

辐射诱变突变体鉴定技术

赵丽丽*, 孙小富, 黄莉娟, 王雷挺, 赵鑫

(贵州大学 动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:辐射诱变育种经过几十年的研究,在方法技术、诱变手段、突变体筛选等方面取得较大进步,已成为种质资源创新、挖掘新基因和培育新品种的一个重要途径。本文简要介绍了植物辐射诱变育种技术的发展情况,总结了辐射诱变育种中诱变剂量、突变体类型及主要的突变体选择方法,并对比了各种突变体选择方法的优缺点,以期为提高植物诱变育种的效率提供参考。

关键词:辐射诱变;突变体;鉴定技术

中图分类号:S335

文献标识码:A

辐射诱变育种是植物育种的重要手段之一,是采用一定剂量的射线,照射植物的种子、茎段、花粉、愈伤组织或其他器官,诱发植物产生基因突变和染色体畸变,并从突变群体中鉴定、筛选有利突变,培育新品种的过程^[1]。辐射诱变育种不仅可以大大提高植物基因的突变频率,在短时间内获得有价值的突变体,而且多数突变属于小量突变,在改良品种时保证了原有品种的优质性状,常被用于改良优良品种的单一性状^[2]。辐射诱变主要的辐射源有 γ 、X、 β 射线和中子等电离辐射源,离子束、激光和紫外线等非电离辐射源。各种辐射源的性质、波长不同,引起的变异效果不同,所以辐射应用范围也不同^[1]。其中 ^{60}Co - γ 射线的穿透性强,波长短,诱变效果稳定,诱变当代效果直观, M_2 代即可出现大量明显的突变性状,突变体易于筛选,所以 ^{60}Co - γ 射线成为高等植物诱变育种中应用最多的辐射源^[3]。据统计,目前辐射诱变育成的突变品种中,70%以上来自 γ 辐射或用 γ 辐射诱发的突变体培育而成^[4]。

诱变育种应用广泛,育种效果显著。诱变育种过程包括诱变源选择、最佳辐射剂量确定、突变体筛选和鉴定等,每个过程对诱变育种的成败起到重要作用。本文对诱变育种关键环节研究进展进行综述,拟为各种植物诱变育种提供技术支持。

1 辐射诱变育种技术的发展情况

1896 年,法国科学家 BECQUEREL H A 发现了天然放射性元素铀,揭开了原子能时代的序幕^[5]。之后,越来越多的研究者开始关注核辐射的生物学效应,生物学和农业科学领域开始了核技术的应用研究。1927 年,昆虫学家 MULLER H J 发现 X 射线能诱发果蝇产生多种类型的遗传性变异^[6]。1928 年,植物育种学家 STADLER L J 利用 X 射线研究了辐射对小麦和玉米等农作物产生的诱变效应,开启了人们对植物诱变育种技术的研究^[7]。1934 年,印度尼西亚科学家 D. Tollenear 等利用 X 射线育成了世界上第一例辐射诱变烟草突变新品种“Chlorina F1”^[1]。到 50 至 60 年代,随着遗传学、细胞生物学等学科的发展,辐射诱变的规律逐步被了解,促使诱变育种方法进一步成熟,并获得了一些突出性成果^[8]。特别是 1969 年《突变育种手册》的出版,使得辐射诱变育种技术得到迅速的发展^[9]。进入 70 年代后,离体培养技术有效地解决了辐射诱变育种中嵌合体的形成^[10]。到 80 年代,辐射诱变育种开始与化学诱变、杂交育种、倍性育种及现代生物技术等方法相互交叉、结合,发展成为综合性育种技术。到 20 世纪末,全世界已有 50 多个国家运用辐射诱变育种技术在 150 多个植物种类上育成了近 1 800 个品种^[11]。进入 21 世纪,

收稿日期:2019-09-23

基金项目:贵州省科技计划资助项目(黔科合支撑[2016]2516号,黔科合重大专项[2016]3002号);国家自然科学基金资助项目(31702173);贵州省高层次创新型人才资助项目(黔财教[2017]45号)

作者简介:赵丽丽(1981-),女,教授,博士,研究方向:牧草种质资源及育种,Email: zhaolili_0508@163.com.

* 通讯作者:赵丽丽,Email: zhaolili_0508@163.com.

辐射诱变育种技术不仅为科学家提供了创造和筛选突变体的广阔平台,丰富了物种的遗传变异范畴,也为遗传学研究和植物育种家提供了崭新的手段和领域^[12]。据联合国粮农组织/国际原子能机构(food and agriculture organization of the united nations/international atomic energy agency, FAO/IAEA)突变品种数据库统计:截至2009年9月,世界上60多个国家在170多种植物上利用诱发突变技术育成和推广了3 088个突变品种;截至2013年9月底,在214个植物种类上育成3 218个突变品种。其中,中国在45种植物上育成了802个突变品种,超过目前国际诱变育成品种数据库中总数的1/4,位居世界第一。特别是棉花品种“鲁棉一号”、水稻品种“原丰早”、大豆品种“铁丰18号”等多个诱变品种获得国家发明一等奖。这些突变品种累计种植面积已达到数亿公顷,创造了巨大的社会和经济效益^[1]。

2 辐射剂量选择及突变类型

2.1 辐射敏感性和剂量选择

辐射诱变育种的关键是采取适当的剂量,既获得较高的变异率和较宽的变异谱,又不致过分损伤植株。适宜的辐射剂量与材料的辐射敏感性有关,需考虑到植物种类、品种、器官、发育阶段、生理状况及外界因素,是一个比较复杂的问题^[13]。辐射剂量过低,起不到诱变作用;辐射剂量过高,变异频率虽然增加,但植物的死亡率也会增加,影响选择机率。因此,确定植物的适宜辐射剂量被称为诱变育种的第一步工作^[14]。目前,国内外一般采用半致死剂量和临界剂量确定辐射诱变适宜剂量,采用的指标包括种子发芽率、植株成活率、出苗率、植株不育程度和生长抑制程度等。胡瑞阳、耿兴敏和李凤涛等分别针对杉木(*Cunninghamia lanceolata*)、桂花(*Osmanthus fragrans*)和白刺花(*Sophora davidii*)等研究材料,分析了⁶⁰Co- γ 射线对不同植物种子萌发的影响,提出了各种植物种子适宜辐射剂量,有效突变剂量的选择为后期突变性状的产生和突变体的选择提供了保障^[14-16]。

2.2 辐射诱变后代主要突变类型

辐射诱变已经在农作物、花卉、果树、牧草等植物中得到广泛应用,获得了大量有益突变体,为植物育种及基因功能的研究奠定了基础。李臻等经多年种植及筛选,从圣稻15诱变突变体库中获得

93份在叶色、叶形、株高、抽穗期、穗型、粒型等方面出现明显变异的突变体^[17]。孙孟园等从辐射诱变获得的大豆突变体中发现了叶片、株型、生育期、粒形、籽粒蛋白质及油脂等性状的突变体^[18]。彭振英等对花生干种子进行⁶⁰Co- γ 辐射诱变处理,获得了高油突变体和高蛋白突变体^[19]。宋华伟等利用⁶⁰Co- γ 辐射诱变结缕草,从诱变材料中选育获得了3个抗旱性优于其亲本的新品系^[20]。李新鹏等通过⁶⁰Co- γ 辐射诱变京科糯2000,获得了一个糯玉米突变体库,在该突变体库中鉴定出71个不同类型的雄性完全不育的突变体^[21]。综上,辐射诱变产生的突变类型主要包括株高突变、产量突变、品质突变、抗性突变和育性突变等方面^[17]。

3 辐射诱变突变体筛选和鉴定

突变体是植物育种、挖掘基因和研究功能基因组学的重要材料。而各类突变体后代,需要经过详细而大量的鉴定,才能明确其突变的位点和特点,工作量大,过程繁杂,耗时耗力。因此,突变体的鉴定与选择在植物诱变育种中占有举足轻重的位置,特别是突变体的早期鉴定分离与筛选^[22]。如何以有效的手段鉴定和选择优良突变体却是诱变育种的一个难题,目前常用的方法有形态学、细胞学、生化和分子标记鉴定等。

3.1 形态学鉴定

形态学鉴定是将突变体和原品种进行比对,观察与记录植物的外部形态特征,要求必须有能遗传的、相对于野生型有显著差异的外观性状,一般也包括逆境筛选和化验分析筛选。谢向誉等利用⁶⁰Co- γ 辐射木薯后,通过形态学鉴定获得了稳定的裂叶叶形突变体、叶柄颜色突变体、株高突变体、茎粗突变体等^[23]。赵丽丽等发现白刺花辐射诱变后代在植株高度、冠幅直径、茎粗、叶片大小、分枝位点高度等方面发生了显著的变异^[12]。表型鉴定的方法简单、直观、易行,不需要特殊的硬件设备,能直接反映突变体的表型性状变化,可以对变异的性状做出直接的判断。但是因为该方法容易受到生长环境和人为因素的影响,所以多态性差、准确性不高,在突变体鉴别方面的作用是很有限的。因此,在筛选突变体的工作中,一般都会与其他鉴定方法混合使用。

3.2 细胞学鉴定

细胞学鉴定是利用普通显微镜、电镜或荧光原

位杂交技术在细胞水平对诱变后代的细胞变异进行鉴定,不仅可以鉴定辐射诱变后代的细胞及细胞器的形态变化,还可以鉴定染色体易位、缺失等变异^[1]。在小麦矮化突变体及水稻卷叶突变体鉴定中,借助石蜡切片技术,从细胞学水平鉴定出矮化突变体多因茎秆细胞长度减少和细胞变小引起;卷叶突变体多因泡状细胞、厚壁细胞及薄壁细胞的变化,以及维管束中韧皮部变化和叶肉细胞的变化引起^[24-25]。水稻雄性不育突变体是因小孢子畸形、萎缩不能形成正常的花粉粒^[26]。染色体是遗传物质的载体,染色体变异必然会导致遗传变异的发生。 γ 射线辐照处理的黄花苜蓿细胞出现了多倍体突变,多倍体出现的几率为 39.98%~41.71%^[27]。 γ 射线辐照后,籽粒苋细胞中出现了染色体微核畸变、染色体桥、落后染色体、游离染色体、粘连染色体等^[28]。细胞学鉴定虽然克服了形态学标记易受环境影响的缺点,但存在耗时费力、非染色体变异性状难以检测、基因的精细定位困难等缺点,所以近年来细胞学鉴定未得到广泛的应用。

3.3 生化鉴定

生化鉴定是基于蛋白质多态性发展起来的一种标记方法,包括同工酶和贮藏蛋白(谷蛋白、醇溶蛋白、球蛋白及清蛋白等)电泳鉴定。因为蛋白质是基因表达的产物,借助聚丙烯酰胺凝胶电泳获得蛋白质谱带,能从一定程度上反映植物的遗传变异。樊光辉利用 Co 辐射诱变枸杞“宁杞 1 号”的种子,结合单株选优和同工酶谱分析,成功选育出辐射诱变优良新品系^[29]。生化鉴定方法较为简单,易于操作,经济方便,受到广泛应用。但其也存在标记数量有限,稳定性差,不利于贮存和运输等问题。特别是同工酶检测中,因为酶不是基因的直接产物,中间存在一个表达、调节、修饰的问题,所以其检测的可靠性受到一定程度上的影响。另外,同工酶具有发育、组织和物种的特异性,易受发育时期和环境因素影响。这些缺点一定程度上制约了生化鉴定技术的应用和发展。

3.4 分子标记鉴定

分子标记鉴定是继形态学、细胞学和生化鉴定突变体之后应用广泛的一种较为理想和新的遗传标记形式。分子标记的研究开始于 20 世纪 80 年代,经过多年的发展,分子标记大致可以分为 4 类:(1)以分子杂交为基础,如限制性片段长度多态性

(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。(2)以限制性酶切和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为基础,如酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)。(3)基于 PCR 技术的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)分子标记,包括随机引物的 PCR 标记,如随机扩增多态性(random amplified polymorphism DNA, RAPD);特异引物的 PCR 标记,如简单重复序列(sequence repeat, SSR)、序列特异性扩增区(sequence-characterized amplified region, SCAR)等。(4)基于 DNA 芯片技术的分子标记技术,如单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。该技术在突变体鉴定中得到广泛应用。如 RFLP、AFLP、SSR、SNP 等分别在水稻、唐菖蒲、狼尾草、烟草等植物的突变体鉴定中得到成功的应用^[30-33]。分子标记鉴定技术的优点:突变位点直接以 DNA 的形式表现,在植物体的各个组织、各发育时期均可检测到,不受季节环境限制,结果可靠性强;检测位点多、多态性高;而且许多分子标记表现为共显性,能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型,提供的遗传信息较完整。但也存在一定的局限性,如其检测到的突变位点可能没有相应的表型,或者找到多个突变位点后,不能确定到底哪个位点与缺失的功能相关,只能说明诱变材料从 DNA 水平上发生了变化以及突变发生的频率^[34]。

4 结语

随着辐射育种研究的快速发展,诱变育种逐渐与杂交育种、组织培养、分子鉴定等密切结合,现已发展成为一门成熟的综合性育种新技术,并在农作物、蔬菜、果树、观赏植物和牧草育种中取得了很多可喜的成果。诱变育种中,突变体的早期鉴定和选择至关重要,常用的形态学鉴定、细胞学鉴定、生化鉴定和分子标记鉴定 4 种方法各有优缺点,为取得很好的鉴定效果,一般根据植物特性、突变类型和试验条件等选择多个鉴定方法进行综合鉴定。

参考文献:

- [1] 赵林姝, 刘录祥. 农作物辐射诱变育种研究进展[J]. 激光生物学报, 2017, 26(6): 481-489.
- [2] 云锦凤. 牧草及饲料作物育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.

- [3] YANG C, ZHU J, JIANG Y, et al. 100 Gy ^{60}Co γ -ray induced novel mutations in tetraploid wheat[J]. Scientific World Journal, 2014, 20(14): 725-813.
- [4] SHU Q Y, FORSTER B P, NAKAGAWA H. Plant mutation breeding biotechnology[M]. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2012.
- [5] BECQUEREL H A. On radioactivity, a new property of matter[M]. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Publishing Company, 1903: 52-70.
- [6] MULLER H J. Artificial transmutation of the gene[J]. Science, 1927, 66: 84-87.
- [7] STADLER L J. Mutations in barley induced by X-rays and radium[J]. Science, 1928, 68: 186-187.
- [8] 李雅志. 国内外果树诱发突变的几个问题及其研究的趋向[J]. 落叶果树, 1979(2): 26-36.
- [9] 高健, 卢惠萍. 花卉辐射诱变育种研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(3): 228-230.
- [10] BROERTJES C, ROEST S, BOKELMANN G S. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* RAM. using in vivo and in vitro adventitious bud techniques[J]. Euphytica, 1976, 25: 11-19.
- [11] MALUSZYNSKI M, AHLOOWALIA B S, SIGURBJÖRNSSON B. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement[J]. Euphytica, 1995, 85: 303-315.
- [12] 赵丽丽, 王普昶, 张宇君, 等. 白刺花辐射诱变 M_2 代突变群体的形态特征比较和 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(10): 1698-1706.
- [13] ROBERTS T, MCDONALD G, LEHMAN E, et al. Effects of radiation on wheat germination[J]. Transactions of the Kansas Academy of Science, 2015, 73(1): 134-136.
- [14] 胡瑞阳, 吴博, 纳静, 等. ^{60}Co - γ 射线辐照处理对杉木种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 中国农学通报, 2016, 32(4): 1-4.
- [15] 耿兴敏, 王良桂, 李娜, 等. ^{60}Co - γ 辐射对桂花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 核农学报, 2016, 30(2): 216-223.
- [16] 李凤涛, 赵丽丽, 王普昶, 等. ^{60}Co - γ 辐射对白刺花幼苗生理的影响[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(5): 83-87.
- [17] 李臻, 王庆国, 刘炜, 等. 水稻突变体库的构建及部分性状分析[J]. 山东农业科学, 2018, 50(11): 16-22.
- [18] 孙孟园, 白云, 李振宇, 等. ^{60}Co - γ 射线诱变大豆“桂夏7号”突变体筛选[J]. 四川农业大学学报, 2018, 36(6): 737-744.
- [19] 彭振英, 王兴军, 田海莹, 等. 花生 ^{60}Co - γ 辐射诱变和突变体库的构建[J]. 核农学报, 2016, 30(3): 422-429.
- [20] 宋华伟, 刘颖, 曹荣祥, 等. ZS-SJZ 结缕草与 ^{60}Co - γ 辐射诱变新品系的抗寒性比较[J]. 广东农业科学, 2015, 42(20): 39-44.
- [21] 李新鹏, 李京琳, 陈小朋, 等. 玉米突变体库创制及雄性不育突变体鉴定[J]. 玉米科学, 2018, 26(3): 12-16, 21.
- [22] HWANG S G, DONG S K, HWANG J E, et al. Identification of altered metabolic pathways of γ -irradiated rice mutant via network-based transcriptome analysis[J]. Genetica, 2015, 143(6): 635-644.
- [23] 谢向誉, 尚小红, 周慧文, 等. ^{60}Co - γ 辐射对木薯生长的影响及其突变体的 SCoT 分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(3): 513-519.
- [24] 赵秋实, 李倩倩, 王超杰, 等. 普通小麦品种陕农 33 矮秆突变体的矮化效应分析[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(9): 1053-1064.
- [25] 周亭亭, 饶玉春, 任德勇. 水稻卷叶细胞学与分子机制研究进展[J]. 植物学报, 2018, 53(6): 848-855.
- [26] 胡丽芳, 苏连水, 朱昌兰, 等. 辐射诱变水稻雄性不育突变体 tda 的遗传与细胞学分析[J]. 核农学报, 2015, 29(12): 2253-2258.
- [27] 石凤玲, 石凤翎, 赵敏, 等. ^{60}Co - γ 辐射对黄花苜蓿出苗和染色体的诱变效应[J]. 种子, 2016, 35(4): 40-43.
- [28] 韩微波, 刘丽, 李禹尧, 等. 不同诱变处理下籽粒苋种子细胞学效应的比较[J]. 北方园艺, 2017(14): 85-88.
- [29] 樊光辉. “宁杞1号”枸杞辐射诱变育种初报[J]. 北方园艺, 2014(2): 149-151.
- [30] 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(2): 11-15.
- [31] 刘长命, 张显. 唐菖蒲复色花突变体 AFLP 及 SCAR 标记研究[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 237-240.
- [32] 武炳超, 童磊, 杜昭昌, 等. ^{60}Co - γ 射线对 2 种狼尾草属牧草的诱变效应[J]. 中国农业科学, 2019, 52(3): 414-427.
- [33] 孙明铭, 蒋彩虹, 罗朝鹏, 等. 烟草黄绿叶突变体的遗传分析与基因定位[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(5): 942-950.
- [34] 郭建秋, 雷全奎, 杨小兰, 等. 植物突变体库的构建及突变体检测研究进展[J]. 河南农业科学, 2010(6): 150-155.

(责任编辑:周晓南)

Identification Technology of Mutants Induced by Radiation

ZHAO Lili*, SUN Xiaofu, HUANG Lijuan, WANG Leiting, ZHAO Xin

(College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: After decades of research, radiation mutation breeding has made great progress in methods and techniques, method of inducing mutation, mutant screening method, and so on. It has become an important way to innovate germplasm resources, excavate new genes and breed new varieties. This paper briefly introduced the development of plant radiation mutation breeding technology, summarized the mutation dose, mutant types and main mutant selection methods in radiation mutation breeding, and compared the advantages and disadvantages of various mutant selection methods, in order to provide reference for improving the efficiency of plant mutation breeding.

Key words: radiation mutation; mutant; identification technology