

玉米 DNA 诱导的水稻变异株特异序列分析

姬生栋,田存章,张洪超,李志坤,王小翠,姜晓冰,李万昌,王太霞
(河南师范大学 生命科学院,河南 新乡 453007)

摘要: 为了解外源 DNA 导入对受体水稻基因组 DNA 序列的影响,探索受体基因组发生碱基变异的规律,为外源 DNA 诱导水稻变异的研究提供数据。利用改良的花粉管通道法将玉米基因组 DNA 导入水稻受体日本晴中,获得的 2 个水稻变异株 B₁ 和 B₂,经 AFLP 分析,得到 14 条特异条带,对其序列分析发现:14 条特异序列测序共得到 3 791 个碱基,其中有 144 个碱基发生了突变,碱基总突变率为 3.80%。特异带的产生是由于限制性内切酶识别序列的碱基或选择性碱基发生突变,或 DNA 片段的插入或缺失所致。发生单碱基突变的频次显著高于双碱基突变、连续三碱基突变和连续多碱基插入或缺失。发生碱基置换的位点频率(87.04%)显著高于碱基的插入(3.70%)和缺失(9.26%)。在碱基置换中,转换的频率(76.47%)显著高于颠换(23.53%)。上述结果表明,外源 DNA 导入水稻细胞可诱导受体碱基发生突变,且发生碱基置换的位点频率最高,在碱基置换中以转换为主。

关键词: 水稻;玉米 DNA;AFLP;碱基

中图分类号: S513;Q319 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)08-0017-06

Sequence Analysis of Mutative Rice Plant Induced by Maize DNA

Ji Shengdong, Tian Cunzhang, Zhang Hongchao, Li Zhikun, Wang Xiaocui,
Jiang Xiaobing, Li Wanchang, Wang Taixia
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing 453007, China)

Abstract: In order to understand the changes of the genomic DNA of rice caused by the introduction of exogenous DNA, and explore the variation regularity of the recipient genome nucleotide, provide data for mutation by exogenous DNA introduction, two rice mutative materials B₁ and B₂ were obtained by using a modified “pollen-tube pathway” to transfer maize genomic DNA into rice receptor Nipponbare. Fourteen specific bands were got in the two mutant materials by AFLP analysis. And its sequence analysis revealed that 14 specific sequences included 3 791 bp, including 144 base mutation, the base mutation rate was 3.80%. specific bands resulted from base mutation of selective bases or restriction endonuclease recognition sequences, insertion or deletion of DNA fragments. The frequency of single base mutation was significantly higher than that of double bases mutation, three sequential bases mutation and multiple sequential bases mutation. The site frequency of base substitution (87.04%) was significantly higher than that of base insertion (3.70%) or deletion (9.26%). In all of the base substitutions, the frequency of transition (76.47%) was significantly higher than that of transversion (23.53%). The above results indicated that transferring alien species DNA into rice cell could induce base mutation of the receptor, and the site frequency of base substitution was the highest, the dominant type of base substitution was transition.

Key words: rice; maize DNA; AFLP; base

收稿日期:2015-03-16
基金项目:国家自然科学基金项目(31370219);河南省自然科学基金项目(112300410226,112106000037);河南水稻产业体系项目(Z2012-04-02)
作者简介:姬生栋(1963-),男,河南沁阳人,高级实验师,主要从事水稻分子育种研究。为通讯作者。
E-mail:jjisd99@126.com

利用外源 DNA 诱导水稻发生变异,已成为水稻品种改良和创制新种质的重要途径之一,并成功创造大量水稻新种质^[1-3]。赵炳然等^[4]用穗茎注射法将外源小粒野生稻基因组 DNA 直接导入水稻保持系 V20B 中,经 RAPD 分析,在变异品系中发现 1 条与供体 DNA 极为相似的特异序列,初步证明外源 DNA 片段可以转移进受体基因组中,同时还发现所转外源 DNA 片段的个别碱基发生突变。Luo 等^[5]用菰与水稻杂交,经过多代自交,获得了 3 个稳定的变异系,经 AFLP 分析,并通过对部分条带进行 DNA 凝胶印迹杂交和序列分析,证明外源 DNA 可以导致受体基因组发生改变。孙一丹等^[6]同样采用“穗茎注射法”将小粒野生稻基因组 DNA 导入水稻保持系 V20B,通过对变异系进行全基因组测序,比较分析变异系与 V20B 中 27 个可能与变异性状有关的基因,发现这些相关基因中的个别碱基发生了突变。Wang 等^[7]利用复态导入法将菰的基因组导入受体水稻,得到了稳定变异系 RZ35,并对 RZ35 与受体水稻进行全基因组测序,发现 RZ35 中存在大量的 SNPs、插入和缺失。但上述报道对碱基的突变类型和突变位点讨论较少,到目前为止,人们还无法从分子水平完整解释外源 DNA 诱导受体水稻产生变异的原因。为此,利用改良的花粉管通道法将玉米基因组 DNA 片段直接导入到受体水稻中,获得一批具有突出遗传特征的变异株,用 AFLP 技术对其中 2 个水稻变异材料进行多态性分析,并对扩增出的特异带进行序列分析,探讨这些特异带产生的原因,旨在揭示外源 DNA 诱导水稻发生变异的分子机制,为进一步研究生物诱变机制提供理论数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

DNA 供体为玉米杂交种郑单 14 (由河南省农业科学院提供,表示为 CK₁),受体水稻为日本晴,由新乡市农业科学院提供,表示为 CK₂。于 2010 年用改良的花粉管通道法将玉米基因组 DNA 片段直接导入水稻受体,从第 1 代中选出 2 个变异株(分别表示为 B₁、B₂),连续自交选育,用第 3 代种子培养黄化苗,提取 DNA 供 AFLP 分析。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 DNA 提取参照植物基因组 DNA 提取试剂盒(宝生物)操作方法。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其纯度和浓度, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 AFLP 分析 参考 Vos 等^[8]、魏松浩^[9]优化

的 AFLP 反应体系和扩增条件。接头和引物序列见表 1。从 64 对 AFLP 选扩引物中优化出 12 对引物 (P1M1、P1M2、P1M3、P2M4、P3M1、P3M5、P4M6、P4M8、P5M4、P7M1、P8M3、P8M4),对 CK₁、CK₂、B₁ 和 B₂ 的基因组 DNA 进行扩增,然后对其多态性图谱进行分析。

表 1 AFLP 接头与引物序列

接头及引物	序列(5'—3')		
<i>Pst</i> I 接头	CTCGTAGACTGCGTACATGCATGTACGCAG-TCTAC		
<i>Mse</i> I 接头	GACGATGAGTCCTGAGTACTCAGGACTCAT		
<i>Pst</i> I 预扩引物	GACTGCGTACATGCAGA		
<i>Mse</i> I 预扩引物	GATGAGTCTGAGTAAC		
选扩引物	Po;GACTGCGTACATGCAG Mo;GATGAGTCTGAGTAA		
<i>Pst</i> I 选扩引物	P1;Po - AAC	P2;Po - AAG	P3;Po - ACA P4;Po - ACC P5;Po - ACG P6;Po - ACT P7;Po - AGC P8;Po - AGG
<i>Mse</i> I 选扩引物	M1;Mo - CAA	M2;Mo - CAC	M3;Mo - CAG M4;Mo - CAT M5;Mo - CTA M6;Mo - CTC M7;Mo - CTG M8;Mo - CTT

1.2.3 特异带的回收纯化 从聚丙烯酰胺凝胶中切取特异带(变异材料中扩增到而受体 CK₂ 中没有的条带),放入 1.5 mL 离心管中,吸取 100 μL 的灭菌双蒸水(ddH₂O)冲洗胶块,吸去灭菌 ddH₂O;用 100 μL 的灭菌 ddH₂O 浸泡 5 min,吸去灭菌 ddH₂O,碾碎,再加 60 μL 灭菌 ddH₂O 浸泡 5 h,沸水浴 15 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清作为 PCR 扩增的模板,按照选择性扩增条件对回收 DNA 片段进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外分析仪中切取含有特异带的琼脂糖凝胶进行回收,回收方法参照 TaKaRa 微量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒。

1.2.4 特异条带的克隆、测序、序列比对 将回收的 DNA 片段与载体 pMD19 - T 连接,转化感受态大肠杆菌,通过蓝、白斑筛选,挑取阳性克隆于含 100 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基中,振荡培养 3 ~ 4 h,将培养好的菌液送上海生工生物工程技术有限公司测序。用 DNAMAN 软件从测序结果中找出特异序列,与 NCBI 数据库中水稻日本晴序列进行比对分析。根据 NCBI 数据库中特异条带对应的日本晴序列,在其序列两侧分别设计引物(用 Premier 5.0 软件设计特异性引物,经 Oligo7 验证评估,见表 2),分别以对照日本晴和变异材料基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,对扩增片段进行测序,然后将特异序列与对照序列进行比对、分析。

表 2 特异序列两侧引物

引物	序列(5′—3′)
Upper - P1M1 - B ₁ - 126	GTTCTTGGTGGCGTATGATTT
Lower - P1M1 - B ₁ - 126	GCTTGCCATCTTTGTCCTCCCT
Upper - P1M2 - B ₂ - 283	TAGTGCTGCACGAGAAGCGAGG
Lower - P1M2 - B ₂ - 283	CAGACTCAGCAGCGTTGGCACT
Upper - P1M2 - B ₂ - 218	AAAGTTTATCGCATTGAGCACG
Lower - P1M2 - B ₂ - 218	CTGTTATTGAAGGCGGCGAGAT
Upper - P1M3 - B ₂ - 159	ACACTACTTTTGAGGGGTTGCT
Lower - P1M3 - B ₂ - 159	AACGAATAGACTTAATGAATGGAC
Upper - P2M4 - B ₁ - 325	AGCGGTAGCAGATCGAGTATCC
Lower - P2M4 - B ₁ - 325	TTGATGGTGACGGAGGAAAAGG
Upper - P3M1 - B ₂ - 378	GTGGTCTTCTGGCATCTTATC
Lower - P3M1 - B ₂ - 378	CAGTCCAACAACACACAGAAGCG
Upper - P3M5 - B ₁ - 367	ATTTAGGTGGTGTCTGGTTGGAG
Lower - P3M5 - B ₁ - 367	CATTACCAGCAGCGGAGTATCTT
Upper - P4M6 - B ₂ - 188	GCCATTTTAGCCTGGTGTTTGC
Lower - P4M6 - B ₂ - 188	ATTCTACCTCGTAACCATTAT
Upper - P4M8 - B ₁ - 118	TTAACTTATTCCTGAAGAATTGGG
Lower - P4M8 - B ₁ - 118	CAAAATTGGCCCTGGTAAGGTTTT
Upper - P5M4 - B ₁ - 313	TGGGGATGGAAGATATACTCTCTG
Lower - P5M4 - B ₁ - 313	CTCCCTCCTAAGCCTTGTAAT
Upper - P7M1 - B ₁ - 581	TTAGTGCTACAGGTAAGGTTTCG
Lower - P7M1 - B ₁ - 581	CTCCAACAAGGAAGATGCCAAG
Upper - P8M3 - B ₁ - 257	ATTTCTGTGTAAGTAAACTGGC
Lower - P8M3 - B ₁ - 257	GAAGGAAGCGGAGGTGGAAGAG
Upper - P8M4 - B ₁ - 200	GCAGAGGAATGATATTGCCCTGAT
Lower - P8M4 - B ₁ - 200	AGATGCCATAATAACTCTTCACTAC

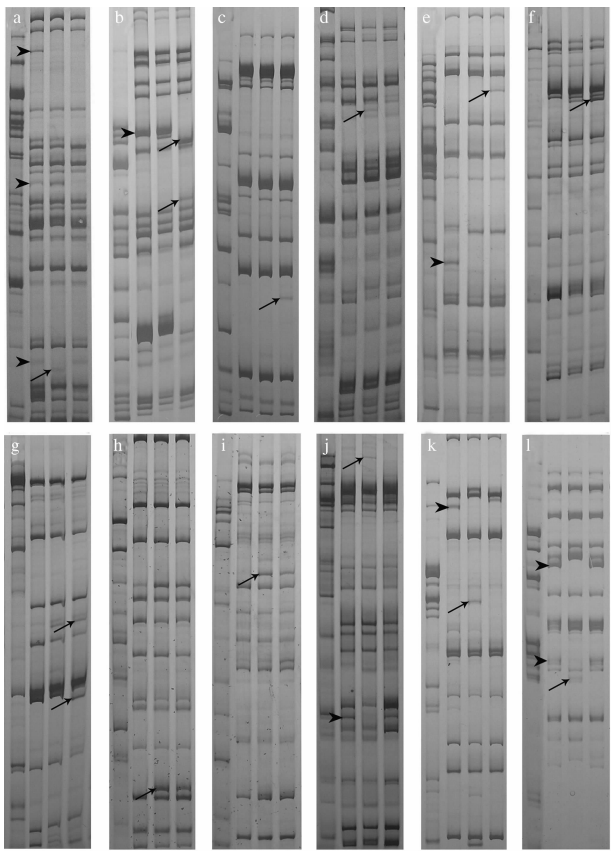
2 结果与分析

2.1 供试材料基因组 DNA 多态性图谱分析

用优化的 12 对 AFLP 选扩引物对 CK₁、CK₂、B₁ 和 B₂ 的基因组 DNA 进行扩增,由 AFLP 扩增图谱(图 1)可以看出:在变异材料 B₁、B₂ 中扩增到 14 条特异带和 9 条缺失带。由于 AFLP 扩增条带是由限制性内切酶识别序列(以下简称酶切识别序列)和选择性碱基决定的,因此,在变异材料 B₁、B₂ 中扩增出的特异带和缺失带,可能是由于外源 DNA 的导入,引起受体基因组中酶切识别序列和选择性碱基的个别碱基发生突变,或 DNA 片段的插入或缺失所致。

2.2 特异序列的突变碱基分析

对 14 条特异序列与对照序列进行比对分析(表 3),测序共得到 3 791 个碱基,其中有 144 个碱



a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l 依次为选扩引物 P1M1、P1M2、P1M3、P2M4、P3M1、P3M5、P4M6、P4M8、P5M4、P7M1、P8M3、P8M4 的 AFLP 扩增图谱。每个图谱加样顺序从左到右依次为:CK₁、CK₂、B₁、B₂。“→”表示扩增得到的特异带。“>”表示缺失带。

图 1 水稻变异材料 B₁、B₂、CK₁、CK₂ 的 AFLP 扩增图谱

基发生了突变,碱基总突变率为 3.80%。变异材料 B₁ 测序得到 2 287 个碱基,其中 111 个碱基发生突变,碱基突变率 4.85%;变异材料 B₂ 测序得到 1 504 个碱基,其中 33 个碱基发生突变,碱基突变率为 2.19%。对碱基突变位点分析发现,有 43 处发生单碱基突变,5 处发生双碱基突变,1 处发生连续三碱基突变,1 处发生连续多碱基插入,4 处发生连续多碱基缺失。由此可知,发生单碱基突变的频次显著高于双碱基突变、连续三碱基突变和连续多碱基插入或缺失。说明外源玉米 DNA 的导入可以诱导受体水稻基因组 DNA 中的碱基发生突变,发生单碱基突变的频次最高。

表 3 14 条特异序列的碱基分析

材料	碱基/个	突变碱基/个	单碱基突变/个	双碱基突变/个	连续三碱基突变/个	连续多碱基突变/个	碱基突变率/%
B ₁	2 287	111	22	3	1	4	4.85
B ₂	1 504	33	21	2	0	1	2.19
总计	3 791	144	43	5	1	5	3.80

对 14 条特异序列的突变碱基进行分析,结果见表 4—10。序列 P1M1 - B₁ - 126、P1M2 - B₂ - 283、

P2M4 - B₁ - 325 分别只有 1 个碱基发生突变,序列 P4M8 - B₁ - 118 有 2 个单碱基突变(表 4)。序列

P1M3 - B₂ - 159 有 3 个碱基发生突变,其中 1 处单碱基突变,1 处双碱基突变;序列 P8M3 - B₁ - 257 有 9 个碱基发生突变,其中包括 4 处单碱基突变,1 处双碱基突变和 1 处连续三碱基突变(表 5)。序列 P3M1 - B₂ - 378、P5M4 - B₁ - 313 分别有 4 个单碱基突变(表 6)。序列 P7M1 - B₁ - 581 有 5 个单碱基突变;序列 P4M6 - B₂ - 278 有 6 个单碱基突变(表 7)。序列 P4M6 - B₂ - 188 有 10 个碱基发生突

变,其中 8 处单碱基突变,1 处双碱基突变(表 8)。序列 P1M2 - B₂ - 218 在第 177—184 位插入 8 个碱基;序列 P8M4 - B₁ - 200 在第 133—145 位缺失 13 个碱基,另有 2 个单碱基突变(表 9)。序列 P3M5 - B₁ - 367 有 74 个碱基发生突变,其中有 3 处单碱基突变,2 处双碱基突变,3 处 DNA 短片段缺失,在第 245—263 位缺失 19 个碱基,第 300—315 位缺失 16 个碱基,第 336—367 位缺失 32 个碱基(表 10)。

表 4 序列 P1M1 - B₁ - 126、P1M2 - B₂ - 283、P2M4 - B₁ - 325、P4M8 - B₁ - 118 比对结果

特异序列	8 位	特异序列	8 位	特异序列	8 位	特异序列	32 位	110 位
CK ₂ (126 bp)	G	CK ₂ (283 bp)	G	CK ₂ (325 bp)	G	CK ₂ (118 bp)	A	A
P1M1 - B ₁ - 126	A	P1M2 - B ₂ - 283	A	P2M4 - B ₁ - 325	A	P4M8 - B ₁ - 118	G	G

注:“—”表示为缺失,下表同;序列 PxMy - B₁ (B₂) - n;PxMy 为选扩引物组合,x、y 表示选扩引物 1~8, n 为特异序列的碱基数,B₁、B₂ 为变异材料;CK₂ 为对照水稻日本晴,下表同。

表 5 序列 P1M3 - B₂ - 159、P8M3 - B₁ - 257 比对结果

特异序列	130—131 位	154 位	特异序列	6 位	66 位	82 位	170 位	211—212 位	241—243 位
CK ₂ (161 bp)	TA	C	CK ₂ (254 bp)	T	C	T	G	CA	—
P1M3 - B ₂ - 159	—	T	P8M3 - B ₁ - 257	A	A	C	C	TG	CTT

表 6 序列 P3M1 - B₂ - 378、P5M4 - B₁ - 313 比对结果

特异序列	6 位	53 位	209 位	272 位	特异序列	7 位	9 位	22 位	276 位
CK ₂ (378 bp)	T	T	C	A	CK ₂ (313 bp)	C	A	A	A
P3M1 - B ₂ - 378	A	C	A	C	P5M4 - B ₁ - 313	A	G	G	G

表 7 序列 P7M1 - B₁ - 581、P4M6 - B₂ - 278 比对结果

特异序列	4 位	75 位	179 位	296 位	530 位	特异序列	1 位	4 位	153 位	157 位	219 位	224 位
CK ₂ (581 bp)	T	A	C	T	T	CK ₂ (278 bp)	G	T	C	A	G	C
P7M1 - B ₁ - 581	A	G	T	C	C	P4M6 - B ₂ - 278	C	C	T	T	A	T

表 8 序列 P4M6 - B₂ - 188 比对结果

特异序列	1—2 位	20 位	50 位	62 位	85 位	101 位	112 位	126 位	154 位
CK ₂ (188 bp)	CA	G	A	G	G	C	A	T	T
P4M6 - B ₂ - 188	TT	A	G	A	A	T	G	C	C

表 9 序列 P1M2 - B₂ - 218、P8M4 - B₁ - 200 比对结果

特异序列	177—184 位	特异序列	47 位	133—145 位	150 位
CK ₂ (210 bp)	—	CK ₂ (213 bp)	C	AACCATATTTTGG	T
P1M2 - B ₂ - 218	GAGCCACT	P8M4 - B ₁ - 200	T	—	C

表 10 序列 P3M5 - B₁ - 367 比对结果

特异序列	29 位	203 位	245—263 位	265—266 位	293—294 位	300—315 位	331 位	336—367 位
CK ₂ (434 bp)	G	A	TTTTTAAAC- CAAAGTATC	TG	AC	TACCACGA- TAACCGTA	G	CCCTACTCAAACGGT- TTGGTAAACCTCGAGC
P3M5 - B ₁ - 367	A	T	—	CA	GT	—	A	—

对 14 条特异序列的酶切识别序列和选择性碱基进行分析(表 11)可知,P1M1 - B₁ - 126、P1M2 - B₂ - 283、P2M4 - B₁ - 325、P4M8 - B₁ - 118、P1M3 - B₂ - 159、P8M3 - B₁ - 257、P3M1 - B₂ - 378 和 P5M4 - B₁ - 313 这 8 条特异序列均是与酶切识别位点相邻的非选择性碱基突变成选择性碱基,而酶切识别序列的

碱基未发生突变;序列 P7M1 - B₁ - 581、P4M6 - B₂ - 278、P4M6 - B₂ - 188 均是非酶切识别序列突变成酶切识别序列,而选择性碱基未发生突变;序列 P1M2 - B₂ - 218、P8M4 - B₁ - 200、P3M5 - B₁ - 367 的酶切识别序列和选择性碱基均未发生突变,但序列中均存在 DNA 片段的插入或缺失。上述结果说明特异序列的

表 11 水稻变异材料特异序列的内切酶识别序列及选择性碱基突变分析

特异序列	<i>Pst</i> I 识别序列及选择性碱基		<i>Mse</i> I 识别序列及选择性碱基	
	CK ₂	变异材料	CK ₂	变异材料
P1M1 - B ₁ - 126	5' - CTGCAGAGC→CTGCAG <u>A</u> AC		5' - TTGTTAA→TTGTTAA	
P1M2 - B ₂ - 283	5' - CTGCAGAGC→CTGCAG <u>A</u> AC		5' - GTGTTAA→GTGTTAA	
P1M2 - B ₂ - 218	5' - GTTCTGCAG→GTTCTGCAG		5' - TTAACAC→TTAACAC	
P1M3 - B ₂ - 159	5' - CTGCAGAAC→CTGCAGAAC		5' - CCGTTAA→CTGTTAA	
P2M4 - B ₁ - 325	5' - CTGCAGAGG→CTGCAG <u>A</u> AG		5' - ATGTTAA→ATGTTAA	
P3M1 - B ₂ - 378	5' - TGTCTGCAG→TGTCTGCAG		5' - TTAAC <u>T</u> A→TTAAC <u>C</u> AA	
P3M5 - B ₁ - 367	5' - TGTCTGCAG→TGTCTGCAG		5' - TTAAC <u>T</u> A→TTAAC <u>T</u> A	
P4M6 - B ₂ - 188	5' - GGTCTGCAG→GGTCTGCAG		5' - CAAAC <u>T</u> C→TTAACTC	
P4M6 - B ₂ - 278	5' - GTGTAGACC→ <u>C</u> TGCAGACC		5' - GAGTTAA→GAGTTAA	
P4M8 - B ₁ - 118	5' - GATCTGCAG→G <u>G</u> TCTGCAG		5' - TTAAC <u>T</u> T→TTAAC <u>T</u> T	
P5M4 - B ₁ - 313	5' - CTGCAGCCA→CTGCAG <u>A</u> CG		5' - ATGTTAA→ATGTTAA	
P7M1 - B ₁ - 581	5' - GCTCTGCAG→GCTCTGCAG		5' - TTATCAA→TTA <u>A</u> CAA	
P8M3 - B ₁ - 257	5' - CCTCTGCAG→CCTCTGCAG		5' - TTAAC <u>T</u> G→TTAAC <u>C</u> AG	
P8M4 - B ₁ - 200	5' - CTCCAGAGG→CTCCAGAGG		5' - ATGTTAA→ATGTTAA	

注:*Pst* I、*Mse* I 为 2 种限制性内切酶;下面划横线碱基为选择性碱基,方框中的碱基为突变碱基。

产生是由于酶切识别序列碱基或选择性碱基发生突变,或 DNA 片段的插入或缺失所致。

2.3 特异序列的碱基突变类型分析

由表 12 可知,在 14 条特异序列中有 54 个位点共 144 个碱基发生突变。其中有 47 个位点共 51 个碱基发生置换,碱基突变率为 35.42%,突变位点频率为 87.04%。有 2 个位点共 11 个碱基发生插入,碱基突变率为 7.64%,突变位点频率为 3.70%。有 5 个位点共 82 个碱基发生缺失,碱基突变率为 56.94%,突变位点频率为 9.26%。由此可见,虽然发生碱基缺失的数量最多,但发生碱基置换的位点频率显著高于插入和缺失。

表 12 碱基突变类型及位点分析

碱基突变类型	碱基数 / 个	碱基突变率 / %	突变位点 / 个	突变位点频率 / %
碱基置换	51	35.42	47	87.04
碱基插入	11	7.64	2	3.70
碱基缺失	82	56.94	5	9.26
总计	144	100	54	100

2.4 特异序列的碱基置换类型分析

由表 13 可知,共有 51 个碱基发生置换,其中有 12 个碱基发生颠换,颠换频率为 23.53%,有 39 个碱基发生转换,转换频率为 76.47%,发生碱基转换的频率是颠换的 3.25 倍,表明在碱基置换中,发生碱基转换的频率显著高于颠换。在碱基颠换中,发生 A→T、C→A 和 T→A 的碱基数均为 3 个,发生 A→C 和 G→C 的碱基数分别为 1 个和 2 个,发生

G→T、C→G 和 T→G 的碱基数均为 0 个。表明在碱基颠换中,可能主要以 A→T、C→A 和 T→A 为主。在碱基转换中,发生 G→A、A→G、C→T 和 T→C 的碱基数分别是 10 个、10 个、9 个和 10 个,说明 4 种碱基转换的发生概率差别不大。

表 13 突变碱基置换类型分析

类型	碱基 / 个	频率 / %
颠换	12	23.53
A→C	1	1.96
A→T	3	5.88
G→C	2	3.92
G→T	0	0
C→A	3	5.88
C→G	0	0
T→A	3	5.88
T→G	0	0
转换	39	76.47
G→A	10	19.61
A→G	10	19.61
C→T	9	17.65
T→C	10	19.61
总计	51	100

3 结论与讨论

关于外源 DNA 诱导水稻发生变异的分子机制,万文举等^[10]认为,外源 DNA 导入具有基因转移和诱变的双重作用,并将这种诱变称为生物诱变。本研究用 AFLP 方法对玉米 DNA 诱导的水稻变异材料 B₁、B₂ 进行分析,得到 14 条特异带,通过对其序

列分析发现,特异带的产生是由于酶切识别序列碱基或选择性碱基发生突变,或 DNA 片段的插入或缺失所致。这既说明用 AFLP 方法检测 DNA 变异具有稳定的可靠性,同时说明外源 DNA 的导入不仅可以引起受体水稻基因组中的个别碱基发生突变,而且可以引起受体基因组中 DNA 片段的插入和缺失。可以推测,这种碱基突变不仅发生在本试验所检测到的 14 条特异序列中,而且在突变体基因组的其他地方也可能发生。Wang 等^[7]通过对菰与水稻杂交获得的变异系和受体水稻进行全基因组测序,发现 RZ35 全基因组中存在大量的碱基突变,与上述结论一致,说明远缘杂交与外源 DNA 直接导入都具有生物诱变效应,表明外源基因组 DNA 直接导入水稻是一种可行的生物诱变途径。

特异序列的碱基突变率达到 3.80%,远高于自然条件下作物的突变率,说明玉米 DNA 导入水稻具有显著的诱变作用。Luo 等^[5]通过用菰与水稻杂交获得 3 个稳定的变异系,经 AFLP 分析,对部分条带的序列进行分析,发现这些序列的碱基突变率达到 6.4%。表明外源 DNA 导入受体水稻与远缘杂交都具有较高的诱变效应。

在各碱基突变类型中,碱基置换主要为单碱基,而碱基缺失和插入偏向于发生连续多个碱基,发生碱基置换的位点频率显著高于插入和缺失,说明花粉管通道法介导外源 DNA 引起受体变异,在第 3 代变异材料中碱基突变类型主要是碱基置换,至于是否存在外源 DNA 片段插入,有待于进一步研究。

在碱基置换中,发生碱基转换的频率(76.47%)显著高于碱基颠换(23.53%),碱基转换是颠换的 3.25 倍;Wang 等^[7]通过对 RZ35 全基因组中的碱基置换分析,同样发现碱基转换的频率显著高于颠换;邓传良等^[11]用离子注入对莲花进行诱变,通过对 6 个莲花突变体和对照的基因组进行 RAPD 分析,将突变体与对照在辐射敏感位点的条带进行测序比对分析,发现发生碱基转换的频率是颠换 2.7 倍,说明外源 DNA 直接导入与远缘杂交和离子注入可能具有类似的诱变效应。为什么在碱基置换中偏向于碱基转换,是否与其分子结构等因素有关,值得进一步研究。

外源玉米 DNA 导入,引起受体水稻基因组中的碱基发生突变,如果碱基突变发生在影响基因功能的关键部位,就可能影响该基因的表达,进而影响编码蛋白质的表达、结构及功能,使其后代在表型上发生变异。姬生栋等^[12]通过复性电泳分析,发现用离

子束介导法将玉米 DNA 导入水稻种子胚中,可引起受体水稻幼苗根系中蛋白水解酶的表达发生变化,这种变化可能是由于受体碱基突变所致。将基因变异与表型变异结合起来,对发现和研究某些功能基因具有重要意义,相关研究数据将在后续报道。

参考文献:

- [1] 周建林,李阳生,李达模. 稗草 DNA 导入水稻产生的变异体的耐铁毒特性和 RAPD 分析[J]. 作物学报, 2001,27(4):529-532.
- [2] Tian F, Li D J, Fu Q, et al. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(3): 570-580.
- [3] 姬生栋,朱德来,王海莎,等. 介导玉米 DNA 的水稻高秆变异株 AFLP 分析[J]. 河南农业科学, 2012,41(5): 22-25.
- [4] 赵炳然,贾建航,王倩,等. 总 DNA 导入水稻后变异系及供体特异带 DNA 片段的核苷酸序列比较[J]. 杂交水稻, 2001,16(2):46-49.
- [5] Luo X D, Dai L F, Cao J F, et al. Identification and molecular cytology analysis of cold tolerance introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff[J]. Euphytica, 2012,187(3):461-469.
- [6] 孙一丹,胡远艺,彭彦,等. 水稻外源 DNA 导入变异系与受体的农艺性状差异及其基因变异分析[J]. 杂交水稻, 2013,28(2):62-67.
- [7] Wang Z H, Zhang D, Bai Y, et al. Genomewide variation in an introgression line of rice-*Zizania* revealed by whole-genome re-sequencing[J]. PloS One, 2013,8(9):e74479.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995,23(21):4407-4414.
- [9] 魏松浩. 介导玉米 DNA 的水稻变异株系分子机理研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2013:18-20.
- [10] 万文举,邹冬,彭克勤. 论生物诱变——外源 DNA 导入的双重作用[J]. 湖南农学院学报, 1992,12(4): 886-891.
- [11] 邓传良,贾彦彦,任映雪,等. 离子注入诱变莲花突变体分子机理的初步研究[J]. 遗传, 2011,33(1): 81-87.
- [12] 姬生栋,袁召,王书玉,等. 离子束介导玉米 DNA 影响水稻幼苗根系蛋白水解酶的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010,26(5):442-443.