



分子植物育种
Molecular Plant Breeding
ISSN 1672-416X, CN 46-1068/S

《分子植物育种》网络首发论文

题目：快中子辐射星油藤突变体库的构建及其突变体筛选
作者：任树林，付乾堂，潘帮珍，徐增富
网络首发日期：2019-10-22
引用格式：任树林，付乾堂，潘帮珍，徐增富. 快中子辐射星油藤突变体库的构建及其突变体筛选. 分子植物育种.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20191022.1012.003.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

快中子辐射星油藤突变体库的构建及其突变体筛选

任树林^{1,2} 付乾堂¹ 潘帮珍^{1*} 徐增富^{1*}

1 中国科学院西双版纳热带植物园/种子创新研究院, 中国科学院热带植物资源可持续利用重点实验室, 勐腊, 666303; 2 中国科学院大学, 生命科学学院, 北京, 100049

*通信作者, pbz@xtbg.org.cn; zfxu@xtbg.ac.cn

摘要 星油藤(*Plukenetia volubilis* L.)是大戟科(Euphorbiaceae)多年生木质藤本油料植物,其种子油富含多不饱和脂肪酸,其中 α -亚麻酸含量高达44.2%~50.8%,被认为是开发高营养价值保健食用油的理想原料之一。但星油藤易感染由尖孢镰刀菌引起的致死性根茎基腐病,严重限制了其推广种植。且因国内星油藤品种资源单一,无法采用传统的杂交育种方法获得抗病高产的新品种。因此,星油藤研究中的当务之急是创制新的种质资源。本研究采用快中子辐射诱变星油藤种子进行新种质创制。首先探索了不同快中子辐射剂量对星油藤成苗率的影响,以确定半致死剂量。然后采用半致死剂量快中子辐射星油藤种子构建突变体库,对M1代植株的生物学及其农艺性状进行观测分析。结果表明:(1)星油藤种子的快中子辐射半致死剂量约为47.6 Gy;(2)快中子辐射抑制了星油藤M1代幼苗生长;(3)快中子辐射的星油藤植株表型变异类型丰富,具有肉眼可见表型变异的植株占M1代存活株的9.2%;(4)采用随机扩增多态性DNA技术(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)鉴定了5株具有扩增产物多态性的突变株;(5)变异株3A423果实显著增大,种子单粒重是野生型的1.8倍,是培育高产品种的优良植株。本研究获得的突变体材料将有助于星油藤遗传育种和功能基因组学的进一步研究。

关键词 星油藤, 美藤果, 辐射诱变育种, 快中子, RAPD

Construction of A Mutant Library and Screening of Mutants Induced by Fast-Neutron Irradiation in *Plukenetia volubilis* L.

Ren Shulin^{1,2} Fu Qiantang¹ Pan Bangzhen^{1,*} Xu Zengfu^{1,*}

1 CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, The Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Mengla, 666303; 2 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

* Corresponding authors, pbz@xtbg.org.cn; zfxu@xtbg.ac.cn

Abstract *Plukenetia volubilis* is a perennial woody oilseed vine, which belongs to Euphorbiaceae family. Seed oil of *P. volubilis* is rich in polyunsaturated fatty acids, especially the α -linolenic acid, which accounts for 44.2%-50.8%. Therefore, *P. volubilis* has the great potential to be an ideal feed stock for production of oil with a high nutritional value. However, *P. volubilis* still suffers from mortal diseases caused by *Fusarium oxysporum*, which considerably hinder the widely exploitation and utilization of products from *P. volubilis*. At present, it is difficult to breed new variety by traditional cross-breeding because of rare germplasm resources. Therefore, it is urgent to obtain new germplasm resources of *P. volubilis*. In this study, seeds of *P. volubilis* were irradiated with fast neutron (FN) for creating new germplasm. Firstly, the effects of different dose of fast neutron on seedling survival rates of the plants were investigated to determine the semi-lethal dose, which will be applied to construct

the *P. volubilis* mutant library. The agronomic and other biological traits of the M1 plants were investigated. The results showed that: (1) The semi-lethal radiation dose of FN on *P. volubilis* seeds is approximately 47.6 Gy; (2) The M1 seedlings induced by fast-neutron radiation grew abnormally; (3) FN induces a range of abnormal phenotypes in *P. volubilis*, accounted for 9.2% of M1 surviving plants; (4) Five mutants were identified by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis; (5) The fruit size of mutant 3A423 was significantly increased, and the average weight of its seed was 1.8-fold heavier than that of the wild-type (WT) plants. Thus, mutant 3A423 is an excellent candidate parent for breeding high-yielding *P. volubilis*. Taken together, these mutants obtained in this study will be useful for further research of genetic breeding and functional genomics of *P. volubilis*.

Keywords *Plukenetia volubilis*, Sacha inchi, Mutation breeding, Fast neutron, RAPD

星油藤(*Plukenetia volubilis* L.)又称南美油藤、印加果、美藤果等,为大戟科(Euphorbiaceae)多年生木质藤本油料植物,原产海拔 800~1 700 m 的南美洲安第斯山脉热带雨林(Hamaker et al., 1992)。于 2006 年引入中科院西双版纳热带植物园并试种成功。星油藤种子油中饱和和脂肪酸含量达 90%以上(其中 α -亚麻酸含量为 44.2%~50.8%),并富含维生素 A、维生素 E 和其它一些微量元素(Bondioli et al., 2006; Gutierrez et al., 2011; Maurer et al., 2012; Rosana et al., 2013),对调节人体血脂、预防心血管疾病、保养肌肤、减缓衰老等作用明显,可广泛用于食品、保健、制药、化妆品等加工利用领域(Connor et al., 2007; Gorriti et al., 2010; Garmendia et al., 2011; Chirinos et al., 2016)。此外,星油藤的油,外壳和叶片可用于合成功能化纳米颗粒,是极具潜能的天然原料(Kumar et al., 2016a; 2016b)。星油藤作为一种多功能的油料作物正在兴起,极具开发和推广利用前景(蔡志全, 2011; Wang et al., 2018a)。

目前,国内种植的星油藤品种资源单一,大面积种植星油藤时易感染爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*) (Wang et al., 2014),尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) (Chai et al., 2017),腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*) (Yang et al., 2017)和假性假单胞菌(*Ralstonia pseudosolanacearum*)(Wang et al., 2018b)而引起的枯萎病和茎基腐病等,由于没有耐受性而大面积死亡。星油藤的病虫草害是限制星油藤产业化发展的主要因素之一。另外,星油藤为雌雄同株异花植物,总状花序,每个花序有 60 朵雄花,但仅有 1~2 朵雌花着生于花序基部(Fu et al., 2014)。单个花序雌花的数量低限制了星油藤的种子产量。因此,筛选多雌花的星油藤株系,是培育高产星油藤品种的手段之一。综上所述,为了更好地对星油藤这一重要资源植物进行开发利用,我们需要进行种质创新,为培育抗病高产的星油藤优良新品种提供种质资源。但目前国内星油藤品种资源单一,无法采用传统的杂交育种方法获得抗病高产的新品种。

人工诱变育种可以快速地获得大量的突变体,是新种质创制的有效途径之一。快中子是一种高能辐射源,能够诱发多种类型的突变,经基因组测序分析,已经报道的有 DNA 水平上的碱基置换、插入、缺失及染色体水平上的缺失、重复、倒位、易位等。快中子轰击产生的大多数突变性状是由 DNA 缺失导致,主要是小片段的缺失,一个植株上不会产生太多性状变异,是创制新种质、选育新品种的有效途径(Men et al., 2002; Bolon et al., 2011; Li et al., 2016)。快中子诱变应用广泛,已有诸多作物关于快中子诱变育种的报道。Campbell 和 Ronald (2005)在快中子诱变的水稻幼苗种群中成功筛选鉴定了 4 种具有稻瘟病抗性的株系(ebr1、ebr2、ebr3 和 ncr1),并确定了导致 ebr3 和 ncr1 类病变表型的遗传模式。Pérez-Pérez 等(2009)采用快中子和 EMS 共同诱变,定向筛选拟南芥叶型突变,最终鉴定了 25 个快中子和 153 个 EMS 诱导的突变株系,并通过高通量基因定位的方法,成功克隆了 25 个突变的基因。Bolon 等(2011)采用快中子辐射诱变处理获得包括根系、叶型和果荚在内的多种农艺性状突变的株系,并鉴定了在不同环境中多代种子蛋白和油含量显著变化的突变体。Wang 等(2015)研究快中子照射对花生胚芽小叶再生培养的影响,结果显示 M2 代植物在活力、株高、分枝和荚数、豆荚大小、豆荚形状上都表现出变异和分离,表明快中子辐照和组织培养相结合的方式是创建新的花生种质的有效方法。

本研究采用快中子辐射诱变星油藤种子,构建星油藤突变体库。尽管 M1 代植株的许多表型变异是由于体细胞生理损伤所致,并非基因组 DNA 突变而导致的可遗传变异;同时隐性突变处于杂合状态无表现

型差异, 但 M1 代也存在显性突变的可能性, 因而在 M1 代进行了初步的表型变化鉴定分析, 获得了一些在叶片、花序和果实发育等方面产生明显变化的材料。这些材料为进一步的突变体筛选以及今后培育抗病高产的星油藤新品种提供了新的种质资源。

1 结果与分析

1.1 快中子辐射处理星油藤 M1 代成苗率

星油藤种子经 7 个不同剂量(14 Gy, 19 Gy, 35 Gy, 45 Gy, 60 Gy, 85 Gy 和 125 Gy)的快中子辐射处理, 筛除霉变, 破损的种子后分别播种 156 粒、156 粒、170 粒、75 粒、164 粒、170 粒和 59 粒, 萌发统计其成苗率, 结果显示各梯度间差异明显。随着辐射剂量的增加, 成苗率呈现下降趋势(图 1)。在辐射剂量为 45 Gy 和 60 Gy 时, 相对成苗率分别达到了 73.3%和 43.5%。根据相对成苗率线性拟合方程 $y = 0.0029x^2 - 1.2138x + 101.24$ 导出, 星油藤种子辐射的半致死剂量为 47.6 Gy。

筛选 3 320 粒新鲜饱满的星油藤种子进行近半致死剂量(42.3 Gy 和 56.3 Gy)的快中子辐射后, 再次筛选去除物理损伤和干瘪霉变的种子后各播种 1 918 粒和 1 387 粒。经统计, 相对成苗率分别为 75.7%和 31.0%, 进一步证实了半死剂量的结论。目前共计获得 1 693 株诱变苗, 其中 42.3 Gy 处理的诱变苗为 1 306 株, 56.3 Gy 处理的诱变苗为 387 株(表 1)。

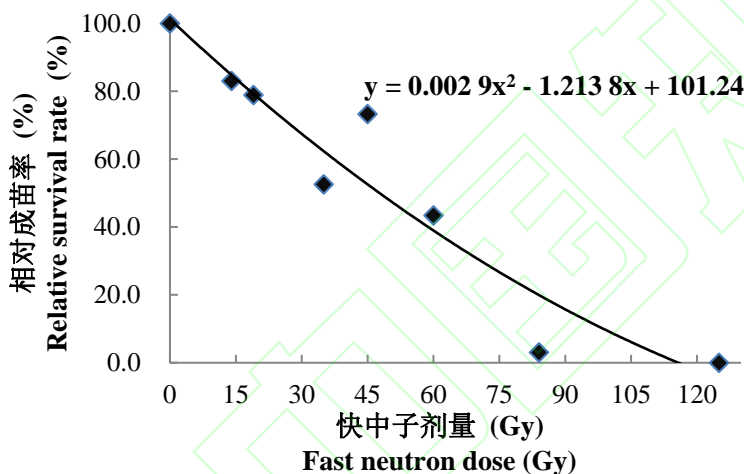


图 1 不同剂量快中子辐射处理对星油藤成苗率的影响

Figure 1 Effect of FN with different irradiation dose on relative survival rate of *P. volubilis* seeds

表 1 近半致死剂量辐射处理后星油藤的成苗率

Table 1 The seeding survival rate of *P. volubilis* under near semi-lethal radiation dose

辐射剂量(Gy)	播种数	成苗数	成苗率(%)	相对成苗率(%)
Radiation dose (Gy)	No. of seeds	No. of survival seedlings	Survival rate (%)	Relative survival rate (%)
0.0	360	324	90.0	100.0
42.3	1918	1306	68.1	75.7
56.3	1387	387	28.0	31.0

1.2 不同剂量快中子辐射处理的星油藤幼苗表型

统计分析星油藤幼苗下胚轴平均长度显示(图 2; 表 2), 高剂量的快中子辐射处理使下胚轴变短, 从而

导致幼苗矮化，且随着剂量的提高下胚轴变短的趋势更为明显。在 60 Gy 快中子处理组中，幼苗下胚轴的平均高度为 2.7 cm，仅有野生型(7.0 cm)的 38.6%。伴随着矮化，幼苗出现了早分枝现象(表 2; 图 3)。在 35 Gy、45 Gy 和 60 Gy 快中子处理组中，分别出现 5 株、16 株和 20 株早分枝的幼苗，分别占该剂量下存活植株的 7.2%、16.2%和 55.6%。在 84 Gy 快中子处理组中，总共存活的 4 株幼苗均出现了早分枝的表型，且植株极度矮化(幼苗后期全部死亡)。这些结果表明快中子辐射对星油藤幼苗的生长具有损伤效应，能显著抑制幼苗株高并促使幼苗出现早分枝现象，且随着剂量的增加损伤效应加强。

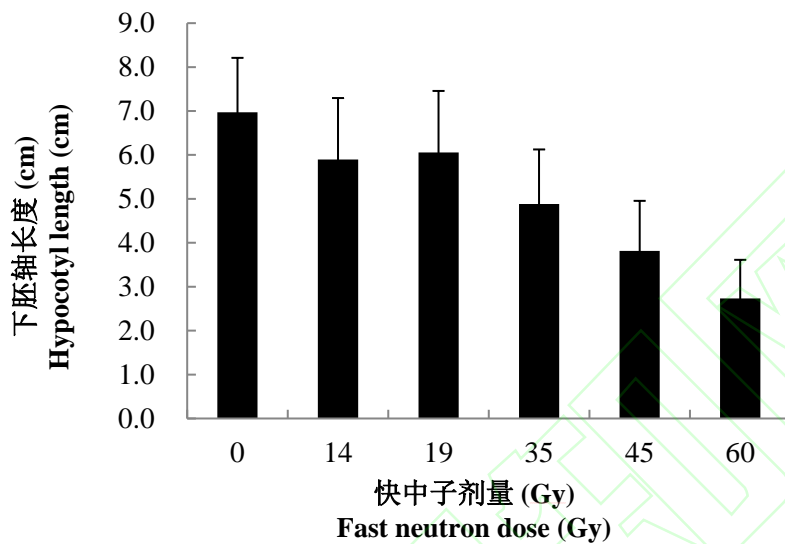


图 2 不同剂量的快中子辐射对星油藤下胚轴长度的影响

Figure 2 Effect of FN with different irradiation does on length of the hypocotyl of *P. volubilis*

表 2 不同辐射剂量对星油藤的成苗率和幼苗生长的影响

Table 2 Effect of different radiation does on the survival rate and growth of *P. volubilis* seedlings

快中子 剂量(Gy)	播种数 No. of seeds	下胚轴长度 Hypocotyl length	分枝表型 Branching phenotype
0	127	7.0±1.2	0
14	156	5.9±1.4	1
19	156	6.1±1.4	0
35	170	4.9±1.2	5
45	175	3.9±1.1	16
60	164	2.7±0.9	20
84	170	0	4
125	59	0	0

Radiation dose (Gy)	长度(cm) Length (cm)	相对长度(%) Relative length (%)	分枝数 No. of branches	分枝率(%) Branching rate (%)
0	7.0±1.2	100.0	0	0
14	5.9±1.4	84.3	1	1.0
19	6.1±1.4	87.1	0	0
35	4.9±1.2	70.0	5	7.2
45	3.9±1.1	55.7	16	16.2
60	2.7±0.9	38.6	20	55.6
84	0	0	4	100.0
125	0	0	0	0

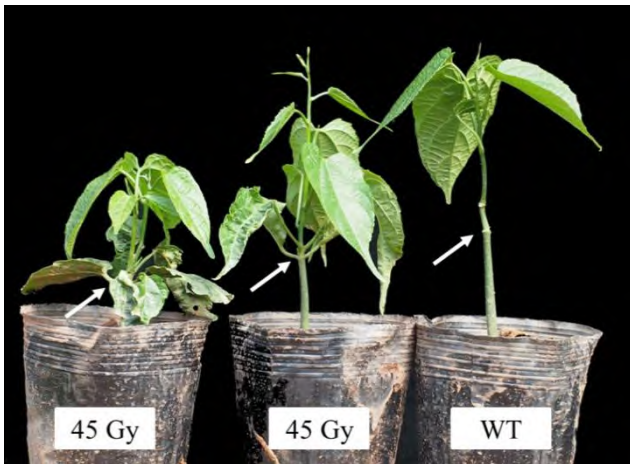


图 3 快中子辐射处理导致幼苗早分枝

Figure 3 Seedlings with early branching phenotypes induced by FN

1.3 M1 代成年植株可见异常表型筛选

M1 代星油藤植株移栽至大田后，于整个花期和果期，观察统计其叶、花和果等可见表型变异。统计分析发现共有 154 株 M1 代星油藤植株出现可见变异表型，占存活株的 9.2%。56.3 Gy 和 60 Gy 处理组的表型变异率最高，分别为 17.1%和 11.6% (表 3)。表型变异率与处理剂量之间没有明显的相关性，这也与 Bolon 等(2011)诱变结果相似。可见的表型变异主要表现为叶片形态、花序和小花形态以及果实形态等方面。

表 3 不同剂量快中子诱导的星油藤表型变异率

Table 3 Phenotypic mutation rate of *P. volubilis* induced by different dose of FN

辐射剂量 (Gy)	14	19	35	45	60	42.3	56.3	总数
Radiation dose (Gy)								Total
存活数	78	84	56	75	43	1052	281	1669
No. of survival plants								
表型变异植株	0	5	6	5	5	85	48	154
No. of phenotypic mutants								
表型变异率(%)	0.0	6.0	10.7	6.7	11.6	8.1	17.1	9.2
Phenotypic mutation rate (%)								

注：存活数指移栽大田后存活的成熟植株数；表型变异率指可见表型异常植株占存活株的百分比

Note: No. of survival plants refer to the number of mature plants were planted in the fields; phenotypic mutation rate refers to the rate of visible phenotypic abnormal plants in the surviving plants

1.3.1 叶片形态变异类型

共计有 130 株 M1 代星油藤植株的叶片形态发生了变异，占可见表型异常植株总数(154 株)的 84.4%。与野生型相比，诱变后星油藤叶表型异常主要包括：嵌合型失绿，即叶片局部叶绿素无法正常合成，呈现绿色和黄色相间的叶片(图 4B)；叶片变小(图 4C)；叶缘锯齿化，即叶缘锯齿程度加剧(图 4E)；皱叶，即叶片表面出现明显皱褶(图 4D)；叶柄变长(图 4F)等。其中，叶片变小的变异株数量最多(44.6%)，其次是叶缘锯齿化和皱叶，分别占 21.5% 和 20.8%。10 株(7.7%)叶片出现了不同程度的失绿现象，8 株(6.2%)叶柄明显长于野生型。

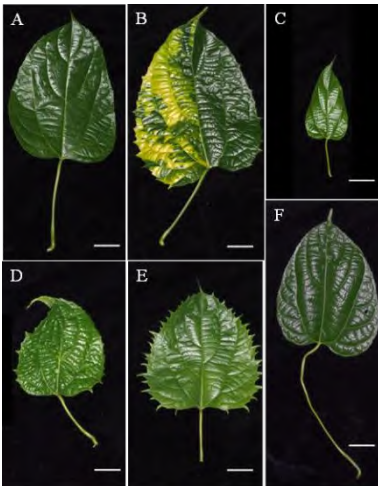


图 4 快中子辐射诱导星油藤叶片的异常表型

注: A: 野生型叶片; B: 嵌合型失绿; C: 异常小叶; C: 皱叶; E: 叶缘锯齿化; F: 叶柄变长; 标尺为 1 cm

Figure 4 Different abnormal phenotypes of leaves induced by FN in *P. volubilis*

Note: A: Wild-type leaf; B: Leaf with chimeric chlorosis; C: Small leaf; D: Wrinkled leaf; E: Serrated leaf; F: Longer petiole; Bars represent 1 cm

1.3.2 花序和小花形态变异

快中子辐射处理导致的星油藤花序和小花形态变化包括花序增长, 花序上增生新的花序, 雌花数量增多, 雄花增大等。经过观察统计发现, 共有 15 株 M1 代星油藤的雌花数量(3 朵及以上)比野生型(1~2 朵)多, 其中大部分植株雌花表型与 35 Gy 快中子辐射处理组中的 13512 表型类似, 即单个花序的雌花数量增多, 且柱头裂痕加深(图 5B), 但该类型植株上同时存在正常的花序和小花, 推测可能是嵌合体或是由辐射处理产生的胁迫导致; 与此不同的是, 在 56.3 Gy 快中子辐射处理组中, 3B261 和 3B038 植株整体都呈现稳定的多雌花表型(图 5C; 图 5D), 同时伴有雄花发育不完全, 叶片变小, 果实形状异常。并且, 这两个植株还分别伴有叶片革质化, 节间距缩短和叶片发黄, 整体长势较弱的表型。突变体 3B261 的多雌花表型稳定, 其接芽嫁接到野生型砧木后, 新生花序芽也出现了多雌花的表型(图 6), 说明通过无性繁殖可保存其变异性状。

除此之外, 雌花和雄花形态也出现了多种变异。与野生型相比, 少数诱变植株的雌花皆发生了花柱变短加粗, 柱头膨大(图 7A)和柱头深裂的变异(图 7B); 个别诱变植株的雄花花苞尖锐(图 8A); 3B142 的雄花个体增大(图 8C)且伴有花序的增长(图 8B)。

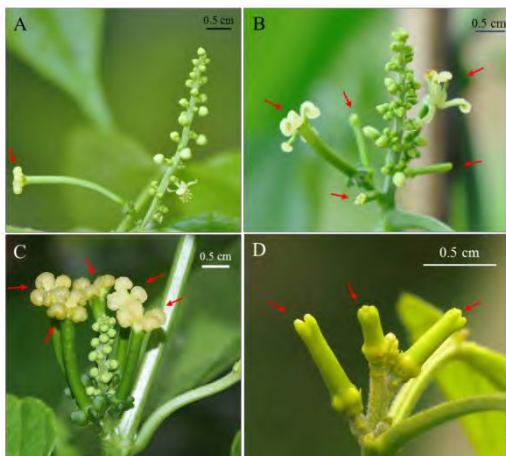


图 5 快中子辐射诱导的星油藤出现多雌花表型

注: A: 野生型花序; B~D: 快中子诱导的不同表型的多雌花的花序, 编号分别为 13512, 3B261, 3B038; 图中箭头所指为雌花

Figure 5 Inflorescences with multi-female flowers induced by FN in *P. volubilis*

Note: A: Inflorescence of wild-type plant; B~D: Inflorescences with different types of multi-female flowers induced by FN, and number as 13512, 3B261, 3B038 respectively; The arrows in the picture indicate the female flowers



图 6 3B261 接芽新生的多雌花表型

Figure 6 New flower buds of 3B261 scion bud with multi-female flowers

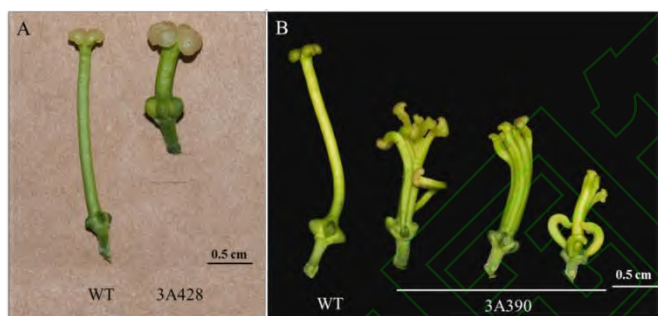


图 7 快中子辐射诱导的星油藤雌花异常表型

注: A: 3A428 的雌花(右)较野生型雌花(左)短, 粗, 且柱头加厚; B: 3A390 的雌花(右)较野生型雌花(左)变短, 且柱头深裂

Figure 7 Abnormal phenotypes of female flowers induced by FN in *P. volubilis*

Note: A: The female flower of 3A428 (right) show shorter and boader style, and thicker stigma than that of wild-type plant (left); B: The female flowers of 3A428 (right) show shorter and broader style, and deeper splitted stigma than that of wild-type plant (left)

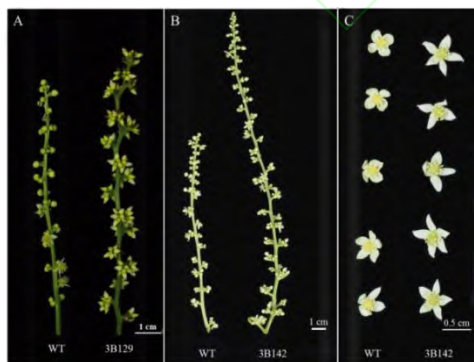


图 8 快中子辐射诱导的星油藤雄花异常表型

注: A: 3B129 花序上的雄花数量(右)较野生型(左)多且花苞尖锐; B: 3B142 的花序(右)较野生型花序(左)长; C: 突变体 3B142 的雄花(右)较野生型雄花(左)大

Figure 8 Abnormal phenotypes of male flowers induced by FN in *P. volubilis*

Note: A: 3B129 (right) breeds more and sharper male flowers than wild-type plant (left) does; B: The inflorescences of 3B142 (right)

were longer than that of wild-type plant (left); C: The male flowers of 3B142 (right) were bigger than that of wild-type plant (left)

1.3.3 果实性状变化

对果实性状进行观察统计后发现，共有 29 株 M1 代星油藤的果实发生了可见的异常表型，包括颜色，形状和大小等。其中有 6 株植株的果皮颜色在绿果期出现了黄化，部分失绿及斑点加深等表型。例如，与野生型相比，3A296 的果皮呈嵌合失绿(图 9B)；在果型变异株中，主要是果实棱角变化，包括棱角平滑和棱角异型，如 3A212 的果棱发生了螺旋状扭曲(图 9C)；3B038 棱角不明显(图 9D)，同时 3B038 也是一株稳定的多雌花变异株(图 5D)。果实大小及种子重量作为与产量相关的重要农艺性状，被重点观察统计。野生型星油藤果实通常有 4~7 个棱角，其中有 4 个棱角的果实(4 棱果)所占比例最高(Shaw, 1981)。我们发现共有 5 株星油藤的果实大小发生变异。经过统计有 4 棱果，5 棱果和 6 棱果的最大直径发现(表 4)，2A072、2A553 和 3A321 的果实直径，种子单粒重与野生型相比都有不同程度的减小，3A321 与野生型减少最为明显，呈极显著差异。与野生型相比，2A181 的果实最大直径略大，但种子单粒重显著高于野生型。3A423 的果实最大直径和单粒重均显著大于同时期野生型的果实和种子，其种子平均单粒重达 2.0 g，是野生型(1.1 g)的 1.8 倍。

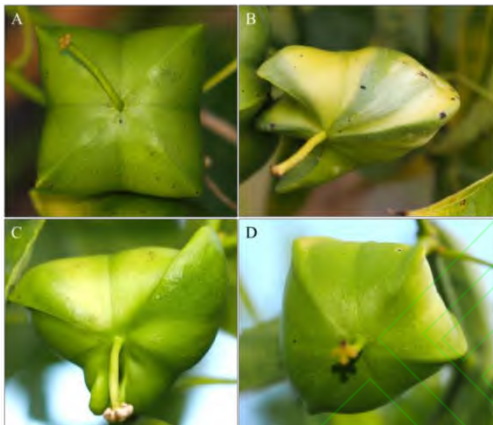


图 9 快中子辐射诱导的星油藤果实异常表型

注: A: 野生型果实; B: 3A296, 果皮黄化; C: 3A212, 果翅螺旋状扭曲; D: 3B038, 果棱区分不明显

Figure 9 Abnormal phenotypes of fruits induced by FN in *P. volubilis*

Note: A: Fruit of wild-type plant; B: Fruit of 3A296 with chimeric chlorosis; C: Fruit of 3A212 with wings spirally twisted; D: Fruit of 3B038 with ambiguous angles

表 4 果实大小(最大直径)统计

Table 4 Statistics on fruit size (maximum diameter)

果实性状	果棱数	WT	2A072	2A553	3A321	2A181	3A423
Fruit characters	Fruit No. of angel						
最大直径(cm) Maximum Diameter (cm)	4 棱果 4-angel fruit	6.1±0.30 b	5.1±0.19 c	5.1±0.26 c	-	7.0±0.35 a	7.3±0.33 a
	5 棱果 5-angel fruit	6.0±0.30 b	4. 80	5.2±0.19 c	4.2±0.37 d	7.4±0.25 a	7.8±0.41 a
	6 棱果 6-angel fruit	6.4±0.39 b	-	5.5±0.24 b	-	-	8.4±0.15 a
	单粒重(g) Seed weight (g)	1.1±0.17 c	0.8±0.08 e	0.9±0.09 d	0.7±0.10 e	1.4±0.10 b	2.0±0.22 a

注: 2A072 植株上只有一个 5 棱果, 没有 6 棱果; 3A321 植株上没有 4 棱和 6 棱果; 2A181 植株上没有 6 棱果; 表中数值为平均值±标准差; 小写字母表示差异极显著($p<0.01$); 最大直径: $n\geq 1$; 单粒重: $n\geq 25$

Note: There is only one 5-angel fruit on 2A072, no 4-angel fruit on 3A321 and no 6-angel fruit on 3A321, 2A181; Values are mean ± standard deviation; Lower case letters indicated significant difference at $p<0.01$ level; Maximum diameter: $n\geq 1$; Seed weight: $n\geq 25$

1.4 表型变异植株的 RAPD 分析

以野生型星油藤基因组 DNA 为模板, 设置 4 次重复, 对 50 条随机引物进行筛选, 其中有 46 条具有扩增产物。每条引物可扩增的片段数目为 1~10 条, 大小约为 200~5 000 bp, 共计 238 个 DNA 片段, 平均每条引物可扩增约 5.2 个片段。

利用上述引物对 8 株表型变异明显的植株(3A321, 3A423, 3B033, 3B035, 3B038, 3B060, 3B091, 3B261) 进一步分析, 每个变异株 2 个生物学重复。以野生型为对照, 引物 S68 的扩增条带中, 3B261 在 750~1 000 bp 之间缺失了一个条带(图 10A); 引物 S88 的扩增条带中, 3B060 和 3B091 在接近 750 bp 的位置缺失了一个条带(图 10B); 引物 S93 的扩增条带中, 3A321、3B038 和 3B091 在略大于 1.0 kb 的位置增加一个条带(图 11A); 引物 S99 的扩增条带中, 3B060 在 1~2 kb 之间的位置缺失了一个条带(图 11B)。这些突变体材料(3A321, 3B038, 3B060, 3B091 和 3B261)RAPD 扩增条带的缺失或增加, 可能由于 DNA 的缺失、插入或碱基的改变而引起的扩增产物多态性。上述结果表明, 这些突变体株系在 DNA 水平发生了变化。

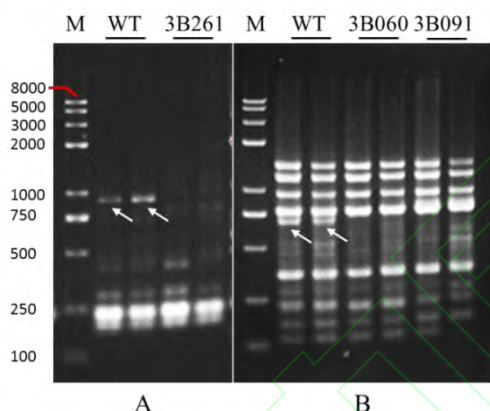


图 10 随机引物 S68, S88 对突变体材料的扩增谱带

注: M: Trans2K Plus II; A: 引物 S68 对野生型和 3B261 的扩增谱带; B: 引物 S88 对野生型, 3B060 和 3B091 的扩增谱带

Figure 10 PCR amplification of mutants by RAPD primers S68, S88

Note: M: Trans2K Plus II; A: PCR amplification of 3A321 by RAPD primer S68; B: PCR amplification of 3B060 and 3B091 by RAPD primer S88

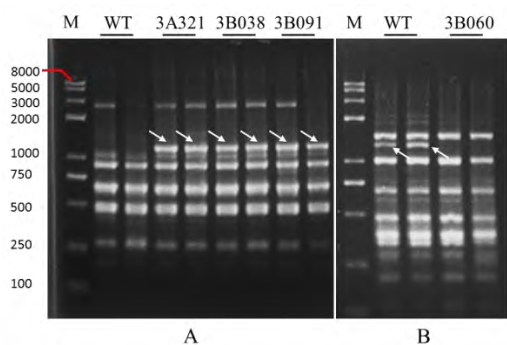


图 11 随机引物 S93, S99 对突变体材料的扩增谱带

注: M: Trans2K Plus II; A: 引物 S93 对野生型, 3A321, 3B038 和 3B091 的扩增; B: 引物 S99 对野生型和 3B060 的扩增谱带

Figure 11 PCR amplification of mutants by RAPD primers S93, S99

Note: M: Trans2K Plus II; A: PCR amplification of 3A321, 3B038 and 3B091 by RAPD primers S93; B: PCR amplification of 3B060 RAPD primer S99

2 讨论

丰富的种质资源是作物遗传育种的基础，物理辐射诱变育种以其简便、安全、突变率高、变异谱广、能打破不良基因连锁、改变不良单一性状以及短时间内可育出新品种等特点而广泛运用于人工创制种质资源(Tanaka et al., 2010; Shirasawa et al., 2016)。快中子是一种高能辐射源，诱变效果良好。采用基因组重测序技术对快中子诱变的拟南芥进行分析发现，60 Gy 的快中子辐射后的自交后代基因组中每个位点的突变率高达 359.7×10^{-9} ，是自发突变率(每代每个位点的突变率为 7.1×10^{-9})的 50 倍(Stephan et al., 2010; Belfield et al., 2012)。本研究采用快中子辐射诱变星油藤创制新种质资源，通过对诱变后的 M1 代植株的叶、花和果表型变化进行统计分析，发现了多株表型异常的植株，其中叶表型变化最大。在 154 株具有异常表型的 M1 代星油藤中，有 84.4% 的植株皆出现了叶表型变异。通过对星油藤产量相关的农艺性状进行测量统计，得到了两株稳定多雌花以及两株果实异常增大的表型，其中 3A423 果实大小和种子重量增大最为显著，单粒重是野生型的 1.8 倍。

通过对 M1 代植株进行观察分析获得了多种的农艺性状变异植株，结合分子标记可以筛选出部分显性突变体。本研究利用 RAPD 分子标记技术分析了野生植株和表型变异植株的基因组 DNA 间多态性的差异，发现 5 株表型变异植株的特异 RAPD 引物，确定了植株在基因组水平上发生了变异，为进一步的突变体基因定位和功能分析奠定了基础。但是，本研究仅完成了诱变当代(M1)的突变体库构建工作，需要进一步对其自交后代群体植株的表型和 DNA 变异进行分析。快中子作为电离辐射的一种，可诱发生物学损伤，即使 M1 代植株未发生 DNA 改变也可引起萌发率、幼苗生长的变化及植株形态异常等(Ramesh et al., 2014; 李强等, 2016; Sjahril et al., 2018)。且 M1 代多为嵌合体和隐性突变，需要构建自交后代群，以获得纯合、稳定的突变株系，结合后代表型和基因组序列变化，确定突变及突变类型。因此，本研究的下一步工作将是 M1 代套袋自交后代群体的构建，筛选表型稳定株系，同时对已经初步鉴定的多雌花突变体(3B261)，多雌花变异株(3B038)和大果变异株(3A423)后代进行重点鉴定分析，进一步确定其 DNA 的突变和农艺性状变异。

3 材料与方法

3.1 供试材料和生长条件

供试材料星油藤(*Plukenetia volubilis* L.)种植于云南省勐腊县勐仑镇的中国科学院西双版纳热带植物园内，东经 $101^{\circ}25'$ ，北纬 $21^{\circ}41'$ ，海拔 570 m，年平均气温 21.4°C ，年降雨量 1 556 mm (赵俊斌等, 2009)。

3.2 诱变处理

挑选成熟饱满的星油藤种子，除去内种皮，用于快中子辐射处理。设置 7 个梯度的快中子剂量(14 Gy, 19 Gy, 35 Gy, 45 Gy, 60 Gy, 85 Gy 和 125 Gy)辐射星油藤种子，以不辐射处理种子作对照，摸索出半致死剂量，然后用近半致死剂量(42.3 Gy 和 56.3 Gy)照射，共计处理 3 320 粒星油藤种子构建突变体库。将处理后的种子播种于人工气候室内， 28°C 萌发。快中子辐射处理委托中国原子能科学研究院进行。

3.3 突变体性状观测与鉴定

首先对经快中子辐射诱变的星油藤种子的萌发情况进行统计，然后将幼苗转移至大棚观察记录其成苗率和生长情况。待幼苗长到 30 cm 左右移栽至试验田中，株行距为 $1.5\text{ m} \times 2.0\text{ m}$ 。在 M1 代植株营养生长期

和生殖生长期进行详细的性状调查，主要包括叶片形态、花序和小花形态、以及果实形态等变异性状，记录变异特征。

计算公式如下：

萌发率=(萌发数/播种数)×100%

相对萌发率=(诱变萌发率/对照萌发率)×100%

成苗率=(成苗数/播种数)×100%

相对成苗率=(诱变成苗率/对照成苗率)×100%

分枝率=(早分枝的幼苗数/成苗数)×100%

注：子叶完全展开时视为成苗。

3.4 突变体的 RAPD 鉴定

参照 Porebski 等(1997)描述的 CTAB 法从供试材料的幼嫩叶片提取基因组总 DNA，对 50 条 RAPD 引物进行初步筛选，选用扩增带型清晰、稳定的引物对野生型与表型异常植株进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体积为 20 μ L，包括 2×*Taq* Master Mix 10 μ L，5 μ mol/L 的引物 1 μ L，20~40 ng/ μ L 的 DNA 模板 1 μ L，ddH₂O 8 μ L。扩增程序：94℃ 预变性 2 min，然后进入 45 个循环(94℃ 变性 20 s，33℃~36℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 2 min)，再于 72℃ 延伸 6 min。PCR 产物用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳观察，试验重复 4~5 次。

作者贡献

任树林是本实验研究的执行人，完成数据分析和论文初稿的撰写；付乾堂参与本研究的实验设计及实验指导；潘帮珍参与本研究的实验设计、数据采集与论文修改；徐增富是项目的构思者及负责人，参与本研究的实验设计和论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由云南省自然科学基金面上项目(2016FB051)和中国科学院西双版纳热带植物园一三五项目(2017XTBG-T02)资助。感谢中国科学院西双版纳热带植物园提供的种植基地，感谢蔡志全研究员提供的星油藤种子材料，陈江华研究员给予的指导；感谢唐明勇博士给予的实验指导和赵美丽女士在数据采集中提供的帮助。

参考文献

- Belfield E.J., Gan X.C., Mithani A., Brown C., Jiang C.F., Franklin K., Alvey E., Wibowo A., Jung M., Bailey K., Kalwani S., Ragoussis J., Mott R., and Harberd N.P., 2012, Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, 22(7): 1306-1315
- Bolon Y.T., Haun W.J., Xu W.W., Grant D., Stacey M.G., Nelson R.T., Gerhardt D.J., Jeddelloh J.A., Stacey G., Muehlbauer G.J., Orf J.H., Naeve S.L., Stupar R.M., and Vance C.P., 2011, Phenotypic and genomic analyses of a Fast Neutron mutant population resource in soybean, *Plant Physiol.*, 156(1): 240-253
- Bondioli P., Della Bella L., and Rettke P., 2006, Alpha linolenic acid rich oils. Composition of *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi) oil from Peru, *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 83(3): 120-123
- Cai Z.Q., 2011, Advance in research on a special woody oilseed crop of *Plukenetia volubilis* L, *Zhongguo Youzhi* (China Oils and Fats), 36(10): 1-6 (蔡志全, 2011, 特种木本油料作物星油藤的研究进展, *中国油脂*, 36(10): 1-6)
- Campbell M.A., and Ronald P.C., 2005, Characterization of four rice mutants with alterations in the defence response pathway, *Molecular Plant Pathology*, 6(1): 11-21

- Chai X., Yang Z., Fu Q., Pan B.Z., Tang M., Li C., and Xu Z.F., 2017, First report of root and basal stem rot in sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) caused by *Fusarium oxysporum* in China, *Plant Disease*, 102(1): 242
- Chirinos R., Necochea O., Pedreschi R., and Campos D., 2016, Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: an alternative source of phenolic compounds and antioxidants, *International Journal of Food Science and Technology*, 51(4): 986-993
- Connor K.M., SanGiovanni J.P., Lofqvist C., Aderman C.M., Chen J., Higuchi A., Hong S., Pravda E.A., Majchrzak S., Carper D., Hellstrom A., Kang J.X., Chew E.Y., Salem N., Serhan C.N., and Smith L.E.H., 2007, Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis, *Nature Medicine*, 13(7): 868-873
- Fu Q.T., Niu L.J., Zhang Q.F., Pan B.Z., He H.Y., and Xu Z.F., 2014, Benzyladenine treatment promotes floral feminization and fruiting in a promising oilseed crop *Plukenetia volubilis*, *Industrial Crops & Products*, 59: 295-298
- Garmendia F., Pando R., and Ronceros G., 2011, Effect of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) on the lipid profile of patients with hyperlipoproteinemia, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 28(4): 628-632
- Gorriti A., Arroyo J., Quispe F., Cisneros B., Condorhuamán M., Almora Y., and Chumpitaz V., 2010, Oral toxicity at 60-days of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) and linseed (*Linum usitatissimum* L.), and determination of lethal dose 50 in rodents, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 27(3): 352-360
- Gutierrez L.F., Rosada L.M., and Jimenez A., 2011, Chemical composition of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction, *Grasas Y Aceites*, 62(1): 76-83
- Hamaker B.R., Valles C., Gilman R., Hardmeier R.M., and Lescano M., 1992, Amino acid and fatty acid profiles of the Inca peanut(*Plukenetia volubilis* L.), *Cereal Chemistry*, 69(4): 461-463
- Kumar B., Smita K., Cumbal L., and Debut A., 2016a, One pot synthesis and characterization of gold nanocatalyst using Sacha inchi(*Plukenetia volubilis*) oil: Green approach, *J. Photochem. Photobiol. B*, 158(5): 55-60
- Kumar B., Smita K., Sánchez E., Stael C., and Cumbal L., 2016b, Andean sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell biomass as new biosorbents for Pb²⁺ and Cu²⁺ ions, *Ecological Engineering*, 93: 152-158
- Li G.T., Chern M., Jain R., Martin J.A., Schackwitz W.S., Jiang L.R., Vega-Sanchez M.E., Lipzen A.M., Barry K.W., Schmutz J., and Ronald P.C., 2016, Genome-wide sequencing of 41 rice (*Oryza sativa* L.) mutated lines reveals diverse mutations induced by Fast-Neutron irradiation, *Molecular Plant*, 9(7): 1078-1081
- Li Q., Ren L.K., Chen F., Sun Z W., Wang K.J., and Guo M.M., 2016, Application research on mutation breeding of wheat with nitrogen ion beam, *Shandong Nongye Kexue (Shandong Agricultural Sciences)*, 48(7): 18-22 (李强, 任立凯, 陈凤, 孙中伟, 王康君, 郭明明, 2016, 小麦 N 离子束注入诱变育种的应用研究, *山东农业科学*, 48(7): 18-22)
- Maurer N.E., Beatriz H.S., Gloria P.C., and Rodriguez-Saona L.E., 2012, Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil, *Food Chem.*, 134(2): 1173-1180
- Men A.E., Laniya T.S., Searle I.R., Iturbeormaetxe I., Gresshoff I., Jiang Q., Carroll B.J., and Gresshoff P.M., 2002, Fast neutron mutagenesis of soybean (*Glycine soja* L.) produces a supernodulating mutant containing a large deletion in linkage group H, *Genome Letters*, 3(3): 147-155
- Pérez-Pérez J.M., Candela H., Robles P., Quesada V., Ponce M.R., and Micol J.L., 2009, Lessons from a search for leaf mutants in *Arabidopsis thaliana*, *Int. J. Dev. Biol.*, 53(8-10): 1623-1634
- Porebski S., Bailey L.G., and Baum B.R., 1997, Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 15(1): 8-15
- Ramesh H.L., Murthy V.N.Y., and Munirajappa, 2014, Induction of useful mutation in mulberry (*Morus*) variety S54 by gamma irradiation in M1 generation, *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(1): 48-57
- Rosana C., Gledy Z., Romina P., Eric M., Yvan L., and David C., 2013, Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity, *Food Chem.*, 141(3): 1732-1739
- Shaw H.K.A., 1981, The Euphorbiaceae of Sumatra, *Kew Bulletin*, 36(2): 239-374
- Shirasawa K., Hirakawa H., Nunome T., Tabata S., and Isobe S., 2016, Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato, *Plant Biotechnol.*, 14(1): 51-60

- Sjahril R., Riadi M., Rafiuddin, Sato T., Toriyama K., Abe T., and Trisnawaty A.R., 2018, Effect of heavy ion beam irradiation on germination of local Toraja rice seed (M1-M2) mutant generation, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 157(1): 012046
- Stephan O., Korbinian S., José Ignacio L.L., Norman W., Clark R.M., Shaw R.G., Detlef W., and Michael L., 2010, The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*, Science, 327(5961): 92-94
- Tanaka A., Shikazono N., and Hase Y., 2010, 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, Radiation Research, 51(3): 223-233
- Wang G.F., Li H., Zhou Y., Yang L.Y., Ding Z.J., Huang J.S., and Pan B.Z., 2018b, Bacterial wilt of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype i in southern China, Plant Disease, 103(2): 364-365
- Wang J.S., Sui J.M., Xie Y.D., Guo H.J., Qiao L.X., Zhao L.L., Yu S.L., and Liu L.X., 2015, Generation of peanut mutants by fast neutron irradiation combined with in vitro culture, Journal of Radiation Research, 56(3): 437-445
- Wang S., Zhu F., and Kakuda Y., 2018a, Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses, Food Chemistry, 265: 316-328
- Wang Y., Xie Y., Cui H.D., and Dong Y., 2014, First report of *Meloidogyne javanica* on sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) in China, Plant Disease, 98(1): 165-165
- Yang L.Y., Pan C., Guo L.J., Zhou Y., Wang G.F., Du Q.J., and Huang J.S., 2017, First report of vine wilt disease caused by *Fusarium solani* on sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) in China, Plant Disease, 101(9): 1675-1675
- Zhao J.B., Zhang Y.P., Song F.Q., Xu Z.F., and Xiao Y.L., 2009, A comparison of the phenological characteristics of introduced plant species in the Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Zhiwu Xuebao (Chinese Bulletin of Botany), 44(4): 464-472 (赵俊斌, 张一平, 宋富强, 许再富, 肖云来, 2009, 西双版纳热带植物园引种植物物候特征比较, 植物学报, 44(4): 464-472)