

氮离子注入的拟南芥 M1 代 RAPD 分析*

王卫东, 刘磊安, 王 燕, 秦广雍, 霍裕平

(郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

[摘 要] 对拟南芥种子进行能量为 30 keV 的不同剂量 N^+ 离子束诱变, 以当代拟南芥幼苗叶片为材料建立基因池, 并进行随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术分析。结果表明, 每个基因池可扩增出约 200 条有效条带, 不同剂量组变异率随剂量的增加而增大。对经离子注入后的拟南芥发芽率统计显示, 发芽率并不随剂量的增加而单调下降。最后初步探讨了不同剂量条件下发芽率和变异率变化趋势不一致的机制。

[关键词] 离子注入; 拟南芥; 离子束诱变; RAPD; 变异率

[中图分类号] Q947.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0045-04

离子束作为一种新的诱变源在我国已经被成功地应用于水稻、棉花等作物的诱变育种研究中。在过去的 20 多年中, 利用离子注入在水稻、小麦、棉花、甜菊、大豆等农作物中相继育出了新的品种和品系^[1,2]。近 10 年来, 离子束的应用范围逐渐拓宽, 在微生物诱变育种和辅助 DNA 转化等方面, 也逐渐显示出了广阔的应用前景。离子注入生物体内后, 由于注入离子的电、能、质的联合作用, 生物体表现出了不同于 X 射线和 γ 射线作用的生物效应^[3]。目前对低能离子的生物学效应也进行了众多研究, 并取得了一定的结果^[3~6]。随着分子生物学的发展, 从 DNA 水平检测植物变异的技术也愈来愈完善, 为进行辐射诱变机理方面的研究提供了便利的手段和方法。本研究以模式植物拟南芥为研究材料, 利用 RAPD 方法探讨了拟南芥在离子注入后引起的基因组 DNA 的变异, 以期对离子束诱变机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

拟南芥菜 (*A. thaliana*) 为 Columbia 生态型, 来自英国诺丁汉大学拟南芥储藏中心。为减小热效应对拟南芥种子的损伤, 将拟南芥干种子用双面胶带粘贴在导热性良好的厚金属片上, 面积为 3 cm^2 , 种子均匀分布。

1.2 方 法

1.2.1 离子注入 用本实验室进口的俄罗斯产 TITAN 离子注入机进行注入。注入的离子为氮离

子, 能量 30 keV, 剂量分别为 0.5×10^{17} , 1×10^{17} , 2×10^{17} , $4 \times 10^{17} N^+/\text{cm}^2$ 。注入机的工作条件: 真空度 5×10^{-2} Pa, 采用脉冲注入 (频率 25 Hz), 束流 200 mA。以未注入处理的干种子作对照。

1.2.2 栽培条件 将经离子注入后的拟南芥干种子从双面胶带上用水洗脱, 4 春化 3 d 后, 播种于营养土中, 每处理重复 3 次, 单粒播种。室内温度 23°C , 光照强度 4 000 lx, 光照时间每天 16 h。

1.2.3 观测和取材 出苗后 4 d 计算发芽率 (%), 10 d 对幼苗的发芽率进行观测统计。DNA 所需样品取自不同注入剂量的莲座叶, 剪下的新鲜叶片用纱布擦拭干净后备用。对每处理剂量, 随机选取 8 个单株基因组的 DNA 为 1 个基因池。DNA 提取采用基因组抽提试剂盒 (购自上海 Sangon 生物工程公司)。

1.2.4 RAPD 分析 本试验共用 50 条引物 (购自上海 Sangon 生物工程公司), 分别为 S41~S60, S161~S180, S27, S82, S108, S135, S140, S154, S204, S223, S346 和 S515。Ex Taq 酶, dNTP 和 PCR Buffer 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

RAPD 反应体系 (25 μL): Taq Plus 10 $\times$ Buffer 2.5 μL (100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 100 mmol/L KCl, 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mmol/L MgSO_4 , 1% TritonX-100); Taq plus DNA Polymerase 1 U; 模板 DNA 25 ng; dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各 6.25 mmol; primer 0.4 μmol 。

RAPD 反应程序^[7,8]: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 35 30 s, 40 30 s, 45 30 s, 72 2

* [收稿日期] 2003-07-25

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA302B-03)

[作者简介] 王卫东 (1977-), 男, 河南正阳人, 在读博士, 主要从事离子注入农作物后的生物效应研究。

m in, 共 5 个循环; 94 30 s, 35 45 s, 40 45 s, 45 45 s, 72 2 m in, 共 40 个循环; 最后 72 保持 5 m in, 降温至 4 时保存。

每次反应设不含模板的 DNA 空白为阴性对照, 设对照基因组 DNA 为阳性对照。RA PD 产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, 点样 5 μL, 电压 8 V/cm, 溴化乙锭染色后于紫外灯下观测并照相。每条引物重复扩增 3 次, 分析并统计数据。变异率按下式计算:

变异率/% = $\frac{\text{试验组与对照组差异条带数}}{\text{总条带数}} \times 100\%$

表 1 低能离子(30 keV)注入对拟南芥发芽势与发芽率的影响(平均值)

Table 1 Effect of low energy ions(30 keV) on *A. thaliana* germinating potential and germinating rate(average)

低能离子剂量/ ($\times 10^{17} \text{ N}^+ \cdot \text{cm}^{-2}$) Low energy ion fluence	发芽势/% Germinating potential	发芽率/% Germinating rate	低能离子剂量/ ($\times 10^{17} \text{ N}^+ \cdot \text{cm}^{-2}$) Low energy ion fluence	发芽势/% Germinating potential	发芽率/% Germinating rate
0(CK)	61	83	2	61	73
0.5	52	67	4	34*	41*
1	56	62			

注: * 表示在 0.05 水平上差异显著。
Note: * Statistically significant at 0.05 levels, respectively.

2.2 RAPD 分析

采用 RAPD 分子标记法分析了对照和低能离子注入后的 4 个处理。在所采用的 50 条引物中, 有 12 条没有扩增出条带, 其余的均能扩增出清晰、重复性好的条带。有些引物扩增出的带数可多达 7 条, 有的引物只扩增出 1 条。扩增产物的分子量在 250~2 000 bp, 主要集中在 350~1 500 bp。不同引物不仅扩增出的谱带数差异较大, 而且谱带差异率相差也较大, 其中 S44, S55, S165, S170, S171 和 S180 等引物扩增出的带谱差异率较大, 有些引物呈近 50% 的多态性(图 1A), 而有些引物不表现多态性(多态带数为零), 这说明不同序列在 DNA 链上

2 结果与分析

2.1 离子注入对发芽势和发芽率的影响

从表 1 可以看出, 离子注入后各剂量只有发芽势在 $2 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 剂量点能达到对照水平, 其余剂量下的发芽势及所有处理的发芽率均低于对照。剂量 $4 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 可达到半致死剂量。 t 检验表明, 剂量 $4 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 与对照相比, 差异达显著水平。这说明经离子处理后的种子的萌发力受到了一定程度的损伤, 造成萌发力降低。

的保守性不同, 对辐射的敏感性也不同。

所扩增的条带呈现出下列特点: (1) 对照和处理多具有相同的主扩增带, 大约 40 个引物都表现为这种特征, 这些 DNA 的片段应该说都是离子辐射的非敏感区序列。(2) 在所试各剂量组间存在差异片段, 其差异表现为扩增片段不同、主扩增带的不同或扩增强度不同。这些特点与其他作物或者微生物的核基因组扩增的结果相似, 说明辐射引起的差异与种间的基因差异相似, 存在较丰富的遗传多样性(图 1B)。(3) 随着离子注入剂量的增加, 差异条带数和变异率增加(表 2)。

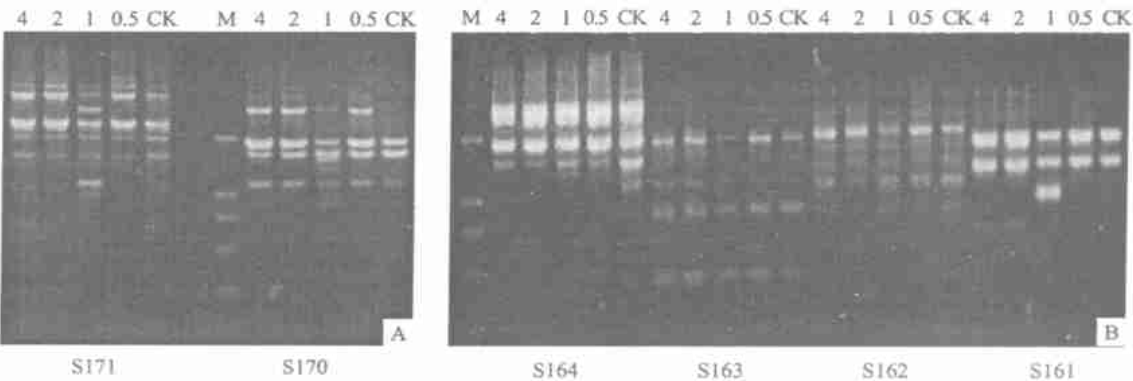


图 1 不同剂量和不同引物拟南芥的基因组多态性

M. DNA 标准分子量; CK. 对照样品; 0.5, 1, 2, 4 分别表示剂量为 $0.5 \times 10^{17}, 1 \times 10^{17}, 2 \times 10^{17}, 4 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$

Fig. 1 Some primers amplification image of the *A. thaliana* genomics by different low energy N^+ ion implantation
M. DNA marker; CK. Control Sample; 0.5, 1, 2, 4: Fluence $0.5 \times 10^{17}, 1 \times 10^{17}, 2 \times 10^{17}, 4 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$

表 2 不同剂量条件下 RA PD 产物变异率

Table 2 The mutagenetic percentages caused by different low energy N⁺ ion implantation

低能离子剂量/(×10 ¹⁷ N ⁺ ·cm ⁻²) Low energy ion fluence	差异条带数 Numbers of different bands	总条带数 Total numbers of bands	变异率/% Mutation percentages
0.5	12	212	5.7
1	17	203	8.4
2	23	202	11.4
4	29	202	14.4

辐射可能引起几种基因突变形式, 这些基因突变主要包括: 与引物互补位点发生碱基突变, 互补位点之间的 DNA 发生插入或缺失, 断裂或插入片段过大而导致不能扩增等, 从而使 RA PD 扩增条带改变。对于低能离子注入所引起的基因突变, 高剂量的低能离子引起的基因突变在数量上和程度上是低剂量的叠加, 表现出与剂量呈线性关系的特性。另外, 多拷贝引物结合位点上某些位置的碱基发生突变, 使引物结合量减少, 造成扩增出的 DNA 量减少, 或是出现的新片段与原有某条片段具有相近的 DNA 序列或分子量, 从而在电泳后出现谱带加深, 即反映出谱带深浅的变化。

3 讨 论

目前发现影响 RA PD 结果的因素很多^[9], 在做 RA PD 试验之前, 有必要优化出对拟南芥总基因组进行 PCR 的各个因素的较佳条件。保证 RA PD 分析稳定性的关键在于严格控制试验条件和规范操作手法, 同时要以多次试验中能重复出现的条带作为阳性扩增条带来分析基因组变异情况, 从而保障其

可靠性和准确度。

离子注入后种子的发芽率- 剂量曲线呈先降后升再降的“马鞍型”特性, 与 DNA 的突变率- 剂量的关系特征有一定差别, 这种现象可能是由于离子注入对种子造成的损伤在较低剂量下会启动某种修复体系^[10], 如酶的修复、DNA 的修复等。小剂量的离子注入引起的损伤较小, 此时修复系统尚未完全启动, 其结果是形成从外观看来较小的突变, 同时对种子萌发力损伤产生一定的抑制作用; 若注入剂量继续增大, 修复系统完全启动, 其效应不再是发芽率的持续降低, 而是出现一个发芽率提高的过程; 继续提高注入剂量, 则会使修复体系在短时间内不能完成修复, 或是由于 DNA 损伤修复系统本身遭到破坏而难以或不能起作用, 最终结果是发芽率骤降。

在低能离子造成的各种损伤的机理方面, 出现了各种各样的推测和假说, 随着生物技术的不断发展和进步, 致力于离子束生物效应研究的学者对此问题的解答也越来越完善, 但是还没有比较令人信服的结果。作为离子束诱变的理论基础, 这种机理的研究值得人们进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 吴敬德, 吴跃进, 汪秀峰, 等. 早粳 S9042 的选育及高产栽培技术[J]. 安徽农业科学, 1996, 24(2): 97- 98

[2] 杨赞林, 甘斌杰, 余增亮, 等. 皖麦 32 生物学特性和栽培技术[J]. 安徽农业科学, 1999, 27(4): 341- 342

[3] 余增亮, 霍裕平. 离子注入生物学研究述评[J]. 安徽农业大学学报, 1994, (3): 221- 225

[4] 余增亮, 邵春林, 杨建波. 离子刻蚀生物样品的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 1994, (3): 260- 264

[5] 邵春林, 吴跃进, 程备久, 等. 低能离子辐照生物体存活率剂量效应的质量效应模型[J]. 核农学报, 1995, 9(1): 37- 41

[6] 卫增泉, 韩光武, 马受武, 等. 低能重离子注入麦胚引起深层细胞损伤的一种可能机制[J]. 核技术, 1995, 18(2): 90- 93

[7] 孟金陵. 拟南芥及其分子生物学的研究[J]. 遗传, 1995, 17(增刊): 41- 45

[8] 梁前进, 胡玉连, 张根发. 拟南芥 (*A. rabidopsisth thaliana*) 氮、碳离子注入诱变效应分析[J]. 生物物理学报, 2001, 18(2): 251- 255

[9] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究[J]. 动物学研究, 1997, 18(2): 221- 227

[10] 陈若雷, 宋道军, 余增亮, 等. RA PD 分析 N⁺ 注入紫花苜蓿种子后幼苗基因组 DNA 变异[J]. 高技术通讯, 2001, (11): 12- 16

The variations of M 1 to the seeds of *A rabidopsis thaliana* implanted by keV N⁺ ion beam

WANG Wei-dong, LIU Lei-an, WANG Yan, QIN Guang-yong, HUO Yu-ping

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract After the *A rabidopsis thaliana* seeds were implanted by the different doses of the N⁺ ion beams with the energy of 30 keV, DNA pools were set up and their changes of the M 1 DNA were investigated using the method of RAPD. The results indicated that there are about 200 bands of RAPD generated. With the intensification of the implantation dose, compared with the control genomic DNA, the rates of the frequencies of RAPD variation increased. Moreover, the germination percentages of the implantation seeds were counted. It suggested that the germination percentages were not always decreased with the dose increase. And at last, the reason that the trends of the germination percentage and the mutation percentage with the different dose were not consistent was discussed.

Key words: ion implantation; *A rabidopsis thaliana*; ion beam mutation; RAPD; variation rate

· 简 讯 ·

“板栗保鲜贮藏技术”获陕西省科学技术二等奖

由西北农林科技大学林学院鲁周民副研究员主持的“板栗保鲜贮藏技术”为国家林业局重点科研项目(编号 97-11)。该成果于 2002 年 3 月通过国家林业局组织的技术成果鉴定, 2003 年获陕西省林业厅科技进步一等奖和全国商业科技进步一等奖, 2004 年 4 月获陕西省科学技术二等奖。

该项目研究了板栗采后呼吸强度变化规律及不同成熟度板栗的冰点, 首次提出板栗为非呼吸跃变型果实, 充分成熟的板栗具有较低的结冰点温度(-4~-5℃), 该结果为板栗在低温冷藏下的最佳贮藏温度参数的确定提供了理论依据; 研究了板栗采后失水变化和在贮藏过程中影响板栗腐烂的因素, 确定了板栗最佳采收期和在贮藏过程中减少失水和腐烂的前处理方法; 基本搞清了板栗采后的生理生化变化, 为板栗保鲜贮藏工艺及工艺参数的确定提供了理论依据; 进行了不同药剂、低温以及 γ 射线辐射处理抑制板栗萌发的试验, 提出了方便实用的抑制板栗萌发的技术, 并确定了采用 γ 射线抑制板栗萌发时的最佳辐射剂量; 提出了简单实用的板栗低温冷藏新工艺及工艺控制参数和板栗贮藏前处理技术, 为板栗的低温冷藏提供了可靠的技术依据; 首次确定了板栗气调贮藏时的O₂和CO₂浓度以及温、湿度等调控参数。

采用该技术可有效抑制霉菌的生长和板栗萌发, 使板栗保鲜贮藏期达 180 d, 好果率达 95% 以上。该研究成果已经在陕西省板栗产区应用于生产, 取得了很好的效果。本技术与生产实际结合紧密, 容易掌握, 适于栗农及中小企业应用, 投资小, 见效快。另外, 对于无冷藏库的地方, 采用本技术对板栗进行预处理后, 利用山洞或土窑洞贮藏, 也具有较好的贮藏效果。

(窦春蕊 供稿)