

DOI:10.11686/cyxb2025092

http://cyxb.magtech.com.cn

彭辉, 穆麟, 沈佳欣, 等. 扁穗牛鞭草种茎 EMS 化学诱变突变体创制. 草业学报, 2026, 35(2): 95—106.

PENG Hui, MU Lin, SHEN Jia-xin, *et al.* Creation of ethyl methanesulfonate chemical mutants of *Hemarthria compressa* seed stem. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(2): 95—106.

扁穗牛鞭草种茎 EMS 化学诱变突变体创制

彭辉^{1,2}, 穆麟^{1,2}, 沈佳欣^{1,2}, 王靖轩^{1,2}, 黄菁^{2,3}, 黄雨珣^{2,3}, 张志飞^{1,2*}

(1. 湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128; 2. 岳麓山实验室, 湖南长沙 410128; 3. 湖南省国有林和种苗工作站, 湖南长沙 410004)

摘要:扁穗牛鞭草是禾本科牛鞭草属多年生草本植物, 生长速度快, 适应性和抗逆性强, 是南方地区重要的饲草资源。本研究以扁穗牛鞭草种茎为试验材料, 设置甲基磺酸乙酯(EMS)不同浓度(0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)和处理时间(2、4、6 h)的双因素完全随机试验, 明确了扁穗牛鞭草种茎 EMS 诱变最佳处理浓度和处理时间分别为 0.6% 和 6 h。在扁穗牛鞭草 EMS 诱变群体中通过表型评价筛选获得了 1 株优良突变体(编号 5-5-4)。对突变体 5-5-4 进行低磷胁迫试验发现, 5-5-4 较野生型生根数和根尖数更多, 最长根长和总根长更大, 根毛结构更发达。低磷胁迫导致扁穗牛鞭草磷吸收量大幅下降, 但磷利用效率大幅提高, 且 5-5-4 根部和地上部磷利用效率均高于野生型。低磷胁迫下, 5-5-4 根系中酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性更高, 富集了解磷菌芽孢杆菌、沙壤土杆菌、红育菌。本研究基于 EMS 化学诱变技术, 解析了扁穗牛鞭草突变体耐受低磷胁迫的生理学机理, 创制出耐低磷的新型种质资源, 为南方低磷地区草牧业品种选育提供了理论依据与育种材料储备。

关键词:扁穗牛鞭草; EMS; 诱变; 突变体; 低磷胁迫

Creation of ethyl methanesulfonate chemical mutants of *Hemarthria compressa* seed stem

PENG Hui^{1,2}, MU Lin^{1,2}, SHEN Jia-xin^{1,2}, WANG Jing-xuan^{1,2}, HUANG Jing^{2,3}, HUANG Yu-xun^{2,3}, ZHANG Zhi-fei^{1,2*}

1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Yuelushan Laboratory, Changsha 410128, China; 3. State-owned Forest and Seedling Station in Hunan Province, Changsha 410004, China

Abstract: *Hemarthria compressa* is a perennial species of the Poaceae family, with fast growth rate, strong adaptability and stress resistance. It is a very important forage resource in the southern region of China. This study investigated the use of ethyl methanesulfonate (EMS) as a chemical agent to produce mutants of *H. compressa*. Stems of seedlings were used to provide cells of *H. compressa* for exposure to EMS and two factors were tested: EMS concentration (0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% or 1.0%) and treatment time (2, 4 or 6 h). It was found that the optimal EMS concentration and treatment time for mutagenesis of *H. compressa* is 0.6% and 6 hours. Phenotypic comparison testing identified an excellent *H. compressa* mutant among the EMS-mutated population, designated number 5-5-4. Comparative testing of mutant 5-5-4 and the wild type under low phosphorus stress conditions showed that 5-5-4 had greater root and root tip number, longest root length and total root length, and a more developed root hair structure than the wild-type. Low phosphorus stress resulted in a significant decrease in phosphorus uptake, but the phosphorus use efficiency was greatly improved and the phosphorus utilization efficiency

收稿日期: 2025-03-20; 改回日期: 2025-05-21

基金项目: 2023 年湖南省林业生态保护修复及发展项目资助。

作者简介: 彭辉(2000—), 男, 湖南邵阳人, 硕士。E-mail: 2670992877@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangzf@hunau.edu.cn

in roots and stems of mutant 5-5-4 was higher than in the wild type. Under low phosphorus stress, the activities of acid phosphatase, superoxide dismutase and peroxidase were also higher in roots of the mutant and roots of the mutant exhibited greater presence of phosphate-solubilizing bacteria, including *Bacillus*, *Ramlibacter* and *Rhodofera* in the rhizosphere. In summary, this study used EMS chemical mutagenesis technology to generate *H. compressa* mutants and analyzed the tolerance to low phosphorus stress and associated physiological parameters in a promising mutant, resulting in new germplasm resources with low phosphorus tolerance. These results provide both technical data for further mutagenesis work and breeding material development of improved *H. compressa* varieties to support animal husbandry in low phosphorus areas in southern China.

Key words: *Hemarthria compressa*; ethyl methane sulfonate (EMS); mutagenesis; mutant; low phosphorus stress

扁穗牛鞭草(*Hemarthria compressa*)是禾本科黍亚科牛鞭草属多年生草本植物,茎基部横卧,茎中上部直立,生长速度快,再生能力强,属于C₄植物,具有绿期长、适应性和抗逆性强、水土保持能力优良等特性,是热带、亚热带草地生态系统中的重要组成部分^[1-2]。截至目前,我国育成并通过国家登记的扁穗牛鞭草品种仅有广益(1987年登记)、重高(1987年登记)、雅安(2009年登记)和川中(2022年登记),均通过野生资源驯化选育而成,突出表现为饲用营养价值较好、草产量较高^[3-4]。广益和重高是我国最早育成的扁穗牛鞭草品种,主要针对长江中下游地区的气候特点,通过野生群体筛选和适应性驯化获得。雅安是通过四川雅安青衣江江边的野生扁穗牛鞭草群体进行筛选、驯化,再经过无性系多代优选,而培育出的显著提升抗逆性和产量的品种。寻找野生群体开展驯化育种需要大量的种质资源进行筛选评估,而且驯化所需的时间通常很漫长。扁穗牛鞭草自然结实率低,即使偶有结实,种子的发芽率也几乎为零,主要以营养体繁殖为主,导致育种手段受限,难以通过常规的育种方式如杂交育种进行新品种的选育,为扁穗牛鞭草的育种工作带来了困难^[5]。化学诱变育种是改变植物性状,培育新品种的有效手段,甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate, EMS)化学诱变具有成本低、易操作、变异率大等特点,已成功应用到多种禾本科植物中^[6],是目前应用最广泛的化学诱变育种手段之一。利用EMS诱变可以在短时间内获得大量的突变体,为育种提供基础材料。本研究以中国科学院桃源试验站在红壤丘陵坡地建植多年的扁穗牛鞭草地方种质资源为材料,其表现出抗逆性强、返青早等性状,拟利用EMS诱变其种茎,确定最佳EMS诱变条件,并对EMS诱变获得的扁穗牛鞭草突变体材料进行低磷胁迫处理,通过观察其根系结构、根系生理及细菌群落变化,对突变体材料的耐低磷胁迫能力进行鉴定,并尝试解析其耐受低磷胁迫的机理。

本研究旨在建立适用于扁穗牛鞭草种茎的高效EMS诱变技术体系;同时筛选具有生物量高、耐低磷等性状的突变体,为选育适应南方低磷边际土地种植的优秀牧草新品种提供材料基础,对提升我国南方草牧业生产效益、促进退化草地生态修复具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

扁穗牛鞭草于2023年4月采自中国科学院桃源试验站(111°30' E, 28°55' N),选取健康、粗壮的扁穗牛鞭草地上茎的中下部,去除叶片,每个茎节为一个材料,茎节上下部长度比例为2:1。化学药剂包括:EMS, 0.1 mol·L⁻¹、pH=7的磷酸缓冲液。

1.2 EMS诱变条件筛选

试验设置EMS浓度(0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)和处理时间(2、4、6 h)两个因素,将EMS溶于pH值为7的0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液,以0%EMS处理为对照,每个处理20个种茎,3次重复。

EMS浸泡处理:将种茎浸泡于不同EMS溶液中,溶液面超过茎节处,诱变2、4、6 h后用流水冲洗5次以上。采用沙培法,将冲洗后的种茎扦插至纯沙育苗盘(规格55 cm×35 cm×8 cm)中,扦插深度为茎节节点插入1 cm左右,试验期间(2023年4至5月)每天观察育苗盘水分含量,保持育苗盘中沙粒湿度稳定。7 d时测定出芽率,14 d时测定生根率和出芽率。

1.3 耐受低磷胁迫的扁穗牛鞭草突变体创制及优势突变体筛选

根据上述EMS诱变条件筛选试验结果,于2023年8月选择1000个扁穗牛鞭草种茎,放置于0.6%EMS溶液浸泡6h,以磷酸缓冲液浸泡50个扁穗牛鞭草种茎6h为对照,冲洗后种茎进行扦插。试验地位于湖南省浏阳市永安镇(113°20'24" E, 28°19'08" N),为典型酸性低磷红壤(pH值4.29,全氮、全磷、全钾含量分别为0.31 g·kg⁻¹、0.24 g·kg⁻¹、12.52 g·kg⁻¹,根据第二次全国土壤普查土壤养分分级标准^[7],氮、磷均处于极缺乏水平,钾处于缺乏水平)。扦插后搭建遮阳棚避免阳光直射,浇灌适量的水,之后根据天气情况,及时浇水保湿(试验期为2023年8至9月)。扦插35d,对EMS处理组 and 对照组进行表型指标测定,筛选优异单株,将生长良好的23株幼株移栽至相邻试验地单独种植,株行距1.5m,移栽后15d内每天浇水,保持土壤湿度。生长一年后(2024年10月24日)测量地上生物量等数据,通过加权隶属函数分析筛选优异突变体。

1.4 优异突变体材料低磷胁迫水培试验

以EMS诱变创制的优势突变体5-5-4和野生型(wild type, WT)的扁穗牛鞭草种茎为材料。将扁穗牛鞭草种茎置于洗净的纯沙中育苗,种茎的选取同1.1,育苗4d后,挑选生长均匀的材料移至水培盒(127 mm×87 mm×114 mm)中,进行水培,每个水培盒6株,每个处理3次重复。设置正常供磷(PO₄³⁻浓度为0.5 mmol·L⁻¹, NP)和低磷胁迫(PO₄³⁻浓度为0.01 mmol·L⁻¹, LP)两个磷水平。营养液组成:2 mmol·L⁻¹Ca(NO₃)₂·4H₂O、0.75 mmol·L⁻¹K₂SO₄、0.1 mmol·L⁻¹KCl、0.65 mmol·L⁻¹MgSO₄·7H₂O、0.1 mmol·L⁻¹EDTA-Fe、微量营养液[H₃BO₃(1×10⁻² mmol·L⁻¹)、MnCl₂·4H₂O(1×10⁻³ mmol·L⁻¹)、ZnSO₄·7H₂O(1×10⁻³ mmol·L⁻¹)、CuSO₄·5H₂O(1×10⁻⁴ mmol·L⁻¹)、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O(5×10⁻⁶ mmol·L⁻¹)],磷以KH₂PO₄供给,在LP处理下添加0.49 mmol·L⁻¹KCl补充与NP处理中等量的K, pH为4.8。水培30、60d进行各项指标检测。

1.5 测定指标及方法

出芽率(%):出芽的个数/种茎总数×100%;

相对出芽率(%):EMS处理组的出芽数/对照组的发芽数×100%;

生根数(个·株⁻¹):茎节新生根数量;

最长根长(cm):茎节新生最长根的长度;

叶片数(个·株⁻¹):茎节新生叶片数;

叶长(cm):茎节出苗后最长叶片长度;

叶宽(mm):茎节出苗后最长叶片的最宽处宽度;

株高(cm):植株高度;

分蘖数(个·株⁻¹):单株分蘖的个数;

最长分蘖长度(cm):植株所有分蘖中最长分蘖的长度;

生物量(kg·株⁻¹):留茬约2cm刈割地上部称重;

根冠比:根部干重/地上部干重;

生根率:(生根数/种茎总数)×100%;

磷吸收量(mg·株⁻¹)=植株干重(g·株⁻¹)×磷浓度(mg·g⁻¹);

植株磷利用效率(植株体内单位磷所产生的生物量, g·mg⁻¹)=植株干重(g)/磷吸收量(mg)^[8]。

水培30d时,每个处理随机选取3株采用根系扫描仪(MRS-9600TFU2L,上海中晶科技有限公司)进行拍照、测量总根长和根尖数。

水培60d时,采用连续流动分析仪(SAN++ ,SKALAR。SKALAR公司,荷兰)测定全磷含量,采用苏州格锐思生物科技有限公司的试剂盒测定酸性磷酸酶(acid phosphatase, APase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性。收集水培营养液,提取细菌总DNA。使用通用引物F:ACTCCTACGGGAGGCAGCA; R:GGACTACHVGGGTWTCTAAT对细菌16S rDNA进行扩增,通过Illumina NovaSeq测序平台进行测序。

1.6 数据处理

采用Excel进行数据整理、绘图及加权隶属函数分析^[9],采用IBM SPSS Statistics 26.0软件进行数据分析,对出芽、生根数据进行方差分析、多重比较。

在细菌16S rDNA数据分析中,使用Trimmomatic v 0.33软件,对测序得到的Raw Reads进行过滤,然后使用cutadapt 1.9.1软件进行引物序列的识别与去除,得到不包含引物序列的Clean Reads。使用USEARCH(version 10.0)在相似性97%(默认)的水平上对序列进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类。使用QIIME 2(<https://qiime2.org/>)进行Alpha多样性指数分析;通过计算binary jaccard距离矩阵进行Beta多样性分析,使用R语言工具绘制主坐标(principal coordinates analysis, PCoA)分析结果。使用LefSe(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>)分析网站进行显著差异物种分析。

2 结果与分析

2.1 EMS诱变条件筛选

如表1所示,7 d时所有处理组的出芽率均较低,当处理时间为2 h时,EMS各浓度下出芽率无显著差异;处理时间为4 h时,0.8%和1.0%浓度EMS处理组的出芽率显著低于对照;处理时间为6 h时,当EMS浓度达到0.4%及以上,出芽率显著低于对照。14 d,处理时间为2、4 h时,0.2%、0.4%、0.6% 3个EMS浓度的出芽率与对照间没有显著差异,当EMS浓度达到0.8%及以上时出芽率显著低于对照组。处理时间为6 h,当EMS浓度达到0.4%及以上时出芽率显著低于对照组。EMS对扁穗牛鞭草种茎生根的影响远小于出芽(图1A),相对出芽率接近50%的处理组合有3个(图1B):1.0% EMS和2 h,0.8% EMS和4 h以及0.6% EMS和6 h,接近半致死剂量,可以作为扁穗牛鞭草EMS诱变处理的适宜组合。低浓度长时间的处理能够有效节约成本,因此在后续试验中采用了0.6% EMS处理6 h。

表1 不同EMS处理下扁穗牛鞭草7和14 d出芽率

Table 1 The germination rate of *H. compressa* on the 7 and 14 days under different EMS treatment (%)

EMS浓度 EMS concentration (%)	7 d 出芽率 7 days germination rate			14 d 出芽率 14 days germination rate		
	2 h	4 h	6 h	2 h	4 h	6 h
0	8.33±2.36Aa	10.00±4.08Aa	30.00±18.71Aa	95.00±4.08ABa	88.33±2.36Ba	96.67±2.36Aa
0.2	8.33±8.50Aa	11.67±2.36Aa	15.00±12.25Aab	81.67±12.47Aab	86.67±2.36Aa	86.67±8.50Aa
0.4	8.33±6.24Aa	6.67±2.36Aab	5.00±4.08Ab	76.67±8.50Aab	78.33±14.34Aa	33.33±6.24Bb
0.6	0Aa	5.00±4.08Aab	6.67±4.71Ab	83.33±9.43Aab	78.33±6.24Aa	41.67±6.24Bb
0.8	0Aa	1.67±2.36Ab	0Ab	58.33±6.24Abc	50.00±7.07Ab	1.67±2.36Bc
1.0	0Aa	0Ab	0Ab	41.67±18.41Ac	11.67±2.36Bc	3.33±2.36Bc

注:不同大写字母表示同一EMS浓度下不同处理时间之间差异显著($P<0.05$);不同小写字母表示同一处理时间下不同EMS浓度之间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different capital letters indicated significant differences ($P<0.05$) among different treatment time at the same EMS concentration. Different lowercase letters indicate significant differences among different EMS concentrations at the same treatment time ($P<0.05$).

2.2 扁穗牛鞭草突变体的创制及筛选

采用0.6% EMS溶液处理1000个扁穗牛鞭草种茎6 h,扦插至典型的南方酸性低磷红壤,35 d后成活率为33.33%(333株幼苗),测量株高、叶片数、叶长、叶宽、生根数和最长根长,进行加权隶属函数分析,筛选得到综合评价D值大于对照组的有23株。2024年越冬后,死亡4株,越夏后又死亡2株,但发现之前加权隶属函数分析中排名在野生型之后的3-3-1生长状态变好因此在后续试验保留了此株。生长一年后于2024年10月24日测量剩余18株突变体和野生型的地上生物量、分蘖数等数据,通过加权隶属函数分析得到综合评价优于对照组的有7株(表2)。其中5-5-4长势最好,株型大、生物量高,综合排名第一,选取此株进行低磷胁迫能力评价试验。

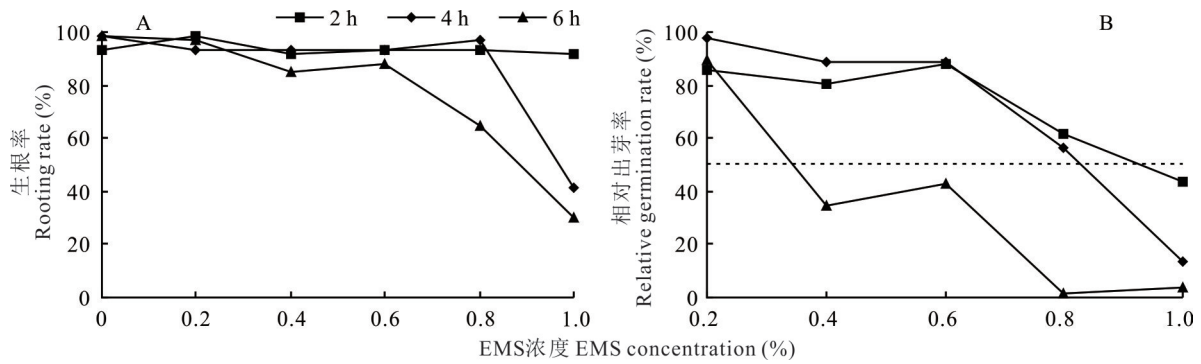


图 1 扁穗牛鞭草 14 d 生根率和相对出芽率

Fig. 1 The rooting rate and relative germination rate of *H. compressa* on the 14 days

表 2 扁穗牛鞭草长势评价

Table 2 Growth evaluation of *H. compressa*

编号 Number	分蘖数 Tiller number (个·株 ⁻¹ No. ·plant ⁻¹)	最长分蘖长度 Longest tiller length (cm)	叶长 Leaf length (cm)	叶宽 Leaf width (mm)	生物量 Biomass (kg·plant ⁻¹)	D 值 D value	排名 Rank
5-5-4	106	312.73	13.12	6.1	2.45	0.95	1
3-8-10	91	243.53	8.79	3.4	2.30	0.64	2
7-10-10	86	194.57	13.10	5.1	3.07	0.49	3
4-7-1	50	237.63	8.20	3.9	1.20	0.44	4
4-1-8	62	210.44	14.15	5.3	0.43	0.43	5
3-3-1	45	222.36	12.23	4.3	2.99	0.40	6
5-4-3	61	206.72	9.00	4.0	1.35	0.40	7
CK	40	228.97	12.51	5.1	1.07	0.39	8
5-4-2	36	229.88	13.35	4.6	2.51	0.39	9
5-1-1	85	173.45	6.12	4.2	1.71	0.38	10
9-8-3	37	230.46	7.27	5.0	1.00	0.36	11
5-3-1	61	182.45	12.81	5.5	1.67	0.34	12
7-8-10	47	203.21	8.14	4.2	2.76	0.33	13
9-7-6	25	226.04	8.93	5.1	0.43	0.30	14
3-6-6	32	192.33	9.56	3.6	0.43	0.22	15
6-9-10	52	157.34	11.21	4.8	0.42	0.21	16
6-7-8	30	180.64	9.50	3.9	0.41	0.18	17
5-10-1	28	178.71	7.75	4.0	0.34	0.16	18
6-8-9	31	136.43	10.88	5.0	0.53	0.05	19
最大值 Maximum value	106	312.73	14.15	6.1	3.07	—	—
最小值 Minimum value	25	136.43	6.12	3.4	0.34	—	—
变异系数 Coefficient of variation	0.44	0.18	0.23	0.15	0.67	—	—

注：D 值为加权隶属函数分析中的综合评价值。

Note: D value is the comprehensive evaluation value in the analysis of weighted membership function.

2.3 优异突变体耐低磷胁迫能力评价

2.3.1 低磷胁迫下突变体 5-5-4 根系特征 水培 30 d, 正常供磷下, 突变体 5-5-4 的生根数较野生型 (wild type, WT) 增加 26.95%, 最长根长较野生型增加 1.86% (图 2A, B); 低磷胁迫下, 5-5-4 的生根数较野生型增加 52.10% ($P < 0.01$), 最长根长较野生型增加 10.45%。与正常供磷相比, 低磷胁迫下突变体 5-5-4 和野生型的生根数均下降, 而最长根长则均上升。正常供磷下突变体 5-5-4 的总根长和根尖数较野生型分别高 51.52% 和 27.65% ($P <$

0.01,图2C,D);低磷胁迫下,5-5-4的总根长和根尖数较野生型分别高58.59%和22.28%($P<0.01$)。与正常供磷相比,低磷胁迫下突变体5-5-4和野生型的总根长均增大,而总根尖数则均减小。突变体5-5-4不仅生根数较野生型更多、根长较野生型更长,而且根毛结构也更为发达,根毛上长出来更多的分叉(图3)。

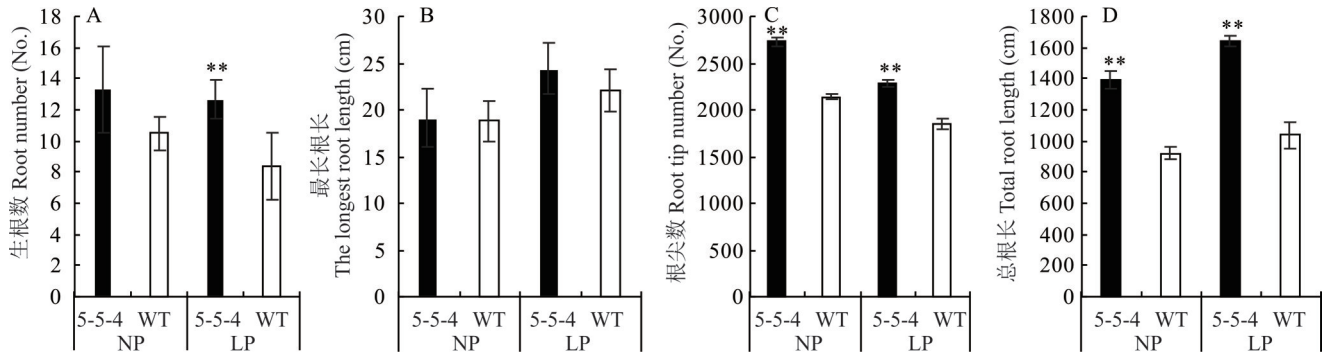


图2 突变体5-5-4与野生型在不同处理下30 d根系参数比较

Fig. 2 Comparison of the total root trait parameters of mutant 5-5-4 and wild type on 30 days under different treatments

WT: 野生型。*表示同一处理下两份材料间差异显著($P<0.05$), **表示差异极显著($P<0.01$),下同。WT: Wild type. * indicate significant difference ($P<0.05$) between two materials under the same treatment, ** indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same below.

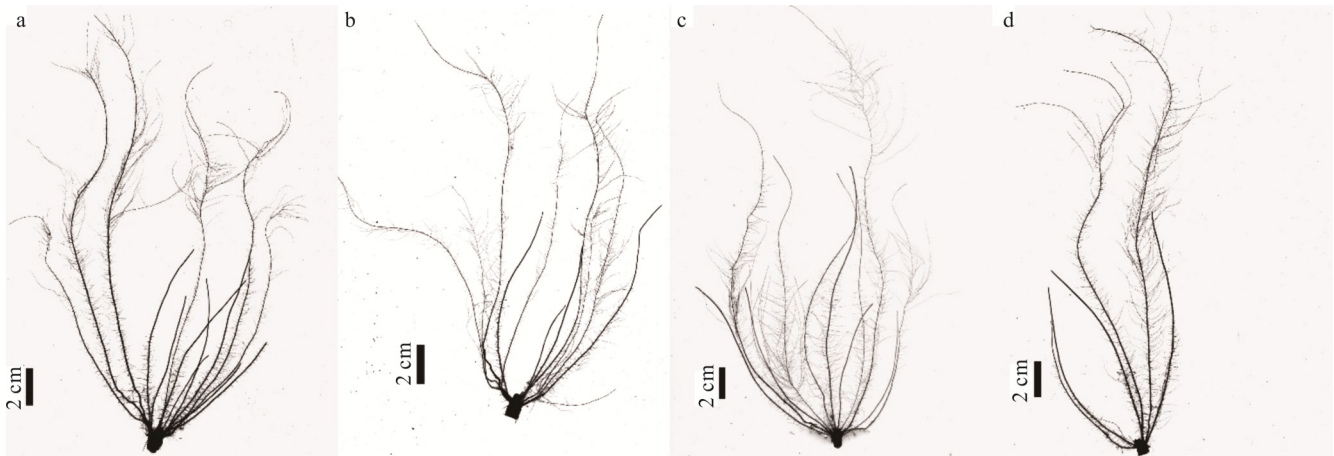


图3 突变体5-5-4与野生型在不同处理下30 d的根系扫描结果

Fig. 3 The root scanning of mutant 5-5-4 and wild type on 30 days under different treatments

图a、c为突变体5-5-4,图b、d为野生型,图a、b为正常供磷处理,图c、d为低磷胁迫处理。Figs a and c are mutant 5-5-4, Figs b and d are wild type, Figs a and b are normal phosphorus supply treatment, Figs c and d are low phosphorus stress treatment.

如图4所示,突变体5-5-4的根冠比均较野生型更大。水培30 d,正常供磷条件下5-5-4的根冠比较野生型高33.94%,低磷胁迫下,5-5-4的根冠比较野生型高14.29%(图4A)。水培60 d,正常供磷条件下5-5-4的根冠比较野生型高20.08%,低磷胁迫下,5-5-4的根冠比较野生型高6.36%(图4B)。低磷胁迫下,突变株和野生型的根冠比均较正常供磷组增加,但野生型的根冠比增加幅度大于突变体5-5-4(30 d 5-5-4根冠比增加48.77%,野生型增加74.36%;60 d 5-5-4增加69.06%,野生型增加91.25%)。

2.3.2 低磷胁迫下突变体5-5-4磷含量、磷吸收及利用效率变化 如图5所示,正常供磷和低磷胁迫下,突变体5-5-4根部磷含量较野生型分别减少7.88%和7.09%($P<0.01$,图5A);正常供磷下,5-5-4地上部磷含量较野生型增加6.64%($P<0.01$),低磷胁迫下磷含量较野生型减少69.49%($P<0.01$,图5B)。正常供磷下5-5-4及野生型根部和地上部磷吸收量差异不大(表3),5-5-4根部磷利用效率高于野生型,但地上部低于野生型;低磷胁迫下,5-5-4根部磷吸收量高于野生型,地上部磷吸收量低于野生型,但5-5-4根部和地上部的磷利用效率均高于野

生型。低磷胁迫导致 5-5-4 和野生型的磷吸收量均大幅度下降,但磷利用效率大幅度提高。

2.3.3 低磷胁迫条件下突变体酸性磷酸酶及抗氧化酶活性变化 如图 6A 所示,正常供磷和低磷胁迫下,突变体 5-5-4 根中 APase 活性均极显著高于野生型;5-5-4 叶片中 APase 活性在正常供磷下极显著高于野生型,但低磷胁迫下极显著低于野生型(图 6B)。低磷胁迫促使了扁穗牛鞭草根和叶片中 APase 活性的增强,且叶片中 APase 活性增强的幅度大于根,但不管在根还是叶片中,低磷胁迫下野生型 APase 活性的增幅均远高于突变体 5-5-4。

正常供磷下,突变体 5-5-4 根中 SOD 活性极显著低于野生型(图 6C),叶片中显著高于野生型(图 6D);低磷胁迫下,5-5-4 根中 SOD 活性极显著高于野生型,但叶片中极显著低于野生型。低磷胁迫致使 5-5-4 根中 SOD 活性提高,野生型根中 SOD 活性降低;5-5-4 叶片中 SOD 活性基本未变,而野生型叶片中提高了 31.71%。

正常供磷下,突变体 5-5-4 根和叶片中 POD 活性均低于野生型,低磷胁迫下,5-5-4 根中 POD 活性极显著高于野生型(图 6E),但叶片中极显著低于野生型(图 6F)。低磷胁迫导致 5-5-4 根中 POD 活性提高,野生型根中 POD 活性降低,5-5-4 和野生型叶片中 POD 活性均提高。

正常供磷条件下,突变体 5-5-4 根和叶片中 CAT 活性均显著高于野生型(图 6G,H)。低磷胁迫下 5-5-4 和野生型根和叶片中 CAT 活性较正常供磷均出现下降,5-5-4 根中 CAT 活性与野生型差异不显著,但在叶片中极显著低于野生型。

表 3 低磷胁迫对扁穗牛鞭草磷吸收量、利用效率的影响

Table 3 Effects of low phosphorus stress on phosphorus uptake and utilization efficiency of *H. compressa*

处理 Treatment	编号 Number	根部 Root part			地上部 Overground part		
		干物质 Dry matter (g)	磷吸收量 Phosphorus uptake (mg)	磷利用效率 Phosphorus utilization efficiency (g·mg ⁻¹)	干物质 Dry matter (g)	磷吸收量 Phosphorus uptake (mg)	磷利用效率 Phosphorus utilization efficiency (g·mg ⁻¹)
NP	5-5-4	0.525	4.478	0.117	5.665	30.025	0.189
	WT	0.484	4.482	0.108	6.275	31.187	0.201
LP	5-5-4	0.786	0.927	0.847	5.017	5.418	0.926
	WT	0.541	0.687	0.787	3.675	13.009	0.282

注: 60 d 时因根系难以分开,根和地上部的干物质重量为所有植株根和地上部的总干重,因此未标注标准差,未进行显著性分析。

Note: At 60 days, because the roots were difficult to separate, the dry weight of the roots and overground part is the total dry weight of the roots and overground part all plants, the standard deviation is not marked, and no significance analysis was performed.

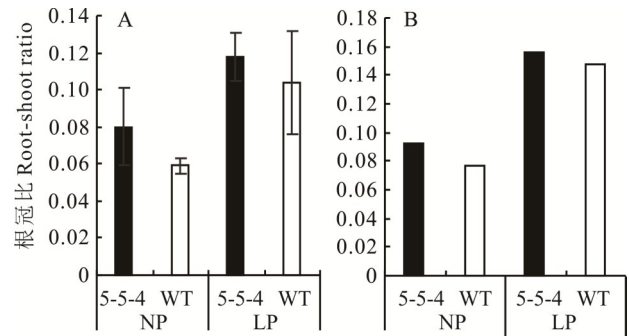


图 4 突变体 5-5-4 与野生型在不同处理下 30 d(A) 和 60 d(B) 根冠比

Fig. 4 The root-shoot ratios of mutants 5-5-4 and wild-type on 30 days (A) and 60 days (B) under different treatments

60 d 时因根系难以分开,根冠比由所有植株根的总干重比茎的总干重计算得出,因此未进行显著性分析,图中未标注误差线。At 60 days, because the roots were difficult to separate, the root-shoot ratio was calculated by dividing the total dry weight of roots of all plants by the total dry weight of stems, so no significant analysis was performed, and the error line was not marked in the figure.

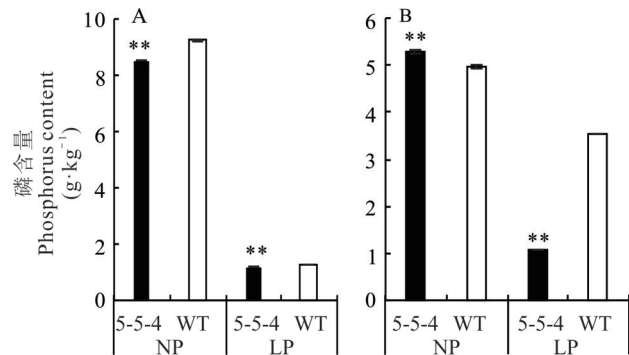


图 5 5-5-4 与野生型(60 d)在不同处理下根部(A)和地上部(B)全磷含量比较

Fig. 5 Comparison of total phosphorus content in roots (A) and shoots (B) between 5-5-4 and wild type (60 d) under different treatments

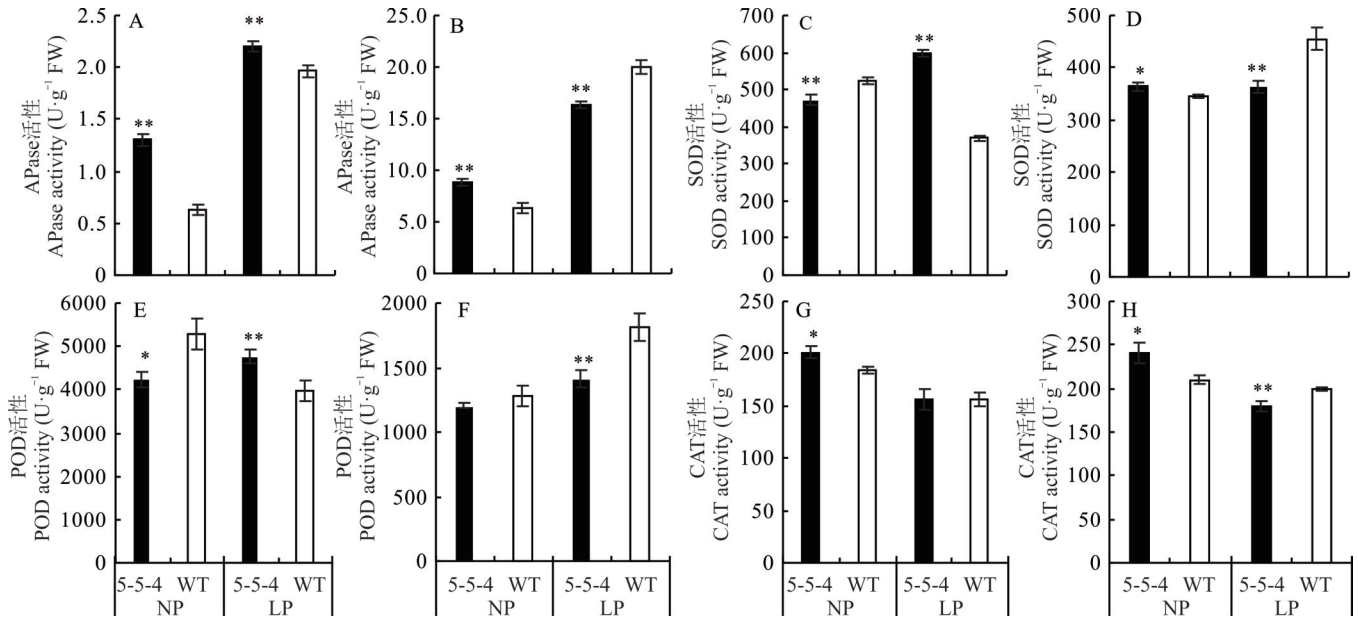


图6 5-5-4与野生型在不同处理下60 d的APase、SOD、POD、CAT活性

Fig. 6 APase, SOD, POD, and CAT activities of mutant 5-5-4 and wild-type on 60 days under different treatments

A、C、E、G是根中的APase、SOD、POD、CAT活性，B、D、F、H是叶片中的APase、SOD、POD、CAT活性。A、C、E、G are the activities of APase, SOD, POD, and CAT in the root, B、D、F、H are the activities of APase, SOD, POD, and CAT in the blade.

2.3.4 低磷胁迫条件下扁穗牛鞭草突变体根际微生物多样性分析 水培60 d时,正常供磷下,突变体5-5-4和野生型的OTU数量分别为468和507个,低磷胁迫下,5-5-4和野生型的OTU数量分别为481和433个(图7A)。PCoA分析结果如图7B所示,正常供磷和低磷胁迫下,5-5-4和野生型样本的距离均较远,两者的Beta多样性差异大,说明在正常供磷和低磷胁迫下5-5-4和野生型的细菌群落组成差异大。如表4所示,正常供磷和低磷胁迫下5-5-4和野生型的ACE指数和Chao1指数均无显著差异,表明其细菌丰富度均无显著差异。正常供磷下,5-5-4的Simpson指数和Shannon指数显著低于野生型($P < 0.01$),但在低磷胁迫下Simpson指数($P < 0.05$)和Shannon指数($P < 0.01$)则显著高于野生型,表明5-5-4细菌群落的多样性在正常供磷下低于野生型,但在低磷胁迫下高于野生型。

根据细菌分类单元的注释结果,野生型与5-5-4中的细菌隶属于21门40纲110目181科329属。图8所示,门水平上,正常供磷下,野生型中相对丰度>5%的有变形菌门(Proteobacteria, 47.06%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 35.43%)、酸骨菌门(Patescibacteria, 7.73%);5-5-4中相对丰度>5%的仅有变形菌门(56.68%)、疣微菌门

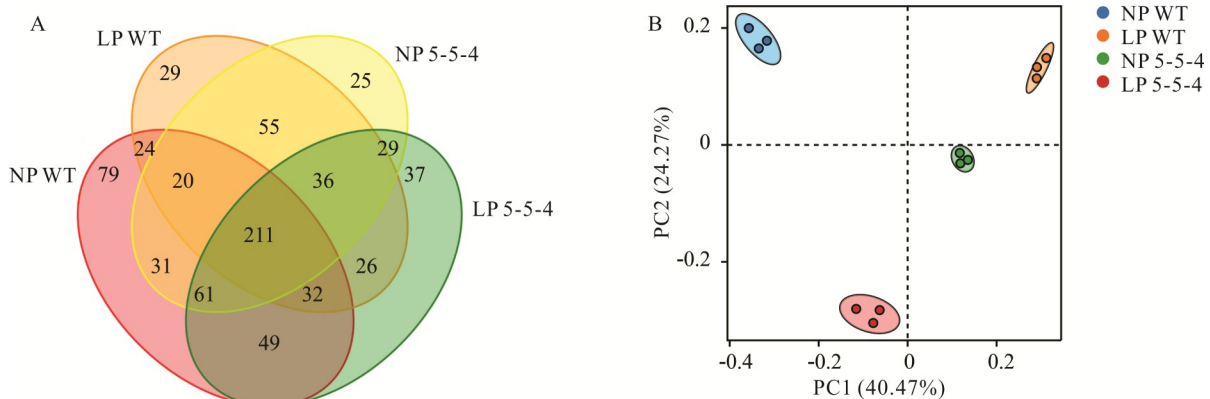


图7 5-5-4与野生型的细菌分类单元水平及群落结构的主坐标分析

Fig. 7 Operational taxonomic unit level and principal coordinates analysis of mutant 5-5-4 and wild-type

表 4 5-5-4 与野生型细菌群落 Alpha 多样性指数

Table 4 Alpha diversity index of bacterial community in mutant 5-5-4 and wild-type

处理 Treatment	编号 Number	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	覆盖度 Coverage
NP	5-5-4	441.60±40.76	457.35±55.87	0.79±0.02**	3.78±0.17**	0.99
	WT	457.62±31.49	463.31±32.81	0.96±0.01	5.76±0.21	0.99
LP	5-5-4	433.58±19.39	434.94±25.25	0.91±0.03*	5.12±0.26**	0.99
	WT	416.30±4.10	424.64±17.66	0.82±0.01	3.56±0.04	0.99

*表示同一处理下 2 份材料间差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。* indicate significant difference ($P < 0.05$) between two materials under the same treatment, ** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).

(Verrucomicrobiota, 32.33%)。低磷胁迫下,野生型中相对丰度 $> 5\%$ 的有疣微菌门(23.83%)、装甲菌门(Armatimonadota, 21.58%)、变形菌门(16.35%);5-5-4 中相对丰度 $> 5\%$ 的有变形菌门(39.56%)、拟杆菌门(9.89%)、厚壁菌门(Firmicutes, 8.76%)、装甲菌门(6.52%)。

在属水平上,正常供磷下,野生型相对丰度排名前 5 的依次为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*, 9.74%)、黏液杆菌属(*Mucilaginibacter*, 9.28%)、无色杆菌属(*Achromobacter*, 7.95%)、肠杆菌属(*Enterobacter*, 1.80%)、*Unclassified_env. OPS_17* (1.78%); 5-5-4 相对丰度排名前 5 的依次为肠杆菌属(32.28%)、*Candidatus_Xiphinematobacter*(31.90%)、*Unclassified_Neisseriaceae*(5.84%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 3.40%)、无色杆菌属(*Achromobacter*, 2.15%)。低磷胁迫下,野生型相对丰度排名前 5 的依次为 *Candidatus_Xiphinematobacter* (23.61%)、*Uncultured_soil_bacterium* (21.49%)、*Unclassified_Neisseriaceae* (4.24%)、*Unclassified_env. OPS_17* (3.17%)、芽孢杆菌属(0.42%); 5-5-4 相对丰度排名前 5 的依次为 *Unclassified_Neisseriaceae* (11.17%)、芽孢杆菌属(7.78%)、*Uncultured_soil_bacterium* (5.85%)、*Unclassified_env. OPS_17*(3.89%)、*Candidatus_Xiphinematobacter*(3.31%)。这些优势菌属中的解磷菌有金黄杆菌属、无色杆菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属。

LefSe 分析结果如图 9 所示,在线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)阈值为 4 的条件下,确定细菌

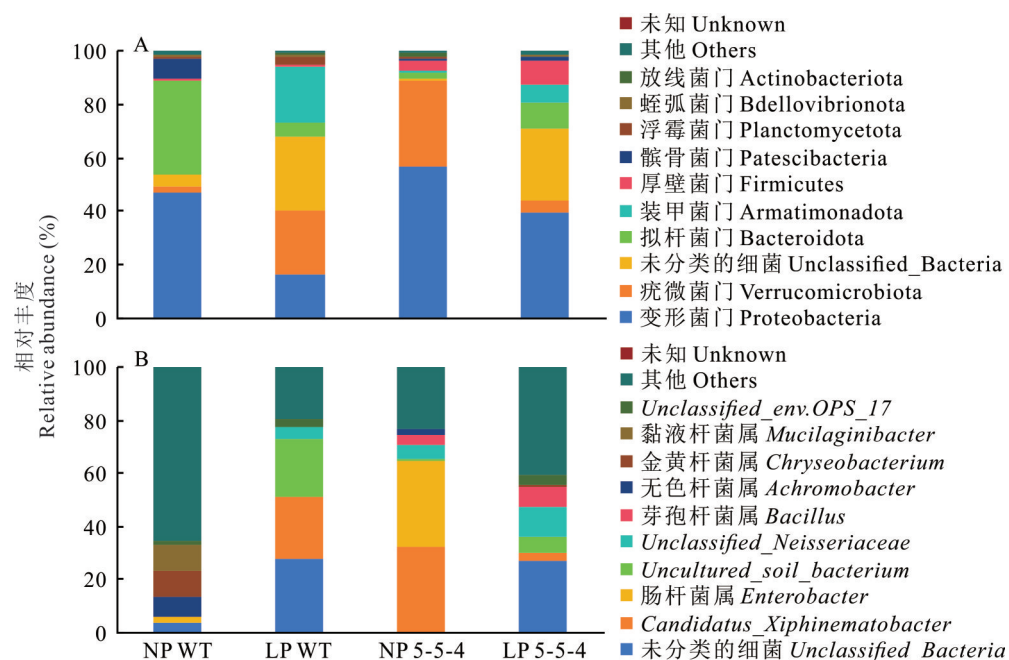


图 8 细菌群落门和属水平组成分析

Fig. 8 Composition of the bacteria community at phyla and genus level

A、B 分别为门和属水平的物种组成分析。A、B are the composition of the bacteria community at phyla and genus level, respectively.

标志物种 57 个,包括 8 门 9 纲 17 目 20 科 20 属。正常供磷下,野生型有 28 个标志物种,其中解磷菌有金黄杆菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、哈沙藻属(*Hassallia*)、雷尔氏菌属(*Ralstonia*)、草小螺菌属(*Herbaspirillum*);突变体 5-5-4 有 6 个标志物种,其中解磷菌有肠杆菌属。低磷胁迫下,野生型 9 个标志物种中没有解磷菌;5-5-4 的 14 个标志物种中,解磷菌有芽孢杆菌属、沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)和红育菌属(*Rhodoferrax*)。

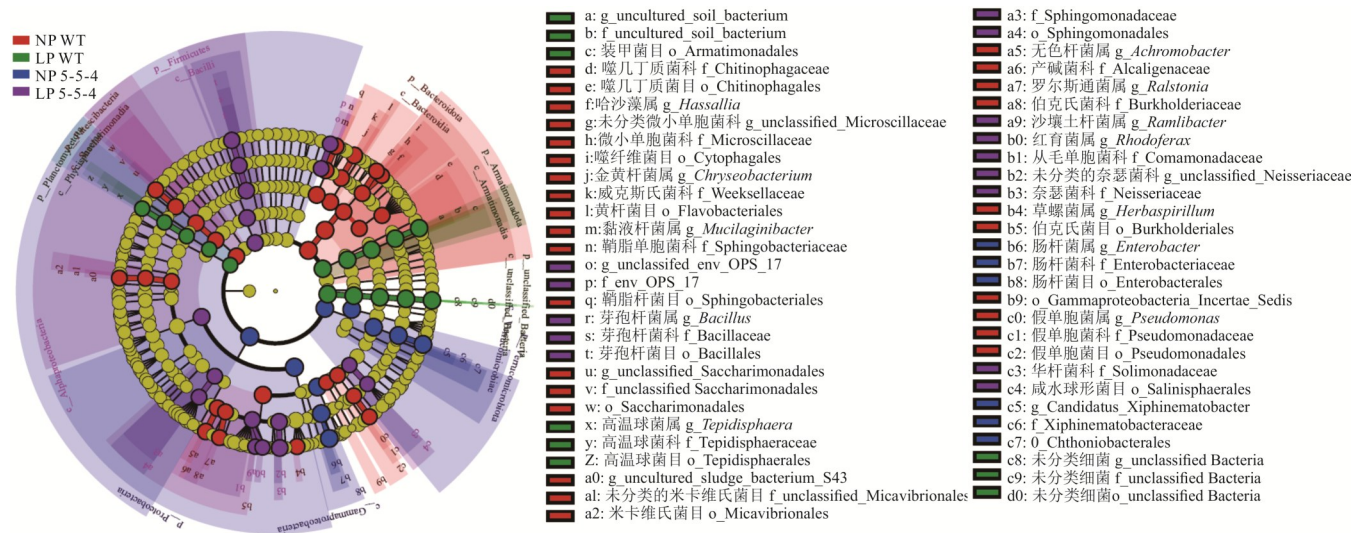


图9 细菌标志物种

Fig. 9 Biomarking bacteria

3 讨论

3.1 无性繁殖材料EMS处理条件的筛选

EMS化学诱变育种具有操作简便、诱变效果好等特点,不仅适用于种子繁殖植物,也可用于无性繁殖材料,在多种植物育种中取得了很好的诱变效果^[6]。目前已报道出应用EMS诱变技术获得突变体材料的无性繁殖植物有甘蔗(*Saccharum officinarum*)^[10]、柳枝稷(*Panicum virgatum*)^[11]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[12]、兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)^[13]等,诱变性状包括株高、叶形、分蘖、耐盐性等。EMS诱变成功的关键是确定其诱变剂量,通常以半致死剂量为最佳。许雯雯^[10]利用EMS诱变甘蔗茎芽时确定1.5%浓度EMS处理5h为半致死剂量。郭思雨^[13]以兰州百合鳞片为材料,进行EMS诱变处理时发现,0.8%EMS处理2h为其半致死剂量。本研究参考前人研究结果,设置EMS处理浓度0~1.0%,处理时间2~6h,结果发现0.6%浓度的EMS处理6h最接近扁穗牛鞭草种茎的半致死剂量。由此可见,不同种质资源的EMS诱变条件均有差异,这与种茎对EMS的耐受程度和吸收(吸附)能力可能有关。

3.2 耐受低磷突变体材料对磷胁迫的响应

南方红壤贫瘠主要表现为土壤肥力退化、酸化,在土壤养分指标中尤其是磷含量低,根据全国第二次土壤普查土壤养分分级标准^[7],大多处于缺乏和很缺乏的级别^[14-15]。低磷胁迫下,植物根系会产生一系列的适应性变化,包括抑制主根的伸长、增加侧根的数量、增加根毛的密度,从而增强对土壤中磷的获取能力^[16-17]。Yugandhar等^[18]研究发现,水稻(*Oryza sativa*)品种Nagina22和高磷利用效率突变体NH787在低磷胁迫下的总根长和生根数均出现降低,但NH787降低的幅度均小于Nagina22。在低磷胁迫条件下,扁穗牛鞭草5-5-4和野生型的生根数与总根尖数均减少但最长根长和总根长则均有所增加。与野生型相比,5-5-4的根系结构更为发达,表现为根冠比更大、生根数和根尖数更多、最长根长和总根长更大、根毛更发达。低磷胁迫导致扁穗牛鞭草的磷吸收量大幅度下降,但根部和地上部的磷利用效率大幅度提高,且突变体5-5-4根部和地上部的磷利用效率均高于野生型。

植物在低磷胁迫下,会增加酸性磷酸酶、核酸酶以及有机酸等的分泌来分解土壤有机物和磷酸盐中的磷,从

而增强对土壤中磷的利用率^[19]。Li 等^[20]研究发现小麦 (*Triticum aestivum*) 耐低磷品种 G28 和低磷敏感品种 L143 在低磷胁迫下根系中酸性磷酸酶活性随着胁迫时间的延长而增加,且 G28 的酸性磷酸酶活性始终高于 L143。本研究发现突变体 5-5-4 和野生型根中酸性磷酸酶活性在低磷胁迫下均增加,且 5-5-4 始终高于野生型。

面对生物和非生物胁迫的过程中,植物会氧化应激而产生活性氧,活性氧水平升高会对许多细胞组分造成损伤,不过植物已经进化出了通过抗氧化酶来清除活性氧的适应性机制^[21-22]。Yugandhar 等^[23]发现超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性在低磷胁迫下均不同程度提高,本研究中扁穗牛鞭草野生型在低磷胁迫 60 d 后根部的超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性均降低,而叶片中的超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性则均提高,突变体 5-5-4 根和叶片中超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性提高。另外野生型和突变体 5-5-4 根部和叶片中的过氧化氢酶活性在低磷胁迫下均出现下降趋势,这可能是因为在扁穗牛鞭草在低磷胁迫下的抗氧化策略不同,在长时间低磷胁迫下将更多的资源分配给更具“多功能性”的抗氧化酶来清除过氧化氢,而不是专一性较高的过氧化氢酶。微生物与植物的生长有着密不可分的关系,植物根系通过其产生的代谢物和分泌物可以招募特定的微生物群^[24]。Zheng 等^[25]研究发现,野生大豆 (*Glycine soja*) 在盐胁迫下根系能够分泌黄嘌呤招募假单胞菌,使之富集在根际协助抵抗盐胁迫、促进生长。本研究发现,低磷胁迫下 5-5-4 根际微生物中富集了 3 种解磷菌芽孢杆菌、沙壤土杆菌、红育菌,这可能与 5-5-4 应对低磷胁迫的响应有关。

以上结果说明,5-5-4 具有更好的低磷胁迫耐受性,适应能力更强,后续将继续对其在贫瘠土壤中植株根系生长、生长性能和产量表现进行比较评价,验证 5-5-4 材料突变性状遗传的稳定性、特异性和一致性,为新品种选育奠定基础;另外,本试验观察到 5-5-4 在低磷胁迫下根系显著富集了 3 种解磷菌,后续将进一步在土壤中进行验证 5-5-4 是否能特异性招募解磷菌。后续还可对突变性状与基因进行关联分析,寻找突变位点,进一步解析扁穗牛鞭草应对低磷胁迫的响应机制。

4 结论

EMS 处理抑制了扁穗牛鞭草种茎的出芽,对生根的影响远小于出芽,只有在高浓度时抑制效果比较明显。扁穗牛鞭草种茎 EMS 诱变适宜处理条件推荐为 0.6% EMS 和 6 h。突变体材料 5-5-4 在低磷胁迫下通过增强根系形态适应性(如增大根冠比、增加生根数和根尖数、延长最长根和总根长、促进根毛发育),提高磷的吸收效率;通过提升酸性磷酸酶活性促进有机磷的分解利用,并增强抗氧化酶系统(如超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性升高)以缓解低磷胁迫诱导的氧化损伤;通过富集解磷菌(如芽孢杆菌、沙壤土杆菌、红育菌),增加根际可利用的磷含量。突变体 5-5-4 具有耐低磷胁迫的潜力,可作为耐低磷品种的培育材料。

参考文献 References:

- [1] He W, Zhang X Q, Yang C H, *et al.* The distribution characters and planting technology of *Hemarthia* spp. SICHUAN CAOYUAN, 2003(5): 42-44.
何玮, 张新全, 杨春华, 等. 牛鞭草种质资源在中国的分布及其人工草地建植技术. 四川草原, 2003(5): 42-44.
- [2] Li F, Zhang X Q, Ma X, *et al.* Comparative study on the agronomic traits of new whipgrass lines. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48(5): 1210-1213.
李芳, 张新全, 马啸, 等. 扁穗牛鞭草新品系的农艺性状比较研究. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1210-1213.
- [3] Chen Y X, Zhang X Q, Yang C H, *et al.* Breeding and cultivation techniques of a new variety *Hemarthria compressa* cv. Ya'an. Chinese Journal of Grassland, 2012, 34(3): 109-112.
陈永霞, 张新全, 杨春华, 等. 扁穗牛鞭草新品种选育及栽培技术. 中国草地学报, 2012, 34(3): 109-112.
- [4] Yang C. Waterlogging resistance and root microstructure analysis of different *Hemarthria compressa* germplasm resources under flooding stress. Chongqing: Southwest University, 2022.
杨成. 淹水胁迫下不同扁穗牛鞭草种质资源耐涝性能及其根部显微结构分析. 重庆: 西南大学, 2022.
- [5] Zeng J, Huang L K, Zhang X Q, *et al.* Study on phenotype mutation of *Hemarthria compressa* and dose selection of ⁶⁰Co- γ irradiation. Acta Agrestia Sinica, 2014, 22(4): 828-833.
曾捷, 黄琳凯, 张新全, 等. ⁶⁰Co- γ 辐射扁穗牛鞭草剂量筛选及表型变异研究. 草地学报, 2014, 22(4): 828-833.

- [6] Chen L Z, Duan L, Sun M H, *et al.* Current trends and insights on EMS mutagenesis application to studies on plant abiotic stress tolerance and development. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 13: 1052569.
- [7] Zhang J. Spatial and temporal changes of soil nutrients in typical red soil erosion region of southern China. Fuzhou: Fujian Normal University, 2021.
张婧. 南方典型红壤侵蚀区土壤养分时空变异特征研究. 福州: 福建师范大学, 2021.
- [8] Zhao C. Study on characteristics and physiological mechanism of phosphorus efficient utilization of switchgrass in saline-alkali soil. Yinchuan: Ningxia University, 2023.
赵匆. 盐碱地柳枝稷磷高效利用特征及其生理机制研究. 银川: 宁夏大学, 2023.
- [9] Wu R X, Li Y, You Y L, *et al.* Study on drought resistance identification and evaluation methods of alfalfa during whole growth period. *Acta Agrestia Sinica*, 2020, 28(5): 1444–1453.
武瑞鑫, 李源, 游永亮, 等. 紫花苜蓿全生育期抗旱性鉴定评价方法探讨. *草地学报*, 2020, 28(5): 1444–1453.
- [10] Xu W W. Construction of sugarcane mutant library induced by EMS and screening of SSR primers. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
许雯雯. EMS诱变甘蔗突变体库的构建及其SSR引物的筛选. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [11] Li M, Wang Y F, Xu K J, *et al.* Construction of mutant library by EMS induction with *Panicum virgatum* spike buds. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2016, 25(2): 203–208.
李毛, 王勇锋, 徐开杰, 等. 利用EMS诱变构建柳枝稷穗芽无性系突变体库的初步研究. *西北农业学报*, 2016, 25(2): 203–208.
- [12] Yang Q, Zhang F, Wang D, *et al.* Selection of salt-tolerant variants from potato *in vitro* micro-cuttings induced by EMS. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(4): 673–678.
杨乾, 张峰, 王蒂, 等. EMS诱变筛选马铃薯茎段离体耐盐变异体. *核农学报*, 2011, 25(4): 673–678.
- [13] Guo S Y. EMS mutagenesis creates *Lilium davidii* var. *unicolor* mutants. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
郭思雨. EMS诱变创建兰州百合突变体. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [14] Feng S Z, Chen X B, He X Y, *et al.* Effects of land use and fertilization on lignin accumulation in red soil. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(9): 1761–1768.
冯书珍, 陈香碧, 何寻阳, 等. 不同土地利用方式及施肥措施对红壤木质素积累特性的影响. *农业环境科学学报*, 2015, 34(9): 1761–1768.
- [15] Liu Z P. Quality characteristics and regulation technique of sugarcane cultivated-layer in red soil slope farmland. Chongqing: Southwest University, 2018.
刘志鹏. 红壤坡耕地甘蔗耕层质量特征及调控技术研究. 重庆: 西南大学, 2018.
- [16] Sun Z W, Xu Y M, Xu R Y, *et al.* Research advance in the response of rice to low phosphorus stress and its regulation mechanism. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(8): 1562–1570.
孙志伟, 徐月梅, 许荣越, 等. 水稻低磷胁迫响应及其调控机制的研究进展. *核农学报*, 2023, 37(8): 1562–1570.
- [17] Dong L. Root developmental responses to phosphorus nutrition. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(6): 1065–1090.
- [18] Yugandhar P, Veronica N, Ai H, *et al.* NH787 EMS mutant of rice variety Nagina22 exhibits higher phosphate use efficiency. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 9156.
- [19] Zhang Y. Molecular regulation of phosphate starvation-induced acid phosphatase activity. Beijing: Tsinghua University, 2014.
张焯. 低磷胁迫诱导植物酸性磷酸酶的分子调控机制. 北京: 清华大学, 2014.
- [20] Li P C, Ma X L, Wang J C, *et al.* Integrated analysis of metabolome and transcriptome reveals insights for low phosphorus tolerance in wheat seedling. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19): 14840.
- [21] Sewelam N, Kazan K, Schenk P M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(187): 187.
- [22] Shuvasish C, Piyalee P, Lingaraj S, *et al.* Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(4): e23681.
- [23] Yugandhar P, Sun Y, Liu L. Characterization of the loss-of-function mutant NH101 for yield under phosphate deficiency from EMS-induced mutants of rice variety Nagina22. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 1–13.
- [24] Oburger E, Dell'mour M, Hann S, *et al.* Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 87: 235–247.
- [25] Zheng Y F, Cao X W, Zhou Y, *et al.* Purines enrich root-associated *Pseudomonas* and improve wild soybean growth under salt stress. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3520.