文章编号：1000-5773(2005)04-0305-07

水稻高压诱变与突变体的 ISSR 分析*

徐世平[1]，郭丽秀[2]，翁克难[1]，段 俊[2]，律广才[1]

(1. 中国科学院广州地球化学研究所，广东广州 510640；
2. 中国科学院华南植物园，广东广州 510650)

摘要：以两个水稻(*Oryza sativa* L.)品种粤香占和毕粳 38 号为材料，通过高压处理，获得了 5 个当代突变体和 4 个后代分离出的突变体。ISSR 分析表明高压可以诱导水稻产生变异，这种变异是由于遗传物质(DNA)的改变所引起的。由高压诱变产生的水稻突变体不仅在当代出现，而且具有很高的遗传稳定性，突变体与原种的遗传差异越大，其稳定性越高。

关键词：高压；水稻；变异；ISSR 分析
中图分类号：O521.21 **文献标识码**：A

1 引 言

自 2001 年我们首次报道通过高压处理诱导水稻(*Oryza sativa* L.)产生变异以来[1]，国内有关生物高压诱变研究的报道不断增多，研究对象包括病毒[2]、细菌[3]、小麦[4]以及水稻[5~7]等，研究发现，高压不仅可以影响生物的生长发育，同时也可以诱导生物发生可以稳定遗传的变异。但是，这些变异的出现是因为在高压作用下，生物遗传物质发生了变化，导致突变体产生？还是高压诱导了某些基因的表达，使其性状出现变化？甚至有可能在群体中已经存在耐压个体，高压处理可以认为只是一种筛选作用？目前，高压诱变研究首先要回答的问题是，变异的产生是否由于遗传物质的变化所引起的。

自 1999 年发现压变植株以来[1]，我们一直采用多代连续自交纯化后的水稻种子为实验材料，进行静水高压处理并种植。水稻种子的高度均一性和实验结果的高度重复性说明，压力筛选的可能性可以排除。高翔等[3]也使用单一克隆培养得到的大肠杆菌进行试验，推测压力处理引起的细菌耐压性变化可能是发生在基因水平，最终得到的耐压菌是一种突变菌株。

要证实变异的产生是由于遗传物质的变化所引起，除了对突变体进行传统遗传学研究之外，分子生物学研究则是更为快速、有效的方法。

在分子生物学研究手段中，简单重复序列区间扩增多态性(Inter Simple Sequence Repeat，ISSR)分析具有技术操作简单，反应系统稳定、成本低、快速、灵敏的特点。只需要微量的 DNA 模板就可进行分析[8]。在不能大规模进行 DNA 直接测序的情况下，ISSR 分析可以为研究者快速、高效地提供基因组位点的多态性资料。自 1994 年 Zietkiewicz 建立 ISSR 方法[9]以来，已成功应用于居群生物学研究，品种鉴定，物种的分类系统学比较等方面，并作为构建遗传图谱的工具。在水稻中应用 ISSR 对各地区的野生及栽培品种进行鉴别也是很有效的[10]。

2 材料与方法

2.1 材料

实验所用两个水稻品种均为常规稻，即粤香占和毕粳 38 号。其中粤香占由广东省农业科学院水稻

* **收稿日期**：2004-10-15；**修回日期**：2004-12-07
基金项目：中国科学院农业办公室应用与发展重点项目；农作物高压诱变与水稻新品种选育(KY95-J-324)；国家自然科学基金(30471002)
作者简介：徐世平(1957—)，男，高级工程师，主要研究方向为有机地球化学和高压生物学. E-mail：shiping@gig.ac.cn

研究所提供,毕粳38号由贵州省毕节地区农业科学研究所提供。原始种的基本特征如下:

粤香占,籼稻品种,平均株高95 cm,株型直立,叶色深绿,分蘖力强,穗长19.5 cm,谷粒细长,千粒重18.3 g,无芒。

毕粳38,粳稻品种,平均株高85.5 cm,株型直立,叶色深绿,分蘖较差,平均穗长17 cm,谷粒饱满,近椭球形,千粒重28.0 g,部分籽粒具芒。

2.2 高压处理方法

(1) 高压处理装置:由高压容器(容积为800 mL)、手动压力泵、循环水加热系统和温度、压力测量控制系统组成。

(2) 加压处理方法:将稻种粤香占和毕粳38号在室温下浸种4 h,然后以75～300 MPa的静水压力在高压容器中处理,保持压力4～8 h后卸压。

2.3 种植与田间管理

2.3.1 种植与田间管理

高压处理后的稻种用常规方法催芽育秧,秧苗叶片达到4～5片时移入大田栽培,各种材料单季种植数量在100～1000株不等,种植过程中按常规施用复合化肥、农药与中耕。于生长期内记录各种性状变化,主要调查变异单株的变异频率、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,考察变异的遗传和稳定性。在秧苗初期特别注意剔除杂苗,收获时单株收割。对照也在相同条件下种植。

2.3.2 种质纯化

对照种和突变体继代种植,在抽穗、扬花时均采用套袋处理,严格自交。对照种粤香占和毕粳38号已经过10代提纯。突变体粤变长亦经过8代纯化。不同世代的种子均在6 ℃下冷藏保存。

2.4 简单重复序列区间扩增多态性(ISSR)分析

2.4.1 DNA制备

取水稻种子发芽后的幼苗叶片约3 g,采用CATB法(详见Doyle等[11])提取样品的总DNA,经紫外分光光度法测定纯度和浓度后用于ISSR-PCR扩增。

2.4.2 PCR反应与电泳

PCR反应在PTC-200(MJ Research)PCR仪上进行。反应体系共20 μL:其中10×buffer 2 μL,100 mmol/L的dNTP0.3 μL,10 μmol/L的引物0.3 μL,甲酰氨0.4 μL,1.5单位Taq酶,25 mM的MgCl 1.9 μL,约20 ng DNA,加双蒸水至20 μL。

ISSR-PCR反应程序:95 ℃预变性5 min,然后在如下条件35个循环:94 ℃ 45 s,50～53 ℃退火40 s,72 ℃延伸70 s;最后在72 ℃ 7 min延伸。反应产物在4 ℃下保存。Taq聚合酶为Promega公司产品。

PCR扩增产物在2.0%的琼脂糖凝胶上电泳分离。凝胶浸入含1×TAE电泳缓冲液(Tris-乙酸-EDTA,pH 8.0)的电泳槽(电泳仪为北京六一仪器厂生产,DYY2Ⅲ33A型)中,并以北京天为时代科技有限公司100 bp DNA ladder (100～1500 bp)为分子标记,琼脂糖凝胶上所加电压不超过5 V/cm。当溴酚蓝指示剂距离前沿约2～3 cm时,停止电泳。溴化乙锭(EB)染色显带。DNA片断使用紫外投射仪-计算机凝胶成像系统(Lab Works Soft Version 3.0;UVP,Upland,CA 91786,USA)观察、记录。

3 结 果

3.1 水稻压致变异

经高压处理后,从2种原始材料共获得9个突变体,它们的株型、株高、分蘖能力、颜色、粒型、千粒重、熟期、米质、育性和抗性等性状一个或几个同时发生了变化。这些突变体没有在对照组中出现过。从粤香占(YXZ)处理当代获得了3种当代突变体——粤变长(YBC)、巨无霸(JWB)和粤不育以及4种后代分离的突变体——矮不育、巨矮化(JAH)、巨变长(JBC)和巨不育,其各种性状变化见文献[1];从

毕粳 38(BJ38)号获得两种当代突变体——毕早熟(BZS)和粳变籼(JBX)。表 1 列出了这些突变体的出现时间和次数,图 1 表示各种突变体与原始种之间的相互关系。

表 1　各种压致突变体的来源、出现次数与稳定性

Table 1　Origin, times of emerge and stability of pressure induced rice mutants

Mutant	Origin	Treatment	Emerge time*	Stability (Generations)
BZS	BJ38	78 MPa/4 h	1999E	11
JBX	BJ38	300 MPa/2 h	1999E,2004E	11
YBC	YXZ	78 MPa/8 h	1999E,2000E,2001E,2003E,2004E	10
JWB	YXZ	78 MPa/8 h	1999L,2000L	10
YBY	YXZ	78 MPa/4 h	1999E,2000E	Sterile
ABY	YBC	Differentiation	1999L	Sterile
JBC	JWB	Differentiation	2000E	9
JAH	JWB	Differentiation	2000E	9
JBY	JWB	Differentiation	2000E	Sterile

Note: Number stands for year, E stands for early crop and L for late crop.

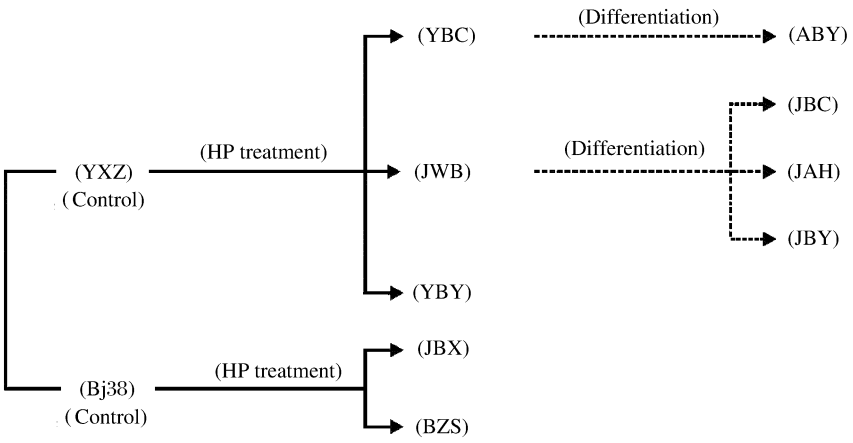


图 1　各种变异材料的来源

Fig. 1　Origin of the mutants

粤香占系列中的粤变长在 1999 年至 2004 年的所有早造加压种植中连年出现,处理条件为浸种 2 h 后,78 MPa 加压 8 h,诱变几率稳定在 6‰左右,是实验重复率最高的一个突变体。除 2000 年早造种植中出现一矮化不育植株之外,其余历次出现的新突变体以及继代种植中均没有发现分离现象。与粤香占比较,其株高,穗长和米质都有所提高,但株型较为松散,抗病性较差。

另外一个重复性较高的变异是巨无霸,在 1999 年晚造和 2000 年早造高压处理中产生,高压处理条件与粤变长相同。该变异稳定性较差,1999 年获得的突变材料在 2000 年早造种植时分离出巨矮化(JAH)、巨变长和巨不育 3 个后代分离突变体,其中巨变长和巨矮化在以后的种植中也有轻微分化。但巨无霸本身在以后的种植中并未分离新的突变。

对 3 个不育突变,即粤不育、矮不育和巨不育,虽然采取了人工授粉和分株种植等措施,但由于其育性的原因均未能保存下来。

从原始种毕粳 38 号获得的粳变籼(JBX)的处理条件为 300 MPa、2 h,变异幅度最大,由粳稻突变为籼稻,株高增加 18 cm,分蘖数和总生物量增加 4～5 倍。首次于 1999 年早造出现,为处理后仅存活的

一株。2004年早造以相同处理再次出现，变异率为3‰。继代种植均没有发生分离(表2)。

表2 水稻高压处理(毕粳38号)突变体特征

Table 2 Characters of new mutants from high-pressure treated rice variety of BJ38

Mutant	Height	Plant shape	Grain shape	Ear length	Emerge time*	Weight/1 000 grains	Leaf shape
BJ38	94 cm	Loose, tilted stem	Round	16 cm	Control	27.5 g	Narrow
BZS	100 cm	Loose, tilted stem	Round	16 cm	99E	27.5 g	Narrow
JBX	112 cm	Normal, erect stem	Long	30 cm	99E, 2004E	32.0 g	Longer and broaden

毕早熟(BZS)于1999年早造由毕粳38号经78 MPa、4 h处理获得，除熟期提前20 d左右之外，其他性状未发生明显变化。在广州的多代种植中，该突变体包括熟期在内的各种性状相对比较稳定，但在原产地贵州省毕节地区种植，熟期一致性较差，比原种提前10～20 d。目前已经由贵州省毕节地区农科所选育出两个熟期提前20 d的稳定株系。

3.2 简单重复序列区间扩增多态性(ISSR)分析

对10个样品进行了简单重复序 列区间扩增多态性(ISSR)分析，样品为图1中所有育性正常的7个材料。为了检查不同世代原种纯度，使用了分别提纯6代(YXZ_{M6}，$BJ38_{M6}$)和10代(YXZ_{M10}，$BJ38_{M10}$)的样品。粤变长也包括连续种植10代(YBC_{M10})的样品和2004年早造新出现的突变体(YBC_{M1})，以考察5 a后重复实验所获得的突变体是否与以前的材料相同。

从100个ISSR引物中筛选出10个能够扩增出清晰而且条带相对较多的引物(见表3)，对所提取的水稻DNA进行扩增，共扩增出162条多态性条带，扩增产物片断大小在0.3～2.5 kb之间。对于不同的对照与突变材料对，总条带数目不同，样品的同源性越高，总条带数目越少，均在112～140之间(见表4)。

根据ISSR分析结果，利用统计软件(Popgene V1.31)计算出各种材料的遗传距离(Genetic distance)和遗传一致性(Genetic identity)(见表5)，并做出聚类分析图(图2)。

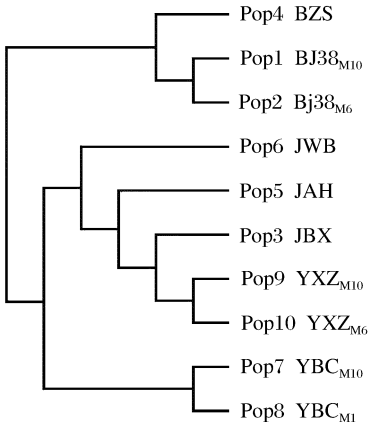


图2 不同水稻材料的聚类分析图

Fig. 2 Cluster tree for the different rice varieties

表3 ISSR引物序列

Table 3 ISSR primer sequence

ISSR	Sequence	ISSR	Sequence
ISSR-809	$(AG)_8G$	ISSR-840	$(GA)_8YT$
ISSR-810	$(GA)_8T$	ISSR-844	$(CT)_8RT$
ISSR-811	$(GA)_8C$	ISSR-864	$(ATG)_5$
ISSR-812	$(GA)_8A$	ISSR-885	$BHB(GA)_7$
ISSR-823	$(TC)_8A$	ISSR-889	$DBD(AC)_7$

表 4　原始种与突变体对的 ISSR 扩增条带总数、特征条带数与多态性参数

Table 4　Total band number, distinct band number and polymorphic coefficient of the control-mutant pairs

Variety pair		Total bands	Distinct bands	Polymorhpic coefficients/(%)
$BJ38_{10}$	BZS	129	34	26.36
$BJ38_{10}$	JBX	140	61	43.57
$BJ38_{6}$	$BJ38_{10}$	112	6	5.36
JWB	JAH	126	35	27.78
YBC_{10}	YBC_{1}	120	3	2.50
YXZ_{10}	JWB	134	39	29.10
YXZ_{10}	YXZ_{6}	117	7	5.98
YXZ_{10}	YBC_{10}	134	36	26.87

表 5　不同水稻材料之间的遗传距离(左下)与遗传一致性(右上)

Table 5　Genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) of the rice species

Sample	$BJ38_{10}$	$BJ38_{6}$	JBX	BZS	JAH	JWB	YBC_{10}	YBC_{1}	YXZ_{10}	YXZ_{6}
$BJ38_{10}$		0.9630	0.6235	0.7901	0.5309	0.5864	0.5864	0.5926	0.5802	0.5802
$BJ38_{6}$	0.0377		0.6111	0.7901	0.5185	0.5741	0.5617	0.5679	0.5802	0.5679
JBX	0.4725	0.4925		0.7099	0.8210	0.8519	0.8025	0.7963	0.8704	0.8580
BZS	0.2356	0.2356	0.3427		0.6049	0.6605	0.6728	0.6667	0.6296	0.6296
JAH	0.6332	0.6568	0.1972	0.5026		0.7840	0.7593	0.7407	0.8395	0.8519
JWB	0.5337	0.5550	0.1603	0.4148	0.2434		0.7654	0.7469	0.8086	0.8210
YBC_{10}	0.5337	0.5767	0.2201	0.3962	0.2754	0.2673		0.9815	0.7840	0.7840
YBC_{1}	0.5232	0.5658	0.2278	0.4055	0.3001	0.2918	0.0187		0.7654	0.7778
YXZ_{10}	0.5443	0.5443	0.1388	0.4626	0.1749	0.2124	0.2434	0.2673		0.9506
YXZ_{6}	0.5443	0.5658	0.1531	0.4626	0.1603	0.1972	0.2434	0.2513	0.0506	

4　讨　论

由于原始水稻种子经过多代连续自交繁殖,是高度纯合的。ISSR 分析结果显示粤香占第 6 代(YXZ_{M6})和第 10 代(YXZ_{M10})之间的遗传距离为 0.0506,毕粳 38 第 6 代($BJ38_{M6}$)和第 10 代($BJ38_{M10}$)之间的遗传距离为 0.0377,而一般不同材料之间的遗传距离系数大于 0.13。在聚类分析图上,它们均处于相同的位置。因此,原始种群中并不存在耐压个体,同时在所使用压力处理条件下,种子的存活率很高,如巨变长产生的处理条件为 78 MPa、4 h,种子的存活率超过 90%,可以完全排除压力筛选的可能性。

对比图 1 和图 2 可以发现,关于原种和突变体之间的亲缘关系,实际来源与 ISSR 分析的结果是相互吻合的,说明突变体确实由原种经过高压处理获得。在图 2 中,首先,样品被划分为粳稻和籼稻两个组群,籼稻-粳稻之间的遗传距离系数大于 0.34,同类材料的遗传距离系数小于 0.31。其次,粤香占系列的两个子系列——粤变长和巨无霸也被清楚地区别开来。粳变籼出现在粤香占系列中,这也是在情理之中,因为其变异幅度很大,已经由粳稻变为籼稻。

水稻高压诱变的一个重要特征是突变体当代出现,同时具有很高的遗传稳定性,第二代以后就不会再发生自然分离。粤变长第 10 代($YBCM_{M10}$)和新产生的突变体(YBC_{M1})之间的遗传距离为 0.0187,遗传一致性系数为 0.9815。其遗传距离系数远小于同类材料之间的差异(0.13)[9]。甚至小于粤香占第 6 代(YXZ_{M6})和第 10 代(YXZ_{M10})之间的遗传距离(0.0506),完全可以认为两者是相同的材料。说明虽然经过 10 代种植,其宏观生物学性状和遗传物质都没有发生变化。

值得注意的是,突变体与原种之间的差异越大,其遗传稳定性越高,子代分离的可能性越小,同时分

离出的突变体与原始种之间的遗传距离变小。如粳变籼(JBX)与毕粳38($BJ38_{M10}$)的距离系数为0.4725,从来没有出现过分离;粤香占系列中粤变长(YBC_{M10})与原种粤香占(YXZ_{M10})之间的距离系数为0.2434,后代分离出一种突变体矮不育;毕早熟(BZS)与毕粳38($BJ38_{M10}$)的距离系数为0.2356,其唯一的变异特征——熟期则有一定的波动。巨无霸(JWB)与粤香占(YXZ_{M10})虽然宏观性状差异很大,但它们之间的距离系数为0.2124,后代则分离出三个突变体。而且,后代突变体与原种之间的距离缩小,如巨矮化(JAH)与粤香占(YXZ_{M10})之间的距离系数降低为0.1749,事实上,巨矮化在继代种植中也出现轻微分离。

根据以上实验结果,无论是从形态性状上还是从DNA分子水平上看,水稻种子经过高压处理,的确产生了可以稳定遗传的变异,这种变异是由于遗传物质的改变而引起的。

References:

[1] 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, 12(4): 241－247. (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(4):241－247.

[2] Chen Z M, Tian S M, Ruan K C. A Vaccine to Coxsackie Virus Prepared by High Pressure [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2001, 33(1): 128－130. (in Chinese)
陈忠明,田少敏,阮康成. 高压力制备柯萨奇病毒疫苗 [J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33(1):128－130.

[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] Shen S L, Xu C E, Long G H, et al. Effects of High Pressure on Germination of Wheat Seeds and Growth of Wheat Seedling [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2003, 28: 8－10. (in Chinese)
申斯乐,徐春娥,龙国徽,等. 高压对小麦种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. 吉林农业科学,2003,28:8－10.

[5] Bai C K, Li G S, Duan J. Effect of High Hydrostatic Pressure on Seeds Germination and Seedling Isoenzyme in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2003, 17(4): 283－289. (in Chinese)
白成科,李桂双,段 俊. 高静水压对水稻种子萌发及同工酶的影响 [J]. 高压物理学报,2003,17(4):283－289.

[6] Li G S, Bai C K, Duan J, et al. Changes in Agronomic Traits and Photosynthetic Characteristics in Rice Mutated Strains Induced by High Hydrostatic Pressure Treatment [J]. Acta Agronomica Sinca, 2003, 29(5): 765－769. (in Chinese)
李桂双,白成科,段 俊,等. 高静水压诱变水稻突变体的农艺性状及光合特性 [J]. 作物学报,2003,29(5):765－769.

[7] He X Y, Xu S P, Liao Y P, et al. SSR Analysis and Soluble Protein Content in Leaf of Rice Mutants Induced by High Pressure [J]. Chinese J Rice Sci 2003, 17(4): 373－375. (in Chinese)
何秀英,徐世平,廖耀平,等. 水稻高压变异材料的SSR标记和叶片可溶性蛋白质含量分析 [J]. 中国水稻科学,2003,17(4):373－375.

[8] Yu Y, Chen H S, Ge X J. Optimization of Experiment Conditions and Primer Screening with ISSR Markers [J]. Journal of Tropic and Subtropic Botany, 2003, 11(1): 15－19. (in Chinese)
余 艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选 [J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(1):15－19.

[9] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplifyication [J]. Genomics, 1994, 20: 176－183.

[10] He Y Q, Zhang Y, Sun M, et al. Studies on the Relationship between Cultivated and Wild rice Using ISSR Markers [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2001, 9(2): 123－127. (in Chinese)
何予卿,张 宇,孙 梅,等. 利用ISSR分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系 [J]. 农业生物技术学报,2001,9(2):123－127.

[11] Doyle J. DNA Protocols for Plants—CTAB Total DNA Isolation [A]. Hewitt G M, Johnston A. Moleecular Techniques in Taxonomy [C]. Berlin: Springer, 1991. 283—293.

Pressure Induced Rice Mutation and ISSR Analysis of the Mutants

XU Shi-Ping[1], GUO Li-Xiu[2], WENG Ke-Nan[1], DUAN Jun[2], LÜ Guang-Cai[1]

(1. *Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou* 510640, *China*;
2. *South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou* 510650, *China*)

Abstract: After up to 10 generations of purification by strict self-fertilizing, seeds of two rice varieties (*Oryza sativa* L.), Yuexiangzhan and Bijing-38 were treated with high hydrostatic pressure during last 5 years, and 5 contemporaneous mutants and 4 descendant natural mutants were obtained with high reproducibility for the contemporaneous mutants. To verify if the mutation was take place at DNA level, Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of the original rice varieties and mutants was conducted. The analysis revealed that the genetic substance (DNA) had been altered. Evidently, the mutation was induced by high hydrostatic pressure treatment. Generally, the mutation took place contemporaneously and the new characters are of high genetic stability; the further the genetic distance between the mutant and the original is, the higher the genetic stability of the mutant is.

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