

空间搭载诱导水稻种子突变的分子标记多态性分析

易继财¹, 庄楚雄¹, 姚涓¹, 王慧², 陈志强², 梅曼彤¹

(1. 华南农业大学生命科学学院; 2. 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘要: 以卫星空间搭载广东水稻品种特粘占 13 干种子, 返地种植后经 5 代选择、培育, 获得一批形态及育性变异的突变体及品系(种), 如株高变矮, 稻穗变大, 雄性不育等。为了探索空间诱变的本质, 对选出的 6 个突变体及 2 个优良品系, 选用了 130 个 10-mer 随机扩增多态性 DNA(RAPD)引物和 17 对扩增片段长度多态性(AFLP)引物组合, 分别对其基因组 DNA 进行多态性位点扫描分析, 两种方法的结果均显示: 不同的突变体与原种 DNA 之间存在不同程度的多态性差异, 且由两法得到的结果较接近, 为 6%–12%。此结果从分子水平上进一步证明了空间环境确实对植物种子存在诱变作用。

关键词: 空间搭载; 水稻突变体; 分子标记分析

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2002)04-0478-06

自 1987 年以来, 我国多次组织作物种子空间搭载, 从空间搭载植物种子的后代中发现各种类型变异, 为品种选育和分子生物学研究提供了优良突变类型和研究材料。至今已获得不少优良的突变类型, 并培育成功了数个水稻、小麦、青椒等作物新品种(系), 在生产上有所应用^[1,2]。王斌等^[3]、Mei 等^[4]还利用随机扩增多态性 DNA(random amplification polymorphism DNA, RAPD)方法对空间诱变绿豆、玉米的突变体进行分析, 从分子水平证明了突变的存在。20 世纪 60 年代以来, 美、俄等国科学家对空间辐射的生物学效应进行了不少研究, 但尚少见关于植物种子返地后, 在 DNA 分子水平对经多代选择获得的稳定突变体研究报道。

我们把水稻种子在 1996 年 10 月搭载于返回式卫星, 返地后与原种对照进行田间种植观察, 经过连续五代的选择获得了一批性状稳定的突变株系, 周峰等^[5]已对其基因组 DNA 进行了简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)多态性分析。为了更进一步研究空间诱变现象的本质, 本文以对基因组作随机分析的两种分子标记分析方法, 即 RAPD 及扩增片段长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)对其中的几个突变体进行分析, 以期了解其基因组的变化。

1 材料与方法

1.1 供试材料及搭载条件

籼稻品种特粘占 13 为广东省重要栽培品种, 性状表现稳定。将其干种子(含水量约为 13%)在 1996 年 10 月于我国返回式卫星(飞行高度 178–320 km, 倾角 63°, 辐射吸收剂量 2.65 mGy)搭载 15 天。返地后与原种同时在田间种植、观察, 并从第一代及第二代中选择形态性状变异的突变株系。本研究以获得的 8 个突变株系经自交 4 代的后代为研究材料。

1.2 DNA 提取

参照 Murray 等^[6]抽提植物 DNA 的 CTAB 法, 进行水稻总 DNA 提取。

收稿日期: 2002-01-27

基金项目: 国家高技术航天领域(863-2-7-10-1)、国家自然科学基金项目(30170534)

作者简介: 易继财, 1971 年生, 助理研究员, 在职博士研究生, 电话: (020)85280200, E-mail: jicai@scau.edu.cn.

通讯作者: 梅曼彤, 教授, 博士生导师, 电话: (020) 85280200, E-mail: mtmei@scau.edu.cn.

1.3 变异株系的分子标记分析

1.3.1 随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析

参照 Williams 等^[7]的方法。选用 Operon 公司的 130 个 10-mer 随机引物作 RAPD 分析, 在 9700DNA 扩增仪(PE 公司)上进行 PCR 扩增。扩增反应体系的总体积为 25 μ l, 起始模板 DNA 为 40 ng, Mg^{2+} 终浓度为 2.0 mmol/L。扩增反应的条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min 后, 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 36 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 38 个循环, 再在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。RAPD 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 由凝胶成像分析系统检测记录结果。

1.3.2 扩增片段长度多态性(AFLP)分析

参照 Vos 等^[8]发明的 AFLP 方法, 采用 Gibco-BRL 公司(美国)的 AFLP 分析试剂盒, 以 35 S 标记法进行。起始水稻 DNA 样品用量为 200 ng, 总共用了 17 对引物组合。扩增反应完成后, 90 $^{\circ}$ C 加热 3 min, 然后经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 凝胶干燥后置于 X 光片感光或用分子磷屏成像系统(BioRad 公司)检测记录结果。

2 结 果

2.1 空间诱导的各突变体的特征

本研究所用突变株系均经 4 代自交繁育, 突变性状稳定, 对其选育过程及结果将另文发表, 本文只对其特性作简单描述。这些突变株系包括: 矮生(ST-1, dwarf)、穗型变大(ST-2, larger spikelet)、

谷粒变短圆(ST-3, shorten grain)、谷粒变紫(ST-4, purple grain)、剑叶增长(ST-5, lengthened flag-leaf)、雄性不育(ST-6, male sterility)6 个突变体, 以及从变异株系中选育出的两个高产优质的品种(系)华航一号(ST-7, huahang 1)、华航二号(ST-8, huahang 2)(表 1 及下文中均用此编号代表不同突变株系)。这些突变株系主要变异表现在: 株高变异, 如矮生突变体, 其平均株高比原种矮约 41.1%, 而且其叶呈卷叶状, 叶色浓绿; 穗粒变异, 如穗增大、增长的大穗突变体, 谷粒增宽且呈短圆型的短圆粒突变体, 谷粒呈紫色的紫穗粒突变体; 叶型变异, 如剑叶增长突变体; 育性变异, 如雄性不育突变体, 其雌性可育, 但不产生花粉; 综合性状变优, 如华航一号及华航二号, 是从水稻空间诱变后代中选育出的具优良综合性状的新品种(品系)。其中华航一号产量高, 米质优, 抗性佳, 性状稳定, 已于 2001 年初通过广东省品种审定, 全面推广。华航二号的综合性状虽比华航一号还要好, 但仍未完全稳定, 正在继续选育。

由上可见, 空间飞行搭载水稻种子可导致后代产生范围广泛、多种多样的形态变异, 这与一些已有的研究结果相符合^[1,2,9]。为了进一步探讨这些形态变异的突变体与原种之间是否存在本质差别, 即在 DNA 分子水平上它们是否存在差异, 对表 1 中列出的数个突变体及两个优良品种(系), 以原种为对照分别进行了 RAPD 或 AFLP 分析, 以期了解这些形态变异类型的基因组的变异。

Table 1 Traits changed in rice mutants induced by space flight

Name	Mutation types	Changed traits
ST-1	dwarf	The plant height is 41.1% lower than that of the original variety, with curled and dark-green leaves
ST-2	larger spikelet	With larger spikelets and more grains in each spikelet. The average length of spikelet is 23.8% longer than that of the original variety. The average grain number in each spikelet is 56.4% higher than that of the original variety
ST-3	shorten grain	With widen and shorten grains. The ratio of average length to width of grain is 28.6% lower than that of the original variety
ST-4	purple grain	Color of grains changes from yellow to purple
ST-5	lengthened flag-leaf	With lengthened flag-leaves. The average length of flag-leaf is 30.4% longer than that of the original variety
ST-6	male sterility	Unable to produce pollens; but female fertility
ST-7	Huahang 1	With higher performance in yield and grain quality, when compared to Texianzhan 13, the original variety
ST-8	Huahang 2	Similar to Huahang 1 in performance, but not so stable as it

2.2 RAPD 分析结果

从 Operon 公司随机引物药盒 A、B、C、F、O、R、U、W、Y 中随机选取 130 个引物，以原种 DNA 为对照，对 ST-1、ST-2、ST-3、ST-4、ST-5、ST-6(见表 1)的 DNA 进行 RAPD 分析。除极少数引物外，都能得到扩增产物。与原种比较，不同突变体的 DNA 水平变异(多态性)主要表现为二种形式：一为扩增产物数的增加或者减少，如图 1 为三个随机引物对这 6 个突变体及原种 DNA 扩增的结果。扩增产物数的增减表现为电泳条带数目差异(引物结合位点改变所致)的多态性；二为扩增产物量的差异，表现为电泳带迁移率相同，但亮度却呈现增强或减弱的差异。由于后者受多种因素包括实验条件的影响，故只统计扩增产物增加或减少的多态性。本研究中获得的多态性产物的分子量约为 0.5–1.8 kb，扩增能够得到产物的引物多态性分析结果总结于表 2。在不同的突变株系中，可扩增出 5.8%–11.2%与原种不同的产物。如果以每一扩增片段代表基因组中的一个座位，则多态性座位率为 5.8%–11.2%，此数值从一定程度上反映了各突变体中遗传物质的变异频率。如其中 ST-6 雄性不育突变的变异率(11.2%)最高，从分子水平证明了此突变体中 DNA 发生了较大的变化。陈忠正等^[10]对该突变体进行了细胞学观察研究，发现该突变体的生殖发育发生了深刻的变化。当把 RAPD 引物数从 127 个扩大到 297 个时，对雄性不育突变体和原种的 DNA 进行分析，探测到的 1 416 个座位中

有多态性的片段(座位)则占 12.9%，与前述结果(11.2%)比较接近。

为证明上述从空间搭载水稻种子后代选出的各株系确为来自特粘占 13 的突变体，而非品种混杂，随机选用了 30 个随机引物，以来自特粘占 13 及其雄性不育突变体以及另一重要籼稻品种 IR36 的 DNA 为模板，进行了 RAPD 分析，对品种间多态率及原种与突变体之间的多态率作一比较。在特粘占 13 与其雄性不育突变体中总共扩增到 143 个片段(座位)，其中 12 个片段(座位)具有多态性，多态率为 8.4%；而在特粘占 13 与 IR36 两品种间扩增到 185 个片段(座位)，其中 99 个片段(座位)具有多态性，多态性率为 53.5%，在雄性不育突变体与

Table 2 DNA polymorphism of rice mutants with RAPD analysis

Name of mutation ¹⁾	No. of primers screened	Total loci detected	Polymorphic loci ²⁾	
			No.	(%)
ST-1	128	500	29	5.8
ST-2	129	519	52	10.0
ST-3	126	524	58	11.1
ST-4	128	521	49	9.4
ST-5	129	517	39	7.5
ST-6	127	534	60	11.2

¹⁾The names of mutation are the same as those shown in Table 1. ²⁾Compared with DNA from Texianzhan 13, the original variety

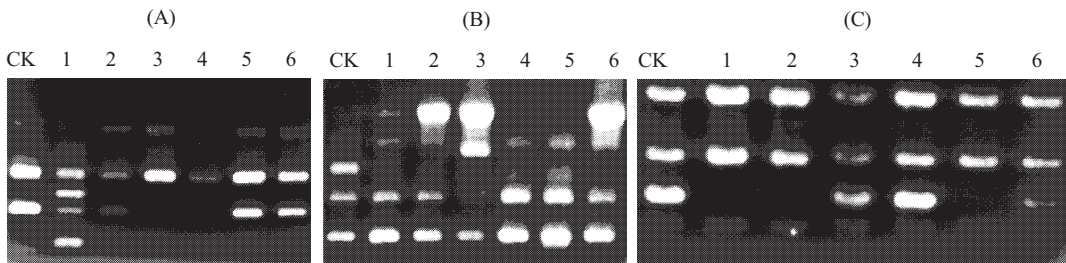


Fig.1 Electrophoresis of RAPD products of rice mutants. The random primers used: (A) OPR09; (B) OPU19; (C) OPF01. DNAs from: CK, *Texianzhan* 13; 1, ST-6; 2, ST-3; 3, ST-5; 4, ST-2; 5, ST-1; 6, ST-4 were used as templates. The names of mutation types are the same as those shown in Table 1

IR36中则扩增到 177 个片段(座位)，其中 100 个片段(座位)具有多态性，多态率也达 56.50%之多，可见品种间的 DNA 差异远高于原种与雄性不育突变体之间 DNA 的差异。

2.3 AFLP 分析结果

以 ST-1、ST-2、ST-4、ST-6、ST-7、ST-8 以

及原种的 DNA 为模板，选用 17 对 AFLP 选择性引物组合进行了 AFLP 分析，多态性结果列于表 3，部分扩增产物见图 2。与 RAPD 方法类似，AFLP 分析所发现的多态性，在基因组上也是随机的。从图中可观察到，不同的引物组合，均能检测到多态性，但检测到的多态性程度不一样，有的引

Table 3 DNA polymorphism of rice mutants with AFLP analysis

Name of mutation ¹⁾	No. of primer combinations	Total loci detected	Polymorphic loci ²⁾	
			No.	(%)
ST-1	17	415	25	6.02
ST-2	17	451	39	8.65
ST-4	17	441	42	9.52
ST-6	17	468	50	10.68
ST-7	17	451	30	6.65
ST-8	17	469	56	11.94

¹⁾The names of mutation are the same as those shown in Table 1. ²⁾Compared with DNA from Texianzhan 13, the original variety

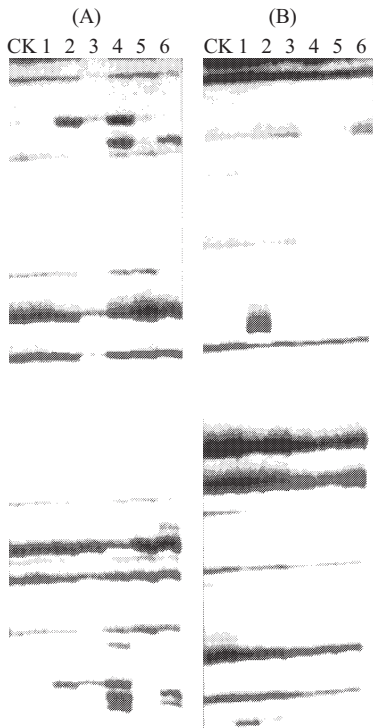


Fig.2 Autoradiography of AFLP analysis for rice mutants. Primer combination used: (A) EACC+MCAA; (B) EACT+MCAA. E: *EcoR* I, M: *Mse* I. DNAs from: CK, Texianzhan 13; 1, ST-7; 2, ST-8; 3, ST-6; 4, ST-2; 5, ST-1; 6, ST-4 were used as templates. The names of mutation types are the same as those shown in Table 1

随机的。

比较表 2 和表 3, 用 AFLP 与 RAPD 两法可发现对不同突变体多态性分析有相似的结果, 如对雄性不育突变体的 AFLP 法与 RAPD 法分析所得的多态率分别为 10.68%和 11.2%, 而矮生突变体在两种分析方法中的多态性座位率都较低(5.8%和 6.02%)。这些结果证明: 各种突变体与原种比较确实存在 DNA 水平上的变异, 且不同的表型变异, 其基因组 DNA 的变异区段、程度是不同的。这种表型变异与基因组突变之间是否存在某种规律尚有待进一步研究。AFLP 还分析了从突变后代中选育出的两个高产优质新品种(系)华航一号(ST-7)和华航二号(ST-8), 其中 ST-7 性状较早达到稳定, 其多态性座位率也较低, 为 6.65%, ST-8 变异较难稳定, 但其综合性状比 ST-7 更优良, 其多态性座位率(11.94%)比 ST-7 高, 说明二者在 DNA 水平上还是有较大差异的。

3 讨 论

作为我国空间生命科学研究的一部分, 空间诱变育种已取得一定的成果, 特别是浙江、江西、广东等省均已从空间搭载返地水稻种子中选育出优良品系, 经省级品种审定部门审定, 已成为有数十万亩以上推广面积、在农业生产中发挥作用的品种^[2]。为了解空间环境条件对搭载种子的诱变作用, 本研究用可对全基因组作随机分析的两类 DNA 分子标记, 对水稻种子经卫星搭载返地后选出的突变体与原种作了对照分析。在总共探测的近千个位点中, 多态性位点所占比例约为 6%–12%, 可见空间环境可导致基因组中相当部分序列的改变。分析结果还表明用 RAPD 探测出突变体与原种间的多态率仅为原种与其它品种之间的多态率的 10%–25%(如原种与 IR36 之间的多态性达 53.5%, 见 2.2), 可从一个方面证实本研究所分析的材料确为出自原种特籼占 13 的突变体, 而非一般的品种混杂。

本研究组周峰等^[5]对同样几个突变体以 SSR 法分析获得的多态性则远远低于本文的结果, 而本文 RAPD 与 AFLP 分析的结果比较接近(表 4), 以 ST-6(雄性不育突变体)为例, RAPD 与 AFLP 分析结果分别为 11.2%、10.68%, 而 SSR 仅为 0.35%。依据 RAPD^[7]和 AFLP^[8]分析的原理, 这两种方法都是检测整个基因组内的随机座位, SSR 方法^[11]则仅

物组合(如图 2B)扩增的多态性带数量少, 这 7 个样品间只有 1–2 条多态性带, 而有的引物组合(如图 2A)则每个突变体与原种间均有多态性位点, 这说明 DNA 水平的变异在整个基因组是不均一的、

检测基因组内的简单重复序列, 而雄性不育等重要性状可能由基因组内编码区所控制, 发生在基因组内重复序列稀少的编码区座位的变异就难以被 SSR 方法探测到, 似可从一个角度解释在这些突变体中重复序列变异率较低的现象。对一些突变体突变基因的克隆、测序将有助于了解这类突变的分子本质。本研究组对本文中的 ST-6 的基因定位与克隆研究正在进行中, 其结果将为解决空间诱变的分子机理这一难题提供新思路。

Table 4 Comparison of the results of analyses with RAPD, AFLP and SSR

Name of mutation ¹⁾	Polymorphic loci(%)		
	RAPD	AFLP	SSR ²⁾
ST-1	5.8	6.02	0.71
ST-2	10.0	8.65	2.12
ST-4	9.4	9.52	1.41
ST-6	11.2	10.68	0.35

¹⁾The names of mutation are the same as those shown in Table 1. ²⁾Data from reference [5]

空间环境的多种因素, 如电离辐射、微重力、高真空、振动等均可对置于空间飞行器中的生物系统产生影响, 而空间特有的高能、高原子序数的重离子辐射一直被认为是空间致突作用的主要因素^[9]。重离子辐射致突作用的有效性已为众多研究结果所证实, 如庄楚雄等^[12]利用 RFLP 分析方法检验了高能重离子(氙离子)辐射引致水稻基因组突变, 证明主要是由于 DNA 片段缺失而非点突变, 并分析了基因组内座位的变异率, 达 5.15%~6.39%。Zhu 等^[13]以 LET 为 150 keV/ μm 的 α 粒子辐照处理人-仓鼠杂交 A_L 细胞, 以多重 PCR 检测 S1⁻ 突变体的缺失, 发现大片段缺失比例与 LET 及剂量相关。Hei 等^[14]更进一步把微束 α 源的单粒子用于同一试验系统, 证明了单一 α 粒子打击细胞核即可引致突变率的成倍增高。据此可推测: 在十多天的空间飞行中, 种子所接受的空间电离辐射的总剂量(仅 mGy 水平)虽远低于地面传统的电离辐射(如 X 射线、 γ 射线)育种所用剂量(达数百 Gy), 但由于空间电离辐射所具的高电离能力、高穿透力的特点, 少量粒子作用于种子胚就可能引致后代出现明显表型变异。进一步探测空间搭载中轰击种子的粒子^[2], 及其对相应种子后代突变体作选择和分子生物学分析的研究正在进行, 其结果将有

助于了解空间辐射的诱变作用。

参考文献:

- [1] 蒋兴村. 863-2 空间诱变育种进展及前景[J]. 空间科学学报, 1996,16(增刊):77-82.
- [2] 梅曼彤. 空间辐射环境对生物系统的效应[A]. 见: 姜景山. 空间科学与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 551-565.
- [3] 王斌, 李金国, 邱芳, 等. 绿豆空间诱变育种及其分子生物学分析[J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊):121-124.
- [4] Mei M, Qiu Y, Sun Y, et al. Morphological and molecular changes of maize plants after seeds been flown on recoverable satellite[J]. *Adv Space Res*, 1998,22:1691-1697.
- [5] 周峰, 易继财, 张群宇, 等. 水稻空间诱变后代的微卫星多态性分析[J]. 华南农业大学学报, 2001,22:55-57.
- [6] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980,8: 4321-4325.
- [7] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990,18:6531-6535.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acid Res*, 1995,23: 4407-4414.
- [9] 梅曼彤. 空间诱变研究的进展[J]. 空间科学学报, 1996,16(增刊):148-152.
- [10] 陈忠正, 刘向东, 陈志强, 等. 水稻空间诱变雄性不育新种质的细胞学研究[J]. 中国水稻科学,2002,16:199-205.
- [11] Panaud O, Chen X, McCouch SR. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Mol Gen Genet*, 1996,252:597-607.
- [12] 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, 1997,11:74-78.
- [13] Zhu LX, Charles A, Waldren DV, et al. Cellular and molecular analysis of mutagenesis induced by charged particles of defined linear energy transfer [J]. *Radiation Research*, 1996, 145:251-259.
- [14] Hei TK, Wu LJ, Liu SX, et al. Mutagenic effects of a single and an exact number of α particles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997,94:3765-3770.

DNA POLYMORPHIC ANALYSIS OF RICE MUTATION INDUCED BY SPACE FLIGHT WITH MOLECULAR MARKERS

YI Ji-cai¹, ZHUANG Chu-xiong¹, YAO Juan¹, WANG Hui², CHEN Zhi-qiang², MEI Man-tong¹

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Dry seeds of Texianzhan 13, an *indica* rice variety, had been on board the Chinese satellite at an orbit of 178–320 km for 15 days. Mutations in morphological characters on plants developed from the recovered seeds, as well as their selected progenies, were investigated. Several types of stable mutants in morphological and fertility characters, such as male sterility, dwarf, shorten grain, larger spikelet etc. were obtained after selected and then inbred for 4 generations. For exploring the genetic basis of mutation induced by space flight, RAPD and AFLP, two kinds of molecular marker analysis were conducted to find the differences in genomes among 8 stable mutation lines, including two high-performing lines used in rice production in Guangdong Province, and the original variety. 130 random primers and 17 primer combinations were screened in RAPD and AFLP analysis respectively, and around 1 000 loci were totally investigated. The results indicated that the variation rates of genomic DNA between each mutant and Texianzhan 13 could reach the level as high as 6%–12%, which is only equal to 10%–25% of the polymorphism between two *indica* rice varieties in general. The various polymorphic rates were observed in different mutants. The results from this study demonstrated that space flight could induce mutation on rice seeds and the changes of genetic material in mutants were verified. The importance of space radiation, especially high LET particles in mutation induction is discussed. Further study in the detection of space particles hitting seeds, as well as the analysis of the mutagenic effects is being performed to understand the mechanism of space induced mutation.

Key Words: Space flight; Rice mutants; Molecular marker analysis