

彭歆, 罗立新, 张力, 等. 重离子诱发的 2 个水稻突变体表型鉴定及遗传分析[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(1): 12-17.

重离子诱发的 2 个水稻突变体表型鉴定及遗传分析

彭 歆, 罗立新, 张 力, 熊子墨, 王 慧, 郭 涛, 陈志强, 肖武名
(华南农业大学 国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要:【目的】明确 2 个水稻突变体的表型特征与遗传方式。【方法】通过重离子诱变野生型籼稻种质 BBS, 从其 M2 代中筛选出 2 个突变体, 分别命名为 *m2* 和 *m3*。通过表型观察和性状比较, 对突变体材料进行鉴定; 构建了粳稻种质 02428(父本) 与 *m2*、*m3* 的 F₂ 群体, 并进行遗传分析。【结果】与野生型 BBS 相比, *m2* 全生育期叶宽极显著变窄且内卷; *m2* 剑叶、倒 2 叶和倒 3 叶的卷曲度分别为 22.30%、38.15% 和 28.84%, 与野生型 BBS 差异达到极显著水平; *m2* 表现出高度不育。早季播种后第 54 天、晚季播种后第 30 天, *m3* 从主茎新叶叶梢开始枯萎, 整个叶枯表型持续 25 d 左右, 之后新长出的叶片恢复正常; *m3* 主穗质量和主穗粒数极显著下降, 其他农艺性状与野生型 BBS 无显著差异。遗传分析结果表明, *m2*/02428 的 F₂ 群体剑叶宽的频率分布符合正态分布, *m3*/02428 的 F₂ 群体中正常个体与叶片枯萎个体的分离比符合 3:1 的理论比值。【结论】*m2* 为窄叶突变体, 其窄叶性状受多个基因控制; *m3* 为叶片枯萎突变体, 其突变性状受 1 对隐性核基因控制。

关键词: 水稻; 重离子诱变; 突变体; 窄叶; 叶片枯萎

中图分类号: S335

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2018)01-0012-06

Phenotypic identification and genetic analysis of two rice (*Oryza sativa* L.) mutants induced by heavy ion

PENG Xin, LUO Lixin, ZHANG Li, XIONG Zimo, WANG Hui, GUO Tao, CHEN Zhiqiang, XIAO Wuming
(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】 To clarify the phenotypic characteristics and genetic patterns of two rice (*Oryza sativa* L.) mutants. 【Method】 Two mutants were screened from the M2 generation of the *indica* rice germplasm BBS (wild type) induced by heavy ion, named *m2* and *m3* respectively. Firstly, the mutant materials were identified by means of phenotypic observation and agronomic trait comparison. Secondly, the F₂ populations of 02428 (male parent)/*m2* and 02428/*m3* were constructed for genetic analysis. 【Result】 Compared with BBS, the leaves of *m2* were inner-rolled and the leaf width was significantly reduced during the whole growth period. The rolling index of flag leaf, the 2nd and 3rd leaf from the top were 22.30%, 38.15% and 28.84% respectively, which were significantly different from BBS. The mutant *m2* showed a high level of sterility. The new leaf tip of *m3* main stem started necrosis on the 54th day after sowing in early season or 30th day after sowing in late season. The leaf necrosis phenotype sustained about 25 days and then new leaves recovered to normal phenotype. Compared with BBS, the main panicle weight and grain number of *m3* dropped highly significantly, but other

收稿日期: 2017-04-27 优先出版时间: 2017-12-29

优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20171229.1131.022.html>

作者简介: 彭 歆 (1991—), 男, 硕士研究生, E-mail: 1044137629@qq.com; 通信作者: 陈志强 (1956—), 男, 教授, 硕士, E-mail: chenlin@scau.edu.cn; 肖武名 (1982—), 男, 助理研究员, 博士, E-mail: heredity24@126.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0102102); 广东省自然科学基金 (2016A030313391); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-01-12)

agronomic traits had no significant difference. Genetic analysis indicated that the frequency distribution of flag leaf width of the F_2 population of $m2/02428$ was in accordance with normal distribution. The segregation ratio of normal individuals and leaf necrotic individuals fitted 3 : 1 in the F_2 generation of $m3/02428$. 【Conclusion】 The mutant $m2$ is a narrow leaf mutant and the narrow leaf trait is controlled by multiple genes, whereas $m3$ is a leaf necrosis mutant and the mutant phenotype is controlled by a pair of recessive nuclear genes.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); heavy ion irradiation; mutant; narrow leaf; leaf necrosis

1986 年余增亮等^[1]发现重离子注入的生物学效应, 并成功将重离子注入到水稻 *Oryza sativa* L. 中。此后, 重离子辐照作为创制新种质和发掘有利突变的有力工具, 广泛应用于作物育种和模式植物功能基因的研究^[2]。生物体内某些对辐射较敏感部位(即辐射敏感靶)受到重离子的撞击而离子化, 引起 DNA 链断裂, 在修复时可能造成交换、倒置、异位等现象, 从而引起突变^[3]。已有的研究表明, 重离子辐射能诱导植物表型^[4]、基因组及其表达^[5]、转录组^[6]、蛋白质组^[7]和信号传导途径^[8]等发生变异。

水稻叶片是光合作用的直接器官, 叶片的颜色、形状和大小对株型起决定作用, 通过影响水稻的光合效率而影响产量和品质^[9]。研究水稻叶片发生变异的突变体、揭示其生物学效应和产生变异的分子机制, 已成为研究控制水稻叶片相关性状基因的主要方法之一。本试验围绕水稻重离子诱变产生的叶片性状发生变异的 2 个突变体 ($m2$ 和 $m3$) 展开研究, 以野生型为对照, 分析了 $m2$ 和 $m3$ 植株早、晚 2 季的农艺性状, 以及 2 个突变体的遗传特性, 旨在为相关基因的定位及克隆奠定基础, 为水稻育种提供潜在的种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的 4 个水稻材料分别为籼稻种质 BBS(野生型, Wild type)、粳稻种质 02428、以及突变体 $m2$ 和 $m3$ 。突变体 $m2$ 、 $m3$ 均来自 BBS 的重离子诱变后代, 辐射处理于 2013 年 2 月在兰州近代物理研究所用重离子加速器(HIRFL)对 BBS 干种子进行辐照(辐照剂量: 100 Gy, 剂量率: 60 Gy·min⁻¹)。以突变体 $m2$ 和 $m3$ 作母本分别与粳稻种质 02428 杂交获得 F_1 代, 再自交得到的 F_2 群体, 用作遗传分析。

1.2 田间种植及管理

水稻干种子先用自来水浸种 24 h, 室温下催芽 24 h, 露白后在事先准备好的大田播种育秧, 早季秧龄 31 d、晚季秧龄 18 d。4 个水稻材料均按 6×6 的

<http://xuebao.scau.edu.cn>

小区规格种植, F_2 群体采用双垄种植(每行种植 125 株), 行、株距均为 20 cm, 单株栽植。早季于 2016 年 3 月 5 日播种、4 月 6 日移植; 晚季于 2016 年 7 月 23 日播种、8 月 10 日移植。早、晚季均种植于华南农业大学校内教学科研试验基地, 常规栽培管理。

1.3 生物学效应分析

针对 $m2$ 的窄叶突变特性, 2016 年早季着重对 $m2$ 的株高、主穗质量、主穗实粒数、主穗总粒数及主穗结实率、剑叶至倒 3 叶的部分性状(长、宽、叶夹角、卷曲度)进行调查, 按照张克勤等^[10]的方法测定叶夹角和卷曲度(Leaf rolling index, LRI), 于齐穗期随机选取中间 5 个单株的主茎叶片进行测量, 量取叶尖与叶耳连线和叶着生茎秆的夹角, 即为叶夹角; 开花后 20 d 分别测定主茎着生叶片最宽处自然卷曲(指内卷)后叶缘间距离(L), 然后把叶片展开, 测量其宽度(D), 按如下公式计算 LRI, 每一个叶位 5 次重复。

$$LRI = (L - D) / D \times 100\%$$

针对 $m3$ 的叶片枯萎特性, 于 2016 年早、晚季重点观察其叶片枯萎情况。同时, 2016 年早季对 $m3$ 的株高、主穗质量、主穗实粒数、主穗总粒数、主穗结实率、千粒质量和剑叶长宽等进行调查。

对照均为野生型 BBS, 采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析。

1.4 遗传分析

2016 年早、晚季于华南农业大学校内教学科研试验基地分别种植 02428(父本)、 $m2$ 、 $m3$ 以及 F_1 代和 F_2 代群体, F_1 代观察各个个体的表型性状, F_2 代调查突变表型和正常表型的单株数, 统计分离比, 用 SPSS19.0 进行正态分析和卡平方检验。

2 结果与分析

2.1 突变体的表型鉴定与农艺学参数

与野生型 BBS 相比, $m2$ 剑叶极显著变窄, 剑叶、倒 2 叶、倒 3 叶宽度分别是野生型的 60.09%、58.18%、40.85%, 株高下降了 15.83%(表 1)。此外,

表 1 野生型 BBS 以及突变体 *m2* 和 *m3* 的农艺性状¹⁾
Tab. 1 Agronomic traits of wild type BBS, *m2* and *m3*

材料	株高/cm	主穗总粒数	主穗质量/g	主穗结实率/%	千粒质量/g	粒长宽比
<i>m2</i>	96.34±4.40**	—	—	—	—	—
<i>m3</i>	109.92±1.57	189.71±15.70**	3.64±0.29**	87.42±3.49	19.83±0.88	3.12±0.02
BBS	114.46±1.23	347.40±8.96	6.96±0.48	87.34±3.50	20.09±0.19	3.09±0.03

材料	剑叶		倒 2 叶		倒 3 叶	
	长/cm	宽/cm	长/cm	宽/cm	长/cm	宽/cm
<i>m2</i>	35.66±1.39*	1.28±0.04**	53.23±1.25	0.96±0.02**	51.50±0.44	0.67±0.01**
<i>m3</i>	37.16±1.55	2.09±0.05	—	—	—	—
BBS	42.70±3.30	2.13±0.06	48.75±1.25	1.65±0.06	54.00±4.00	1.64±0.01

1) “*”、“**”分别表示与野生型(BBS)比较, 差异达 0.05、0.01 的显著水平(*t* 检验)。“—”表示数据缺失, 其中 *m2* 高度不育, 故主穗总粒数、主穗重、主穗结实率、千粒质量、长宽比无法测量; *m3* 部分叶片枯死, 无法准确测量倒 2 叶和倒 3 叶的叶长和叶宽

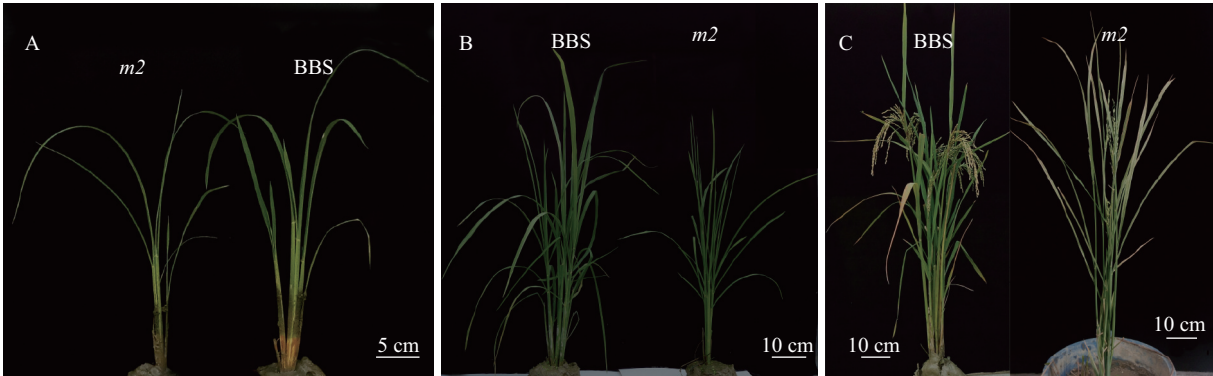
m2 植株倒 3 叶叶片明显内卷, 卷曲度比野生型 BBS 分别增加了 12.09%、30.80% 和 24.62%; *m2* 植株倒 2 叶和倒 3 叶与茎秆的叶夹角均增加, 差异达

极显著或显著水平(表 2)。观察发现, *m2* 表现出高度不育。*m2* 和野生型 BBS 各生育期的植株表型如图 1 所示。

表 2 野生型 BBS 和突变体 *m2* 叶片的卷曲度及叶夹角¹⁾
Tab. 2 Leaf rolling indexes and leaf angles of *m2* and wild type BBS

材料	卷曲度/%			叶夹角/(°)		
	剑叶	倒 2 叶	倒 3 叶	剑叶	倒 2 叶	倒 3 叶
<i>m2</i>	22.37±3.56**	38.15±4.27**	28.84±3.09**	19.69±2.61	13.65±0.53**	22.13±0.79*
BBS	10.28±1.69	7.35±1.19	4.22±0.93	17.39±0.35	7.90±1.20	18.60±0.46

1) “*”、“**”分别表示与野生型 (BBS) 比较, 差异达 0.05、0.01 的显著水平 (*t* 检验)



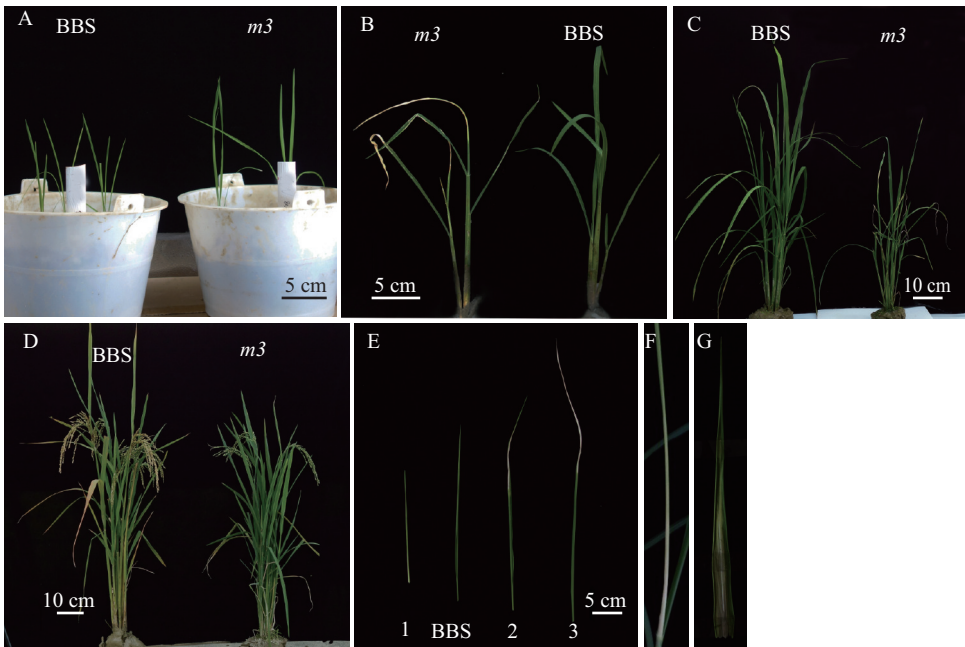
A: 幼苗期; B: 分蘖盛期; C: 成熟期

图 1 野生型 BBS 与 *m2* 各生育期表型

Fig. 1 Phenotypes of wild type BBS and *m2* at different stages

2016 年早季, *m3* 在播种后第 45 天, 主茎第 9 片叶从叶尖开始枯萎。之后, 主茎和其他分蘖上新抽出的叶片随着生长的进程, 表现出叶枯症状。播种后第 62 天, 心叶未完全展开就已经完全枯黄, 且之前表现正常的叶片也开始逐渐枯萎(图 2)。在孕穗期(播种后第 79 天)枯萎叶片数量占总叶数的比例达到最大, 此时 *m3* 仍然有正常叶存在(图 3A)。播种后第 82 天, 主茎和其他分蘖上新长出的叶片

均呈正常表型, 直至黄熟。2016 年晚季, *m3* 在播种后第 30 天开始出现叶尖枯萎现象。播种后第 35 天, 心叶未完全展开就已枯黄(图 2B、2F), 播种后第 50 天枯萎叶数占总叶数的比例达到最大, 此时 *m3* 整株叶片都表现为枯萎症状(图 3B), 分蘖后期(播种后第 55 天), *m3* 新抽出叶片和分蘖恢复正常(图 2C、2D)。除叶枯表型始现、突变叶片占比达到最大和突变表型开始恢复的时间以及叶枯表型



A: 幼苗期; B: 分蘖前期; C: 分蘖盛期; D: 成熟期; E: 分蘖期叶片 (1、2、3 分别为 *m3* 抽出 1、2、3 d 的叶片); F: *m3* 分蘖期的心叶; G: *m3* 抽出 1 d 的叶片展开照片

图 2 野生型 BBS 与 *m3* 各生育期表型
Fig. 2 Phenotypes of wild type BBS and *m3* at different stages

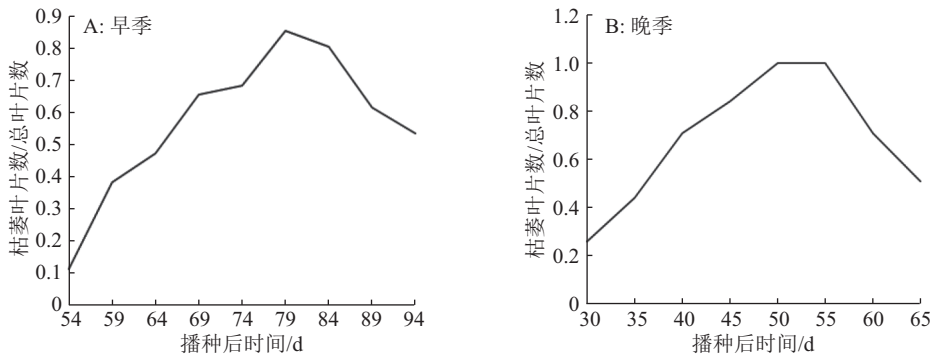


图 3 2016 年早、晚季 *m3* 枯萎叶数随时间的变化
Fig. 3 The changes of the necrotic leaf numbers of *m3* with time in early and late seasons in 2016

的严重程度不一样外, 2016 年早、晚 2 季 *m3* 叶枯表型的变化趋势基本一致。此外, *m3* 主穗总粒数、主穗质量较野生型分别下降了 45.39% 和 47.71%, 差异均达极显著水平 (表 1)。

2.2 遗传分析

2016 年早季重点观察了 F_1 代植株, 发现 *m2*/02428 的 F_1 代植株叶宽介于两亲本之间; *m3*/02428 的 F_1 代植株从苗期至成熟期均未出现叶片枯萎现象, 株型介于两亲本之间。上述结果说明 *m2* 和 *m3* 的突变表型均由隐性基因控制。2016 年晚季对 02428/*m2* 的 F_2 群体 721 个单株的剑叶宽展开调查, 经分析发现剑叶宽分布范围为 1.0~3.8 cm, 不同剑叶宽的频率分布图为连续的柱状图形 (图 4), 且服从正态分布 ($P=0.096\ 2>0.05$), 说明 *m2* 的剑叶宽变异表型受多基因控制。

<http://xuebao.scau.edu.cn>

来源于 *m3*/02428 的 F_2 群体共 777 株, 其中, 正常植株 598 株、叶枯表型植株 179 株, 经卡平方

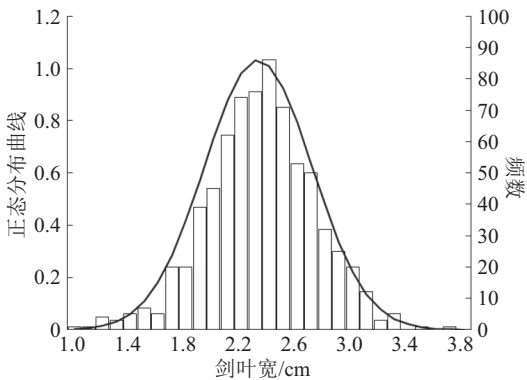


图 4 *m2*/02428 的 F_2 群体剑叶宽的分布频数
Fig. 4 The frequency distribution of flag leaf width in the F_2 generation of *m2* and 02428 cross

检验, 正常个体与叶枯个体的分离比符合 3:1 分离比, $\chi^2=0.205\ 9<\chi^2_{(0.05,\ 1)}=3.840$, 说明 *m3* 的叶片枯萎表型受 1 对隐性核基因控制。

3 讨论与结论

3.1 水稻重离子诱变育种

重离子诱变具有变异率高、变异谱宽、变异快、稳定周期短和简便易行等优点^[11]。由于重离子电离峰 (Bragg 峰) 更尖锐, 使得重离子与生物体相互作用区域更集中, 集中受损的区域可随离子能级的大小而改变^[12]。低剂量 (10~40 Gy) 的重离子辐照处理水稻种子, 对于株高、根长和幼苗鲜质量有促进作用, 而对发芽率和叶片数量没有显著影响。中能重离子辐射对发芽率和存活率影响显著, 对幼苗株高无显著影响^[4]。在诱变频率方面, Xu 等^[13]研究发现低能辐射组 60 000 个 M2 代水稻植株中, 有 2 823 个可观察到形态学突变, 突变率为 4.71%; 中能组有 3 132 个呈现形态学突变, 突变率为 5.22%。本研究中, 从 2 500 个中能 (100 Gy) 重离子诱变 M2 代植株中筛选到 2 个可稳定遗传的叶片发生变异的突变体 (*m2* 和 *m3*), 获得目标突变体的频率为 0.08%。重离子辐射诱变育种前景广阔, 已有的文献表明, 重离子辐照育种在组织培养、转基因操作、分子标记辅助育种和航天诱变育种等方面均有应用, 必将极大丰富种质资源^[14]。随着分子生物学的发展, 可以直接从分子水平上对突变体进行鉴定^[15]。在今后的研究中, 重离子诱变配合高通量测序筛选技术将成为水稻性状改良和作物遗传育种的有效方法之一。

3.2 *m2* 在水稻品种改良及遗传育种中的应用潜力

迄今为止, 对水稻株型的概念仍有争议。总的来说, 株型的根本是株叶形态^[16]。袁隆平^[17]认为理想水稻株型的株高 100 cm 左右, 上 3 叶修长, 倒 3 叶 50 cm 左右, 倒 2 叶比剑叶长 10% 以上并高过穗尖, 倒 3 叶叶尖达到穗中部。*m2* 突变体株高 96.34 cm, 除剑叶 (35.66 cm) 外, 倒 2、倒 3 叶的长度均在 50 cm 左右。水稻叶片挺直可以减少叶片之间的遮光, 从而改善水稻群体的光合效率, 提高产量^[18]。*m2* 突变体叶片内卷, 使其从苗期至成熟期, 叶片都能保持挺直, 在作物品种改良和遗传育种应用中具有很大的可塑性。未来超级杂交水稻育种将基于籼粳杂交, 通过精准分子设计与全基因组分子标记辅助选择技术选育新品种^[19]。因此, 通过籼粳杂交将优良的叶形相关基因和高产优质基因组合到一起, 培育具有籼粳杂种优势和理想株型的优良

品种, 是未来水稻株型育种的一个方向^[20]。本试验中 *m2* 的育性降低, 但从 *m2* 与 02428 杂交的 F₂ 代群体中选择得到了 1 批株型与 *m2* 极其相似且育性正常的单株 (文中未列出), 通过多代自交有望得到株型大幅改善的育种材料。

3.3 水稻叶片早衰突变体

水稻叶片提前枯萎是叶片早衰最明显的形态特征^[20]。已报道的水稻叶片早衰突变体有 30 多个, 这些突变体主要是通过 EMS、⁶⁰Co 辐射、T-DNA 插入、空间诱变和自然变异获得。叶片早衰突变以隐性突变为主, 除 *OsSAP*^[21] 为线粒体基因外, 其他突变基因均为细胞核基因。控制水稻叶片早衰表型的基因广泛分布在水稻的 12 条染色体上, 在第 3、4、11 染色体上分布较多, 目前已有少部分控制叶衰表型的基因得到了克隆验证。

叶片一旦早衰, 将极大影响水稻的生长发育, 进而影响产量和品质。综观目前已报道的水稻叶片早衰突变体, 鲜见与 *m3* 表型相同的突变体, 因此, 控制 *m3* 突变表型的基因很可能是一个新基因, 对其进行研究有利于加深我们对水稻叶片衰老遗传机理的理解, 为水稻抗衰老育种提供新的基因资源。*m3* 植株的叶片苗期正常, 之后叶片枯萎, 持续一段时间后新抽的叶片又恢复正常。推测可能存在一种机制能够弥补 *m3* 突变表型带来的损伤, 对 *m3* 展开进一步的研究很有可能发现新的控制水稻叶片衰老的分子机制。

参考文献:

[1] 余增亮, 何建军, 邓建国, 等. 离子注入水稻诱变育种机理初探[J]. 安徽农业科学, 1989(1): 12-16.
[2] HIRANO T, KAZAMA Y, ISHII K, et al. Comprehensive identification of mutations induced by heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 2015, 82(1): 93-104.
[3] 韦祖生, 李开绵. 作物诱变育种及突变体鉴定与筛选研究进展[J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 38-41.
[4] LING A P K, UNG Y C, HUSSEIN S, et al. Morphological and biochemical responses of *Oryza sativa* L. (cultivar MR219) to ion beam irradiation[J]. JZUSB, 2013, 14(12): 1132-1143.
[5] RAKWAL R, KIMURA S, SHIBATO J, et al. Growth retardation and death of rice plants irradiated with carbon ion beams is preceded by very early dose- and time-dependent gene expression changes[J]. Mol Cells, 2008, 25(2): 272-278.
[6] HWANG J E, HWANG S, KIM S, et al. Transcriptome profiling in response to different types of ionizing radiation and identification of multiple radio marker genes in

rice[J]. *Physiol Plant*, 2014, 150(4): 604-619.

[7] WANG W, GU D P, ZHENG Q, et al. Leaf proteomic analysis of three rice heritable mutants after seed space flight[J]. *Adv Space Res*, 2008, 42(6): 1066-1071.

[8] KIM S, SONG M, LEE K J, et al. Genome-wide transcriptome profiling of ROS scavenging and signal transduction pathways in rice (*Oryza sativa* L.) in response to different types of ionizing radiation[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(12): 11231-11248.

[9] 冯章丽. 水稻叶色突变体基因定位研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2014(9): 135-139.

[10] 张克勤, 戴伟民, 樊叶杨, 等. 水稻剑叶角度与主穗产量的遗传剖析[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(9): 186-192.

[11] 颀红梅, 卫增泉, 郝冀方, 等. 重离子束辐照育种概述[C]//西部地区第二届植物科学与开发学术讨论会论文摘要集, 乌鲁木齐: 中国植物学会, 2001: 119.

[12] ISHII K, KAZAMA Y, MORITA R, et al. Linear energy transfer-dependent change in rice gene expression profile after heavy-ion beam irradiation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): 1-11.

[13] XU X, LIU B M, ZHANG L L, et al. Mutagenic effects of heavy ion irradiation on rice seeds[J]. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 2012, 290(1): 19-25.

[14] 李文建, 周利斌, 陈积红, 等. 重离子诱变育种及其应用[C]//第三届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会会议论文摘要集, 兰州: 中国微生物学会, 2011.

[15] SHI J, LU W, SUN Y. Comparison of space flight and heavy ion radiation induced genomic/epigenomic mutations in rice (*Oryza sativa*)[J]. *Life Sci Space Res*, 2014, 1(1): 74-79.

[16] 王昆, 罗琼, 蔡庆红, 等. 水稻株型的研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2013(17): 1-4.

[17] 袁隆平. 杂交水稻超高产育种[J]. *杂交水稻*, 1997, 12(6): 1-6.

[18] XIANG J J, ZHANG G H, QIAN Q, et al. *SEMI-ROLLED LEAF1* encodes a putative glycosylphosphatidylinositol: Anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells[J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(4): 1488-1500.

[19] 张宝来. 水稻叶片衰老的研究进展[J]. *天津农业科学*, 2013, 19(4): 19-24.

[20] 郑庆伟. 中国农科院等提出高产优质超级杂交水稻设计育种新模型[J]. *农药市场信息*, 2016(7): 48.

[21] UBAIDILLAH M, KIM K, KIM Y H, et al. Identification of a drought-induced rice gene, *OsSAP*, that suppresses bax-induced cell death in yeast[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(11): 6113-6121.

【责任编辑 周志红】