文章编号：1000-5773(2004)04-0289-06

高静水压处理水稻诱导稳定遗传变异系的 DNA 分析*

申斯乐[1,4]，徐世平[2]，翁克难[2]，谭 梅[3]，张剑锋[4]
龙国徽[4]，贾晓鹏[1]，池元斌[1]，刘 宝[3]，邹广田[1]

(1. 吉林大学超硬材料国家重点实验室，吉林长春 130021；
2. 中国科学院广东地球化学研究所，广东广州 510640；
3. 东北师范大学生命科学学院，吉林长春 130024；
4. 吉林大学生命科学学院，吉林长春 130021)

摘要：用高压手段诱变水稻品种“毕粳 38”，产生了两个稳定的可遗传的变异：变异 1，植株分蘖减少，成熟期较原种提早 20 d；变异 2，植株变高，分蘖增加，籽粒变长，类似于籼稻。对原种及两个变异进行了 ISSR 及 RAPD 分析，结果显示原种及两个变异在 ISSR 和 RAPD 的检测中多态性明显，分别为 28.57%和 45.98%。变异 2 的变异大于变异 1；ISSR 检测中原种与变异 1 的平均绝对距离系数为 0.030 3，与变异 2 的平均绝对距离系数为 0.261 3。RAPD 检测中原种与变异 1 的平均绝对距离系数 0.084 5，与变异 2 的平均绝对距离系数为 0.416 7。研究结果表明：高静水压可以对高等植物的种子进行诱变，产生在表型上及 DNA 分子水平上均可稳定遗传的变异。研究结果首次从 DNA 分子水平上证明高静水压处理可以产生变异。继各种化学制剂、各种射线诱变等方法之后，高压不失为一种行之有效的新诱变方法。

关键词：高静水压；水稻；变异；ISSR；RAPD
中图分类号：O521 **文献标识码**：A

1 引 言

自从 19 世纪末人们发现了深海生物起，就开始注意到高静水压对生物体的影响，但直到近 20 年这一领域才引起了物理学及生物学界的广泛关注。随着高压理论和技术的发展，高压生物学的研究已经深入到生物学的多个领域[1]，如高压对核酸、蛋白等多种生物大分子结构的影响，高压对微生物代谢的影响，高压对细胞凋亡的影响，高压技术在食品工业的应用以及深海生物对高压的适应等[2~7]。最早用高压处理植物种子可追溯到 20 世纪 20 年代[8]，但当时只是注意到高压对种子发芽的影响。至今为止，通过高压诱变种子植物的种子并产生可遗传的变异却未见国外报道。

1999 年、2001 年，徐世平等[9,10]首次连续报道了通过高压对水稻品种粤香占进行诱变，在形态上产生了明显的可遗传的稳定变异。此外，实验还对水稻的其它品种(如毕粳 38)及其它作物(如小麦、大麦等)的种子进行诱变，都出现了形态上可遗传的稳定变异，但这些变异均缺少分子水平上的证据。为进一步从 DNA 分子水平揭示这种变异的存在，首次同时以 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 和 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)两种手段对毕粳 38 的两个变异进行了 DNA 水平变异的鉴别，发现 RAPD 和 ISSR 的多态性是十分明显的。

* **收稿日期**：2004-03-01；**修回日期**：2004-09-12
基金项目：国家重点基础研究项目(001CB711201)；国家自然科学基金(30070426)；吉林大学创新基金
作者简介：申斯乐(1963—)，女，副教授. E-mail：sileshen@sina.com

自从1990年Williams建立RAPD及1994年Zietkiewicz建立ISSR方法以来，以RAPD和ISSR的多态性鉴别种子植物的种及变种就被广泛应用，成为两种最为简便易行、结果可信的常规方法[11]。同样，在水稻中应用ISSR、RAPD对各地区的野生及栽培品种进行鉴别也是行之有效的[12~14]。

2 材料与方法

2.1 原种

原种采用毕粳38，贵州省毕节地区农业科学研究所育成并提供，优质杂交粳稻，株高85 cm左右，株型直立，叶色深绿，分蘖较差，平均穗长17 cm左右，谷粒饱满，近椭球形，千粒重28.0 g，具芒。

变异1：由原种种子约600粒经100 MPa压力(保压24 h)处理，获30株，1株变异。变异性状：分蘖减少，熟期提前20 d左右。

变异2：由原种种子约600粒经300 MPa高压(保压20 min)处理，成活16株，1株变异。变异性状：直立，株高105 cm，叶宽、色浓绿，分蘖较多，平均穗长23 cm，最长达30 cm，粒型类似与籼稻，籽粒无芒。

2.2 高压设备及条件

高压设备及条件见文献[9,10]。

2.3 栽培及田间管理

高压处理后的水稻种子用常规方法催芽、育秧，当秧苗长至4～5叶时插秧。在整个生长期详细跟踪并记录生长过程中水稻生理和性状变化，主要统计株高、分蘖数、成穗数、穗长、千粒重和产量。对于变异单株，主要调查变异频率、株型、株高、分蘖数、成穗数、穗长、千粒重和产量，并将种子连续多代种植，考察变异的遗传性和稳定性。种植过程中适时按常规施用复合化肥与农药。在秧苗初期特别注意剔除杂苗，收获时单株收割。

2.4 DNA提取

约20 cm苗单株剪取，毕粳38、变异1、变异2各三株，采用上海生工生物工程技术服务有限公司的SK1252基因组DNA抽提试剂盒单株提取DNA。

2.5 ISSR引物及扩增

引物的筛选参考文献[12～14]，最终选取16个，见表1。ISSR引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。PCR扩增体系及条件参考文献[12,13]的方法 。PCR扩增体系：每20 μL反应体系中含10×buffer 2 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL，ISSR primer 20 μM，1U Tag，template DNA 20 ng，甲酰胺0.2 μL。PCR扩增条件：94 ℃ 5 min，94 ℃ 45 s，55 ℃ 45 s，72 ℃ 1.5 min，从第二步循环45次，72 ℃ 7 min，4 ℃结束。2%的琼脂糖，TAE缓冲液中电泳。

2.6 RAPD引物及扩增

引物的筛选参考文献[14]，最终选取16个，见表1。RAPD引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。PCR扩增体系及条件参考文献[12,14]的方法 。PCR扩增体系：每25 μL反应体系中含10×buffer 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTP 2.5 μL，RAPD primer 20 μM，1U Tag，template DNA 20 ng。94 ℃ 5 min，94 ℃ 1 min，36 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，从第二步循环44次，72 ℃ 7 min，4 ℃结束。1.5%的琼脂糖，TAE缓冲液中电泳。

3 结果与分析

(1) 毕粳38经高压产生了两个明显的形态变异(见表2)：变异1，见图1(a)，与原种同盆栽种的变异1已抽穗；及变异2，见图1(b)。

在形态上，变异1最明显的变异是分蘖减少，熟期提早20 d以上，变异2最明显的变异是植株变高，分蘖增加，籽粒变长(见图2)，类似于籼稻。

(2) ISSR的16个引物中有12个出现了变异的特征带(见图3中3个ISSR的引物)，共扩增出112条带，共有带为80条，以此计算出多态性为(112－80)/112＝28.57%。原种与变异1的平均绝对距离系数(Mean absolute distance coefficient)为0.0303。原种与变异2的平均绝对距离系数为0.2613。

表 1　ISSR、RAPD 引物

Table 1　Primer ISSR, RAPD

ISSR	Sequence	RAPD	Sequence
ISSR-4	BDB$(CA)_6$	A05	5'- - -AGGGGTCTTG- - -3'
ISSR-5	HVH$(GT)_7$	A09	5'- - -GGGTAACGCC- - -3'
ISSR-6	DBD$(GA)_7$	A11	5'- - -CAATCGCCGT- - -3'
ISSR-7	$(CT)_8$RG	A15	5'- - -TTCCGAACCC- - -3'
ISSR-9	$(CT)_8$RC	A17	5'- - -GACCGCTTGT- - -3'
ISSR-15	CCC$(GT)_6$	RA62	5'- - -GAAGGCCGTG- - -3'
ISSR-16	GSG$(GT)_6$	RA63	5'- - -GGGGTACCGT- - -3'
ISSR-17	CSC$(GA)_6$	RA68	5'- - -CACCTTCGTT- - -3'
ISSR-18	GCW$(GA)_6$G	RA69	5'- - -GTCAGGGGAC- - -3'
ISSR-20	CCAG$(TGG)_3$TG	RA70	5'- - -GGCGCGACTT- - -3'
ISSR-21	GCGA$(CA)_6$	RA71	5'- - -GAACCACCCC- - -3'
ISSR-22	SSWN$(GACA)_3$	D4	5'- - -CGTTGGCCCG- - -3'
ISSR-31	$(AG)_8$T	D5	5'- - -CCAAGGGGGC- - -3'
ISSR-32	$(AG)_8$C	D6	5'- - -TAGGGGCCCC- - -3'
ISSR-33	$(GA)_8$T	D9	5'- - -TGGCCCCGGT- - -3'
ISSR-34	$(GA)_8$C	D10	5'- - -AGCCGGCCTT- - -3'

Notes:B=C/G/T,D=A/G/T,H=A/C/T,V=A/C/G,R=A/G,S=G/C,W=A/T,N=A/T/G/C

表 2　毕粳 38、变异 1、变异 2 性状比较

Table 2　Morphological traits of Bijing 38 and Mutants 1, Mutants 2

Rice	Plant height /(cm)	Number of tillers	Length of panicles /(cm)	Growth period /(d)	Weight/ (1 000 kernels)	Seed morphology		
						Length /(cm)	Width /(cm)	Length/ Width
Bijing 38	85	12	17.0	130	28.0	0.70	0.41	1.71
Mutants 1	76	10	20.5	110	25.0	0.72	0.42	1.71
Mutants 2	105	17	23.0	130	19.9	0.85	0.28	3.04

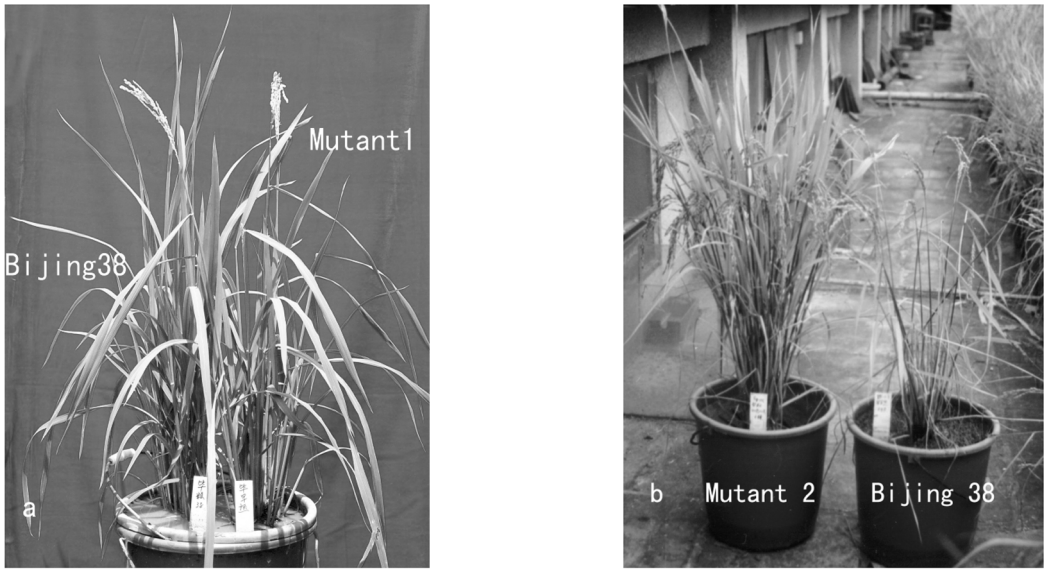


图 1　亲本与两个稳定变异的植株(a:变异 1;b:变异 2)

Fig. 1　Plant morphology of rice cultivar Bijing38 and the two stable mutants obtained(a:Mutant 1;b:Mutant 2)

(3) RAPD 的 16 个引物中有 13 个出现了变异的特征带(见图 3 中 3 个 RAPD 的引物),共扩增出 87 条带,共有带为 47 条,以此计算出多态性为(87－47)/87＝45.98%。原种与变异 1 的平均绝对距离系数为 0.0845。原种与变异 2 的平均绝对距离系数为 0.4167。同时,还发现变异 1 的三棵植株中有一棵 4 次出现个体特异带,变异 2 的三棵植株中有一棵 12 次出现个体特异带。

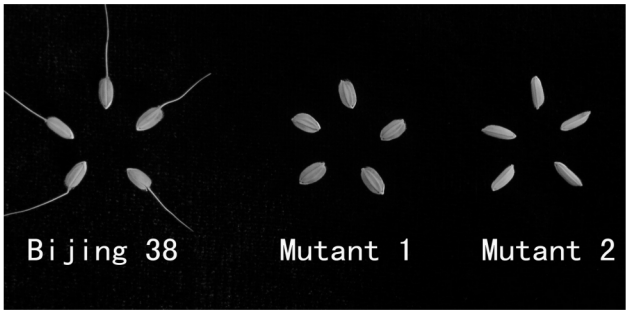


图 2 亲本与两个稳定变异系的种子

Fig. 2 Kernel morphology of Bijing 38 and the two stable mutants

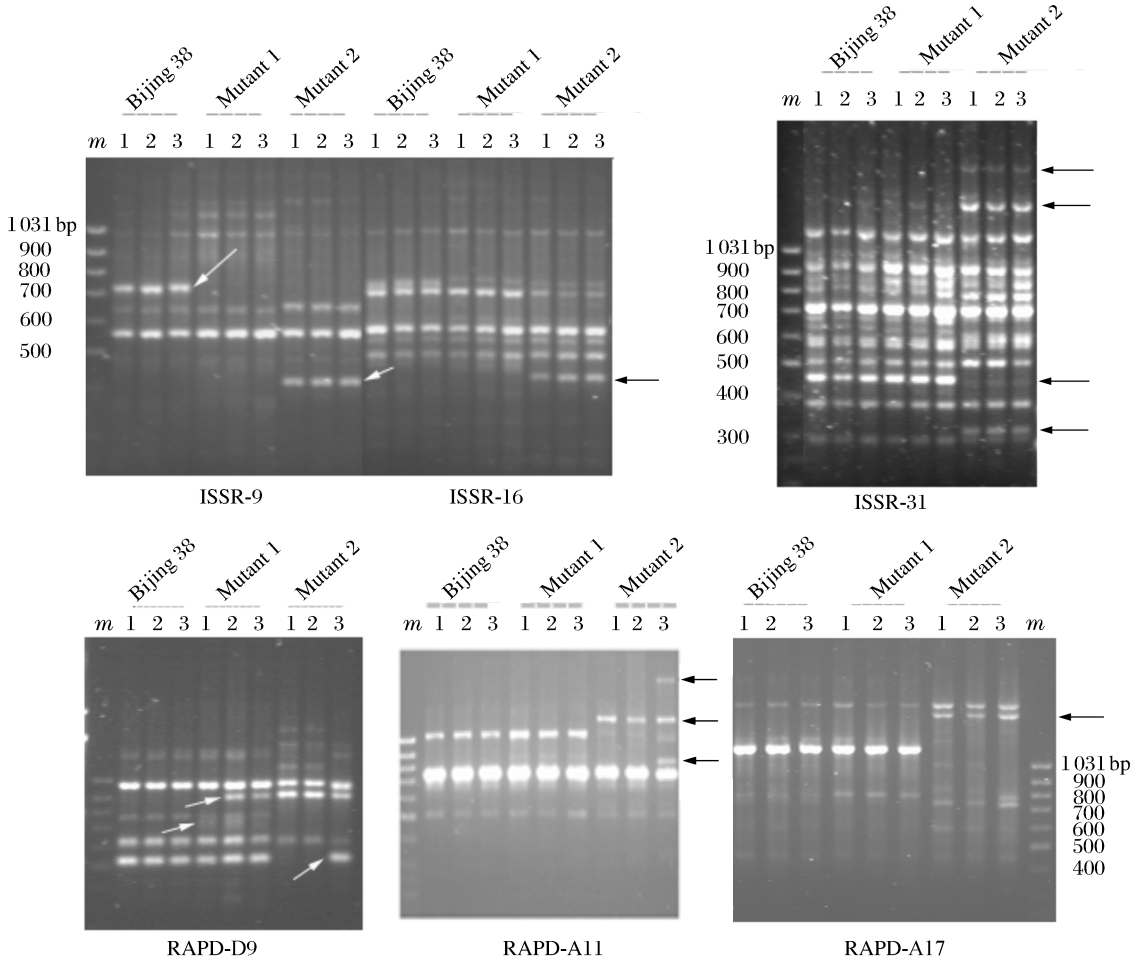


图 3 高压诱导的两个稳定变异系的 ISSR 和 RAPD 的分析

(泳道 1、2、3 分别为从亲本和 2 个变异系随机选取的 3 个单株;

ISSR 和 RAPD 引物在胶的底部标出;

m 为 100 bp DNA 分子量标记(MBI Fermentas))

Fig. 3 ISSR and RAPD molecular analysis of the two genetically stable rice lines

(Lane 1,2 and 3 are respectively Bijing38, Mutant 1 and Mutant 2;

The primers used are specified on the bottom of the gel;

m is the 100 bp DNA size marker (MBI Fermentas)

4 讨　论

一般而言,生物表型发生可遗传的变异可能是 DNA 分子序列改变引起的,也可能是由于基因组的表观遗传修饰,如染色体改构和 DNA 甲基化等所引起的[15]。同样,DNA 分子序列的改变,也未必都在生物表型上引起变异,如发生在非转录序列,内含子序列及不引起氨基酸顺序改变的序列。

本实验结果无论从形态上还是从 DNA 分子水平上看,都确切地证明高压可以引起种子植物的可遗传变异,且这种变异是多元的。因为我们既发现了多种表型上的变异,并证明了这些表型上的变异同时发生在 DNA 分子序列上,又发现了表型上同样变异的植株中 DNA 分子间在 ISSR、RAPD 的检测上的不同。

高压诱变微生物已见报道[3],但未见有关变异机理的详尽阐述。目前认为 DNA 分子的双螺旋结构在高压下比蛋白质分子更具有稳定性,共价键在 1 200 MPa 压力以下也是稳定的[5],因此,我们认为在本实验采用的压力下,DNA 分子因压力断裂而重排的可能性不大。但吸涨萌动的种子,胚芽细胞处于分裂前的准备时期,细胞处在 DNA 复制及 RNA 转录的状态下,此时压力的增加改变 DNA 分子复制的正常环境,很可能导致碱基配对发生错误或在该条件下,修复酶系统的精确性受到影响而引起 DNA 分子序列改变;同时 DNA 分子的空间结构可能在压力的作用下发生改变,导致不同的 RNA 转录变化,种子受压后产生一些滞后的生理生化改变,这些都是能够引起 DNA 分子发生序列变异的因素。有关变异序列的测序及进一步对变异机理的研究工作正在进行中。

References:

[1] Claude B, Ruan K C. An Emerging Field in Bioscience: High Hydrostatic Pressure Study [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1999, 31(6): 619－624.

[2] Takano K J, Takano T, Yamanouchi Y, et al. Pressure-Induced Apoptosis in Human Lymphoblasts [J]. Expriment Cell Research, 1997, 235: 155－160.

[3] Gao X, Li J, Ruan K C. Barotolerant *E coli* Induced by High Hydrostatic Pressure [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2001, 33(1): 77－81. (in Chinese)
高　翔,李　炯,阮康成. 高压力诱变的耐压大肠杆菌 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(1): 77－81.

[4] Macgregor R B Jr. The Interactions of Nucleic Acids at Elevated Hydrostatic Pressure [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 226－276.

[5] Sharma A, Scott J H, Cody G D, et al. Microbial Activity at Gigapascal Pressures [J]. Science, 2002, 295: 1514－1516.

[6] Kornblatt J A, Kornblatt M J. The Effects of Osmotic and Hydrostatic Pressures on Macromolecular Systems [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 30－47.

[7] Ludwig H. Cell Biology and High Pressure: Applications and Risks [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1595: 390－391.

[8] Rivera R, Popp H W, Dow R B. The Effect of High Hydrostatic Pressure upon Seed Germination [J]. American Journal of Botany, 1937, 24: 508－513.

[9] Xu S P, Liao Y P, Xiao W S, et al. Effects of High Pressure on the Growth and Development of Rice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 1999, 13(Suppl): 58－62. (in Chinese)
徐世平,廖耀平,肖万生,等. 高压对水稻生长发育的影响 [J]. 高压物理学报, 1999, 13(增刊): 58－62.

[10] Xu S P, Liao Y P, Weng K N, et al. Pressure Induced Rice Mutation and Effects of High Hydrostatic Pressure on the Growth and Development of Rice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2001, 15(4): 241－248. (in Chinese)
徐世平,廖耀平,翁克难,等. 水稻压致变异和高压对水稻生长发育的影响 [J]. 高压物理学报, 2001, 12: 241－248.

[11] Zou Y P, Ge S, Wang X D. Molecular Marker of Systematic and Evolutionary Botany [M]. Beijing: Science Press, 2001. 30－47; 68－103. (in Chinese)

邹喻苹,葛 颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京:科学出版社,2001. 30－47;68－103.

[12] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic Variation within and among Populations of a Wild Rice *Oryza Granulate* from China Detected by RAPD and ISSR Markers [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 440－449.

[13] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship as Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism in the Genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1311－1320.

[14] Labra M, Savini C, Bracale M, et al. Genomic Changes in Transgenic Rice (*Oryza sativa* L) Plants Produced by Infecting Calli with *Agrobacterium Tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 325－330.

[15] Liu B, Wendel J F. Epigenetic Phenomena and the Evolution of Plant Allopolyploids [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29: 365－379.

Molecular Analysis of Stable Mutagenesis Rice Cultivar Induced by High Hydrostatic Pressure

SHEN Si-Le[1,4], XU Shi-Ping[2], WENG Ke-Nan[2], TAN Mei[3], ZHANG Jian-Feng[4], LONG Guo-Hui[4], JIA Xiao-Peng[1], CHI Yuan-Bin[1], LIU Bao[3], ZOU Guang-Tian[1]

(1. *National Laboratory of Superhard Materials, Jilin University, Changchun* 130021, *China*;
2. *Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou* 510640, *China*;
3. *College of Life Science, Northeast Normal University, Changchun* 130024, *China*;
4. *College of Life Science, Jilin University, Changchun* 130021, *China*)

Abstract: By using high hydrostatic pressure treatment, two genetically stable rice lines were obtained from the japonica rice cultivar Bijing 38. Mutant 1 is characterized by its lower segregation frequency and 20 d less of maturation period than the original cultivar. Mutant 2 is characterized by its significantly increased height, increased tillering efficiency and elongated kernels which is similar to what has been seen for indica rice. ISSR and RAPD analyses of these two mutants and the original cultivar revealed that there exists significant genetic variation between the two mutants and the original cultivar, each with 28.57% and 45.98% polymorphic bands respectively. The genetic diversity in Mutant 2 is significantly higher than in Mutant 1. ISSR analysis indicated that the mean absolute distance coefficient between the original cultivar and the Mutant 1 is 0.0303, while that between the original cultivar and the Mutant 2 is 0.2613. RAPD analysis demonstrated that the mean absolute distance coefficient between the original cultivar and the Mutant 1 is 0.0845, while that between the original cultivar and the Mutant 2 is 0.4167. These studies have provided strong evidence that high hydrostatic pressure could induce mutagenesis during seed germination and the phenotypes, and genetic traits can be stably passed on to the progeny. This is the first time we have shown at molecular level that treatment by high hydrostatic pressure can induce genetically stable mutations in higher plants. In addition to a variety of chemical and X-ray mutagenic methods, high hydrostatic pressure might as well be proven as another efficient method for mutagenesis.

Key words: high hydrostatic pressure; mutation; rice; ISSR; RAPD