DOI: 10. 11721/cqnuj20190212

水稻"9311"突变体库的氯酸盐毒性筛选与分析。

刘石锋,陈 倩,洪广成,张汉马,秦小健 (重庆师范大学 生命科学学院 植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室,重庆 401331)

摘要:【目的】用氯酸盐筛选水稻(Oryza sativa)突变体库,分析氯酸盐对水稻的毒性。【方法】使用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulphonate, EMS)处理水稻材料"9311"种子,构建完成了水稻"9311"突变体库。【结果】通过水培法并利用氯酸盐的特性对诱变材料进行筛选,共筛选了2361份诱变M2代材料,且与野生型相比获得了40份对氯酸盐表现差异敏感的材料。【结论】研究结果为进一步的材料创建与相关基因克隆提供了基础,也为水稻硝酸盐吸收与转化相关分子机理的研究奠定了基础。

关键词:水稻;突变体;氯酸盐;差异筛选

中图分类号:Q945.12

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)02-0107-05

水稻($Oryza\ sativa$)是全球主要的粮食作物之一,全世界有一半以上的人口以稻米为主食[1]。在中国,水稻种植具有悠久的历史,水稻种植面积居世界第 1 位。当前,中国国内水稻的播种面积仅占粮食作物总播种面积的 1/4,而产量却占全部粮食总产量一半以上,且约有 60%的中国人口以稻米为食[2]。水稻作为模式作物已被广泛应用在基础研究中[3]。随着水稻全基因组序列测定的完成,水稻基因功能的研究已成为目前研究的热点和重点,构建水稻突变体库是研究水稻基因功能最直接和有效的方法[4]。目前,构建突变体库的方法主要有物理诱变、化学诱变、插入突变及其他方法[5]。物理诱变主要是通过电离辐射诱变研究材料,引起研究材料的 DNA 序列或结构发生变化[6]。最常采用的射线主要包括 γ 射线、X 射线、X 射线、X 中子、X 射线等,其中应用最多的是 X 射线和 X 射线[7]。化学诱变主要通过甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulphonate, EMS)、叠氮化钠、平阳霉素、秋水仙素等试剂处理研究材料[8]。生物诱变主要通过 X 干DNA 插入诱变、转座子介导诱变等手段来对研究材料进行处理[9]。物理诱变和化学诱变具有技术条件较为简便、突变效率比较高的优点,是常用的诱变方法[10]。其中化学诱变剂 EMS 能够诱发基因点突变,而利用点突变可以精确地鉴定基因的功能[11]。

氮是植物生长发育所必需的重要元素,对植物的生长发育起着重要的作用[12]。豆科(Leguminosae)以外的植物对氮的吸收主要依赖于硝酸盐的吸收与还原,其中的同化途径由3个必要步骤组成:1)将硝酸盐还原成亚硝酸盐;2)将亚硝酸盐还原成铵态氮;3)铵态氮在植物体内被吸收利用[13]。虽然现代植物生物学技术发展迅猛,但是对于高等植物硝酸盐吸收途径的第1步骤仍不是很清楚。而氯酸根与硝酸根的分子结构相似,是硝酸还原酶(Nitrate reductase,NR)的竞争抑制剂,可抑制硝酸的还原过程,阻断硝态氮的利用;同时氯酸根离子的大量积累会对植物产生毒害,不利于植物的正常生长[14]。大部分缺乏硝酸还原酶活性的水稻突变系具有抗氯酸盐的特点[15],因此用氯酸盐筛选水稻突变体库,有助于从中找出与硝酸还原酶相关的关键基因,进而揭示硝酸盐吸收与还原的分子机理。为此,本研究利用 EMS 溶液处理水稻"9311"种子,构建了水稻"9311"的突变体库,并用氯酸盐筛选突变体库,获得了一定数量可供进一步研究的实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的水稻"9311"又名扬稻6号,是中籼常规水稻品种,由江苏省里下河地区农科所培育。水稻

^{*} 收稿日期:2018-05-30 修回日期:2019-02-13 网络出版时间:2019-03-15 07:00

资助项目:国家重点研发计划(No. 2016 YFD0100706);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJ1600310)

第一作者简介: 刘石锋, 男, 研究方向为植物学分子生物学, E-mail: 13838657723@163. com; 通信作者: 秦小健, 男, 副教授, 博士, E-mail: ginxiaoijan@cgnu, edu, cn

"9311"品质优良,具有产量高、适应性强等性状,是水稻基因功能研究的模式品种^[16]。水稻"9311"在 2001 年通过了国家品种审定委员会审定,它的全基因组序列测序工作于 2005 年完成^[17]。

1.2 突变体库的建立

诱变处理工作在重庆师范大学根系发育与氮高效利用实验室中完成。首先选取质地饱满的水稻"9311"种子约 500 g,用网袋装好,放入水中清洗,除去表面灰尘;然后用 37 ℃清水浸泡种子过夜;接着将 Na_2HPO_4 与 KH_2PO_4 以 3:2 的质量比配制 $0.1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 且 pH 为 5.8 的磷酸盐缓冲液,并将磷酸缓冲液与 EMS 母液混合,配成 EMS 体积分数为 0.15% 的 EMS 工作液;用吸水纸除去种子多余水分,将种子装入棕色瓶中,并向棕色瓶中加入配制好的 EMS 工作液,放入摇床进行诱变孵育,然后用清水清洗水稻种子,并将种子阴干,于阴干后的第 2 天进行播种 [18]。

1.3 诱变材料的种植

将播种 30 d 后的材料移栽到重庆师范大学生命科学学院水稻试验基地试验田,单株种植,共有 8 000 株左右的 M1 代。在稻穗成熟后分单株收获,每株收获 1~2 穗,共收到大约 8 000 份左右的 M2 代材料,做好编号,放入种子储存柜中。

1.4 M2 代水稻幼苗的培养

采用水培方法对 M2 代幼苗进行培养,用改良后的 Hoagland 营养液,KNO。作为唯一氮源。水稻种子先用溶质质量分数为 20%的 NaClO。溶液浸泡消毒 10 min,接着用清水冲洗,放置在 37 ℃恒温培养箱中过夜,培养催芽^[19];然后将种子转移至带有纱网的培养瓶中,将种子放在纱网上,每个培养瓶中放置 8~10 粒种子,培养瓶放置在植物光照培养箱中。主要培养环境参数如下:光照期间温度为 28 ℃,相对湿度为 70%,光照强度为 260 μ mol·m⁻²·s⁻¹;黑暗期间温度为 23 ℃,相对湿度为 50%。光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗。另外,培养瓶用锡箔纸包住避光以控制其中的藻类生长,每隔 1 天换 1 次培养液。

2 结果与分析

2.1 水稻"9311"幼苗氯酸盐敏感性初步分析

为了研究正常水稻"9311"幼苗对氯酸盐的敏感性,只将改良的霍格兰营养液中的 KNO₃ 替换成 KClO₃。为防止其他无关因素的影响,处理时设置对照组和实验组。设置 1,2 和 3 mmol·L⁻¹的 KClO₃ 浓度梯度,每个梯度重复 3 次。在氯酸盐处理 12 h 后换成 KNO₃ 培养液,恢复培养 3~4 d,其间注意观察水稻幼苗的生长状况,同时进行表型观察,具体结果如封三彩图 1 所示。

从封三彩图 1 可以看出,与对照组相比,用含有 KClO。培养液处理的水稻幼苗呈现出相似的变化:水稻幼苗根长和植株长度变短,叶片卷曲且表面出现黑斑。但在不同浓度 KClO。处理下水稻幼苗的表型也不完全相同。 1 mmol·L⁻¹KClO。处理过的水稻幼苗在经过恢复培养后,成活率达 99%,说明这一浓度的 KClO。对幼苗的影响较小,不足以使幼苗致死。在经过 3 mmol·L⁻¹KClO。处理后,水稻幼苗叶片上的黑斑的面积较大约占整个叶面积的 1/3,叶片卷在一起,根长和植株长度明显短于其他实验组和对照组,幼苗枯萎更加严重;在经过恢复培养后有仅 5%左右的幼苗能够成活,且成活幼苗的生长状态也极差。这表明 3 mmol·L⁻¹KClO。对水稻"9311" 幼苗的处理效果过强。而用 2 mmol·L⁻¹KClO。处理时,虽然水稻幼苗的生长状况与对照组相比也表现极差,但是在恢复培养后幼苗致死率在 $50\%\sim60\%$,并且在恢复培养后幼苗的生理状况良好。这表明 2 mmol·L⁻¹KClO。对水稻幼苗的毒性中等偏上,可在筛选诱变材料时起到有效的筛选作用。

2.2 水稻"9311"M2 代诱变材料的筛选

在确定氯酸盐的浓度为 2 mmol • L⁻¹时处理效果最佳后,从种子储藏柜中按照编号从每个种子袋中挑选 10 粒左右的水稻种子,用正常的水稻种子作为对照组,等到水稻幼苗长到如封三彩图 2 中所显示的状态时,进行 氯酸盐处理。从封三彩图 2 中可以看出,突变体的水稻幼苗长势要略差于正常水稻幼苗,即根长短于后者。用 含2 mmol • L⁻¹KClO₃的培养液处理 12 h后,再用含 3 mmol • L⁻¹KNO₃ 的培养液进行正常恢复生长,2~3 d后进行表型观察并拍照记录,其中部分 M2 代诱变材料表型如封三彩图 3 所示。

封三彩图 3 显示,与野生型相比,进行氯酸盐筛选后的部分诱变材料株系中出现了比野生型更为严重的氯酸盐毒害表型,整个植株变为黄褐色并枯死,即使进行恢复培养后也不能正常生长,如图中红色箭头所示。这可能是与硝酸盐转运相关的基因发生了突变,因而诱变材料比野生型吸收转运更多的氯酸盐,以至于氯酸盐在植

物体内大量积累产生毒害。由此推测这些候选材料在硝酸盐的吸收利用效率方面也应较高。而与之相反的是,有一些诱变材料的生长状况要好于野生型,它们叶片的绿色面积更大,可能是对氯酸盐的吸收较少,产生的毒害较轻。目前国内关于氯酸盐转运与利用的研究主要有:中国科学院遗传研究所储成才团队研究发现了硝酸转运基因 $NRT1.~1B^{[20]}$,南京农业大学徐国华研究团队研究发现了硝酸转运基因 NRT2.~1 等,这些研究成果均揭示了硝酸转运与利用的机理 $^{[21]}$ 。

本研究共筛选了 2 361 份 M2 代材料,综合统计筛选结果发现其中对氯酸盐敏感存在差异的共有 40 份。同时在筛选中还出现了少量的黄化苗和白化苗(叶绿素突变体),白化突变率是 0.25%。鉴于白化突变是衡量 EMS 诱导成功与否的重要指标,因此该结果可以说明本研究中的诱导突变是成功的,所构建的突变体库是可用的。此外,这些筛选出来的白化苗绝大多数在 3 叶期前后因为缺乏叶绿体无法进行光合作用而死亡[22]。在筛选时,同一株系的种子经过氯酸盐处理后还表现出了表型差异,即同一株系的种子在经过氯酸盐筛选并恢复培养后,有些幼苗枯萎致死,有些幼苗生长状况略好于对照组。这可能是由于诱变处理后 M2 代的水稻花粉基因发生了分离,不同的基因相互组合,产生了不同的基因型从而造成了表型差异[23]。通过大规模的筛选,笔者所在研究团队将确定存在差异的材料种植于大田,进一步跟踪观察它们的生长发育状况,从而为后续的群体构建和相关基因初步定位做准备。

3 讨论

水稻是一种重要的模式作物,与它的基因组功能相关的研究越来越受到重视^[24]。传统研究基因功能的遗传学手段分为"正向遗传学"和"反向遗传学"两类。反向遗传学的方法主要有基因转导、反义技术、转基因和基因剔除、染色体转导、RNA 干涉等^[25],而正向遗传学中研究基因功能最直接有效的方法就是构建突变体库,然后通过对突变体表型的研究进而推断出相关基因的功能^[26]。物理诱变和化学诱变具有技术操作简单、突变频率高的优点,能够在较短的时间内获得大量的突变体材料^[27]。笔者所在研究团队前期通过 EMS 诱变剂处理水稻"9311"种子构建了该品种的突变体库,在 M1 代得到了 8 000 份左右的诱变材料。采用氯酸盐敏感差异筛选的方法,最终在 M2 代的 2 361 份的材料中筛选出了 40 个敏感差异株系。有研究报道:氯酸盐的还原反应不仅与NR 的能力相关,而且还与细胞内其他的一些还原反应也有关系。因此,氯酸盐抗性筛选是 NR 缺陷型突变体产生的必要非充分条件^[28],筛选出的敏感差异株系不一定就是 NR 缺陷型突变体,还需要在下一代继续进行重复筛选验证。另外笔者所在研究团队下一步还将做杂交和测交实验,以此来验证基因的显隐性以及是单基因突变还是多基因突变,为后续相关基因的克隆实验做铺垫。此外,鉴于 NR 发挥作用还需要在多种辅酶的参与下完成,因而 NR 缺陷突变体的产生是由多种因素造成的,其中包括硝酸盐的吸收障碍、辅酶的缺失、结构基因突变或正/负调控基因的突变等^[29],因此还要对候选材料作进一步的筛选鉴定。

总之,本研究通过对前期构建的突变体材料进行氯酸盐的严格筛选,经重复验证确定了部分候选差异材料,可以推测出候选材料在硝态氮的吸收利用方面存在一定差异,同时这些候选材料也为后续相关基因的定位克隆和研究硝态氮的吸收、转运和利用机制以及为水稻的氮高效育种奠定了基础。

参考文献:

- [1] 曲志恒. 水稻根系相关性状 QTL 定位[D]. 广州:华南农业大学,2016.
 - QU Z H. Mapping of QTL for root-related traits in rice [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [2] 马冬雪. 水稻空育 131 苗期耐冷候选基因 OsrbcS3 的克隆和功能分析[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2016.

 MA D X. Cloning and functional analysis of a candidate
 - MA D X. Cloning and functional analysis of a candidate cold-tolerant gene *OsrbcS3* in seedling of rice Kongyu 131 [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2016.
- [3] 于仁波. 日本晴/9311 水稻重组自交系重要农艺性状 QTI 定位研究[D]. 长沙:湖南师范大学,2016.

- YU R B. Study on QTl mapping of important agronomic characters of Nipponbare/9311 rice recombinant inbred lines[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2016.
- [4] 符德保,李燕,肖景华,等. 中国水稻基因组学研究历史及现状[J]. 生命科学,2016(10):1113-1121.
 - FU D B, LI Y, XIAO J H, et al. The history and current status of rice genomics research in China[J]. Chinese Bulletin of Life Science, 2016(10):1113-1121.
- [5] 高志勇,谢恒星,王志平,等. 植物突变体库的作用及构建研究进展[J]. 作物杂志,2016(6):16-19.
 - GAO Z Y, XIE H X, WANG Z P, et al. Progress on the function and construction of plant mutant library [J].

- Crops, 2016(6):16-19.
- [6] 耿金鵬. 电离辐射对玉米种质改良的应用研究[D]. 天津: 河北工业大学,2014.
 GENG J P. Study on application of ionizing radiation to maize germplasm improvement[D]. Tianjin: Hebei University of Technology,2014.
- [7] 杨瑰丽,陈莹,郭涛,等. 碳离子束辐照水稻诱变效应及突变体的筛选[J]. 华南农业大学学报,2018,39(2):29-33. YANG G L,CHEN Y,GUO T, et al. Mutagenic effects of carbon ion beam irradiation on rice and screening for induced mutants[J]. Journal of South China Agricultural University, 2018,39(2):29-33.
- [8] 罗文泊. 粗糙脉孢菌物理-化学诱变及分子验证[D]. 长春: 吉林农业大学,2005.

 LUO W B. Physical-chemical mutagenesis and molecular validation of rough neurospora[D]. Changchun: Jinlin Agricultural University, 2005.

[9] 张长正,刘进平,时涛,等.木薯地毯草黄单胞菌转化子 T-

- DNA 插入模式分析[J]. 热带生物学报,2016,7(2):246-252.

 ZHANG C Z,LIU J P,SHI T,et al. T-DNA insertion patterns for the genome of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* transformants[J]. Journal of Troplical Biology, 2016,7(2):246-252.
- [10] 叶俊. 水稻"9311"突变体的筛选和突变体库的构建[D]. 杭州:浙江大学,2006. YE J. Screening of rice "9311" mutant and Construction of mutant library [D]. Hangzhou, Zhejiang University, 2006.
- [11] 杨媛媛. 玉米 EMS 突变体库创建及 opaque 和 CENH3 基因的 TILLING 分析[D]. 成都:四川农业大学,2013. YANG Y Y. Construction of EMS mutant library and TILLING analysis of gene opaque and CENH3 in maize [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University,2013.
- [12] 倪婷. 拟南芥硝态氮调控突变体的筛选与鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学,2016. NI T. Screening and identification of nitrate regulatory mutant in *Arabidopsis*[D]. Taian: Shandong Agricultural University,2016.
- [13] MACKOWN C T. 小麦硝酸盐吸收同化与氯酸盐的耐性 [J]. 麦类作物,1997(1):28-32.

 MACKOWN C T. Absorption and assimilation of wheat nitrate and chloride tolerance[J]. Tritical Crops,1997(1): 28-32.
- [14] 黄旭明,陆洁梅,王惠聪. 氯酸盐在龙眼生产上的运用和研究现状[J]. 中国南方果树,2004,33(3):29-30. HUANG X M,LU J M,WANG H C. The application and research status of chlorate in longan production[J]. South China Fruits,2004,33(3):29-30.
- [15] 宋景荣,徐文静,赵曦,等. 球孢白僵菌硝酸还原酶缺陷型

- 突变体的筛选与鉴定[J]. 黑龙江农业科学,2010(5):3-6. SONG J R, XU W J, ZHAO X, et al. Effect of different plant growth retardants on conservation *in vitro* plantlets of potato [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2010 (5):3-6.
- [16] ODRISCOLL C. IRGSP cracks genome for rice[J]. European Chemical News, 2005, 83(2160):28.
- [17] 汪仁银. 优质中籼稻新品种:扬稻 6 号[J]. 农业科技通讯, 2001(2):34.

 WANG R Y. High quality medium japonica rice variety: Yangdao 6 [J]. Famous and new improved varieties, 2001 (2):34.
- [18] 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.

 GU J Q,ZHANG Z Q,ZHOU Y, et al. Screening and identification of mutants induced from rice Zhonghua 11 (Oryza sativa L. subsp. Japonica) by EMS[J]. Acta Agriculturae Shanghai,2005,21(1):7-11.
- [19] 肖娟,严欢欢,杨永清,等. 不同品种水稻苗期硝态氮吸收与利用效率差异的筛选及研究[J]. 植物生理学报,2016,52(12):1941-1949.

 XIAO J,YAN H H,YANG Y Q,et al. Screening and re-
 - XIAO J, YAN H H, YANG Y Q, et al. Screening and research of different rice (*Oryza sativa*) varieties based on nitrate absorption and utilization in seedlings [J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52 (12):1941-1949.
- [20] DUAN D D, ZHANG H M. A single SNP in NRT1. 1B, has a major impact on nitrogen use efficiency in rice[J]. Science China Life Sciences, 2015, 58(8):827-828.
- [21] FAN X, TANG Z, TAN Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. [J]. PNAS, 2016, 113(26):7118-7123.
- [22] 郑静. 一份水稻白化突变体的遗传分析及其基因定位 [D]. 成都:四川农业大学,2008. ZHENG J. Genetic analysis and gene mapping of a rice albino mutant[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University,2008.
- [23] 魏溪涓. 水稻闭花授粉突变体 fod 的突变基因克隆与功能分析[D]. 金华:浙江师范大学,2015.
 WEI X J. Cloning and function analysis of a cleistogamy mutant in rice (Oryza sativa)[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University,2015.
- [24] 徐小金. 稻瘟病抗性基因资源的挖掘及其育种利用[D]. 金华:浙江师范大学,2016. XU X J. Exploitation and breeding utilization of blast re-
 - XU X J. Exploitation and breeding utilization of blast resistance gene resources in rice[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2016.
- [25] 王雪颖,米丽娜,杨铮,等.基因功能的研究方法[J].中国疗养医学,2017,26(2):131-133.
 - WANG X Y, MI L N, YANG Z, et al. Gene function re-

- search methods[J]. Chinese Journal of Convalescent Medicine, 2017, 26(2):131-133.
- [26] 刘峰. 烟草激活标签突变体库的构建与分析[D]. 北京:中国农业科学院,2014.

 LIU F. Construction and analysis of tobacco activation label mutant library[D]. Beijing: Chinese Academy of Agri-
- [27] 彭慧. 水稻不育系 Y58S 辐射诱变典型突变体农艺性状分析[D]. 南昌:江西农业大学,2014.

cultural Sciences, 2014.

Typical analysis of agronomic traits mutant rice sterile line Y58S radiation mutagenesis D. Nanchang: Jiangxi Agricul-

- tural University, 2014.
- [28] PRIETO R, FERNÁNDEZE. Toxicity of and mutagenesis by chlorate are independent of nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Molecular & General Genetics, 1993, 237(3):429-438.
- [29] 林振武,陈敬祥. 硝酸还原酶作为作物育种的生化指标的研究[J]. 河北农业大学学报,1987,10(3):104-110.
 LIN Z W, CHEN J X. Study on nitrate reductase activity as a biochemical criterion in plant breeding[J]. Journal of Hebei Agricultural University,1987,10(3):104-110.

Screening and Analysis for Rice "9311" Mutant Library by Chlorate

LIU Shifeng, CHEN Qian, HONG Guangcheng, ZHANG Hanma, QIN Xiaojian (Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plants Environmental Adaptations, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To screen the mutant library of rice (Oryza sativa) was screened by chlorate and investigate the toxicity of chlorate to rice. [Methods] The chemical mutagen, ethyl methanesulphonate (EMS) was used to treat the seeds of rice material "9311" and construct the "9311" rice mutant library. [Findings] The rice mutant library was screened by hydroponics and using the characteristics of chlorate. A total of 2361 mutant materials were screened and 40 lines showed a difference in sensitivity to chlorate compared with the wild type. In addition, the phenotypic differences of the 40 materials screened confirmed further candidate materials by further repeated experiments. [Conclusions] The results provided the basis for our further material creation and related gene cloning, and also laid the foundation for the study of molecular mechanisms related to nitrate uptake and transformation in rice. Keywords: rice; mutant; chlorate; differential screening

(责任编辑 方 兴)

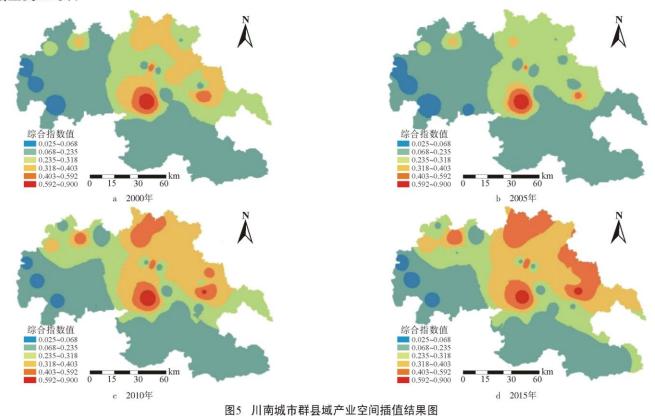


Fig. 5 The results of spatial interpolation in the county area of the southern Sichuan urban agglomeration

(接正文108页)

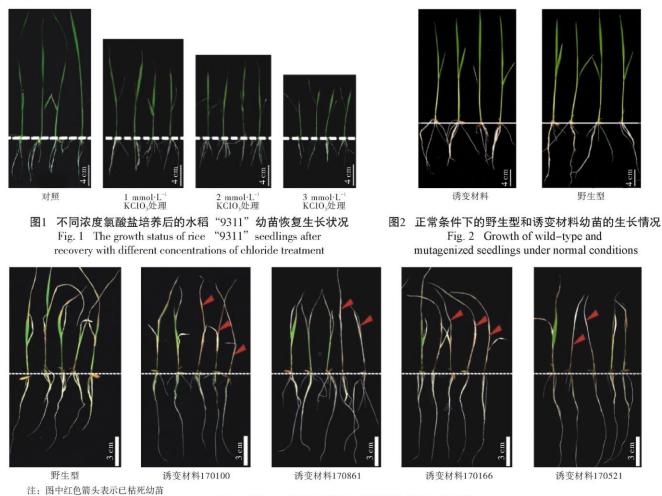


图3 部分M2代诱变材料氯酸盐筛选后恢复生长状况

Fig. 3 The restore growth status of a part of the M2 generation mutagenic material after chlorate screening