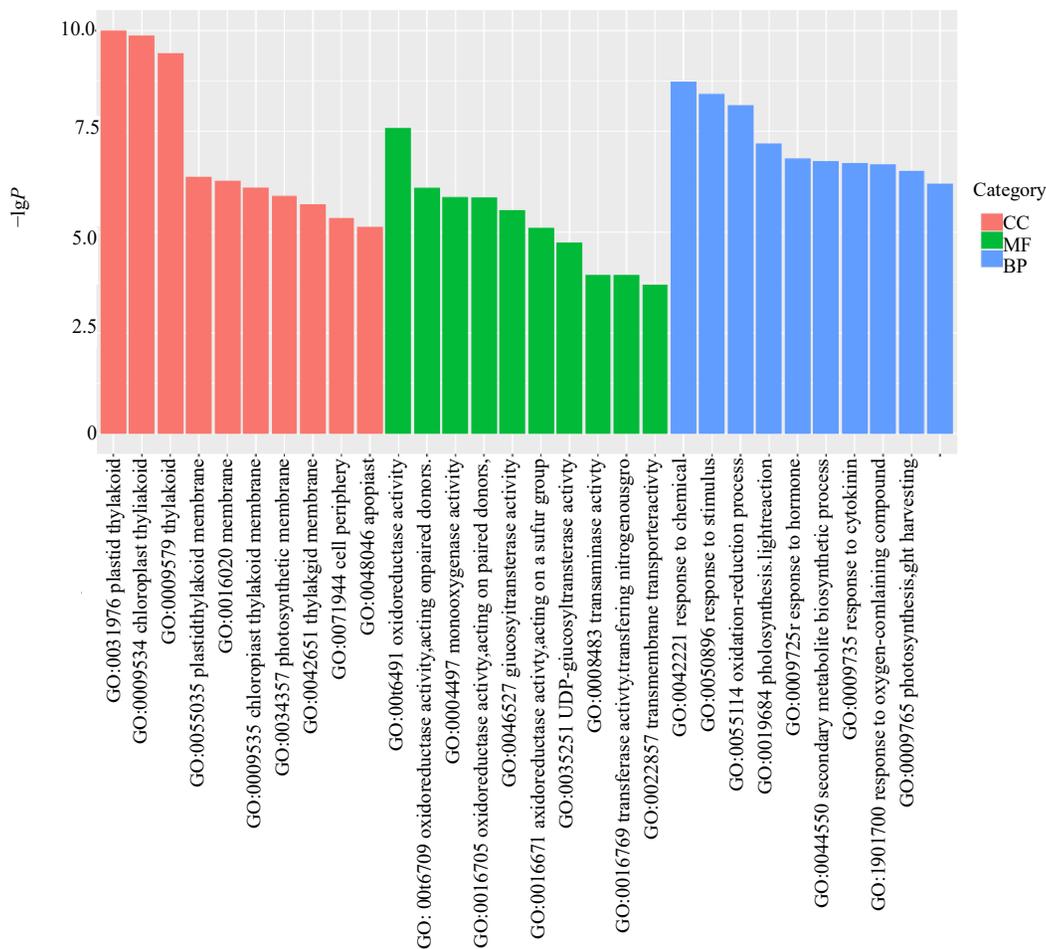


图6 EMS诱导下蒲公英胚性细胞差异基因的GO功能注释分类

Fig. 6 Classification of GO functional annotation of differential genes in *T. mongolicum* embryonic cells induced by EMS

### 3.7 EMS 诱变对蒲公英植物激素信号转导相关酶基因的调控

EMS 诱变下蒲公英植物激素信号转导主要包括，赤霉素生物合成途径，玉米素生物合成途径，芸苔素类固醇生物合成。通过 KEGG map 分析并结合前人研究发现 EMS 诱变下有 10 个编码酶基因在植物激素信号转导中发挥重要作用（表 4），并且这些酶基因在 EMS 诱变的蒲公英胚性细胞中均存在差异表达。

**3.7.1 赤霉素生物合成途径** 该途径主要是 ABA 参与的信号转导途径（图 8），AHG1 型蛋白磷酸酶是蒲公英植物激素信号转导过程中的关键酶，AHG1 型蛋白磷酸酶可以和脱落酸受体（pyrabatin resistance/pyrabatin resistance 1-Like, PYR/PYL）、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SRK2（sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2, SnRK2）相互作用调控植物体内抵御逆境胁迫。当受到逆境胁迫

时，PYR/PYL 与丝氨酸/苏氨酸残基蛋白磷酸酶（2C-type protein phosphatases, PP2Cs）蛋白基因结合从而抑制磷酸酶活性，使下游 SnRK2 的处于失活状态，失去磷酸化并活化下游信号通路成分的能力<sup>[17]</sup>。本实验中 AHG1 型蛋白磷酸酶的基因在蒲公英胚性细胞中下调（TbA07G036180, 1.9 倍），推测 EMS 诱变负调控该基因的表达参与激素信号转导，ABA 响应基因表达受抑制，从而提高蒲公英胚性细胞的抗逆性。

**3.7.2 玉米素生物合成途径** 玉米素是细胞分裂素家族的成员<sup>[18]</sup>，细胞分裂素家族是一类参与植物生长和发育过程的植物激素。玉米素可以通过 2 种不同的途径合成：tRNA 途径和 AMP 途径。在 tRNA 通路中，玉米素是异戊烯基化 tRNA 的回收产物。在 AMP 途径中，玉米素由异戊烯基供体、二甲烯丙基二磷酸和 AMP、ADP 或 ATP 通过异戊烯基转移酶合成。合成后，细胞分裂素可以被糖基化。

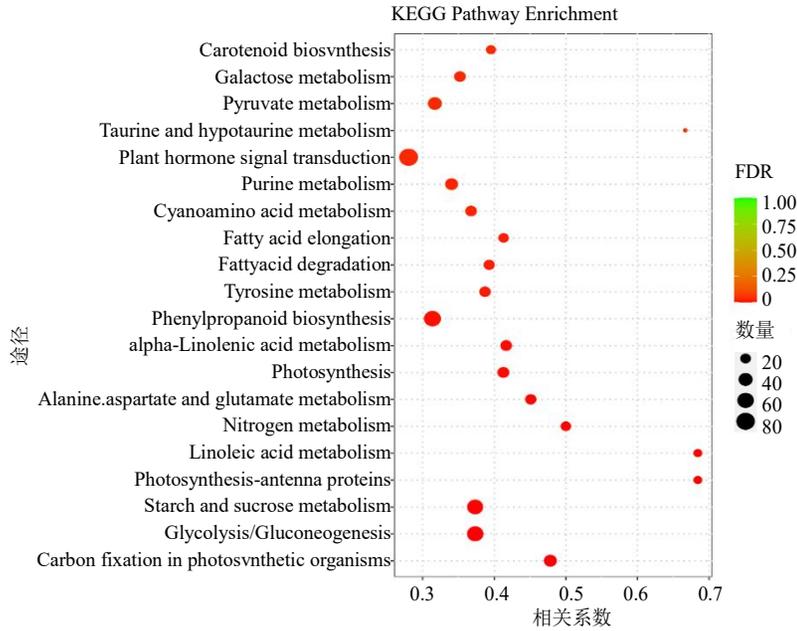


图7 KEGG 富集气泡图

Fig. 7 KEGG enriched bubble chart

表3 差异表达基因显著富集的 KEGG 途径

Table 3 Significantly enriched KEGG pathways of DEGs

| KEGG途径         | 上调基因数 | 下调基因数 | 基因总数 | 通路ID    | P值                      |
|----------------|-------|-------|------|---------|-------------------------|
| 光合生物的固碳作用      | 14    | 19    | 69   | ko00710 | 1.04 × 10 <sup>-6</sup> |
| 糖酵解            | 39    | 20    | 158  | ko00010 | 3.44 × 10 <sup>-6</sup> |
| 淀粉和蔗糖代谢        | 25    | 31    | 150  | ko00500 | 6.11 × 10 <sup>-6</sup> |
| 光合作用-天线蛋白      | 0     | 13    | 19   | ko00196 | 1.48 × 10 <sup>-5</sup> |
| 亚油酸            | 3     | 10    | 19   | ko00591 | 1.48 × 10 <sup>-5</sup> |
| 氮代谢            | 9     | 10    | 38   | ko00910 | 9.57 × 10 <sup>-5</sup> |
| 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 | 10    | 13    | 51   | ko00250 | 1.38 × 10 <sup>-4</sup> |
| 光合作用           | 1     | 25    | 63   | ko00195 | 3.05 × 10 <sup>-4</sup> |
| α-亚麻酸代谢        | 9     | 16    | 60   | ko00592 | 3.32 × 10 <sup>-4</sup> |
| 苯丙烷生物合成        | 43    | 21    | 204  | ko00940 | 5.84 × 10 <sup>-4</sup> |
| 植物激素信号转导       | 25    | 58    | 296  | ko00940 | 4.20 × 10 <sup>-3</sup> |
| 丙酮酸代谢          | 24    | 15    | 123  | ko00620 | 3.32 × 10 <sup>-2</sup> |

表4 蒲公英胚性细胞受 EMS 诱导调控的植物激素信号转导途径基因

Table 4 Plant hormone signaling pathway genes regulated by EMS induction in *T. mongolicum* embryogenic cells

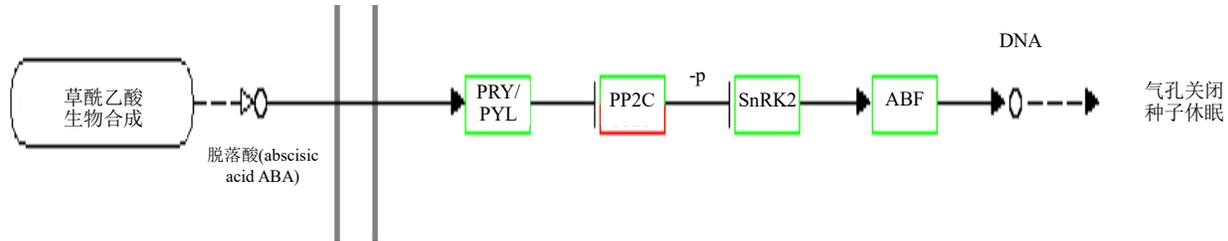
| 基因ID         | 表达变化 | 基因注释            |
|--------------|------|-----------------|
| TbA03G008910 | 上调   | 组氨酸激酶4          |
| TbA03G045730 | 上调   | 生长素反应蛋白IAA17    |
| TbA06G012820 | 上调   | 乙烯受体2           |
| TbA04G068550 | 上调   | 蛋白磷酸酶2C 75      |
| TbA07G099330 | 上调   | 油菜素抗性蛋白1        |
| TbA05G071330 | 下调   | 组氨酸激酶3          |
| TbA02G010390 | 下调   | 油菜素内酯不敏感受体激酶    |
| TbA05G013450 | 下调   | 吲哚-3-乙酸诱导蛋白ARG7 |
| TbA01G013760 | 下调   | 蛋白质RGL2         |
| TbA08G021320 | 下调   | 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶CTR1 |

本实验中 UDP-葡萄糖基转移酶 (TbA04G077120, 1.16 倍) 是玉米素生物合成途径中的关键酶, 与组氨酸激酶 2/3/4 (细胞分裂素受体) 结合正向调控糖基转移酶 B 型反应调节因子 (B-ARR) 与 A 型反应调节因子 (A-ARR), EMS 诱变对细胞分裂素进行 N-葡萄糖基化, 从而调控蒲公英胚性细胞分裂响应胁迫 (图 9)。

**3.7.3 芸苔素类固醇生物合成** 芸苔素类固醇是一组调节生长发育的植物类固醇激素。在多种植物物种中已鉴定出 50 多种天然存在的油菜素类固醇, 最丰富和广泛存在的油菜素类固醇是 C<sub>28</sub> 类固醇, 其中芸苔素内酯 (brassinolide, BL) 的生物活性最强<sup>[19]</sup>。植物具有多种 BL 的生物合成途

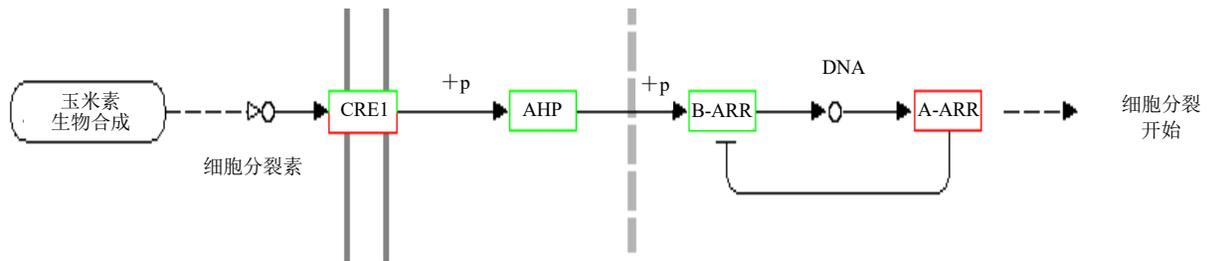
径, 这些途径来源于类固醇生物合成途径。从菜树酚到卡司酮的 2 种途径, C<sub>6</sub>氧化和晚期 C<sub>6</sub>氧化途径, 在许多植物中起作用。本实验中芸苔素类固醇生物合成途径中存在 2 个分支途径, 一个分支途径为细胞伸长的途径。BAK1 和 BRJ1 作为芸苔素类固醇不敏感相关受体激酶可作为 BRI1 信号传导的负调节因子负调控 BSK1 激酶抑制剂响应胁迫, 另一方面正向调控 BR 信号激酶 (BR signal kinas,

BSK)。BIN2 蛋白激酶底物是芸苔素类固醇信号传导的核心, 也是蛋白酶体降解途径的分子开关。该蛋白激酶调控木葡糖基转移酶影响细胞生长, 另一个分支途径核心蛋白激酶调控 CYCD3 (TbA04G015210, 上调 1.8 倍) 细胞周期蛋白促进细胞分裂 (图 10)。本实验中芸苔素类固醇生物合成途径中关键基因变化响应 EMS 诱变胁迫, 从而促进蒲公英胚性细胞的生长与分裂。



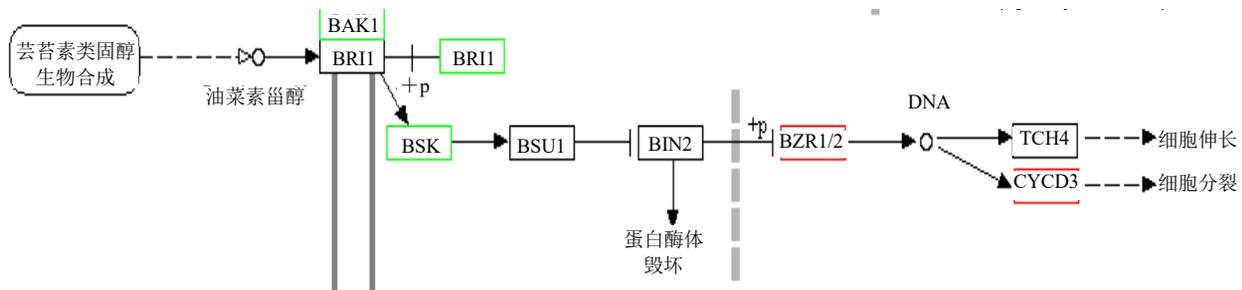
PYR/PYL-脱落酸受体; PP2C-2C 类蛋白磷酸酶; SnRK2-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SRK2; ABF-ABA 响应元件结合因子。  
 PYR/PYL-Abscisic acid receptor; PP2C-Class 2C protein phosphatase; SnRK2-Serine/threonine protein kinase SRK2; ABF-ABA- responsive element binding factor.

图 8 赤霉素生物合成途径  
 Fig. 8 Gibberellin biosynthesis pathway



CRE1-细胞分裂素受体; AHP-组氨酸磷酸转移蛋白; B-ARR-B 型反应调节因子; A-ARR-A 型反应调节因子。  
 CRE1-cytokinin receptor; AHP-histidine phosphotransfer protein; B-ARR-B-type response regulatory factor; A-ARR-A-type response regulatory factor.

图 9 玉米素生物合成途径  
 Fig. 9 Biosynthetic pathway of zeaxanthin



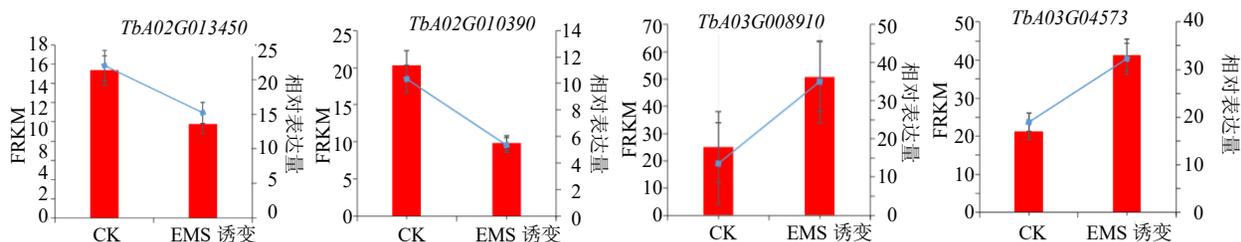
BAK1、BRJ1 为芸苔素类固醇不敏感相关受体激酶; BSK 为 BR 信号激酶; BSU1 为正向调控蛋白; BIN2 为蛋白激酶底物; BZR1/2 为下游转录因子; TCH4 为木葡糖基转移酶; CYCD3 为细胞周期蛋白。  
 BAK1、BRJ1 are brassinoid steroid insensitive receptor kinase; BSK is BR signal kinase; BSU1 is positive regulatory proteins; BIN2 is protein kinase substrate; BZR1/2 is downstream transcription factors; TCH4 is wood glucosyltransferase; CYCD3 is cyclinD3.

图 10 芸苔素类固醇生物合成  
 Fig. 10 Biosynthesis of brassinosteroids

### 3.8 qRT-PCR 表达量分析

为保证试验结果的可靠性,选取4个蒲公英植物激素信号转导途径相关的酶基因(上调基因 *TbA03G008910*、*TbA03G045730* 及下调基

因 *TbA02G010390*、*TbA05G013450*) 进行 qRT-PCR 表达量验证(图 11),图中可以看出,转录组测序基因变化趋势与 PCR 验证结果基本一致。



柱状图表示 RNA-seq 数据 (FPKM), 折线图表示代表 qRT-PCR 结果。  
the bar graphs represent the RNA-seq data (FPKM), and the line graphs represent the qRT-PCR result.

图 11 EMS 诱变下蒲公英胚性细胞中植物激素信号转导相关基因表达量

Fig. 11 Expression levels of genes related to plant hormone signaling transduction related in embryogenic cells of *T. mongolicum* under EMS mutagenesis

## 4 讨论

变异是生物进化的基础推动力,也是保证物种多样性的前提,是其他任何方式不能代替的重要演变方式<sup>[20]</sup>。丰富的种质资源是作物育种和功能基因组学研究的重要基础,研究诱变育种可为其提供丰富的原始材料。EMS 是一种最常见的烷化剂,是目前诱变效率最高,使用最为广泛的诱变剂之一<sup>[21]</sup>,EMS 诱变不仅操作简单,同时在改良性状和抗逆性方面也具有显著效果<sup>[22]</sup>。基于高通量测序技术为诱变植物基因表达的全面分析提供合理的数据资源,对揭示植物抗逆机制、培育优良品种具有重要意义。

本研究对 EMS 诱变下的蒲公英胚性细胞进行了转录组测序和差异表达基因分析。GO 富集结果表明,EMS 诱变下,蒲公英胚性细胞中 DECs 在 GO 功能部位中的分布富集到代谢过程、细胞结构、刺激响应、催化活性、光合作用等功能中,表明蒲公英对 EMS 诱变初期的响应可能涉及多个功能基因。

KEGG 途径富集分析表明,蒲公英胚性细胞受 EMS 诱变胁迫调控的途径存在显著差异。其中植物激素信号转导途径、多种代谢途径基因均受到 EMS 诱变胁迫的不同影响,EMS 诱变可激活多种植物激素信号转导途径,本研究中主要涉及赤霉素生物合成途径、玉米素生物合成途径、芸苔素类固醇生物合成途径 3 类代谢通路。赤霉素生物合成途径种主要为脱落酸 (ABA) 参与的信号转导途径,研究表明,ABA 是一种倍半萜烯类植物激素,它可以调节植物的生长发育,如胚胎成熟、气孔调节、休眠、

发芽、种子发育和激活胁迫应答基因<sup>[20]</sup>,需要 PYR/PYL、PP2Cs 和 SnRK2s, 3 个蛋白家族的共同参与<sup>[23]</sup>。当蒲公英胚性细胞受到 EMS 诱变胁迫时, PYR/PYLs 与 PP2Cs 相互作用、抑制磷酸酶活性, SnRK2 的磷酸化目标蛋白,并结合脱落酸应答元件 (ABF),从而诱导相关基因表达抵御逆境胁迫<sup>[24]</sup>。所以 EMS 诱变胁迫下,脱落酸可以显著促进蒲公英次生代谢产物的积累,提高蒲公英的品质<sup>[25]</sup>;玉米素是最普遍的天然细胞分裂素,在植物生长和发育的许多方面发挥作用,包括顶端优势、芽分生组织的形成和活性、叶片衰老、养分动员、种子发芽和病原体反应。它们似乎还介导了许多光调节过程,例如脱硫醇化和叶绿体分化<sup>[26]</sup>。本实验编码玉米素合成途径的相关基因组氨基酸激酶 4 显著高表达,推测 EMS 诱变下组氨酸激酶 4 正向调控糖基转移酶反应调节因子,从而调控蒲公英胚性细胞分裂响应胁迫;分子遗传学研究表明,油菜素类固醇 (BR) 是决定植物高度的最重要因素<sup>[27-29]</sup>。Zhi 等<sup>[30]</sup>发现 d61 突变是由 OsBRI1 功能丧失引起的,OsBRI1 编码一种推定的蛋白激酶,与推定的 BR 受体拟南芥 BRI1 高度相似。通过这项开创性的研究,揭示了 BR 对单子叶植物茎的伸长很重要,它也为研究 BR 在植物中的功能作用提供了线索。本实验中 BAK1 和 BRJ1 作为芸苔素类固醇不敏感相关受体激酶可作为 BRI1 信号传导的负调节因子正向调控 BSK,从而促进蒲公英胚性细胞的伸长与分裂。

关于植物在 EMS 诱变下的生理变化及抗逆反

应的研究已较成熟<sup>[31]</sup>,但鲜有将所有生理生化变化的分子机制研究透彻。通过转录组测序与分析,目前对蒲公英的 EMS 诱变胁迫分子响应机制研究较少,可供参考的遗传信息甚少,在一定程度上限制了蒲公英功能基因的挖掘。本研究获得了蒲公英胚性细胞的转录组信息,比较 EMS 诱变胁迫下的 DEGs 的表达情况和功能,尤其是调控蒲公英植物激素信号转导途径相关基因的表达差异性,为进一步揭示蒲公英植物激素信号转导途径和培养优质蒲公英提供基因依据,也为蒲公英种质创新或品种改良提供了基本材料。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 肖发林,黄诗雨,陈丽华,等. 蒲公英及其组方的价值及产品开发趋势研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 369-375.
- [2] 杨锐杰,乔华,刘文,等. 中药蒲公英花体外抗氧化活性部位研究 [J]. 中国药物与临床, 2016, 16(1): 9-11.
- [3] Fan M, Zhang X, Song H, *et al.* Dandelion (*Taraxacum* genus): A review of chemical constituents and pharmacological effects [J]. *Molecules*, 2023, 28(13): 5022.
- [4] Liu Q, Xu Y, Wu Z Q, *et al.* Understanding the biosynthesis and regulatory mechanisms of bioactive compounds in *Taraxacum* species (dandelions), a model system for natural rubber, food, and medicinal plant biology [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2022, 41(6): 406-425.
- [5] 付晨青,何立威,王秀萍,等. 药食同源蒲公英的开发应用研究现状与展望 [J]. 陕西农业科学, 2021, 67(5): 86-88.
- [6] 彭辉,穆麟,沈佳欣,等. 禾本科植物 EMS 诱变研究进展 [J/OL]. 植物遗传资源学报, [2024-08-28]. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231120001>.
- [7] 董文科,路旭平,姜寒玉,等. 多年生黑麦草 EMS 诱变与耐旱性评价 [J]. 核农学报, 2018, 32(10): 1889-1897.
- [8] Kölmark G. Differential response to mutagens as studied by the *Neurospora* reverse mutation test [J]. *Hereditas*, 1953, 39(1/2): 270-276.
- [9] 李晓艳,周敬雯,严铸云,等. 基于转录组测序揭示适度干旱胁迫对丹参基因表达的调控 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1600-1608.
- [10] 黄璐琦,郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(4): 277-280.
- [11] 吴正景,职铃华,刘素娟,等. 化学诱变提高植物抗逆性的研究进展 [J]. 核农学报, 2024, 38(2): 274-281.
- [12] 廖恩慧,郑玉红,葛海涛,等. 甲基磺酸乙酯(EMS)对黄蜀葵植株表型性状和花黄酮类成分含量的影响及优株筛选 [J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(6): 94-101.
- [13] 尹丽娟,王春霞,李陈浩,等. 西瓜 EMS 诱导的突变体筛选及表型分析 [J]. 园艺学报, 2023, 50(11): 2401-2416.
- [14] 张桂芳,周韦钦,陈斯嘉,等. EMS 诱变广金钱草突变体库的构建 [J]. 中药材, 2018, 41(10): 2255-2260.
- [15] 孙明洋,王萍. 籽用美洲南瓜 EMS 诱变突变体库的构建及表型分析 [J]. 西北植物学报, 2024, 44(8): 1283-1294.
- [16] 吴志清,亓希武,房海灵,等. 蒲公英 *TmRAV1* 基因克隆及其响应脱落酸信号表达分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 47-58.
- [17] 冯婵莹,王永飞. 植物脱落酸 PYR/PYL/RCAR 受体 [J]. 生命的化学, 2015, 35(6): 721-726.
- [18] Werner T, Motyka V, Laucou V, *et al.* Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2532-2550.
- [19] Choe S. Brassinosteroid biosynthesis and inactivation [J]. *Physiol Plant*, 2006, 126(4): 539-548.
- [20] 刘进平,郑成木. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用 [J]. 上海农业学报, 2004, 20(1): 19-22.
- [21] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, *et al.* Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis* [J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 731-740.
- [22] 曹亚萍,武银玉,刘博,等. 基于 EMS 诱变的济麦 22 抗旱节水突变体创制与鉴定 [J]. 麦类作物学报, 2024, 44(3): 315-322.
- [23] Li J L, Song C Y, Li H M, *et al.* Comprehensive analysis of cucumber *RAV* family genes and functional characterization of *CsRAV1* in salt and ABA tolerance in cucumber [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1115874.
- [24] Agarwal P K, Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling [J]. *Biol Plant*, 2010, 54(2): 201-212.
- [25] Fu M J, Kang H K, Son S H, *et al.* A subset of *Arabidopsis* *RAV* transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(11): 1892-1904.
- [26] McGaw B A, Hobgan R. Cytokinin metabolism and the

- control of cytokinin activity [J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 27 (2): 180-187.
- [27] Clouse S D, Sasse J M. BRASSINOSTEROIDS: Essential regulators of plant growth and development [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 427-451.
- [28] Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 137-164.
- [29] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, *et al.* Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the *Lamina* joint [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1591-1606.
- [30] Zhi H, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, *et al.* A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450 [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 2900-2910.
- [31] Liu Q, Wu Z, Han B, *et al.* Comprehensive metabolomic and transcriptomic analysis reveals that TmbZIP1-Tm4CL1 transcriptional module mediates ABA-promoted cholic acid biosynthesis in *Taraxacum mongolicum* [J]. *Sci Horticult*, 2023, 322: 112429.

[责任编辑 时圣明]