

杨瑰丽, 陈莹, 郭涛, 等. 碳离子束辐照水稻诱变效应及突变体的筛选[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(2): 29-33.

碳离子束辐照水稻诱变效应及突变体的筛选

杨瑰丽¹, 陈莹¹, 郭涛¹, 黄明¹, 黄翠红¹, 王慧¹, 李文建², 陈志强¹

(1 华南农业大学 国家植物航天育种工程研究中心, 广东 广州 510642; 2 中国科学院 近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘要:【目的】丰富水稻 *Oryza sativa* L.突变体库, 快速创造稳定遗传的新种质, 为重离子辐照诱变机理研究和水稻遗传育种提供丰富的基础材料。【方法】利用碳离子束辐照水稻品种 ‘IR-55’、‘IR-60’、‘三粒寸’ 和 ‘云南陆稻’ 原种进行诱变, 并对诱变后代的多个农艺性状进行多代跟踪调查。【结果】4 个水稻品种突变株系株高、剑叶长、穗长和粒长宽比等性状呈现出较大变异幅度, 且具有明显的正向或负向性, 结实率表现出明显的下降趋势, 最低为 2%。利用随机选取的 SSR 分子标记引物对突变体进行遗传多样性检测发现, 突变株系与原种的遗传多样性表现出明显的差异, 表明重离子辐照诱变引起 DNA 序列较大片段的改变, 而不是微小的点突变。【结论】碳离子束辐照对水稻株高、剑叶长和粒型等多个农艺性状产生正向或负向的诱变效应, 在诱变后代中可以筛选出一批农艺性状变异的水稻新种质。

关键词: 水稻; 碳离子束辐照; 诱变效应; 突变体
中图分类号: S335.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)02-0029-05

Mutagenic effects of carbon ion beam irradiation on rice and screening for induced mutants

YANG Guili¹, CHEN Ying¹, GUO Tao¹, HUANG Ming¹, HUANG Cuihong¹,
WANG Hui¹, LI Wenjian², CHEN Zhiqiang¹

(1 National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: 【Objective】To enrich rice (*Oryza sativa* L.) mutant library, rapidly create genetically stable new germplasm, and provide valuable materials for following study of mutation mechanisms and rice genetic breeding. 【Method】The breeder seeds of ‘IR55’, ‘IR60’, ‘Sanlicun’ and ‘Yunnan Ludao’ were irradiated by carbon ion beam, and the agronomic traits of induced generations were consecutively investigated. 【Result】The mutants of four cultivars varied over a large range of variation in plant height, flag leaf length, spikelet length, length-width ratio of grain and other traits, and displayed obvious positive or negative mutation. Seed setting rate decreased respectively with the lowest value of 2%. Large genetic diversity variations were detected between the mutants and breeder seed populations of four cultivars using randomly selected SSR markers, indicating that heavy ion irradiation induced big fragment variations at DNA sequences, rather than subtle site mutation. 【Conclusion】Carbon ion beam irradiation can cause positive or negative mutation of plant height, flag leaf length, grain shape and other agronomic traits of rice. New rice germplasms with variation in agronomic traits

收稿日期: 2017-06-22 优先出版日期: 2018-01-17
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180117.1613.032.html>
作者简介: 杨瑰丽 (1977—), 女, 助理研究员, 博士, E-mail: yanggl@scau.edu.cn; 通信作者: 陈志强 (1956—), 男, 教授, 硕士, E-mail: zqchen@scau.edu.cn
基金项目: 国家重点研发计划专项资金 (2016YFD0102102); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-01-12); 广东省应用型研发专项资金 (2015B020231011)

can be screened out from mutation progenies.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); carbon ion irradiation; mutagenic effect; mutant

突变体是功能基因组研究的重要材料,也是作物育种的基础^[1]。新的突变体可直接间接地在生产上利用,加快作物育种进程^[2-3]。重离子诱变作为一种新兴的辐射诱变手段,具有变异率高、变异谱宽、变异稳定快、诱变方法稳定可靠和简单易行等独特优势,能够诱发植物基因组在当代发生可遗传变异,近年来为作物改良提供了新途径^[4-5]。目前,重离子诱变已广泛用于创建新种质,尤其是用于高等植物辐射诱变育种,在植物育种中发挥着重要作用^[6-10]。水稻 *Oryza sativa* L. 作为最主要的粮食作物之一,为全世界一半以上的人口提供主食^[11]。利用重离子诱变技术诱导突变体,构建水稻突变体库,创造丰富的水稻种质资源,不仅可以为水稻功能基因组学提供有价值的研究材料,同时也是选育优良水稻品种的有效手段,目前已培育出优质、高产、在生产上大面积推广的水稻新品种^[12-13]。本研究以水稻品种‘IR-55’、‘IR-60’和‘三粒寸’等为试验材料,利用碳离子辐射诱变技术,诱变后连续多代种植并跟踪调查筛选,以期获得一系列突变株系,丰富水稻的突变体资源库,为后续重离子辐照诱变机理研究以及水稻育种提供有利的基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为‘IR-55’、‘IR-60’、‘三粒寸’和‘云南陆稻’共 4 个水稻品种原种及其重离子辐照诱变后代。

1.2 试验设计

水稻干种子 (M_0) (每个品种 300 粒) 经中国科学院近代物理研究所重离子加速器国家实验室提供的 $80\text{ MeV}\cdot\text{u}^{-1}\text{ }^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照诱变处理 (辐射剂量为 100 Gy) 后,田间种植。 M_1 代单株主穗混收,双垄种植,筛选不同类型突变株, M_2 单株成系种植,常规栽培管理,开展田间调查和室内考种考察各突变株系的主要农艺性状。

1.3 突变株系遗传多样性检测方法

1.3.1 突变株系与原种株系 DNA 提取 采用简易法快速提取叶片 DNA,叶片用液氮研碎,加 $800\text{ }\mu\text{L}$ TPS; $75\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 $0.5\sim 3.0\text{ h}$ (每 10 min 摇 1 次), $11\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min ; 取上清液转移至 2 mL 离心管,加入等体积预冷的冷冻异丙醇/无水乙醇 (摇匀后,置 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 充分沉淀 DNA), $11\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$

离心 10 min ; 弃上清液,取沉淀,加 $200\text{ }\mu\text{L}$ φ 为 70% 的乙醇溶液, $3\text{ }500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ; 弃上清液,将沉淀干燥,加 $200\text{ }\mu\text{L}$ $1\times\text{TE}$ (含 $4\sim 5\text{ }\mu\text{L}$ RNA 酶) 溶解, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。调查统计突变株系数量,计算多态性频率:

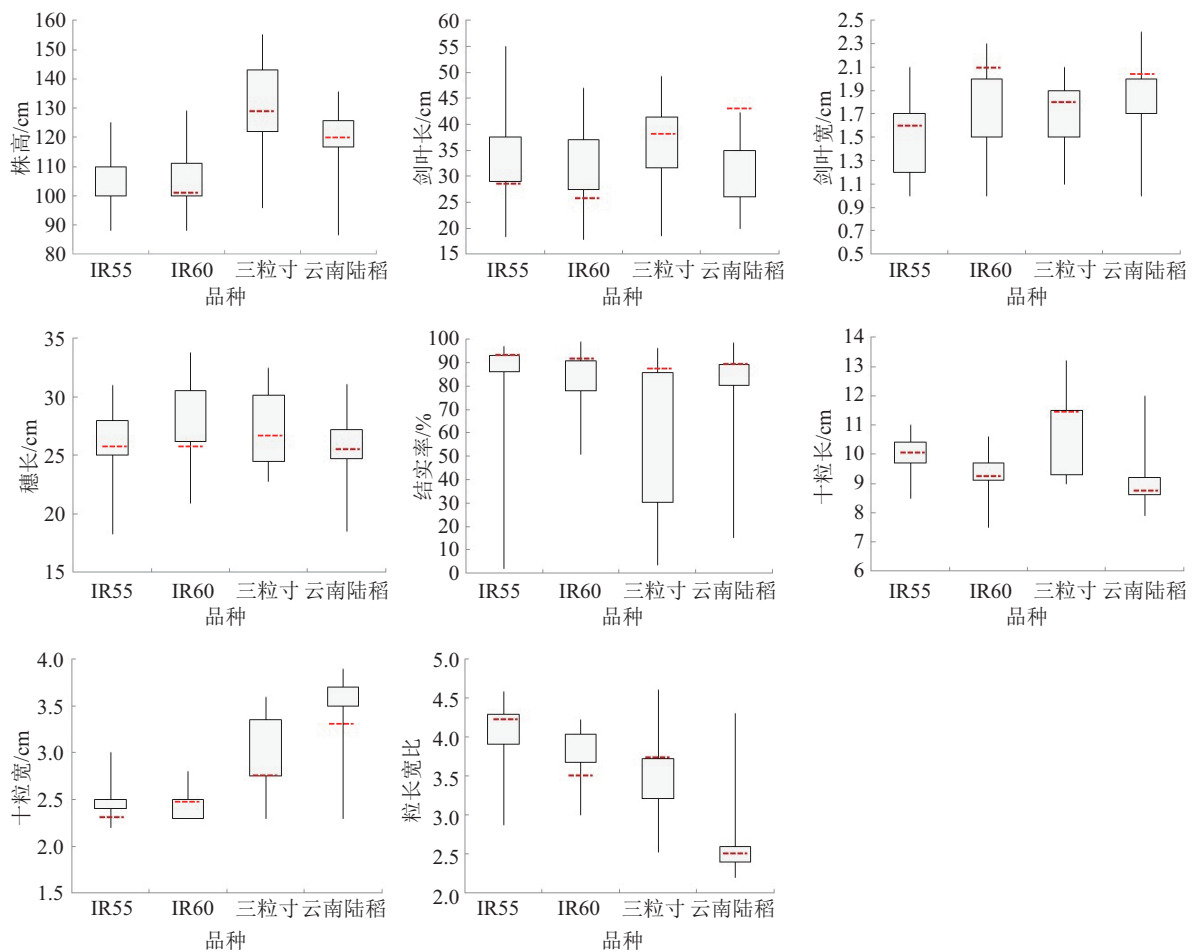
多态性频率=存在多态性的突变株系数量/总突变株系数量 $\times 100\%$ 。

1.3.2 SSR 标记分析 PCR 扩增采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系: $2\times\text{PCR Reaction Mix}$ $10\text{ }\mu\text{L}$ (含 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$, $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$, $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$, $400\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTP}$), *Taq* 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, 引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA $1\text{ }\mu\text{L}$, 超纯水补至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $58\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 $30\sim 60\text{ s}$, 35 个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。扩增产物 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。扩增产物用 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, w 为 0.1% 的硝酸银溶液染色 10 min , 显影液摇动显影 10 min 后用自来水清洗,检验扩增条带,观察电泳结果。

2 结果与分析

2.1 重离子辐照诱变后代突变株系主要农艺、经济性状变异

每个诱变品种 M_0 代种植后,成活率均在 95% 以上。 M_1 代单株主穗混收后,每个品种分别种植 $1\text{ }000$ 株,进行突变体筛选,‘IR-55’、‘IR-60’、‘三粒寸’和‘云南陆稻’4 个品种分别得到 48 、 31 、 15 和 47 株突变株系。在 M_2 代对各候选突变株系继续进行小区种植,并对株高、剑叶长、剑叶宽、穗长、结实率、十粒长、十粒宽和长宽比等主要农艺性状进行调查和统计。总体而言,4 个水稻品种突变株系株高、剑叶长、穗长和粒长宽比等性状呈现出较大变异,发生明显的正向或负向变异 (图 1)。结实率在各品种突变株系中均呈现明显下降趋势,表明辐照诱变对突变后代结实率有较强的负向效应。‘IR-55’突变株系结实率低至 2% , ‘三粒寸’的突变株系结实率比其他品种的下降趋势更为明显。剑叶宽也呈相似的下降趋势,但下降幅度比结实率小。就单个性状而言,不同品种由于遗传背景的差异,辐照诱变效应也存在一定差别。‘三粒寸’突变株系的粒型性状如十粒长和十粒宽比其他品种变异幅度大,‘IR55’和‘云南陆稻’粒型性状变异幅度不明显。



箱上垂直线顶点: 最大值, 箱下垂直线顶点: 最小值, 箱上边缘: 上四分位数, 箱下边缘: 下四分位数, 虚线: 水稻品种原种性状值

图1 不同品种突变株系重要农艺性状变异幅度比较

Fig. 1 Comparisons of variation ranges of agronomic traits in the mutants of different cultivars

2.2 重离子辐照诱变后代突变株系遗传多样性初步分析

为了进一步分析表型发生明显变异的突变株系在 DNA 水平的差异水平, 探讨重离子辐照诱变机制, 我们利用随机选取的 120 对 SSR 分子标记引物 (每条染色体 10 对) 对所有品种的原种和突变体株系进行初步遗传分析发现, 共有 28 对引物在原种和突变株系间检测出多态性。对每个品种不同染色体检测出多态性的频率进行统计, 结果表明, 辐照诱变后不同染色体检测出的多态性频率存在一定差异。所有品种的 10 号染色体均没有检测出多态性, 11 号染色体检测出的多态性频率最高, 为 6.7%。原种和突变株系间遗传多态性差异水平因品种而异, ‘IR55’ 平均遗传多态性变异频率最低, 为 1.4%, ‘三粒寸’ 平均遗传多态性变异频率最高, 达 3.9%。

2.3 部分稳定的突变体性状变异

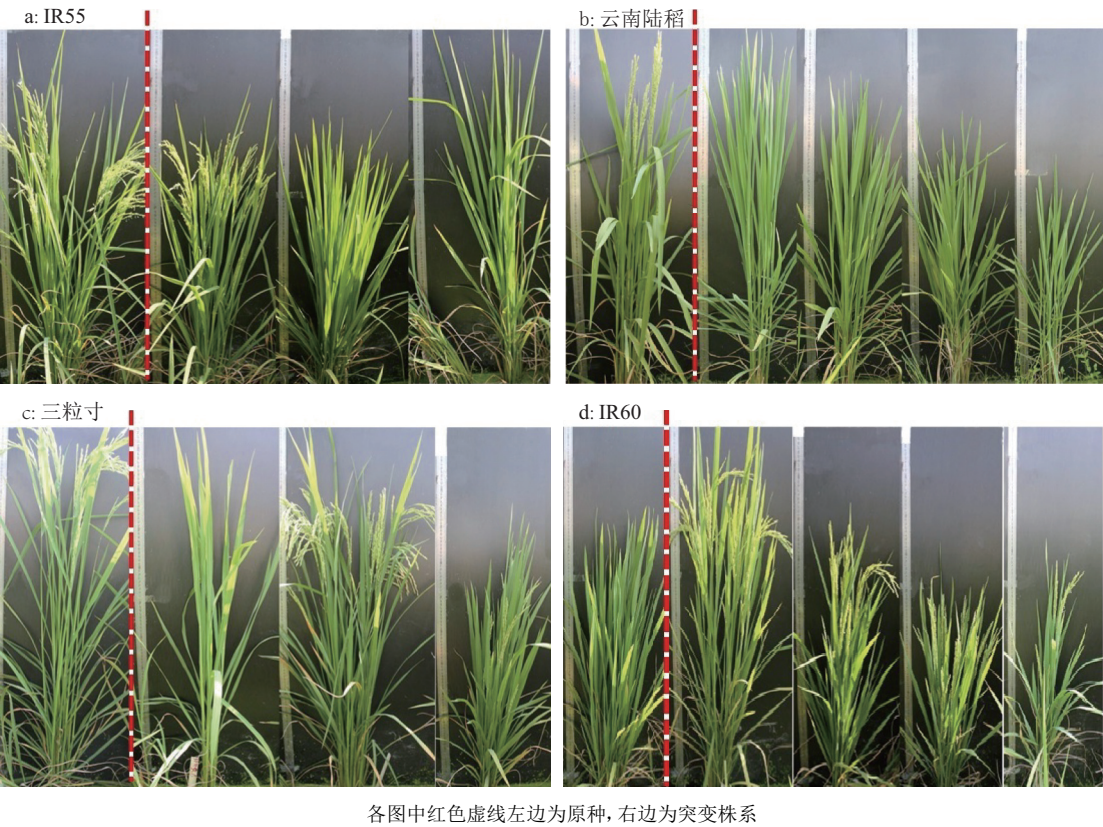
重离子辐照诱变群体经全生育期、多造别、多世代 (M₁、M₂) 的田间筛选, 鉴定出多个性状发生突

变的株系。这些突变株系的生育期、株/叶型和籽粒等性状呈现出丰富变异, 为重离子辐照诱变机理研究和水稻育种提供了丰富的基础材料。

2.3.1 生育期突变体 重离子辐照诱变后, 4 个水稻品种出现多个生育期突变株系, 开花提前或延迟。突变株系的抽穗期较原种出现较大差异, 表现出早熟或晚熟性状 (图 2)。

2.3.2 株高突变体 株高的变异是突变株系较为明显的特征。‘IR55’ 和 ‘三粒寸’ 2 个品种的突变株系中, 均出现植株明显矮化, 但株型和抽穗期无明显变化的突变株系 (图 2)。田间观察发现有些突变株系多个性状 (如株高和抽穗期) 同时发生改变, 如 ‘IR60’ 出现株高增高、抽穗期也明显提前的突变株系 (图 2)。

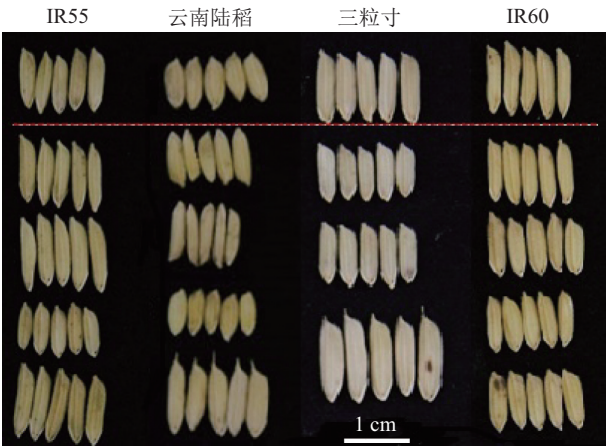
2.3.3 粒型突变体 粒型的丰富变异也是重离子辐照诱变效应的突出特点, 4 个品种突变株系的粒型呈现丰富的变异。‘IR55’、‘云南陆稻’、‘三粒寸’ 和 ‘IR60’ 4 个品种均出现籽粒增大和变小 2 种突变类型 (图 3)。



各图中红色虚线左边为原种, 右边为突变株系

图 2 不同水稻品种突变株系的株高和生育期变异

Fig. 2 The variations of plant height and growth period of mutant lines from different cultivars



红色虚线上面为原种, 下面为突变株系

图 3 不同水稻品种突变体株系的粒型变异

Fig. 3 The grain shape variations of mutant lines from different cultivars

3 讨论与结论

重离子辐射能诱发基因组在当代发生可遗传变异, 并具有高突变率的优势, 对创造新型种质、提高育种效率和加快育种进程具有重要意义^[14-15]。前人在小麦^[9]、大豆^[14, 16]、玉米^[17-19]和大葱^[6, 20-21]等作物离子辐照诱变后代农艺性状变异研究中发现, 同一作物的不同品种和不同性状对辐照的敏感性不同,

离子束对作物性状的诱变既有正向诱变效应也有负向诱变效应。因此在辐照后代的选择中可以保留正向符合育种要求的突变而淘汰表现较差的突变类型, 宽的突变谱更利于培育出符合育种目标的新品种材料。本研究也发现, 4 个水稻品种突变株系在株高、剑叶长、穗长和粒长宽比等性状上呈现出较大变异幅度, 有明显的正向或负向性。大豆辐照诱变后单株荚数和单株粒数与对照相比平均提高了 4.28% 和 3.72%^[14], 而本研究中水稻的结实率则整体出现明显的下降趋势, 表明不同作物的结实性状对辐照的敏感性存在差异。离子束辐照主要引起生物体的原初损伤和遗传物质的变异^[22], 遗传物质的变异主要是 DNA 分子序列较大的改变, 不会是点突变^[23]。本研究利用随机选取的分子标记引物对突变体进行遗传多样性的检测结果也表明, 经过重离子辐照后, 水稻突变体中部分 DNA 序列发生较大片段的改变, 与原种相比表现出一定差异。

遗传资源的单一和匮乏是作物育种实践的瓶颈, 多途径拓宽植物的种质资源对育种实践具有重要意义。本研究利用重离子辐照诱变筛选获得了一批水稻突变体, 为水稻遗传育种研究提供了丰富的材料基础。随着作物分子育种向高效精准方向发展

展, 作物突变体的表型鉴定需要更高的精度^[24], 高通量测序鉴定技术是未来突变体筛选的发展趋势。

参考文献:

[1] 郭龙彪, 储成才, 钱前. 水稻突变体与功能基因组学[J]. 植物学通报, 2006, 23(1): 1-13.

[2] 张小冰, 郝建平, 裴雁曦, 等. 辐射诱变甜荞高产突变体过氧化物酶活性及其同工酶的研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(1): 71-73.

[3] 王子宁, 郭北海, 张艳敏, 等. 小麦糯性突变体的筛选[J]. 华北农学报, 2002, 17(3): 14-19.

[4] HASE Y, YOSHIHARA R, NOZAWA S, et al. Mutagenic effects of carbon ions near the range end in plants[J]. Mutat Res, 2012, 731(1/2): 41-47.

[5] 曲颖, 李文建, 周利斌, 等. 重离子辐射植物的诱变效应研究及应用[J]. 原子核物理评论, 2007, 24(4): 294-298.

[6] 李姝汶, 王晓军, 段翼远, 等. ¹²C⁶⁺高能重离子辐照大葱损伤及其分子生物学效应[J]. 原子核物理评论, 2010, 27(3): 328-334.

[7] 梁前进, 胡玉莲, 张根发. 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 氮、碳离子注入诱变效应分析[J]. 生物物理学报, 2002, 18(2): 251-255.

[8] 王曙阳, 李景华, 姜伯玲, 等. ¹²C⁶⁺离子辐照对苜蓿 M1 代低温胁迫存活率、过氧化氢酶及过氧化物酶活性的影响[J]. 原子核物理评论, 2014, 31(3): 411-415.

[9] 刘青芳, 余丽霞, 杜艳, 等. ¹²C⁶⁺离子束辐照对小麦种子萌发、幼苗生长及存活的影响[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2013, 31(1): 26-30.

[10] ARASE S, HASE Y, ABE J, et al. Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: Effects on plant growth and production of visibly altered mutants[J]. Plant Biotechnol, 2011, 28(3): 323-329.

[11] MIRRA K, IKEDA M, MATSUBARA A, et al. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice[J]. Nat Genet, 2010, 42(6): 545-549.

[12] 叶俊, 吴建国, 杜婧, 等. 水稻“9311”突变体筛选和突变体库构建[J]. 作物学报, 2006, 32(10): 1525-1529.

[13] YAMAGUCHI H, HASE Y, TANAKA A, et al. Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice[J]. Breed Sci, 2009, 59(2): 169-177.

[14] 余丽霞, 李文建, 杜艳, 等. 碳离子束辐照大豆当代诱变效应及褐皮突变体的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, 32(2): 020402(1-7).

[15] 张秋英, 余丽霞, 李彦生, 等. 重离子束辐照大豆籽粒当代效应的初步研究[J]. 大豆科学, 2013, 32(5): 587-590.

[16] 王悦. 重离子束注入大豆种子的诱变效应研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.

[17] 耿金鹏, 李多芳, 曹天光, 等. 重离子辐射玉米自交系田间性状的统计分析[J]. 玉米科学, 2013, 21(2): 66-70.

[18] 刘志生, 陈吉法, 范广华, 等. 等离子束玉米自交系选育初探[J]. 激光生物学报, 2002, 11(2): 142-144.

[19] 罗红兵, 赵葵, 郭继宇, 等. 重离子辐照玉米种子 M1 代诱变效应研究[J]. 原子核物理评论, 2004, 21(3): 238-242.

[20] 钱平平, 侯岁稳, 吴大利, 等. ¹²C⁶⁺重离子辐照大葱的生物学效应[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(4): 211-215.

[21] 孙兰弟, 张颖聪, 吴大利, 等. ¹²C⁶⁺离子辐照对 4 种农作物种子出苗率及幼苗生长的研究[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 182-186.

[22] 周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 离子束辐照结合组织培养在植物诱变中的研究进展[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(4): 232-236.

[23] 庄楚雄, 胡维民, 梅曼彤. 高能重离子辐射诱导水稻半矮生突变株系的 RFLP 分析[J]. 核农学报, 1997, 11(2): 74-78.

[24] 潘映红. 论植物表型组和植物表型组学的概念与范畴[J]. 作物学报, 2015, 41(2): 175-186.

【责任编辑 周志红, 李庆玲】