

离子束介导外源全 DNA 转化拟 南芥菜的诱变效应*

卞 坡¹⁾ 谈重芳^{1,2)} 秦广雍¹⁾ 余增亮³⁾ 霍裕平¹⁾

(¹⁾ 郑州大学离子束生物工程实验室, 郑州 450052; (²⁾ 华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070;

(³⁾ 中科院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室, 合肥 230031)

摘要 用 30 keV 的 Ar⁺ 离子, 以 1.5×10^{17} ions/cm² 的注入剂量分别介导外源拟南芥菜 (Lansberg 生态型)、甘蓝、红甜菜和芦荟的全 DNA 转化拟南芥菜种子 (Columbia 生态型)。转化当代营养期表型变异率与外源供体和转化受体的亲缘远近没有必然的联系, 而低育性株率却随着外源供体亲缘关系的从近到远, 呈现一种从低到高再变低的变化趋势。从低育性株后代中选育出 2 个稳定的突变体, 该突变体不但保持了其亲本的低育性, 而且其他性状也有较显著的变异, 如株型、叶型等。

关键词 离子束介导外源全 DNA 转化; 诱变; 突变体

中图分类号 S 637.035.3

拟南芥菜是十字花科拟南芥属植物, 近年来拟南芥菜以其个体小, 生长周期短以及基因组小等特点而成为分子遗传学研究的模式植物。拟南芥的另一优点是容易被诱变, 目前已经从拟南芥菜中分离得到了几千种突变体, 这些突变体的获得为揭示植物生长发育规律起了非常重要的作用^[1]。现在的诱变手段虽然很多, 但普遍存在诱变效率低和筛选量大的缺陷, 因此人们一直在寻求新的诱变手段。低能离子束介导外源全 DNA 转化技术是在离子束介导目的基因取得成功的基础上发展起来的一种遗传转化技术。低能离子与生物组织作用时引起的物理和化学溅射作用能对生物组织进行层层刻蚀, 由于生物组织结构本身的不均一性, 刻蚀的结果是在生物组织内部形成可供大分子通过的“通道”^[2]。另外, 低能离子的正电荷富集在细胞表面能改变细胞膜的通透性, 这些特点使低能离子束成为介导外源基因转化的有效手段, *GUS*、*CAT*、*hph*、*RCH8* 等基因的成功转化证明了这一点^[3~6]。低能离子束介导外源全 DNA 转化以外源供体的基因组片段为操作对象, 旨在实现远缘物种间 DNA 水平的分子杂交, 并在小麦和水稻育种上取得了一定的成功^[7]。另一方面, 这种无目的的外源片段的导入对受体的诱变

效应长期以来为人们所忽略。从诱变机理上看, 离子束介导全 DNA 转化和化学、物理诱变有着本质的区别, 有自己的特点和规律, 但是到目前为止, 这方面的研究还是空白。笔者以拟南芥菜 (Columbia 生态型) 为转化受体, 以拟南芥菜 (Lansberg 生态型)、甘蓝、红甜菜和芦荟为外源 DNA 供体, 研究了外源转化供体的亲缘远近与受体变异的关系, 并得到了 2 株真正的突变体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转化受体拟南芥菜为 Columbia 生态型, 来自英国 Nottingham 大学拟南芥菜储存中心, 单种子系, 编号 N1092。外源 DNA 供体分别为拟南芥菜 (lansberg)、红甘蓝、红甜菜、芦荟。

1.2 仪器和试剂

离子注入机为俄罗斯产的 TITAN 源低能离子注入机。所用试剂均为分析纯。

1.3 供体全 DNA 的提取

采用 CTAB 方法^[8], 所得基因组片段长度 30~50 kb, 集中于 40 kb。OD_{260 nm}/OD_{280 nm} = 1.9, 溶解于 pH 8.0 的 TE, 调整浓度为 800 μg/ml。

收稿日期: 2002-09-18

* 国家“十五”科技攻关项目资助课题 (2001BA302B-03)

卞 坡, 男, 1973 生, 博士生, 工作单位: 郑州大学离子束生物工程实验室, 郑州 450052

1.4 拟南芥菜种子(M1代)的离子束介导转化

选取拟南芥菜饱满的种子 1 000 粒,置于 50 ml 烧杯中加入蒸馏水,搅拌 5 min,重复 3 遍,置于超净台风干。取 200 粒种子作为原初对照,剩余的 600 粒作离子注入,注入离子为 Ar^+ ,能量 30 keV,注入剂量 1.5×10^{17} ions/cm²,脉冲注入,25 Hz,400 μ s/plus。注入完成后,200 粒作为离子注入对照,200 粒浸入 TE 作为浸 TE 对照。剩下的分成 4 份分别浸入 800 μ g/ml 的拟南芥菜(lansberg)、甘蓝、红甜菜和芦荟全 DNA 溶液,浸泡 24 h 后,用 TE 溶液冲洗种子 3 遍,蒸馏水冲洗 1 遍,置 4 °C 冰箱春化 48 h。种植于光照培养间。培养间条件:土壤为花卉营养土,pH 值 4.5~5.0,光强 5 000~6 000 lx,光暗周期 16 h/8 h。温度 20~22 °C,昼夜温差 2 °C。

1.5 突变体的发现过程

在拟南芥菜种植后 7 d 统计当代的发芽率,20 d 后统计成苗率。观察当代的变异情况。M1 代植株成熟后,单株收当代低育性株的种子(M2 代),在同样的条件下种植,观察 M2 代的变异情况,在 M2 代植株成熟后,单株收变异株的种子(M3 代),以同样的种植条件种植,观察 M3 代的变异情况。

2 结果与分析

2.1 离子束介导外源基因转化的当代的变异

拟南芥菜的低育性分 2 种情况,一是拟南芥菜抽薹后 2~4 周内主轴的总状花序顶端停止向上生长,生成的花蕾积聚在一起,开花和结实均不正常;二是总状花序能够继续生长,但下面的花蕾不能正常开花或结实率低。从表 1 中知,转化当代的 400 株中有 24 株育性较低,外源拟南芥菜(lansberg)

转化的 1 株,占总成苗数的 1.1%,甘蓝转化的 3 株,占总成苗数的 3.4%,红甜菜转化的 12 株,占总成苗数的 13.8%,芦荟转化的 8 株,占总成苗数的 9.6%。从拟南芥菜(Lansberg)到芦荟随着亲缘关系的从近到远,转化株中低育性株率是一个从小到大再变小的变化趋势。其中和受体拟南芥菜(Columbia)亲缘关系最近的拟南芥菜(Lansberg)转化群体的低育性株率最小,外源红甜菜(藜科)转化群体的低育性株率最高,亲缘关系最远的芦荟(单子叶植物纲)的低育性株率次之。拟南芥菜转化当代的表型变异开始于幼苗期,主要表现为叶序生长发育混乱(一般从第 4 或第 5 片叶原基发育开始)叶型窄小细长,多有畸形,伴随有短暂的发育停顿,植株丛生,抽薹时间一般晚 1~2 周。

2.2 M2 代的育性变化

M1 代低育性株成熟后单株收种子,每株播种 40 粒,共有 960 粒,成苗 723 株,其中有 2 个低育性株。这 2 个 M2 代突变株来自同一个 M1 代亲本(编号 TC243),分别编号为 M2TC243(1)和 M2TC243(2)。这 2 个突变株在开花期,花瓣不能完全开放,角果短小,长度为 2~4 mm(同期对照 2.5~3.0 cm),多为空荚,且数量稀少,结实角果数小于开花总数的 5%,每个角果结籽 2~6 粒。M2TC243(1)和 M2TC243(2)还同时伴有其它性状的变异,在营养生长期,叶型发育异常,叶片不对称,成扭曲状,莲花座的直径较小,不到同期对照的 1/2。抽薹后茎生叶的叶缘较对照有明显的齿状,整体株型矮小,M2TC243(1)高度为 7.5 cm,M2TC243(2)的株高为 8 cm(同期对照株高 22 cm),主轴和次生枝的主从关系不明朗。

表 1 转化当代的变异

Table 1 The variation of transferred generation

对照和外源供体 Control and DNA donor	播种数 Seed number	出芽数 Budding number	成苗数 Seedling number	营养期表型变异 Phenotypic variation in vegetal period	黄化苗 Yellowing seedling	低育性株 Low-fertility plant
原初对照 Original control	200	198	198	0	0	0
注入对照 Ion control	200	182	180	0	0	0
浸 TE 对照 TE control	200	184	183	0	0	0
拟南芥菜 <i>A. thaliana</i>	100	94	94	2	3	1
甘蓝 Cabbage	100	88	88	3	2	3
红甜菜 Red beet	100	87	87	2	3	12
芦荟 Aloes	100	83	83	2	3	8

2.3 M2TC243(1)和 M2TC243(2)的子代性状

M2TC243(1)的 M3 代种子种植 24 粒, M2TC243(2)的 M3 代种子种植 44 粒, 成苗数分别为 3 个和 21 个。M2TC243(1)的 3 个子代中有 2 个保持了亲本的变异性状, 1 个子代表型和育性正常, 但生长发育缓慢。M2TC243(2)的 21 个子代个体完全保持了亲本的变异性状, M4 代也保持了亲本的变异性状。这说明 M2TC243(1)和 M2TC243(2)是真正的突变体。

3 讨论

本试验设计了严格的对照, 在所有的对照中, 当代表型、低育性株和黄化苗均未出现, 而在外源全 DNA 转化的群体中, 却高频率地出现这 3 种变异类型, 特别是外源红甜菜的转化群体当代变异率达 19.6%, 这说明当代出现的变异与外源 DNA 片段的导入有直接的关系。当代变异中黄化苗和表型的变异率与外源供体亲缘关系的远近没有必然的联系, 而低育性株率却随着外源供体亲缘关系的从近到远, 呈现一种先升后降的变化趋势。这种现象的解释应该从拟南芥成熟胚的结构和发育着手, 一是因为本实验中离子束的作用对象是拟南芥的成熟胚, 二是拟南芥地上部分的所有构成元件都与成熟胚中的茎分生组织密不可分, 特别是幼苗的建成模式有直接的胚胎来源, 拟南芥成熟胚中的茎端分生组织虽然没有明确的器官分化, 但一些幼苗期器官的起始已经发生, 如第一、二叶原基起始^[9]。拟南芥种子离子注入后浸到外源全 DNA 溶液中的时间为 12~36 h, 种子吸胀后, 第一对叶原基已经明显起始, 在实验的这个阶段, 受到离子束介导转化的胚细胞内可能充斥着大量的外源 DNA 片段, 这些片段少数整合到受体基因组, 大部分游离于受体基因组之外, 受体细胞的正常的生长和发育将受到严重干扰, 进而影响到幼苗期的表型变异(叶序和叶型), 而这种影响和外源片段与受体基因组之间的同源程度是关系不大的。本实验中黄化苗和表型变异出现在拟南芥发育的营养生长早期, 这可能就是黄化苗和表型变异率与外源供体亲缘的远近无关的原因。从种子的成熟胚发育到成熟个体的花序生成、开花和结实, 分生组织至少要经历 3 个阶段的变化, 茎端分生组织、花序分生组织和花分生组织, 在这个变化的过程中, 细胞经历了无数次的分裂, 外源片段也时刻经受着受体细胞的修复和剔除^[10], 外源片段与受体基因组的同源性越低, 其被

受体修复的可能性越大, 另一方面外源片段与受体基因组的同源性越低, 即外源片段与受体基因组的差异越大, 对受体的影响就越明显, 可能正是这两种机制的共同作用, 其低育性株率才随着外源供体亲缘关系的从近到远呈现先升高再降低的变化趋势。

转化当代株 TC243 除育性异常外, 其他性状与对照相比没有明显的差异, 而其 2 个子代变异株在莲花座叶型, 株高、株型、茎生叶型、角果长度和育性等方面与对照相比明显异常。一些性状变异出现在 M2 代, 这可能是由于转化当代体细胞基因型不同, 形成嵌和体的缘故。M2TC243(1)和 M2TC243(2)的性状变异是一致的, 但是不能确定这几个变异性状是单基因或多基因控制的。M2TC243(1)的子代中 1 株表型和育性恢复正常, 说明 M2TC243(1)是杂合性的, M2TC243(2)的子代没有分离说明 M2TC243(2)是纯合性的。根据 M2TC243(1)的子代中一株恢复正常这个事实, 可以推测这几个变异性状是显性的。

离子束介导外源基因转化当代的成苗率在 83% 以上, 与传统的半致死诱变相比, 大大增加了可供筛选的群体。离子束介导外源全 DNA 转化的机理可能是外源无目的片段整合到受体基因组诱发受体发生变异的, 同传统辐射产生的碱基突变、片段缺失、倒置、插入(自身片段)等诱变机理不同, 因此这种诱变方法必定有自己独特的诱变规律, 产生一些新的突变类型。

参 考 文 献

- 1 Meinke D W, Cherry J M, Dean C, et al. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 1998, 282: 662~682
- 2 卞 坡, 霍裕平, 秦广雍等. 低能离子束刻蚀番茄果皮的 α 透射能谱研究. *生物物理学报*, 1999, 3: 551~555
- 3 吴丽芳, 李 红, 宋道君等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转 *GUS* 基因植株. *遗传学报*, 2000, 11: 982~991
- 4 Yu Z L, Yang J B, Wu Y J, et al. Transferring *GUS* gene into intact rice cells by low energy ion beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1993, 80, 81: 1328~1331
- 5 杨剑波, 吴李君, 吴家道等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株. *科学通报*, 1994, 16 : 1530~1534
- 6 吴丽芳, 李 红, 冯慧云等. 用低能氩离子束介导将水稻几丁质酶基因导入小麦. *科学通报*, 2000, 21: 2316~2321
- 7 李 红, 吴丽芳, 宋道君等. 离子束介导玉米 DNA 导入水稻引起遗传变异的 RAPD 分析. *激光生物学报*, 1994, (4): 261~265
- 8 F·奥斯伯, R·布伦特等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学

出版社, 1998. 37~38

10 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社,

9 刘良式. 植物分子遗传学. 北京: 科学出版社, 1998. 331~339

1998. 460~476

Mutagenic Effect of Exogenous DNA Transformation of *Arabidopsis thaliana* Mediated by Ion Beam

Bian Po¹⁾ Tan Zhongfang^{1,2)} Qin Guangyong¹⁾ Yu Zengliang³⁾ Huo Yuping¹⁾

¹⁾Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

²⁾College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

³⁾Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, Hefei 230031, China)

Abstract The total DNAs of *A. thaliana* (Lansberg ecotype), cabbage, red beet and aloes were respectively transformed into the *A. thaliana* (Columbia ecotype), mediated by Ar⁺ ion beam with the energy of 30 Kev and influence of 1.5×10^{17} ions/cm². In transferred generation, the rate of low-fertility plant changed from low to high, then to low with genetic relationship between recipient and DNA donors decreasing, while the rate of phenotypic variation in vegetal period had no link to genetic relationship. We analyzed the possible reason from the viewpoint of structure and development of *A. thaliana*'s mature embryo and features of ion-mediated transformation. Two stable mutants were obtained from offspring of low-fertility plants which not only kept the low-fertility but produced other phenotypic variations such as plant type and phylliform.

Key words exogenous transformation mediated by ion beam; mutagenesis; mutant

(责任编辑: 杨锦莲)