碳离子束辐射诱变水稻基因突变嵌合体的分子特征

吕思维 张 莉 张逸妍 张渊海 彭选明 杨 震
（湖南省核农学与航天育种研究所 长沙 410125）

摘要 嵌合体是辐射诱变M_1代普遍存在的现象，然而，有关水稻的嵌合体突变效应及变异遗传机制尚不清楚。本研究采用靶向捕获测序技术获得碳离子束辐照后的*OsNramp5*突变嵌合体，并利用10 kb液相芯片检测该嵌合体的M_1代及突变M_2代基因组的SNP/InDel发生及变异遗传分离特征。结果表明：水稻M_1代嵌合体中检测到的*OsNramp5*基因突变位点未遗传至M_2代，即在M_1代体细胞检测到的突变位点未进入生殖细胞遗传；另外，在M_1基因组突变类型中，转换是颠换的2倍，虽然超过一半变异位点遗传至M_2代，但很少位点来自基因功能编码区。本研究揭示了碳离子束辐照诱变的体细胞M_1代嵌合体的基因组变异特征及其在M_2代的遗传特征，为研究碳离子束辐照后的嵌合体突变效应机制和选择诱变育种程序提供参考。

关键词 碳离子束，辐射诱变，基因突变，嵌合体，遗传变异
中图分类号 Q319，S335
DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0117
引用该文：
吕思维, 张莉, 张逸妍, 等. 碳离子束辐射诱变水稻基因突变嵌合体的分子特征[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2024, **42**(2): 020401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0117.
LYU Siwei, ZHANG Li, ZHANG Yiyan, *et al*. Molecular characteristics of rice chimeras containing gene mutations induced by carbon ion beam radiation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2024, **42**(2): 020401. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2023-0117.

Molecular characteristics of rice chimeras containing gene mutations induced by carbon ion beam radiation

LYU Siwei ZHANG Li ZHANG Yiyan ZHANG Yuanhai PENG Xuanming YANG Zhen
(*Hunan Institute of Nuclear Agricultural Science and Space Mutation Breeding, Changsha 410125, China*)

ABSTRACT Chimeras are universal phenomena in the M_1-generation plants obtained following radiation-induced mutagenesis; however, the mutational effects and variant inheritance mechanisms of related rice chimeras have yet to be sufficiently clarified. In this study, we used target capture-seq technology to obtain *OsNramp5* mutant chimeras via carbon ion beam irradiation, and used a 10 kb liquid chip to determine the SNP/InDel mutational occurrence and genetic isolation characteristics of the chimeric M_1 generation and mutational M_2 genomes. The

基金资助：长沙市自然科学基金(kq2202344)、“十四五”重点研发计划(2022YFD1200702)和国防科工局核能开发科研项目“核辐射作物品种改良与害虫防控”资助
第一作者：吕思维，女，1990年7月出生，2023年毕业于湖南农业大学，现从事水稻辐射诱变资源创制与育种，助理研究员
通信作者：杨震，研究员，E-mail: yz473@163.com
收稿日期：初稿 2023-12-22；修回 2024-02-22
Supported by Changsha Natural Science Foundation (kq2202344), Key Research and Development Project of the 14th Five-Year Plan (2022YFD1200702) and Nuclear Energy Development Research Project of State Administration of Science, Technology and Industry for National Defense, namely “Crop Varietal Improvement and Insect Pests Control by Nuclear Radiation”
First author: LYU Siwei (female) was born in July 1990, graduated from Hunan Agricultural University in 2023. Currently she works as an assistant professor engaging in rice radiation mutagenesis resource creation and breeding
Corresponding author: YANG Zhen, professor, E-mail: yz473@163.com
Received 22 December 2023; accepted 22 February 2024

results revealed that the mutation detected in the *OsNramp5* gene of M_1 chimeric rice was not inherited by the M_2 generation; that is, the mutation detected in somatic cells of the M_1 population was not passed to the subsequent generation via the germ cells. In addition, conversion was established to be twice as common as transversion among the M_1 genomic mutation types, although more than half of the variant sites were inherited by the M_2 generation. However, these sites were rarely located within the functional coding regions of genes. Our findings in this study revealed the genomic variation characteristics of somatic M_1-generation chimeras induced by carbon ion beam irradiation and their genetic characteristics in the M_2 generation. These findings will provide a reference for further studies that seek to elucidate the mechanisms underlying chimeric mutation effects and for selecting appropriate procedures for mutagenesis breeding following carbon ion beam irradiation.

KEYWORDS Carbon ion beam, Irradiation mutagenesis, Gene mutation, Chimera, Heritable variation

CLC Q319, S335

水稻（*Oryza sativa* L.）养育了世界近一半人口，与世界粮食和营养安全密切相关[1]，成为作物诱变育种的首选。诱变育种不仅可加速作物新品种开发与改良，增强环境适应性[2-3]，而且可拓宽遗传变异和生物多样性[4]。诱变育种主要利用不同理化因素[5]，在全基因组引起DNA遗传物质损伤簇，包括核苷酸碱基损伤（Base lesion）、DNA单链（SSBs）和双链断裂（DSBs）[6]，产生大量遗传变异，而这通过杂交育种和基因编辑育种程序则难以实现。其中，物理诱变相比化学诱变在突变育种中更加友好和环保，目前，FAO/IAEA数据库（http://mvgs.iaea.org）登记的突变体中近乎一半来自γ射线辐照[7]。近年来，具有较高传能线密度、高突变频率和宽突变谱等特性的离子束被认为是一种高效诱变剂[7-9]，在相对较低的剂量下，诱导突变效率较高，且不会严重抑制生长[10]。休眠的植物种子是诱变育种中最常用的材料[2]。植物种子胚组织由多细胞组成，辐射诱变是一个靶细胞事件过程，即胚中仅个别细胞在射线诱变处理下发生突变，由这种带有突变基因的细胞和非突变基因的细胞的种子长成的植株和穗子称之为突变嵌合体[11]。然而，只有经生殖细胞传递的突变对有性繁殖的植物才有利用价值，因此，从分子层面解析嵌合体突变细胞中的基因变异特征及传递能力，对于制定作物诱变育种选择程序及M_2代诱变选择群体大小具有重要意义。受技术局限，前人研究了诱变M_1~M_3代突变表型及嵌合体特性[11-14]，例如大麦M_1穗花粉粒的蜡质特性[15]以及M_2代幼苗的叶绿素突变表型及嵌合体突变频率[16]，但对单子叶水稻突变嵌合体的分子特征研究尚未充分报道。

近年来，因高通量测序技术进步和全基因组序列突变分析的发展，高通量单核苷酸多态性（Single-nucleotide polymorphism，SNP）芯片推动了基因组选择在育种实践中的应用，如水稻中已设计开发了不同密度（6 kb、7 kb、44 kb、50 kb、56 kb、700 kb）的芯片[17-22]。基于SNPs的靶向测序基因型分型（Genotyping by targeted sequencing，GBTS）技术，能在液态中利用生物素修饰的目标探针与靶向序列杂交进行定点捕获和检测，成为继传统基因型检测技术和固相芯片后，兼顾基因型检测成本和分子育种效率的新型高通量分子检测技术[23-24]。本研究采用一套多基因液相靶向捕获测序技术，在M_1代获得了一个碳离子束辐射诱导的*OsNramp5*基因突变嵌合株，通过10 kb液相芯片分析SNPs变异，旨在揭示M_1代嵌合体的基因组变异特征以及其在M_2代的遗传特征，以期为重离子束辐射诱变育种应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为湖南省核农学与航天育种研究所于2016年利用γ射线诱变处理的赣引5号/丰八占干种子，经多代选育定型而成的耐热性强的水稻新品系湘辐1822风干种。

1.2 $^{12}C^{6+}$诱变处理及M_1代种植

风干的水稻种子于2021年4月在中国科学院兰州近代物理研究所重离子加速器国家实验室，采用80 MeV/u的$^{12}C^{6+}$离子束辐照处理。种子量约为2 000粒，吸收剂量设为120 Gy。随后在湖南省农业科学院高桥试验基地播种，25 d左右秧龄进行单本移栽，M_1诱变群体进行严格隔离，防止串粉。水稻抽穗期在M_1代单株按对角线分别挂牌采集叶

片，标记分蘖穗，方便后续取样追踪，待成熟收获后统计嵌合突变株的穗长、实粒数、空壳数和每穗结实率等。

1.3 M_2代种植及基因分型

收获M_1代嵌合杂合突变分蘖穗的种子，形成M_2代群体种子，于当年冬季在三亚进行单本移栽，共移栽284株。为获得突变纯合单株，生长至抽穗期分单株采集叶片，进行KASP分型，由华智生物技术有限公司完成。KASP标记检测参考He等[25]流程，三条引物分别为：正向特异引物F1：GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGAGCCTCATCGTCTCCATCA；正向特异性引物F2：GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGAGCCTCATCGTCTCCATCG；反向通用引物：CTGACCGAAGCGATGATGATGAG。

1.4 DNA提取

在M_1和M_2代诱变群体分蘖盛期取叶片（M_1按单株挂牌分蘖穗采集叶片，每100个单株叶片等量混样；M_2代按单株采集叶片），采用CTAB法提取基因组DNA[26]，微量紫外分光光度计检测DNA浓度和纯度。

1.5 水稻10 kb液相芯片SNPs标记

水稻10 kb液相芯片（包括10 325个高多态性SNPs）标记依托湖南杂交水稻研究中心完成。参考Guo等[23]设计一组探针，每个探针120个碱基数，GC含量大于30%，用于检测每个SNP侧翼区域，并评估了参考基因组中每个SNP区域的所有探针的特异性，每个SNP被两个交叉覆盖探针捕获。根据样本的平均缺失率和平均测序深度对所有SNPs进行质量控制，剔除检出率小于90%的个体，最终M_1代和M_2代中保留9 730和10 038个标记。10 kb液相芯片在染色体的密度分布见图1（于https://www.bioinformatics.com.cn网站绘制）。

1.6 基于液相DNA探针靶向捕获测序技术

Gene bank数据库中查找目的基因，于Oligo6.0软件设计特异性分子探针引物，委托艾柏森生物科技有限公司合成标记有生物素的分子探针（图2）。参考Guo等[23]的方法构建DNA文库并进行探针杂交。简言之，提取的基因组DNA进行片段化和末端修复，添加Poly A尾巴，连接测序接头、纯化、PCR扩增，用不同的条形码序列对200~300 bp大小的连接产物进行索引，获得的DNA文库用Tris-HCl在pH=8.0下洗脱。探针杂交时，取500 ng文库DNA、5 μL GenoBaits Block I和2 μL GenoBaits Block II于试管中混合，真空干燥；再将干燥粉末与杂交缓冲液混合，在PCR仪中65 ℃孵育2 h进行文库杂交；然后加入100 μL的GenoBaits带DNA探针的磁珠捕获靶点序列，再对靶点序列进行洗脱、文库扩增。采用Qubit 2.0荧光仪（Thermo fisher scientifc，CA）检查DNA文库质量；用illumina平台测序，去除低质量的Reads，剩余的干净Reads通过BWA软件[27]比对到水稻日本晴参考基因组，采用SAMTOOLS软件[27]检测个体SNPs和InDels变异情况。

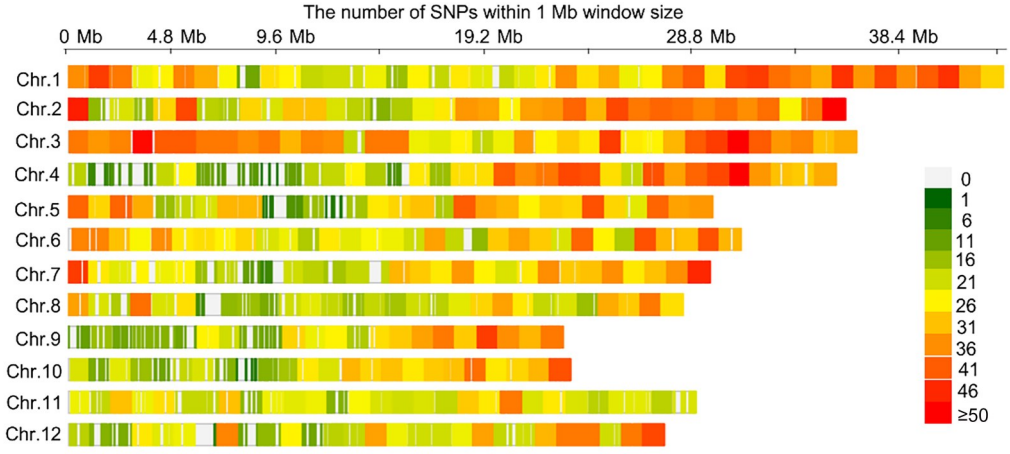

图1 水稻10 kb（10 325 SNPs）液相芯片的SNPs的密度分布（彩色见网络版）
Fig. 1 SNPs density distribution of rice 10 kb (10 325 SNPs) liquid chip (color online)

Os07t0257200-1：GTCACTACCACCATTCTCTTCTTCGTCTACTTCCAGCTAGCCTGAGCTCTAGCTTAGCTCTAGCTTAGCCTGAAGAAGCTAAGAGAGGAAGCAACAATGGAGATTGAGAGAGAGAGCAGT
Os07t0257200-2：GAGAGAGGGAGCATCAGCTGGAGAGCTAGTGCGGCACATGATCAAGATGCCAAGAAGCTCGACGCAGATGATCAGCTGCTAATGAAGGTCAGTTGCTACCTTAATTATCACAAAGTTGTC
Os07t0257200-3：GTTAGTTTCTCAGTTTTGGTAAATTGTGTACAGGAGCCTGCATGGAAAAGGTTCCTTGCCCATGTTGGTCCTGGATTCATGGTGTCTTTAGCCTACTTGGATCCTGGCAATTGTGAGAAT
Os07t0257200-4：TGTCACAAAATGAAACAGTGGAAACCGATCTGCAAGCCGGAGCCAACCACAGATATGAGGTACGTACAGTCGACTTTATTTTACTGTTTACGCACTGAATGACTGAAAGCATGAGTAACT
Os07t0257200-5：AGCTGCTCTGGGTGATTCTGATTGGACTCATCTTCGCACTTATCATACAGTCGCTAGCAGCTAATCTTGGAGTGGTTACAGGTGACTAAATGACACGCAATTAAACTGTAATTACCAACT
Os07t0257200-6：TCCTAGGGAGGCATCTGGCTGAGATCTGCAAGAGTGAGTACCCCAAGTTCGTCAAGATTTTCCTATGGCTGCTGGCAGAGTTGGCCGTCATCGCTGCAGATATCCCAGAAGGTATATACT
Os07t0257200-7：TGCAGTTATAGGGACGGCCTTTGCTTTCAACATATTGTTCCATATTCCGGTGTGGGTCGGCGTCCTCATCACCGGCACCAGCACTCTACTGCTTCTTGGCCTCCAAAAATACGGGGTATA
Os07t0257200-8：TTTCTGATATCGATGCTGGTGTTCGTGATGGCGGCGTGCTTCTTCGGGGAGCTGAGCATCGTGAAGCCttGGCGAAGGAGGTGATGAAGGGGCTCTTCATCCCCAGGCTCAACGGCGAC
Os07t0257200-9：ACGCAACAATCAATCAATTAATTCATACAACTAATCAGTTAATTAACTACTGCATGCATTTATATATATGCAGCCACAATCTGTTCTTGCATTCTGCCTTGGTGCTATCGAGGAAGACAC
Os07t0257200-10：AGCCACAATCTGTTCTTGCATTCTGCCTTGGTGCTATCGAGGAAGACACCGGCATCAGTCAGAGGAATCAAGGTAGCTATATTCAGCCTGGGCAGATCGAGATAGGTATAGGGTAGCTAG
Os07t0257200-11：ATATATGCAGCCACAATCTGTTCTTGCATTCTGCCTTGGTGCTATCGAGGAAGACACCGGCATCAGTCAGAGGAATCAAGGTAGCTATATTCAGCCTGGGCAGATCGAGATAGGTATAGG
Os07t0257200-12：ATCCAGGCTAATAATTAATATGTACTATATGGTGTGTGAATTGCCACGTAGGACGGGTGCAGGTTCTTCCTGTACGAGAGCGGGTTCGCGCTGTTCGTGGCGCTGCTGATAAACATCGCC
Os07t0257200-13：AGAGGACGCCGACAAGTGCGCCAACCTCAGCCTCGACACCTCCTCCTTCCTTCTCAAGGTCATTCATTCATTATTACTTCCTACTCCTTAATATTAAAAATTTTTAAATGGATTAGACGT
Os07t0257200-14：TCAGAACGTGCTGGGCAAGTCGAGTGCGATCGTGTACGGCGTGGCACTGTTGGCATCTGGGCAGAGCTCCACTATTACCGGCACATACGCTGGACAGTACATCATGCAGGTAATTAATTA
Os07t0257200-15：GTGCATGCAGATGATACTGTCCTTCGAGCTGCCGTTTGCTCTCATCCCTCTTCTCAAGTTCAGCAGCAGTAAGAGCAAGATGGGGCCCCACAAGAACTCTATCTATGTAAGATCGTACAC
Os07t0257200-16：GATAATAGTGTTCTCGTGGTTCCTGGGTCTGCTCATCATCGGCATCAACATGTACTTCCTGAGCACGAGCTTCGTCGGCTGGCTCATCCACAACGACCTCCCCAAGTACGCCAACGTGCT
Os07t0257200-17：CTCGTCTACATCGTCGCtGTtGTtTACCTCACCATCAGGAAGGACTCCGTCGTCACCTTCGTCGCCGACTtCTCtCTCtGCtGCtGTtGTtGACGCCGAGAAGGCCGACGCCGGCGACCT
Os07t0257200-18：AGCCCTTGCCGTACCGCGACGACCTGGCCGACATCCCGCTCCCAAGGTAGAGAAGAAGAAGATCGACATGCATACGTATGGTATAGCGTATGTATACGTACGTATATACGCGTACATTGT
Os07t0257200-19：TGTATACGTACGTATATACGCGTACATTGTGAATATACGTACTTACGTACGTATATGTGCATCCTCTATGGATGCCACGTGCGTGCGTCGGAGCCGTTCGTTTATATTTGTGCGGTCCAG
Os07t0257200-20：ATCGCTCGCAGATCGATCGATCGACAAGGGTGTGCAATTAATATATAAGCATTTGAGGGGAGGTGGCTCATGTATCCTTGTAATTTATATGTACGATATGATTTATCATAATTCAGGGCA

图2　*OsNramp5*基因分子探针序列
Fig. 2　Molecular probe sequence of the *OsNramp5* gene

1.7　目标性状*OsNramp5*基因突变验证

筛选到的候选*OsNramp5*基因的突变位点进行靶特异性PCR，采用引物为F：5'-GGTTTCTTGGACATCAGGATG-3'；R：5'-AGCTACATAAATCCGCACGA-3'。使用Genstar试剂盒扩增目标区域，PCR产物由生工生物工程（长沙）有限公司进行Sanger测序，确定突变类型。

2　结果与分析

2.1　M_1代*OsNramp5*基因嵌合体突变位点及农艺特征

基于制备的液相DNA探针靶向捕获测序技术，对碳离子束射线诱变的湘辐1822的M_1代单株进行筛选，发现编号A92的混池中在*OsNramp5*基因第11外显子8874008-8874013位点处发生6 bp缺失（GCCGAT/-），确定存在一个杂合突变位点。取该单株的8个分蘖穗叶片，提取DNA，根据该突变位点设计特异性分子引物进行PCR扩增并Sanger测序，结果见图3。其位于同侧相邻的穗M-92、M-1、M-2、M-4为杂合突变基因型（图3（b）），相邻穗W-93、W-3、W-5、W-6未发生突变（WT）（图3(c)），呈现明显的嵌合扇形体突变模式（图3(a)）。对该基因突变嵌合单株进行农艺性状考察（表1），每穗结实率均低于50%，平均结实率为40.37%，植株育性下降，表现出明显的生物损伤效应。

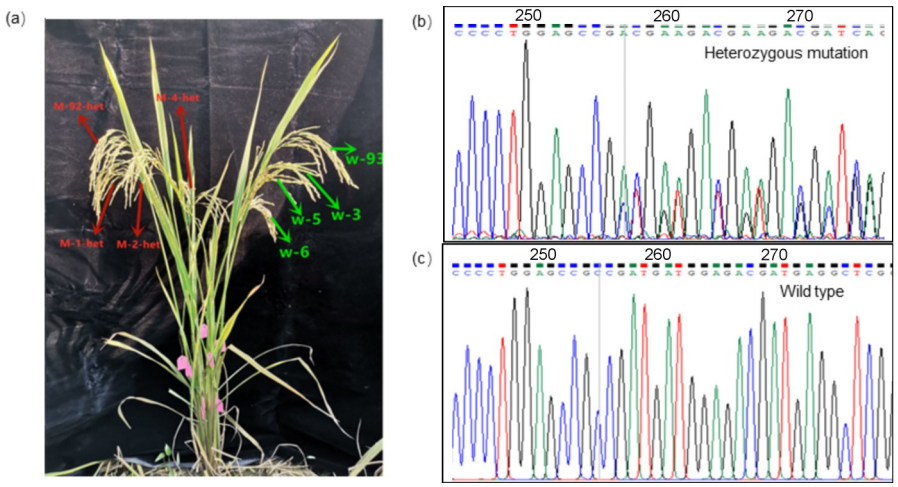

图3　水稻*OsNramp5*基因突变位点分析：(a)水稻*OsNramp5*基因突变嵌合株的扇形突变模式；(b)水稻穗杂合突变型测序结果；(c)水稻穗野生型测序结果（彩色见网络版）
Fig. 3　Analysis of *OsNramp5* mutations in rice: (a) fan-shaped mutated pattern of rice chimeric line with *OsNramp5* gene mutation; (b) heterozygous mutant sequencing result of rice panicle; (c) wild-type sequencing result of rice panicle (color online)

表1　*OsNramp5*基因突变嵌合株农艺性状
Table 1　Agronomic traits of chimeric line with *OsNramp5* gene mutation

穗编号 Panicle No.	穗长 Panicle length	实粒数 Full-grain count	空壳数 Unfilled-grain count	总粒数 Total grain count	结实率 / % Seed-set rate
M-92	28.8	142	171	313	45.37
M-1	26.7	113	149	262	43.13
M-2	21.4	65	74	139	46.76
M-4	21.4	56	78	134	41.79
W-93	25.3	129	214	343	37.61
W-3	25.0	102	114	216	47.22
W-5	25.8	107	120	227	47.13
W-6	30.5	101	284	385	26.23
平均 Mean	25.6	102	151	253	40.37

2.2　M_1穗嵌合株SNPs变异特征

SNP是DNA基因组中最丰富的变异序列[28]。选择多态性高的10 kb液相芯片对M_1基因突变嵌合株的几个分蘖穗进行检测（平均测序深度14×），10 325个SNPs标记均匀分布于水稻的12条染色体上（图1），与日本晴参考基因组序列（Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0）比较，在选择的9 730个有效位点中，发现大量SNPs和少量InDels突变。SNPs变异在各染色体基因组不同结构域的占比，以内含子区域（20%~31%）和基因间隔区域（18%~29%）最多，其次是占比约15%的外显子区域（图4(a)）。而根据碱基替换的不同，SNPs变异又分为转换（C∶G > T∶A和T∶A > C∶G）和颠换（C∶G > A∶T，C∶G > G∶C，T∶A > G∶C，T∶A > A∶T），平均转换（Transition，以T_i表示）与颠换（Transversion，以T_v表示）的比率（T_i/T_v）为1.83（图4(b)）。因此，基于背景基因组差异，不同品种间存在显著的SNPs多态性，可用于评估特定遗传变异。

继续分析该M_1基因突变嵌合株与湘辐1822（野生型，CK）之间的SNPs变异，该单株的8个分蘖穗与CK的遗传背景相似度在99.65%~99.77%，除*OsNramp5*基因6 bp缺失位点外，共存在66个检测位点变异，非均匀分布在12条染色体，且其小部分变异发生在编码基因的外显子区，可能影响基因转录和翻译。具体见表2和图5。

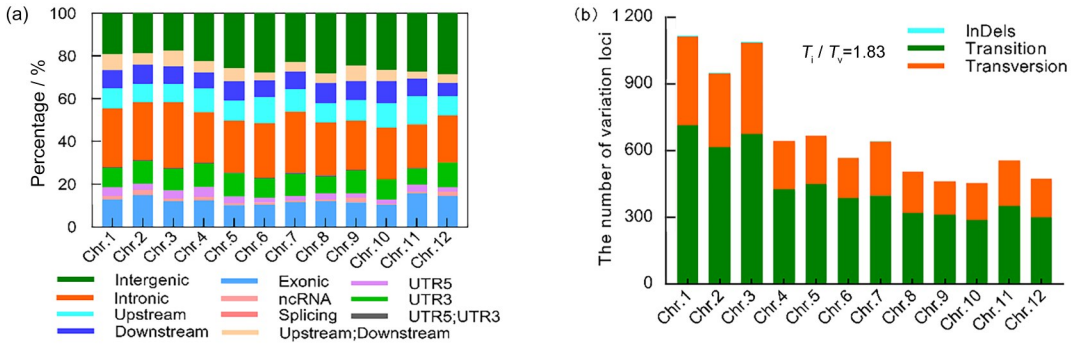

图4　水稻M_1嵌合突变株基因组测序变异位点分析：(a)SNPs变异在M_1全基因组不同结构域的占比；(b)M_1全基因组上SNPs替换类型的变异位点数（彩色见网络版）

Fig. 4　Genome sequencing variation locus analysis in rice M_1 chimeric mutant: (a) the proportion of SNP variation in different structural domains of whole M_1 genome; (b) the variant loci number of SNP substitution types on whole M_1 genome (color online)

表2　M_1代*OsNramp5*基因穗嵌合体的SNP等位变异

Table 2　SNP allele variation among *OsNramp5* chimeric panicle mutants in M_1 population

样品名称 Sample name	编号 Code	与CK相似度 / % Similarity percentage to CK	相似性分析 Similarity analysis		
			SBS突变数（外显子区） Single-base-substitution mutation count (SBS in exon region)	InDel突变位点 InDel mutation loci	*Nramp5*基因型 *Nramp5* genotype
92-1	M-1	99.73	25（2）	1	杂合型 Heterozygous
92-2	M-2	99.75	22（3）	2	杂合型 Heterozygous
92-4	M-4	99.71	27（1）	1	杂合型 Heterozygous
92	M-92	99.74	24（0）	1	杂合型 Heterozygous
92-3	W-3	99.74	24（3）	1	野生型 Wild type
92-5	W-5	99.77	21（1）	1	野生型 Wild type
92-6	W-6	99.72	26（2）	1	野生型 Wild type
93	W-93	99.65	34（5）	0	野生型 Wild type

注：野生型：待测样品中*OsNramp5*位点未突变，与CK一致；杂合型：*OsNramp5*位点发生缺失突变，表现杂合型。

Note: Wild type: no mutation at *OsNramp5* locus in predicted sample, the same detection to CK; Heterozygous: deleted mutation on *OsNramp5* gene locus and performed heterozygous.

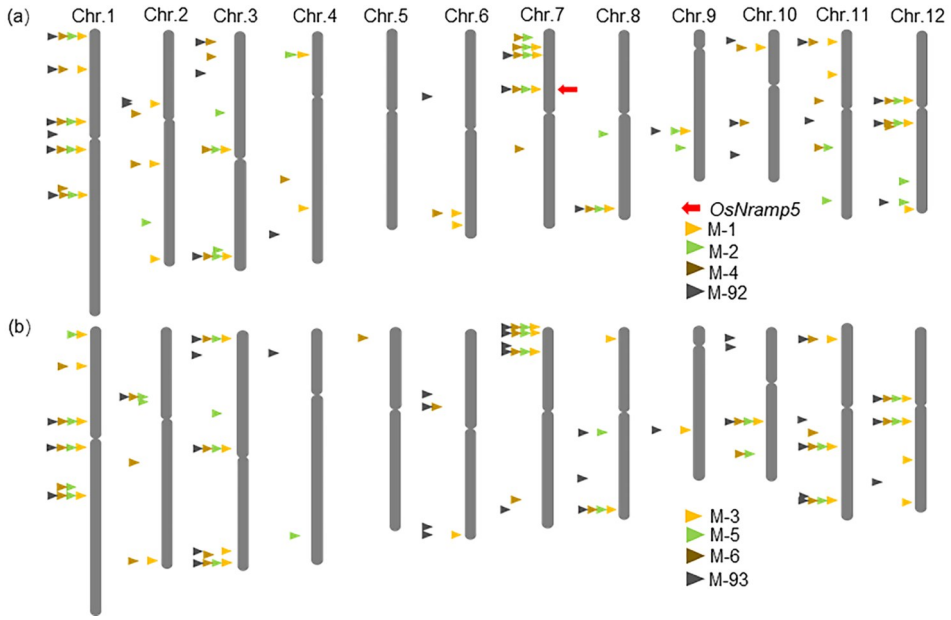

图5　嵌合突变株穗系与CK的全基因组差异位点：（a）*OsNramp5*突变穗系的变异位点；（b）*OsNramp5*野生型穗系的变异位点（彩色见网络版）

Fig. 5　Differential sites located on genome between chimeric mutant and CK: (a) the variation sites of panicle with *OsNramp5* mutation; (b) the variation sites of panicle without *OsNramp5* mutation (color online)

2.3　M_2突变杂合穗*OsNramp5*基因分离情况

重离子照射诱导的基因突变在M_1代表现为突变杂合型。为验证*OsNramp5*基因的M_1嵌合突变是否为可遗传变异及获得纯合型突变，我们对采集的284株单株取叶片进行KASP分型。*OsNramp5*基因分型结果全部为野生型，无杂合型和纯合型突变出现（图6（a））。然而，对长沙移栽到海南的原始突变稻蔸再生分蘖进行分型，结果分蘖的11个穗中，有5个穗为突变杂合体，6个穗为野生型，仍然保留突变嵌合体特征（图6（a）、（b））。因此，基于M_1稻蔸和M_2群体KASP基因分型，M_1代*OsNramp5*基因缺失突变并未遗传至M_2代。

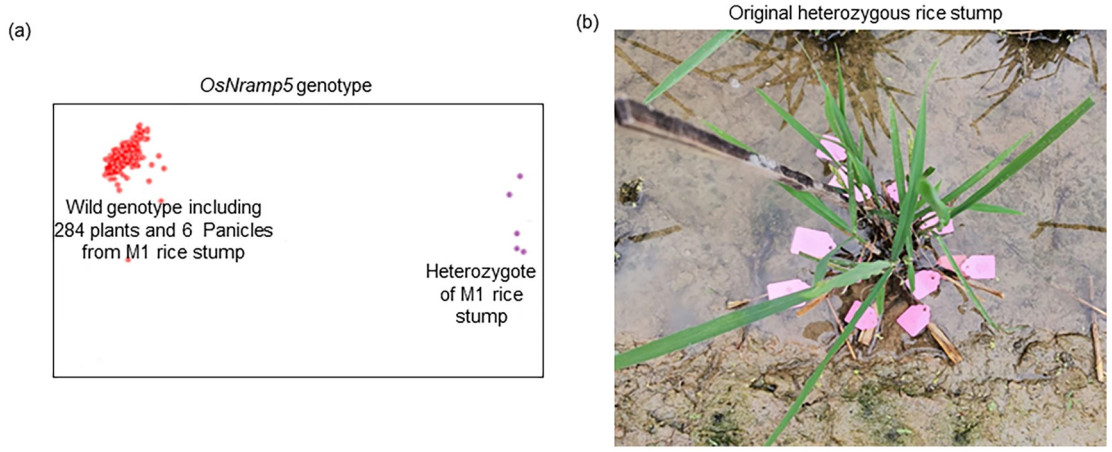

图6 *OsNramp5*基因分型：(a)原始杂合稻蔸及M_2代的284单株的*OsNramp5*基因分型；(b)原始杂合稻蔸的再生分蘖（彩色见网络版）

Fig. 6 *Osnramp5* genotype: (a) the *Osnramp5* genotype of the original heterozygous rice stump and 284 per plant in M_2 generation; (b) regenerated tillers of original heterozygous rice stump (color online)

2.4 M_2代SNPs变异及遗传特征

为探究M_1代基因组其他的SNPs变异位点是否遗传，本研究随机选择M_1代*OsNramp5*基因突变杂合穗M-92播种的M_2代的11个单株(M_2-1~M_2-11)进行了SNPs检测。在10 038个有效标记中，M_2与M_1(M-92)代的遗传相似度在99.16%~99.24%，M_2代基因组发生124个SNP/InDels(<50 bp)(表3)，纯合突变多，杂合突变少(图7(a))；其中InDels占比18.5%，包括短InDels(<3 bp)9.7%(图7(b))；替换的SNPs类型为T_i/T_v=1.66(图7(b))，与报道的突变累积系自发性值(T_i/T_v=2.73)[29]有显著差距，表明辐照诱导的突变更频繁。

前面检测到M_1代突变穗M-92中除*OsNramp5*基因缺失杂合突变外，基因组还有25个SBS变异(表2)，且变异类型转换是颠换的2倍(图8(a))。继续分析它们在M_2代11个单株的遗传变异情况，发现其中部分(14个，56%)遗传；部分(10个，40%)回复突变；1个发生单碱基缺失变异(图8(b))，表现了高多态性SNP的遗传保守性。另外，M_2代变异频率显著高于M_1代(表2~3)，诱变的M_1嵌合体引起的遗传变异在M_2代发生遗传分离(图8)，由此从M_2代进行突变选择更为准确。

表3 ***OsNramp5*嵌合突变体M_2代的SNPs变异率**

Table 3 SNPs variation rate of *OsNramp5* chimeric mutant in M_2 generation

M_2编号 M_2 code	与M_1相似度 / % Similarity percentage to M_1	与M_1差异位点 Number of differential sites with M_1	变异位点中M_1占比 / % Percentage of M_1 in variant loci
M_2-1	99.20	80	12.5
M_2-2	99.18	82	14.6
M_2-3	99.20	80	11.3
M_2-4	99.18	82	13.4
M_2-5	99.21	79	13.9
M_2-6	99.24	76	13.2
M_2-7	99.21	79	13.9
M_2-8	99.23	77	14.3
M_2-9	99.16	84	10.7
M_2-10	99.19	81	13.6
M_2-11	99.24	76	11.8
M_2	—	124	10.5

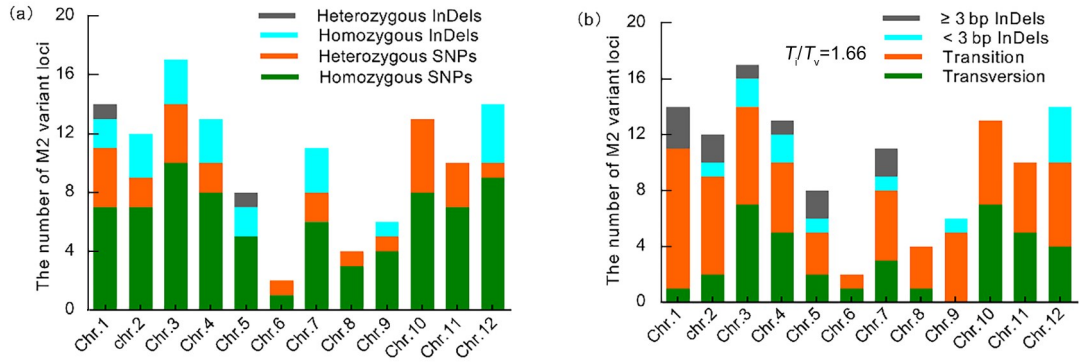

图7 *OsNramp5*嵌合突变体M_2代变异类型：(a)M_2代SNP/InDel杂合与纯合变异位点数；(b)M_2代不同SNPs替换类型的变异位点数(彩色见网络版)

Fig. 7 Variation types in M_2 generation of chimeric mutant with *OsNramp5* mutation; (a) the number of heterozygous and homozygous SNP/InDel variant locus in M_2 generation; (b) the variant loci number of different SNP substitution types in M_2 generation (color online)

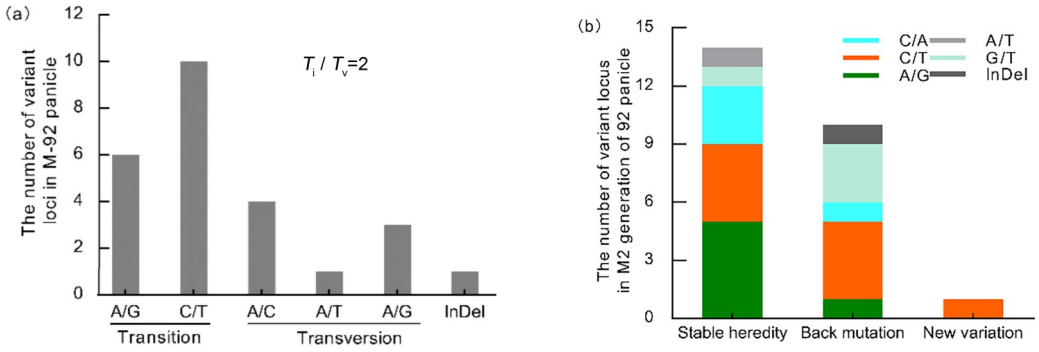

图8 M_1代全基因组变异类型及遗传方式：(a)*OsNramp5*突变穗M-92的替换类型及变异位点数；(b)M-92基因组变异的遗传方式和SNP位点数(彩色见网络版)

Fig. 8 Variation types and its inheritance of whole-genome in M_1 generation: (a) the substitution types and variant loci number in M-92 panicle with *OsNramp5* mutation; (b) genetic variation pattern and SNP number of M-92 genomic variation (color online)

3 讨论

辐照种子可以诱导基因组随机突变，构建突变体库，从而在后代中选择具有利用价值、可遗传的单株培育成新品种。碳离子束辐照诱导突变效率高，在生长抑制、致死性等方面具有较高的相对生物学效应[9]。本研究通过液相DNA探针靶向捕获技术并一代测序验证，在M_1群体获得6 bp缺失的*OsNramp5*基因杂合突变嵌合体（图3）。该嵌合突变穗M_2代基因分型均为野生型，而稻蔸仍为嵌合体（图6），表现M_1代检测到的*OsNramp5*基因杂合突变并未进入生殖细胞遗传至M_2代。而前人报道嵌合突变如果不发生在变异细胞的LII层（即孢原细胞），突变将不能通过有性繁殖遗传给下一代[30]。Stewart等[31-32]提出植物生长点原基（SAM）的三层细胞依次发育成：植物的表皮细胞、内皮层和生殖细胞（花粉和卵细胞）、内层薄壁细胞和导管系统；普遍认为配子体（种系）是由SAM组织LII细胞发育而来[33]。而且嵌合体的嵌合稳态的持续取决于顶端分生组织不同遗传细胞镶嵌位置和分裂模式，以周缘嵌合体十分稳定，而扇区型嵌合体很不稳定，杂合基因型容易消失[34]，很可能是配子体来自非LII细胞[33]。由此推测*OsNramp5*基因嵌合体突变很可能不发生在发育成配子体的LII细胞。

电离辐射诱导的植物全基因组突变认识更依赖于对诱变M_2或其后代的分析[7,35-37]，以致M_1代杂合体细胞中的突变发生和遗传特征鲜少被研究。本研究确定了单个体细胞的突变株（图6）。通过高多态性10 kb液相芯片降低基因组检测的复杂性

并提供可靠数据，扇形嵌合体的全基因组测序中8个穗的SNPs变异基本一致，且极少发生在外显子编码区，其突变穗M_2代SNPs变异数增加（表2~3），证实基因变异的保守性以及M_2代具有更多变异，是突变选择的关键时期。为揭示M_1杂合突变位点的遗传规律，跟踪了M_1杂合突变穗与其M_2分子谱变异类型，发现SBS中倾向G：C>A：T转换，M_2比M_1具有更高突变频率，但均介于快中子诱导（T_i/T_v=1）和自发突变（T_i/T_v=3）之间[38]。前人解释这种碱基偏倚取代可能是由氧化性DNA损伤产生的碱基修饰引起的[39-41]，主要源于甲基化胞嘧啶的脱氨作用[29]。而且，在种子繁殖植物中，因物种保护机制，大缺失和染色体重排的细胞一般不参与存活配子或种子的形成，大多数DNA损伤通过同源重组（HR）、非同源末端连接（NHEJ）、错配修复（MMR）等多种机制减少或修复损伤。其中HR和NHEJ通常分别被认为无误和易错地修复，最近的研究却发现以上两者都有可能引起碱基对替换、插入/删除和染色体重排，而修复过程中出错得以保存下来的突变可以遗传[7,42]。以上观点与本文的研究结果相符合，M_1突变穗中超过50%的SNPs变异在M_2代稳定遗传，接近50%的SNPs变异回复突变，另外也发生新的突变（图8）。

4 结论

植物基因组发生的突变是获得新的基因功能和培育新品种的基础。将高多态性的液相芯片与KASP等结合，可大大降低检测成本，助推基因组突变分析。本研究结果表明，碳离子束辐照诱导的体细胞M_1的目标基因*OsNramp5*杂合突变位点未进入M_2代生殖细胞遗传；该嵌合穗系基因组位点变异倾向发生在基因间隙、内含子和上下游区域，虽然遗传至M_2代变异位点超过50%，但极少为编码基因功能域的位点，这也证实了基因突变的保守性和加大M_2代筛选的必要性。

作者贡献声明 杨震和彭选明指导论文试验设计和开展；杨震提供论文撰写思路、修改指导和试验经费支持；吕思维完成数据处理和论文撰写；张莉、张逸妍和张渊海完成论文试验的开展。所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

参考文献

1 Verma V, Vishal B, Kohli A, *et al*. Systems-based rice improvement approaches for sustainable food and nutritional security[J]. Plant Cell Reports, 2021, **40**(11): 2021-2036. DOI: 10.1007/s00299-021-02790-6.

2 Bado S, Forster B P, Maghuly F. Physical and chemicals mutagenesis in plant breeding[M]//Penna S, Jain S M. Mutation breeding for sustainable food production and climate resilience. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023: 57-97. DOI: 10.1007/978-981-16-9720-3_3.

3 New K T. Rice mutation breeding for varietal improvement in myanmar[J/OL]. Plant Mutation Report, 2006, **1**(1): 34-36. https://www-pub. iaea. org/MTCD/Publications/PDF/Newsletters/PMR-01-01.pdf.

4 Raina A, Laskar R, Khursheed S, *et al*. Role of mutation breeding in crop improvement- past, present and future [J]. Asian Research Journal of Agriculture, 2016, **2**(2): 1-13. DOI: 10.9734/arja/2016/29334.

5 Oladosu Y, Rafii M Y, Abdullah N, *et al*. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016, **30**(1): 1-16. DOI: 10.1080/13102818.2015.1087333.

6 Lomax M E, Folkes L K, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy[J]. Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)), 2013, **25**(10): 578-585. DOI: 10.1016/j.clon.2013.06.007.

7 Li F, Shimizu A, Nishio T, *et al*. Comparison and characterization of mutations induced by gamma-ray and carbon-ion irradiation in rice (*Oryza sativa* L.) using whole-genome resequencing[J]. G3 (Bethesda), 2019, **9**(11): 3743-3751. DOI: 10.1534/g3.119.400555.

8 Yamaguchi H, Hase Y, Tanaka A, *et al*. Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice[J]. Breeding Science, 2009, **59**(2): 169-177. DOI: 10.1270/jsbbs.59.169.

9 Tanaka A, Shikazono N, Hase Y. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants[J]. Journal of Radiation Research, 2010, **51**(3): 223-233. DOI: 10.1269/jrr.09143.

10 Abe T, Kazama Y, Hirano T. Ion beam breeding and gene discovery for function analyses using mutants[J]. Nuclear Physics News, 2015, **25**(4): 30-34. DOI: 10.1080/10619127.2015.1104130.

11 毛炎麟, 李浚明, 蔡体树 . 大麦M_1穗突变扇形体和嵌合体研究 . I. M_2幼苗叶绿素缺乏突变穗行中突变体分离

频率的分析[J]. 北京农业大学学报, 1981, **7**(4): 49-58.
MAO Yanlin, LI Junming, CAI Tishu. Studies on the mutated sectors and chimerism of barley in M_1 spikes. I. Analyses on the segregation frepuencies of the mutants in mutated spike progenies of M_2 seedlings chlorophyll-deficiency[J]. Acta Agriculture Universitaties Pekinensis, 1981, **7**(4): 49-58.

12 洪锡钧. 小麦M_1代长芒突变嵌合体的遗传研究[J]. 遗传学报, 1981, **8**(2): 180-188.
HONG Xijun. Genetic research on the chimaera of awned mutations in M_1 generation of triticum aestivum[J]. Acta Genetica Sinica, 1981, **8**(2): 180-188.

13 蔡体树, 毛炎麟, 李浚明. 大麦M_1穗突变扇形体和嵌合体研究. III. M_2无突变表型穗系的鉴定[J]. 北京农业大学学报, 1982, **8**(4): 85-88.
CAI Tishu, MAO Yanling, LI Junming. Studies on the mutated sectors and chimerism in M_1 spikes of barley . III . Analysis of the M_1 spike progeny with mutations undiscoverable in M_2[J]. Acta Agriculture Universitaties Pekinensis, 1982, **8**(4): 85-88.

14 李浚明, 蔡体树, 毛炎麟. 大麦M_1穗突变扇形体和嵌合体研究. II. M_3代突变系谱分析[J]. 北京农业大学学报, 1982, **8**(4): 77-84.
LI Junming, CAI Tishu, MAO Yanling. Studies on the mutated sectors and chimerism in M_1 spikes of barley. II. Mutant pedigree analysis in M_3[J]. Acta Agriculture Universitaties Pekinensis, 1982, **8**(4): 77-84.

15 Eriksson G. Induction of waxy mutants in maize by acute and chronic gamma irradiation[J]. Hereditas, 2009, **50**(2/3): 161-178. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1963.tb01903.x.

16 Arnason T J, Mohammed L, Koehler D, *et al*. Mutation frequencies in barley after treatment with γ -radiation, ethylene imine, ethyl methanesulfonate and maleic hydrazide[J]. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1962, **4**(2): 172-178. DOI: 10.1139/g62-022.

17 Tung C W, Zhao K Y, Wright M H, *et al*. Development of a research platform for dissecting phenotype–genotype associations in rice (*oryza* spp.)[J]. Rice, 2010, **3**(4): 205-217. DOI: 10.1007/s12284-010-9056-5.

18 McCouch S R, Wright M H, Tung C W, *et al*. Open access resources for genome-wide association mapping in rice[J]. Nature Communications, 2016, **7**: 10532. DOI: 10.1038/ncomms10532.

19 Zhang C P, Li M, Liang L P, *et al*. Rice3K56 is a high-quality SNP array for genome-based genetic studies and breeding in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. The Crop Journal, 2023, **11**(3): 800-807. DOI: 10.1016/j.cj.2023.02.006.

20 Yu H H, Xie W B, Li J, *et al*. A whole-genome SNP array (RICE6K) for genomic breeding in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, **12**(1): 28-37. DOI: 10.1111/pbi.12113.

21 Morales K Y, Singh N, Perez F A, *et al*. An improved 7K SNP array, the C7AIR, provides a wealth of validated SNP markers for rice breeding and genetics studies[J]. PLoS One, 2020, **15**(5): e0232479. DOI: 10.1371/journal.pone.0232479.

22 Chen H D, Xie W B, He H, *et al*. A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding [J]. Molecular Plant, 2014, **7**(3): 541-553. DOI: 10.1093/mp/sst135.

23 Guo Z F, Wang H W, Tao J J, *et al*. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize[J]. Molecular Breeding, 2019, **39**(3): 37. DOI: 10.1007/s11032-019-0940-4.

24 徐云碧, 杨泉女, 郑洪建, 等. 靶向测序基因型检测(GBTS)技术及其应用[J]. 中国农业科学, 2020, **53**(15): 2983-3004. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.001.
XU Yunbi, YANG Quannü, ZHENG Hongjian, *et al*. Genotyping by target sequencing (GBTS) and its applications[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, **53**(15): 2983-3004. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.15.001.

25 He C L, Holme J, Anthony J. SNP genotyping: the KASP assay[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, **1145**: 75-86. DOI: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7.

26 Saghai-Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, *et al*. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, **81**(24): 8014-8018. DOI: 10.1073/pnas.81.24.8014.

27 Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al*. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, **25**(16): 2078-2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.

28 Singh N, Jayaswal P K, Panda K, *et al*. Single-copy gene based 50 K SNP chip for genetic studies and molecular breeding in rice[J]. Scientific Reports, 2015, **5**: 11600. DOI: 10.1038/srep11600.

29 Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledó J I, *et al*. The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in Arabidopsis thaliana[J]. Science, 2010, **327**(5961): 92-94.

DOI: 10.1126/science.1180677.

30 李天菲, 蔡得田. 植物嵌合体机理及研究进展[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2002, **24**(1): 81-86. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2375.2002.01.020.
LI Tianfei, CAI Detian. Studies on mechanism and research progress of plant chimera[J]. Journal of Hubei University (Natural Science Edition), 2002, **24**(1): 81-86. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2375.2002.01.020.

31 Carles C C, Fletcher J C. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance[J]. Trends in Plant Science, 2003, **8**(8): 394-401. DOI: 10.1016/S1360-1385(03)00164-X.

32 Stewart R N, Dermen H. Ontogeny in monocotyledons as revealed by studies of the developmental anatomy of periclinal chloroplast chimeras[J]. American Journal of Botany, 1979, **66**(1): 47. DOI: 10.2307/2442624.

33 Marcotrigiano M, Bernatzky R. Arrangement of cell layers in the shoot apical meristems of periclinal chimeras influences cell fate[J]. The Plant Journal, 1995, **7**(2): 193-202. DOI: 10.1046/j. 1365-313x. 1995.7020193.x.

34 李明银, 何云晓. 植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用[J]. 植物学通报, 2005, **40**(6): 641-647. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.2005.06.001.
LI Mingyin, HE Yunxiao. Plant chimeras and application in the breeding of the ornamental plant[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, **40**(6): 641-647. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3466.2005.06.001.

35 Li S, Zheng Y C, Cui H R, *et al*. Frequency and type of inheritable mutations induced by γ rays in rice as revealed by whole genome sequencing[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2016, **17**(12): 905-915. DOI: 10.1631/jzus.B1600125.

36 Du Y, Luo S W, Li X, *et al*. Identification of substitutions and small insertion-deletions induced by carbon-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, **8**: 1851. DOI: 10.3389/fpls.2017.01851.

37 Yang G L, Luo W L, Zhang J, *et al*. Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice *via* resequencing multiple mutants[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, **10**: 1514. DOI: 10.3389/fpls.2019.01514.

38 Belfield E J, Gan X C, Mithani A, *et al*. Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. Genome Research, 2012, **22**(7): 1306-1315. DOI: 10.1101/gr.131474.111.

39 Teebor G W, Boorstein R J, Cadet J. The repairability of oxidative free radical mediated damage to DNA: a review [J]. International Journal of Radiation Biology, 1988, **54** (2): 131-150. DOI: 10.1080/09553008814551591.

40 Bjelland S. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation[J]. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2003, **531**(1/2): 37-80. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002.

41 Wi S G, Chung B Y, Kim J S, *et al*. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants[J]. Micron, 2007, **38**(6): 553-564. DOI: 10.1016/j.micron.2006.11.002.

42 Rodgers K, McVey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks[J]. Journal of Cellular Physiology, 2016, **231**(1): 15-24. DOI: 10.1002/jcp.25053.