

离子束介导玉米 DNA 后受体小麦当代群体的生物学效应

黄群策, 赵帅鹏, 冯伟森

(郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 以 6 份玉米品种的全基因组 DNA 为供体, 以 4 份普通小麦品种为受体, 借助于低能离子束介导技术完成异源遗传物质的转移, 对其介导试验的当代群体的特异性进行了观察鉴定。结果表明, 经过离子束注入处理后试验材料的成苗率明显地降低, 这是低能离子所导致的生物学效应之一。在所有的试验材料的生育前期和中期, 在每一个处理的群体内主要农艺性状上没有表现出明显的差异, 而在生育后期, 被处理材料的大部分农艺性状与对照没有显著差异, 仅仅在 4 个性状, 即植株的生长势、穗型、主茎分蘖状态和单穗变异上, 被处理材料表现出一定的变异特征。尽管离子束注入处理和直接浸泡外源 DNA 的处理也会导致其当代群体内出现突变株, 但其群体内的突变株数量比较少, 突变率比较低。经过离子束介导处理所导致的生物学效应最明显, 其群体内的突变株数量比较多, 突变率比较高。

关键词: 离子束介导技术; 玉米 DNA; 普通小麦; 生物学效应

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)12-0023-04

Transferring Corn DNA into Wheat Via Ion Beam Mediated Method

HUANG Qun-æ, ZHAO Shuai-peng, FENG Wei-sen

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In the experiment, 6 corn varieties were taken as the donors and 4 wheat varieties as the acceptor, and the transformation of hereditary materials were completed by ion beam mediated technique. The characteristics of the materials in M1 were identified. The results showed that the seedling frequency of wheat after ion beam implantation was lowered, which was one of the biological effects of low energy ion beam. In early and mid growing stages, the main agronomic characters of the materials did not display obvious differences. In late stages, most of the agronomic characters had no differences from CK except the growth vigour, ear shape, tillering state and single ear variation. In CK2-1—CK2-4 and CK3-1—CK3-4, there was also mutation, but the mutation number was few and the mutation frequency was low. The biological effects of ion beam treatment was apparent, with more mutation plants and higher variation frequency.

Key words: Ion beam mediated technique; Corn DNA; Wheat; Biological effects

现代植物遗传改良的突出成就主要是 20 世纪 60 年代掀起的作物矮化育种和 20 世纪 70 年代兴起的以挖掘水稻产量潜力为主题的杂种优势利用, 这 2 次重大突破主要受益于育种思路的创新和新种

收稿日期: 2008-04-19

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)

作者简介: 黄群策(1958-), 男, 广西全州人, 教授, 博士, 博士生导师, 河南省特聘教授, 主要从事离子束生物技术的研究工作。

质的有效利用。小麦是 C_3 植物, 其光合效率明显比玉米等 C_4 植物的光合效率要低一些。一些研究者很早就设想通过现代生物技术将玉米等 C_4 植物的遗传物质导入水稻中, 以便培育出光合效率更高的带有玉米优良特性的水稻新材料。

具有我国独立知识产权的离子束生物技术经过 20 多年的不断探索和完善之后, 其实用性已经得到充分地肯定^[1~4]。利用低能离子束介导技术已经将供体的遗传物质成功地转入到受体并获得了一些植物新材料^[5,6]。基于前人的研究结果, 我们以 6 份玉米品种的全基因组 DNA 为供体, 以 4 份普通小麦品种为受体, 借助于低能离子束介导技术完成异源遗传物质的转移, 对其介导试验的当代群体的特异性进行了观察鉴定, 旨在探讨在离子束介导试验中受体当代群体的生物学效应, 为进一步完善离子束介导技术积累更多的研究资料。

1 材料和方法

在介导试验中所采用的受体材料为 4 份小麦品种(兰考 4 号、兰考 906、周麦 16 和济南 17); DNA 供体材料包括 6 份玉米品种(西星黄糯 1 号、西星黄糯 6 号、西星赤糯 1 号、百粘玉米、白糯 1 号、黑珍珠), 它们分别由河南农业大学小麦育种研究室和玉米育种研究室提供。

供体 DNA 大片段的获得采用 CTAB 法提取。以 6 份玉米品种的幼嫩叶片为材料, 分别大量提取幼苗叶片中的 DNA, 将其保存在 4°C 条件下备用。利用紫外分光光度计测定 DNA 纯度与浓度, A_{260}/A_{280} 比值均在 $1.8 \sim 2.0$, 对提取的 DNA 大片段进行琼脂糖凝胶电泳的检测结果表明, DNA 大片段呈现出单一区带。在进行介导试验时的 DNA 溶液浓度为 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$, 利用 $0.1 \times \text{SSC}$ 缓冲液作为稀释液。

在试验设计中包括 6 个供体材料和 4 个受体材料, 其介导处理的组合数目为 24 个。每份供试材料在每一种介导处理中的种子数目为 2000 粒。此外, 以未经过离子注入处理的受体材料(CK1-1—CK1-4)、经过离子束注入处理的受体材料(CK2-1—CK2-4)和未经过离子束注入处理且直接浸泡外源 DNA 的受体材料(CK3-1—CK3-4)分别作为对照。除了 CK1-1—CK1-4 对照材料每份所包括的种子数目为 200 粒之外, 其余对照材料每份所包括的种子数目均为 2000 粒。

对受体种子的前处理按照离子束介导试验的正

规方式进行。首先将小麦种子放入 70% 乙醇中浸泡 1 min, 用无菌双蒸水将其冲洗干净, 然后利用 0.1% 的升汞溶液浸泡 15 min, 再利用无菌双蒸水将其冲洗干净。将消毒后的种子放在无菌滤纸上吸干多余的水, 放入超净工作台中吹干。

对受体种子进行氮离子注入处理也按照正规方式进行。将消毒后的种子摆放在样品盘中, 其胚部朝向离子注入方向。 N^+ 注入处理在河南省离子束生物工程重点实验室进口的俄罗斯科学院强电子研究所制造的离子注入机的靶室内进行。注入离子的能量为 30 keV, 注入剂量为 $3 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 。将经过离子束注入后的试验材料分别在供体 DNA 溶液中浸泡 24 h。随后, 利用清水将其冲洗干净, 直接播种在试验地中。采用常规的栽培管理措施。

对于介导试验的第 1 代群体, 主要根据田间农艺性状的表现对其进行观察鉴定。在试验中所鉴定的主要农艺性状包括成苗率、穗型、生长势、主茎、分蘖的同步状态和分蘖状态。对介导材料的效果评价主要采用变异率这个指标, 其计算公式如下:

$$\text{变异率} = \frac{\text{试验材料变异株数}}{\text{试验材料种子数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

根据试验材料在田间的表现, 对其成苗率、穗型、生长势、主茎分蘖的同步状态和分蘖状态进行了鉴定和统计(表 1)。从试验材料的成苗率来看, 未经过离子注入处理的受体材料(CK1-1—CK1-4)(即空白对照)均表现出比较高的成苗率($85.0\% \sim 88.0\%$); 未经过离子束注入处理且直接浸泡外源 DNA 的受体材料(CK3-1—CK3-4)的成苗率也比较高($81.5\% \sim 86.3\%$); 经过离子束注入处理的受体材料(CK2-1—CK2-4)的成苗率比较低($33.0\% \sim 47.5\%$); 经过离子束注入处理后进行 DNA 介导处理的受体材料的成苗率也比较低($35.4\% \sim 55.2\%$)。由此可见, 试验材料的成苗率在同一处理不同基因型之间存在着明显的差异, 不同的试验处理对同一基因型材料的成苗率也会产生明显不同的影响, 经过离子束注入处理后试验处理的成苗率都会明显的降低。

从试验材料在田间的表现状态来看, 各份试验材料所表现出的特异性相当明显。然而, 在生育前期和中期, 所有试验材料中每一个处理的群体内在主要农艺性状上没有表现出明显的差异。在生育后期, 在当代群体内被处理材料的大部分农艺性状与

表 1 介导材料当代群体内的变异状态

材料	处理	成苗率(%)	弱生长势	畸形穗	主茎分蘖不同步	单穗植株	变异株总数
兰考 906	CK 1-1	85.5	0	0	0	0	0
	CK 2-1	33.0	0	1	11	0	12
	CK 3-1	83.5	0	26	16	6	48
	介导	35.4	17	76	37	28	158
兰考 4 号	CK 1-2	88.0	0	0	0	0	0
	CK 2-2	47.5	0	6	0	3	9
	CK 3-2	86.3	5	42	2	18	67
	介导	41.2	16	75	14	93	198
周麦 16	CK 1-3	87.0	0	0	0	0	0
	CK 2-3	42.0	1	4	0	3	8
	CK 3-3	81.5	1	2	0	1	4
	介导	55.2	14	65	3	32	114
济南 17	CK 1-4	85.0	0	0	0	0	0
	CK 2-4	42.0	0	1	0	0	1
	CK 3-4	82.8	6	1	2	6	15
	介导	54.0	19	3	8	42	72

注: CK 1-1—CK 1-4 分别代表空白对照; CK 2-1—CK 2-4 分别代表经过离子束注入处理的对照; CK 3-1—CK 3-4 分别代表直接浸泡 DNA 溶液处理的对照。下同

对照材料相应的农艺性状没有显著性差异,但在植株的生长势(主要是弱生长势)、穗型(主要是畸形穗)、主茎分蘖状态(主要是主茎分蘖不同步)和单穗变异这 4 个性状上被处理材料表现出一定的变异特征。在未经过离子注入处理的受体材料(CK 1-1—CK 1-4)的群体内均没有出现变异植株。在其他两类对照材料的群体内均出现了不同种类的变异植株,但变异植株的数量均比较少且变异植株的数量因不同材料而异。在经过外源遗传物质介导处理的试验材料中,变异植株的数量均比较多且变异植株的数量也因不同基因型材料而异(表 2)。在兰考 906 CK 2-1 和 CK 3-1 群体内发现的突变株分别为 12 株和 48 株,其变异率分别为 0.60%和 2.40%;在经过离子束介导处理的当代群体内发现 158 株突变株,其变异率为 7.90%。在兰考 4 号的 CK 2-2 和 CK 3-2 群体内发现的突变株分别为 9 株和 67 株,其变异率分别为 0.45%和 3.35%;在经过离子束介导处理的当代群体内发现 198 株突变株,其变异率为 9.45%。在周麦 16 的 CK 2-3 和 CK 3-3 群体内发现的突变株分别为 8 株和 4 株,其变异率分别为 0.40%和 0.20%;在经过离子束介导处理的当代群体内发现 114 株突变株,其变异率为 5.70%。在济南 17 的 CK 2-4 和 CK 3-4 群体内发现的突变株分别为 1 株和 15 株,其变异率分别为 0.05%和 0.75%;在经过离子束介导处理的当代群体内发现 72 株突变株,其变异率为 3.60%。由此可见,试验材料的变异率因材料的种类不同或试验处理不同而表现出一定的差异,在兰考 4 号群体内所筛选到的变异株

最多(274 株),依次为兰考 906(208 株)和周麦 16(126 株),最少的为济南 17(88 株)。在未经过离子注入处理的受体材料(CK 1-1—CK 1-4)的群体内没有发现突变株;在经过离子束注入处理的受体材料(CK 2-1—CK 2-4)和未经过离子束注入处理且直接浸泡外源 DNA 的受体材料(CK 3-1—CK 3-4)的群体内出现了突变株。与各种相应的对照群体相比,在经过介导处理的群体内突变株数量最多(72~198),突变率最高(3.60%~7.90%)。

表 2 试验材料在当代群体内变异率的比较

材料	处理	种子数	变异株总数	变异率(%)
兰考 906	CK 1-1	200	0	0.00
	CK 2-1	2000	12	0.60
	CK 3-1	2000	48	2.40
	介导	2000	158	7.90
兰考 4 号	CK 1-2	200	0	0.00
	CK 2-2	2000	9	0.45
	CK 3-2	2000	67	3.35
	介导	2000	198	9.45
周麦 16	CK 1-3	200	0	0.00
	CK 2-3	2000	8	0.40
	CK 3-3	2000	4	0.20
	介导	2000	114	5.70
济南 17	CK 1-4	200	0	0.00
	CK 2-4	2000	1	0.05
	CK 3-4	2000	15	0.75
	介导	2000	72	3.60

3 讨论

现代作物遗传改良是否能取得突破性成果在很大程度上决定于育种者是否能在育种方法和种质资源上做出实质性创新。利用现代生物技术对小麦进

行有效的遗传改良将有助于为小麦超高产育种筛选到新的种质资源。利用离子束介导技术在水稻遗传改良中已经获得了一些新材料,其技术的实用性已经得到肯定^[6,7]。然而,在前人所开展的离子束介导试验中所存在的问题之一就是试验材料的单一性和试验设计的不完整性,因而难以确定离子束介导异源遗传物质所导致的生物学效应^[8]。

针对离子束介导试验中目前所存在的问题,我们以 6 份玉米品种的全基因组 DNA 为供体,以 4 份普通小麦品种为受体,借助于低能离子束介导技术完成异源遗传物质的转移,对其介导试验的当代群体的特异性进行了观察鉴定。研究结果表明,经过离子束注入处理后试验材料的成苗率都会明显地降低,这是低能离子所导致的生物学效应之一。在所有试验材料的生育前期和中期,在每一个处理的群体内在主要农艺性状上没有表现出明显的差异,而在生育后期,被处理材料的大部分农艺性状与对照材料的相应的农艺性状没有表现出显著的差异,仅仅在 4 个性状,即植株的生长势(主要是弱生长势)、穗型(主要是畸形穗)、主茎分蘖状态(主要是主茎分蘖不同步)和单穗变异上被处理材料表现出一定的变异特征。尽管离子束注入处理和直接浸泡外源 DNA 的处理也会导致其当代群体内出现突变

株,但其群体内的突变株数量比较少,突变率比较低。经过离子束介导处理所导致的生物学效应最明显,其群体内的突变株数量比较多,突变率比较高。

参考文献:

- [1] YU Zengliang. Introduction to ion Beam biotechnology [M]. New York: Springer press, 2006.
 - [2] 黄群策,李玉峰,李国平. 离子注入后同源四倍体核雄性不育水稻的育性表达特性[J]. 核技术, 2006, 29(7): 513—517.
 - [3] 黄群策,代西梅. 低能氮离子对不同倍性水稻的诱变效应[J]. 杂交水稻, 2004, 19(3): 57—61.
 - [4] 黄群策,秦广雍. 离子束生物技术改良同源四倍体水稻的设想[J]. 郑州大学学报, 2003, 35(4): 31—36.
 - [5] 宋道军,陈若雷,尹若春,等. 离子束介导植物分子超远缘杂交研究[J]. 自然科学进展, 2001, 11(3): 327—330.
 - [6] 李红,吴丽芳,余增亮. 低能离子束介导水稻遗传转化的研究[J]. 核农学报, 2001, 15(4): 199—206.
 - [7] 黄群策. 离子束介导技术在植物遗传改良上的发展趋势[J]. 原子核物理评论, 2007, 24(1): 59—63.
 - [8] 黄群策. 离子束介导技术在实际应用中所存在的问题及研究对策[J]. 郑州大学学报, 2007, 39(2): 167—170.
-
- (上接第 20 页)
- [38] Wright R J, Thaxton P M, El-Zik K M, *et al.* Molecular mapping of genes affecting pubescence of cotton [J]. J Hered, 1999, 90: 215—219.
 - [39] Khan M A, Steward J M, Zhang J, *et al.* Addition of new markers to the trisppecific cotton map[C] //Proc of the beltwide cotton conference. National Cotton Council, Memphis, TN, 1999: 439.
 - [40] Jiang C X, Wright R J, Woo S S, *et al.* QTL analysis of leaf morphology in tetraploid *Gossypium* (cotton)[J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 409—418.
 - [41] Ulloa M, Cantrell R G, Percy R G, *et al.* QTL analysis of stomatal conductance and relationship to lint yield in an interspecific cotton[J]. J Cotton Sci, 2000, 4: 10—18.
 - [42] 范术丽,喻树迅,宋美珍,等. 短季棉早熟性的分子标记及 QTL 定位[J]. 棉花学报, 2006, 18(3): 135—139.
 - [43] Wendel J F, Brubaker C L, Percival E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of Upland cotton[J]. Am J Bot, 1992, 79: 1291—1310.
 - [44] Iqbal M J, Reddy O U K, El-Zik K M. A genetic bottleneck in the 'evolution under domestication' of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 547—554.
 - [45] Lin S Y, Sasaki T, Yano M. Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 997—1003.
 - [46] Eshed Y, Zamir D. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*; a tool for fine mapping of genes[J]. Euphytica, 1994, 79: 175—179.
 - [47] 刘冠明,李文涛,曾瑞珍,等. 水稻亚种间单片段代换系的建立[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(3): 201—204.
 - [48] Eshed Y, Zamir D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL[J]. Genetics, 1995, 141: 1147—1162.