

白燕 2 号 EMS 突变体的形态鉴定与遗传变异分析

张娜¹, 杨希文¹, 任长忠^{1,3}, 胡银岗^{1,2}

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; 2. 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100;

3. 吉林省白城市农业科学院, 吉林白城 137000)

摘要:为促进燕麦的遗传改良,采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(Ethyl methane sulfonate, EMS)处理裸燕麦品种“白燕 2 号”种子,构建燕麦 EMS 突变体库,对获得的 M₂ 代突变体的形态特征进行调查鉴定,估计突变效果并采用内含子切结点引物和长随机引物的 PCR 技术分析 M₂ 代突变体间的遗传多态性。结果显示,所创制的燕麦突变体库的 M₂ 代个体间表现出了丰富的遗传变异,变异的总频率为 7.17%。采用 15 个内含子切结点引物和长随机引物对其中 39 个突变体株系进行 PCR 检测,共扩增出 99 条谱带,其中多态性条带 65 条,多态性条带比率为 65.7%。突变体株系间的遗传相似系数为 0.667~0.973,表现出丰富的遗传变异。表明构建的燕麦 EMS 突变体库具有丰富的突变类型,可用于燕麦重要性状突变体的筛选和候选基因的功能分析。

关键词: 燕麦; 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变; 遗传变异

中图分类号: S512.1; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2011)03-0421-06

Morphological Identification and Genetic Variation Analysis of EMS Mutants from Hexaploid Oat (*Avena sativa*) Cultivar Baiyan 2

ZHANG Na¹, YANG Xi-wen¹, REN Chang-zhong^{1,3}, HU Yin-gang^{1,2}

(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Shaanxi Key Lab of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3. Baicheng Academy of Agricultural Sciences, Baicheng, Jilin 137000, China)

Abstract: To promote the genetic improvement of oat, an EMS mutation library of oat was constructed using naked oat cultivar Baiyan 2 as the material. The morphological characteristics of the M₂ population were investigated to identify the mutants and the mutation effects in field condition, as the genetic variation among some individuals of the M₂ population by PCR with intron spliced junction primers and long random primers as well. The results showed that there were rich genetic variations among the M₂ mutants with total variation frequency of 7.17%. A total of 99 fragments were amplified from the genomic DNA of 39 strains of the M₂ mutation population with 15 intron spliced junction primers and long random primers. Of which, 65 fragments were polymorphic with a frequency of 65.7%. The genetic similarity coefficients among those M₂ mutation individuals ranged from 0.667 to 0.973, which indicated extensive genetic variations among the individuals. These results suggested that rich genetic variations were presented in the oat EMS mutation population, further screening the mutants in the key agronomic traits may greatly facility the functional analysis of candidate genes of key agronomic traits.

Key words: Oat (*Avena sativa*); EMS mutation; Genetic variation

* 收稿日期: 2011-01-18 修回日期: 2011-03-05

基金项目: 农业部燕麦产业技术体系(nycyt-x-14); 农业部公益性行业专项(nyhyzx07-009); 西北农林科技大学推广专项(2006ZR013)。

作者简介: 张娜(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为农业生物技术应用。E-mail: nana860204@163.com

通讯作者: 胡银岗(1967-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事小麦抗逆分子生物学研究。

突变体是分离和鉴定功能基因及遗传改良的重要材料,构建突变体库是功能基因组研究和遗传改良的基础工作^[1]。构建饱和的突变体库不仅有助于利用突变体分离和分析候选基因的序列与功能,而且创造的突变体可作为遗传改良的新种质^[2]。化学诱变是构建突变体库的重要方法之一。EMS是最常用的化学诱变剂,其诱变的特点是多形成点突变,不易造成染色体畸变,稳定性较好,后代发生分离的基因数量少,因而被广泛用于构建植物的突变体库^[3]。目前,利用EMS诱变已构建了拟南芥^[4]、玉米^[5]、大麦^[6]、小麦^[7]等植物的突变体库,并在候选基因功能分析等方面发挥了重要作用。顾佳清等^[8]对EMS处理的粳稻的簇生穗、树稻等突变类型进行了初步的遗传分析,发现了具有应用潜力的突变类型。Yasui等^[9]利用0.5%的EMS溶液诱变处理面包小麦种子,在M₂种子中发现糯质小麦突变体,育成了糯质普通小麦新品系。Slade等^[7]利用EMS诱变六倍体小麦,创造了*Waxy*基因的不同变异类型,并对该基因的功能位点进行了深入分析。Chiu等^[10]从EMS处理的拟南芥突变体库中筛选到*TORNADO2*基因的不同变异类型,并分析了该基因在花的心皮发育中的功能。Zhu等^[11]从拟南芥的EMS突变体库中筛选到花发育延迟的突变体*drm1*,并用于花发育的研究。Olsson等^[12]构建了皮燕麦的EMS突变体库,并采用TILLING技术对木质素和 β -葡聚糖生物合成基因的突变体进行了筛选和分析。

燕麦是重要的粮食与饲料作物,国外的燕麦生产主要是皮燕麦,而我国90%以上的燕麦生产是裸燕麦,因而构建裸燕麦的突变体库对我国燕麦生产具有重要意义。近年来,随着分子标记技术的发展,玉米^[13]、小麦^[14]等作物的遗传多样性及群体结构方面已有较多研究。内含子切接点引物和长随机引物的PCR分子标记是一种单引物标记,因其具有多态性高、容易操作等优点,已广泛用于玉米^[15]、酵母^[16]、青稞^[17]等物种的遗传多态性研究,并取得了较好的结果。本研究构建了我国裸燕麦主栽品种白燕2号的EMS突变体库,并采用内含子切接点引物和长随机引物的PCR技术分析了部分突变体间的遗传变异,以促进裸燕麦的功能基因组学和遗传改良研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料及突变群体的创制

用于突变的裸燕麦品种为白燕2号,由吉林省白城市农业科学院选育。该品种生育期适中、丰产性和抗病性均较好,已在我国燕麦主产区广泛应用。突变群体的创制采用0.8%(v/v)的EMS溶液处理“白燕2号”种子。具体方法为:2008年10月,取饱满、有活力的种子1000粒,用pH 7.0的磷酸盐缓冲液浸泡过夜;倒去磷酸盐缓冲液,加入0.8%EMS溶液,室温浸泡8h,其间摇晃数次,以确保诱变效率;倒出EMS诱变剂,用蒸馏水清洗种子20余次,随后播种于瓦盆中,每盆10粒种子,在温室生长至成熟,单株收获M₁代种子。2009年10月,将收获的M₁代种子按单株播种于西北农林科技大学农作一站试验田,每株系2行,2010年5月,以野生型为对照,调查记载各突变体的形态特征,如株高、分蘖、叶型等。

1.2 燕麦基因组DNA的提取与突变体间的遗传变异分析

燕麦叶片基因组DNA采用CTAB法^[18]提取,采用琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,并估测浓度,然后调至同一浓度水平,-20℃保存。突变体个体间的遗传变异采用内含子切接点引物和长随机引物的PCR技术进行检测。以野生型白燕2号为对照,检测M₂代突变体单株的遗传变异。

内含子切接点引物和长随机引物的序列参照文献^[19,20](表1)。PCR反应体系为20.0 μ L,含2.0 μ L 10 \times 扩增缓冲液,1.5 μ L Mg²⁺(2.5 mmol \cdot L⁻¹),1.6 μ L dNTPs(各2 mmol \cdot L⁻¹),2.0 μ L 模板DNA(100 ng \cdot μ L⁻¹),0.5 μ L 引物(10 mmol \cdot L⁻¹),0.2 μ L Taq DNA聚合酶(5 U \cdot μ L⁻¹),ddH₂O补至20.0 μ L。PCR反应程序为:94℃ 3 min;94℃ 40 s,56℃ 40 s,72℃ 90 s,6个循环;94℃ 40 s,59℃ 40 s,72℃ 90 s,32个循环;72℃ 5 min,4℃ 保存。扩增反应在BIO-RAD DNA Engine PCR仪上进行。扩增产物与6 \times Loading buffer按1:5的比例混合上样,1.5%琼脂糖凝胶,1 \times TAE电泳缓冲液,120 V恒压电泳45 min。溴化乙锭染色10~20 min,利用Gel DocXR凝胶成像系统观察、照相,并统计条带。

表 1 15 个 ISJ 引物和长随机引物序列

Table 1 Sequence of 15 ISJ and long random primers used

引物名称 Primer Name	引物序列 Primer sequence 5'-3'	引物名称 Primer Name	引物序列 Primer sequence 5'-3'
B1	GAGCCAGAACGACGCCGG	IT2-18	GCAGAGGGCCAGGTAAGT
R1	TCGTGGCTGACTTCACTG	IT3-18	GTGCGGCCACAGGTAAGT
R2	TGCTGGTTTGCAGGT	IT31-15	GAAGCCGACAGGTAAG
E2	GGAATTCACGTCCTCA	IT32-15	GACTCGCCAGGTAAG
E4	GAATTCACGCTGCA	IT33-15	GATGCCCCAGGTAAG
ET1-18	ACTTACCTGAGGCGCGAC	IT34-15	ACCTACCTGGCCGAG
ET2-18	ACTTACCTGCTGGCCGGA	IT36-15	ACCTACCTGGGGCTC
IT1-18	CCGGCAGGTCAGGTAAGT		

1.3 突变体间的遗传变异分析

采用 NTsys-pc2.1 软件分析突变体遗传多样性^[21]。扩增反应重复 2 次,根据电泳结果记录清晰稳定的条带;同一引物的扩增产物迁移率相同的条带记为一个位点,有条带量化为 1,无条带量化为 0,构建[1,0]二元数据矩阵,采用 NTsys-pc2.1 数据分析软件的 Dice 法计算品种间的遗传相似系数,根据遗传相似系数以 Clustering 模块 SAHN 程序的不加权算术平均数法(UPGMA)进行聚类分析,建立聚类图。采用 Clustering 分析模块的 Cophenetic values 及 Graphics 模块的

Matrix Comparison Plot 分析进化树的符合度。

2 结果与分析

2.1 燕麦突变体的表型特征

由于本研究采用的 EMS 浓度较高,处理的 1 000 粒种子能够正常生长至成熟的个体仅为 151 个,比例为 15.1%,对 M₁ 按单株进行收获,大部分 M₁ 个体的育性很低,有 65 个株系收获的种子少于 15 粒,平均为 8 粒,将其全部播种于田间,每株系 1 行,其余株系每株系播种 15 粒,共播种 M₂ 代种子 1 820 粒,经调查,出苗率为 79.2%。

表 2 白燕 2 号 EMS 诱变群体 M₂ 代的表型突变Table 2 Phenotypic mutation in EMS M₂ population of Baiyan 2

表型 Phenotype	突变个体 No. of Mutants	表型 Phenotype	突变个体 No. of Mutants
叶缘萎缩 Shrinked edge leaf	1	阔叶 Broad leaf	8
叶子有白斑 White spots on leaf	1	矮秆 Dwarf	1
叶子有黄斑 Yellow spots on leaf	1	高秆 Tall	2
叶片黄萎 Verticillium	5	单蘖 Single tiller	1
叶有条纹 Stripe on leaf	8	少分蘖 Few tillers	16
底部叶黄 Yellow leaf at the bottom	2	多分蘖 More tillers	4
叶子卷曲 Curly leaf	4	苗期致死 Seedling lethal	16
细叶 Narrow leaf	11	不育 Sterility	4

在田间条件下对白燕 2 号 M₂ 代突变体的形态变异调查发现,株高、分蘖、叶片等性状的突变株发生表型突变的频率约为 7.17%(表 2)。其中株高突变体 3 株,突变频率为 0.25%,株高最高达 160 cm,最低为 68 cm。分蘖突变体 21 株,突变频率为 1.77%,分蘖突变有 3 种类型:多蘖、少蘖和单蘖,多蘖最多达到 51 个分蘖,少蘖为 2 到 5 个分蘖。观察到叶片突变体 22 株,突变频率为 1.86%,叶片突变可分为叶片颜色突变体和叶片形状突变体。叶片颜色突变体有 3 种:(1)叶片萎蔫突变体,1 株叶子边缘萎缩和 5 株叶子发黄且

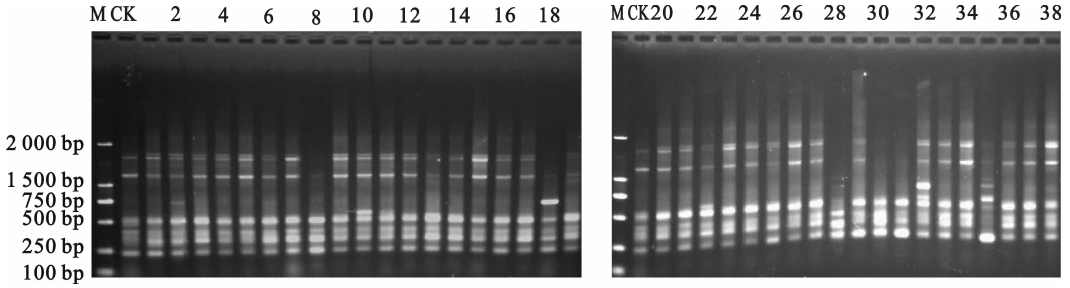
萎蔫,突变频率约为 0.51%;(2)间绿突变体 8 株,整株叶片有黄绿相间的条纹,突变频率为 0.68%;(3)叶斑突变体 4 株,表现叶片上有小黄斑、小白斑,突变频率为 0.34%。叶片形状突变体有 23 株,突变频率为 1.94%,这些突变体可分为 3 类:①卷叶突变体 4 株,表现叶子微微卷曲,突变频率为 2.05%;②细叶突变体 11 株,叶片明显细于对照,最细达 1.1 cm,突变频率为 0.93%;③阔叶突变体 8 株,叶片明显比对照叶片宽,最宽达 3.5 cm,突变频率为 0.67%。不育突变有 4 株,主要变现为花药干瘪无花粉,突变频率为

0.34%。调查中发现,不同单株之间存在多种类型的突变,这些突变性状能否稳定遗传还需进一步鉴定和分析,以便选择出可用于燕麦遗传改良的优异突变体。

2.2 突变体间的遗传变异

以野生型白燕2号基因组DNA为模板,优化PCR反应体系。采用15对引物对M₂代突变体单株进行PCR扩增,均能扩增出稳定清晰的条带(部分扩增结果见图1)。且野生型与突变体间

及突变体之间均有差异条带。15条引物共扩增出99条谱带,多态性条带65条,多态性条带比率为65.7%(表3)。平均每个引物扩增出的条带数为6.6条,多态性条带数为4.3条,多态性片段的百分率介于33.3%~85.7%之间。不同引物扩增出的总带数3~11条不等,其中E4扩增出的条带数最多,为11条;IT32-15扩增出的总带数最少,为3条。E4扩增出的多态性条带最多,为9条,IT32-15扩增出的多态性条带数最少,为1条。



M 为 marker;CK 为白燕 2 号;数字为相应突变体的编号

M is marker; CK is Baiyan 2; Number in the lane indicates the code of the corresponding mutant

图 1 IT34-15 引物在 M₂ 代部分突变体中的扩增结果

Fig. 1 Amplification of primer IT34-15 in partial mutants of M₂

表 3 15 个 ISJ 引物的扩增条带

Table 3 Bands amplified by the 15 ISJ primers

引物名称 Primer Name	每条引物扩增的条带数 No. of bands amplified per primer	扩增的多态性条带数 No. of polymorphic bands amplified	多态性百分率/% Percentage of polymorphic bands
B1	8	6	75.0
R1	4	2	50.0
R2	7	6	85.7
E2	4	3	75.0
E4	11	9	81.8
ET1-18	8	4	50.0
ET2	8	3	37.5
IT1-18	8	5	62.5
IT2-18	7	5	71.4
IT3-18	5	5	83.3
IT31-15	5	4	80.0
IT32-15	3	1	33.3
IT33-15	5	4	80.0
IT34-15	7	4	57.1
IT36-15	8	4	50.0
合计	99	65	65.7

采用 Nei 遗传相似性系数计算方法,计算突变体间的相似性系数矩阵,结果表明,白燕 2 号突变体间的遗传相似系数变幅为 0.667~0.973,最大值为 0.973(样本号 102 与 121 间),表明这两个突变体间遗传变异最小。最小值为 0.667(样本号 123 与 136 间),表明这两个突变体间遗传变

异最大。

根据遗传相似系数将突变材料进行 UPG-MA 聚类分析,构建聚类图(图 2),对聚类结果符合性校验的符合系数 $r=0.856$,表明构建的聚类图与获得的数据符合都较好。由图 2 可看出,137 号被独立划分为一类,与其他突变体间存在较大

的遗传差异。以 0.865 为阈值可将 39 个突变体株系分为七个类群,108、107、129 和 137 分别被独立划分为第 IV、V、VI 和 VII 类群,表明 108、107 和 129 与其它各突变材料间的遗传变异较大。

101、105 和 134 三个株系组成第 I 类群(图 2),第 III 类群包括 112 和 113 两个株系(图 2),第 II 类群包括其余 30 个株系(图 2),这些突变体株系之间还存在一定的遗传差异。

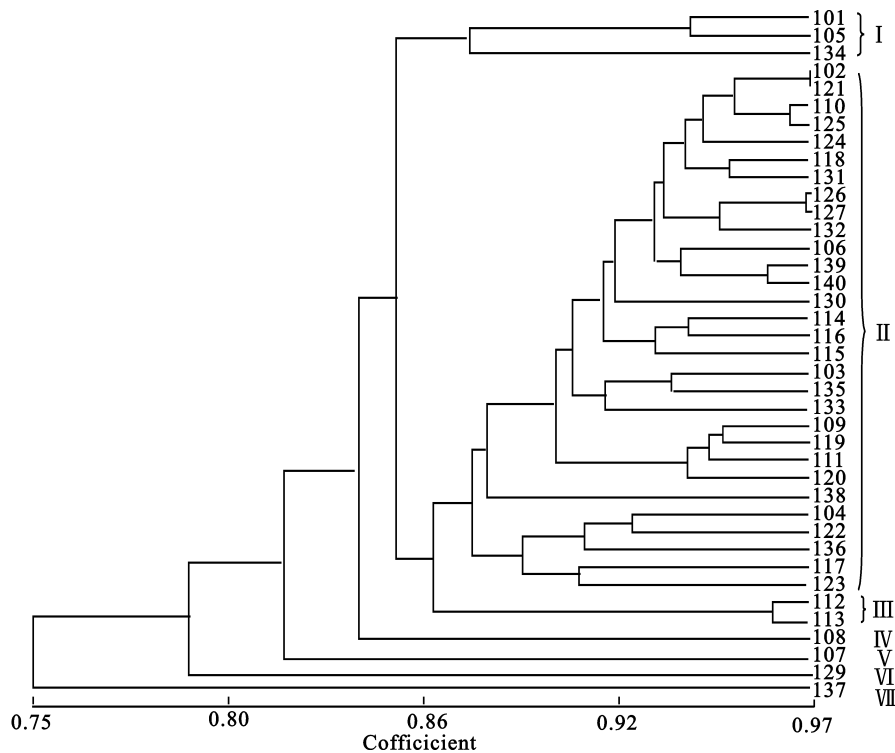


图 2 39 个燕麦 M_2 突变体株系的聚类结果

Fig. 2 Clustering analysis of 39 M_2 oat mutant individuals

3 讨论

通过化学诱变创制作物的突变体,可以产生丰富的遗传变异,为作物的遗传改良研究提供了重要材料。利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变产生点突变的频率较高,已成为拟南芥^[4]、玉米^[5]、大麦^[6]、小麦^[7]等突变体创制的主要技术,创制的突变体已广泛应用于遗传改良与功能基因组学研究。众多的研究^[1,12]表明,浓度太高尽管会获得较大的遗传变异,但获得的突变体较少,浓度太小可能会大大增加突变体的群体,但是会加大突变体选择的工作量。从本研究结果来看,采用的浓度偏高是造成获得突变体群体较小的主要原因,因此需要调整浓度创制新的突变体群体。尽管如此,从初步的观察来看,所获得的燕麦突变体在株高、分蘖、叶片、育性等方面表现出丰富的遗传变异,这一点与相关研究结果^[1,22]一致,特别是其中的矮秆突变体可能会促进燕麦半矮秆品种的选育。这些突变体在其它生物学和农艺性状方面的

变异尚需进一步分析。

突变体群体株系间与株系内的遗传差异对选择合适的突变体非常重要^[23]。一些研究^[24]表明,通常一个 M_1 株系属于一个突变类型,因而提出采用一粒传的方法进行突变体的保存和鉴定等分析,而另一些研究^[25]表明,通常在突变体株系内也存在一定的突变,因而建议从对突变体株系和株系内的单株均作为保存和鉴定的单元。从本研究观察到的结果来看,株系间的突变是主要的,但在株系内也存在丰富的突变,分子标记检测的结果也验证了这一结果。因此建议在突变体后代的处理中要对突变体株系内的突变给予足够的重视,以充分利用创制的突变体。

通常突变体株系间的遗传差异主要是通过表型观察来进行的。近年来,随着分子标记技术的发展,采用定向诱导基因组局部突变(TILLING)技术鉴定候选基因的突变体已广泛应用于拟南芥^[4]、玉米^[5]、大麦^[6]、小麦^[7]等作物中,但是该技术要求已完整克隆候选基因的序列,且仅能检测

目标基因的突变体,而燕麦的基因及基因组序列均很少,加之该技术并不适合从总体上揭示突变体株系间和株系内的变异,而采用随机引物的分子标记却能较快以较低的成本揭示群体内的遗传变异^[12]。本研究也表明利用内含子切接点引物和长随机引物的 PCR 标记分析可以较好地反映突变体株系间的遗传变异,是快速分析突变体间的遗传变异的有效新方法。

参考文献:

- [1] 赵天祥,孔秀英,周荣华,等. EMS 诱变六倍体小麦偃展 4110 的形态突变体鉴定与分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 755-764.
- [2] Wu C Y, Li X J, Yuan W Y. Development of enhancer lines for functional analysis of two rice genome[J]. The Plant Journal, 2003, 35: 418-427.
- [3] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis[J]. Genetics, 2003, 64 (2): 731-740.
- [4] McCallum C M, Comai L, Greene E A, et al. Targeted screening for induced mutations[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18 (4): 455-457.
- [5] Till B J, Reynolds S H, Weil C, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4: 12.
- [6] Caldwell D G, McCallum N, Shaw P, et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley[J]. The Plant Journal, 2004, 40 (1): 143-150.
- [7] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, et al. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23 (1): 75-81.
- [8] 顾佳清,张智奇,周音,等. EMS 诱导水稻中花 11 突变体的筛选和鉴定[J]. 上海农业学报, 2005, 21(1): 7-11.
- [9] Yasui T. Waxy endosperm mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch properties[J]. Breeding Science, 1997, 47: 161-163.
- [10] Chiu W H, Chandler J, Cnops G, et al. Mutations in the *TORNADO 2* gene affect cellular decisions in the peripheral zone of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(6): 731-744.
- [11] Zhu Y, Zhao H F, Ren G D, et al. Characterization of a novel developmentally retarded mutant (*drm1*) associated with the autonomous flowering pathway in *Arabidopsis* [J]. Cell Research, 2005, 15(2): 133-140.
- [12] Olof Olsson, Aakash Chawade, Per Sikora, et al. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 86.
- [13] Wang R, Yu Y, Zhao J, et al. Population structure and linkage disequilibrium of a mini core set of maize inbred lines in China [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117(7): 1141-1153.
- [14] 刘丽华,王丽新,赵昌平,等. 光温敏二系杂交小麦恢复系遗传多样性和群体结构分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(9): 867-875.
- [15] Rafalski A, Gidzinska M, Winiewska I. PCR-based systems for evaluation of relationships among maize inbreds[C]//In: Tsaftaris A ed. Genetics, Biotechnology and Breeding of Maize and Sorghum. Royal Society Chemistry, Cambridge, UK, 1997: 106-111.
- [16] Barros L M, Soden A, Henschke P A, et al. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers[J]. Applied Environment Microbiology, 1996, 62: 4514-4520.
- [17] 孟凡磊,强小林,余奎军,等. 西藏主要农区青稞品种的遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2007, 33(11): 1910-1914.
- [18] 刘杨,黄海,陶建蜀,等. 用改良 CTAB 法从吴茱萸不同组织提取基因组 DNA[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34 (1): 101-103.
- [19] Song W, Henry R. Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction[J]. Genet Resource Crop Evolution, 1995, 42: 273-280.
- [20] Gawel M, Iwona W R. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale [J]. Cellular & Molecular Biology, 2002, 7: 577-582.
- [21] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of National Academic Science in USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [22] 徐艳花,陈锋,董中东,等. EMS 诱变的普通小麦豫农 201 突变体库的构建与初步分析[J]. 麦类作物学报, 2010, 30 (4): 625-629.
- [23] 曹健,李振源,罗少波,等. 博罗福田菜心空问诱变效应研究初报[J]. 广东农业科学, 2006(1): 46-48.
- [24] Dong C M, Jessica D M, Kate V, et al. A Modified TILLING Method for Wheat Breeding [J]. The Plant Genome, 2009, 2: 39-47.
- [25] 徐冠仁. 植物诱变育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.