DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2010.05.024
河南农业科学

离子束介导遗传转化小麦突变体的遗传分析

王铁固[1],杨天佑[1],赵新亮[1],冯伟森[2],黄群策[3],陈士林[1]
(1.河南科技学院 生命科技学院,河南 新乡 453003;2.洛阳市农业科学院,河南 洛阳 471022;
3.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:以离子束介导后代的9个小麦突变体和4个受体作供试材料,对其进行了RAPD和SSR分子标记,在此基础上获得了矮秆突变株系1042的2个特异片断,并进行了测序和同源序列分析。13个材料间分子标记遗传差异比较结果表明,离子束介导遗传转化后的突变明显小于小麦品种间的遗传差异。矮秆突变株系1042的SSR标记特异片断序列BLAST分析结果表明,从1042中扩增到的特异片断与小麦高秆基因*Rht-D1a*中的部分序列高度一致,1042的株高明显降低可能是由于该株系遗传突变,产生了2个矮秆基因所致;该特异片断与小麦BAC克隆中LTR-retrotransposon Angela-3s转座子的部分片断同源性最高,说明离子束介导遗传转化诱发变异可能与小麦基因组中反转录转座子的激活有关。

关键词:小麦;离子束;遗传转化;RAPD;SSR;序列分析
中图分类号:S512.1　　文献标识码:A　　文章编号:1004-3268(2010)05-0011-05

Genetic Analysis of Wheat Mutants by Ion Beam-mediated Transformation

WANG Tie-gu[1], YANG Tian-you[1], ZHAO Xin-liang[1], FENG Wei-sen[2],
HUANG Qun-ce[3], CHEN Shi-lin[1]
(1.School of Life Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, 453003, China;
2.Agricultural Science Institute of Luoyang, Luoyang 471022, China; 3.Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Nine wheat mutants from genetic transformation mediated by ion beam and their 4 recipient varieties were taken as test materials to conduct RAPD and SSR marker analysis, and then 2 special fragments from the dwarf mutant 1042 were sequenced, homology analysis of which was done. The results showed that the variance of mutants from genetic transformation byt ion beam was smaller than the genetic variance between different recipient varieties. After BLAST analysis, the special fragments of SSR marker from the dwarf mutant 1042 were highly identical to partial sequence of high-straw gene *Rht-D1a*, suggesting that the dwarfing might be caused by the two mutation dwarf genes; while the special fragments of RAPD marker had high homology with partial sequence of LTR-retrotransposon Angela-3s in wheat BAC clones, which suggested that the mechanism of mutagenesis by ion beam is partially attributed to the re-activation of the retrotransposons.

Key words: Wheat; Ion beam; Genetic transformation; RAPD; SSR; Sequence analysis

RAPD是以基因组DNA为模板,以一个随机的寡核苷酸序列(通常为10个碱基对)作引物,通过PCR扩增反应产生不连续的DNA产物,用以检测DNA序列的多态性[1]。目前该方法已广泛用于种

收稿日期:2009-10-12
基金项目:农业部农业公益性行业科研专项经费项目(200803034)
作者简介:王铁固(1971-),男,河南伊川人,博士,主要从事作物遗传育种工作。E-mail:tieguwang@163.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质资源鉴定与分类、目标性状基因的标记等研究[2,3]，SSR 是基于基因组内简单重复序列多态性的一种分子标记。在许多植物上的研究结果表明，SSR 是一种高多态性、多等位变异的分子标记[4,5]。Gregan[6] 在 96 份大豆资源中，发现了 29 个 SSR 的等位变异，而通常利用 RFLP 技术，仅能发现 2～3 个等位变异。

离子束生物工程是我国科学家 20 世纪 80 年代创立的新型生物工程技术，20a 来，离子注入和离子束介导遗传转化在作物[7] 和微生物[8] 的遗传改良上得到了广泛的应用。但是迄今为止，离子束生物工程在作物遗传改良上的分子机制仍不清楚。本试验结合 RAPD 和 SSR 分子标记操作简便、多态性高等优点，利用这 2 种分子标记对经离子束介导遗传转化后所筛选的田间性状稳定的部分小麦突变体进行了遗传变异和差异片断序列分析，旨在从分子水平上揭示离子束生物工程诱发作物遗传变异的原因。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以当前黄淮麦区主推小麦品种兰考 906、兰考 4 号、周麦 16 和济麦 17 为遗传转化受体，以玉米基因组大片段 DNA 为转化供体，进行离子束介导的遗传转化试验。系谱法种植转化受体后代变异材料，在转化后第 4 代，选取田间性状稳定的 9 个突变体和 4 个转化受体品种，共 13 个样品进行遗传变异分析，各样品之间的主要农艺性状和系谱关系见表 1。

表 1 试验材料的主要农艺性状及系谱关系

编号	材料	主要农艺性状及来源
1	兰考 906	有芒，株高 78 cm，晚熟，分蘖力弱
2	1042	无芒，矮秆，株高 42 cm，分蘖力强，兰考 906 突变株系
3	1090	无芒，株高变高，85 cm，兰考 906 突变株系
4	2094	有芒，株高 78 cm，蜡质厚，兰考 906 突变株系
5	周麦 16	有芒，株高 75 cm，分蘖力较强
6	2303	无芒，株高较高，85 cm，周麦 16 突变株系
7	2383	无芒，株高较高，85 cm，周麦 16 突变株系
8	济麦 17	无芒，旗叶小
9	3145	无芒，晚熟，生育期延迟 7d，旗叶较大，济麦 17 突变株系
10	3271	无芒，蛋白含量较高，旗叶较小，济麦 17 突变株系
11	兰考 4 号	有芒，晚熟，分蘖力弱
12	3176	有芒，蜡质厚，晚熟，兰考 4 号突变株系
13	3272	有芒，蛋白含量较高，兰考 4 号突变株系

1.2 DNA 的提取

2006 年大田种植的 9 个第 4 代突变株系及其 4 个受体(对照)品种，各取 10 株幼苗叶片混合，称取 2.5 g。DNA 的提取采用 CTAB 法[9]，提取到的 DNA 溶于 TE 中，用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和质量浓度，然后用双蒸水将 13 个样品 DNA 溶液的质量浓度统一调至 10 ng/μL，置于 4 ℃冰箱中备用。

1.3 PCR 反应和电泳检测

随机选取 160 个 RAPD 引物和 29 对 SSR 引物对 13 个样品进行 PCR 扩增，扩增的反应体系总体积均为 25μL，各自的反应条件如下：

RAPD：反应体系中包括 1× PCR buffer，1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$，0.2 mmol/L 的 dNTP，20 ng 引物，1U 的 *Taq* 聚合酶和 20ng 模板 DNA。扩增反应程序：起始变性 94 ℃ 5 min，接着变性 94 ℃ 30 s，退火 38 ℃ 30 s 和延伸 72 ℃ 1.5 min，共 40 个循环。最后 72 ℃延伸 10 min。

SSR：反应体系中包括 1× PCR buffer，1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$，0.2 mmol/L 的 dNTP，每条引物 50 ng，1U 的 *Taq* 聚合酶和 20 ng 模板 DNA。扩增反应程序：起始变性 94 ℃ 5 min；接着变性 94 ℃ 30 s、退火 65 ℃ 30 s(每个循环降低 0.5 ℃)和延伸 72 ℃ 1 min，20 个循环；变性 94 ℃ 30 s、退火 55 ℃ 30 s 和延伸 72 ℃ 1 min，20 个循环；最后 72 ℃延伸 5 min。

PCR 反应均在 Biometra 公司的 T-Gradient PCR 仪上完成。琼脂糖凝胶电泳检测 RAPD 扩增产物时胶的质量体积分数为 1.5%(*W*/*V*)，检测 SSR 扩增产物时胶的质量体积分数为 3%(*W*/*V*)，电泳缓冲液为 0.5× TBE，电泳后的凝胶放入 0.4μg/mL EB 溶液中染色 15 min，用上海天能凝胶成像系统观察电泳结果。PCR 反应试剂和引物均购自上海生工生物工程技术服务有限公司(Sangon)。

1.4 差异片断序列分析

将由 SSR 和 RAPD 标记扩增到的矮秆突变株系 1042 的 2 个特异片断回收纯化，送上海生工生物工程技术服务有限公司测序，将测序结果利用 NCBI 上的BLAST 进行同源序列分析。

2 结果与分析

2.1 样品间的 DNA 差异分析

2.1.1 RAPD 标记 160 个 RAPD 引物在 13 个样品中共检测到了 733 条清晰的条带(表 2)，其中有 612 个片断在所有样品中都被检测到，有 121 个片断在 13 个样品间表现出多态性，多态片断比率为 16.5%。从各受体品种和它的变异株系之间的多态性分析结果可以看出，所有受体品种和变异株系的多态性均低于个各类群内总多态性，类群内总多态

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性又明显低于总计多态性(16.5%)。同时,各受体品种的多态性亦都稍低于或等于变异株系的多态性,但济麦17例外。受体品种亦可作为1个株系,在所有株系当中,兰考906的变异株系1-090多态性最高,多态片段比率为5.8%;济麦17的变异株系3271多态性最低,多态片段比率为0.8%。就4个受体品种和各自的变异株系而言,兰考906类群内的总多态性最高,多态片段比率为8.3%。

表2 RAPD标记样品间多态性分析

编号	样品	扩增片段数	多态片段数	多态片段比率/%
1	兰考906	645	10	1.6
2	1042	662	26	3.9
3	1090	674	39	5.8
4	2094	660	25	3.8
	兰考906总计	674	56	8.3
5	周麦16	670	9	1.3
6	2303	678	17	2.5
7	2383	682	21	3.1
	周麦16总计	682	35	5.1
8	济麦17	668	8	1.2
9	3145	666	6	0.9
10	3271	665	5	0.8
	济麦17总计	668	12	1.8
11	兰考4号	655	8	1.2
12	3176	663	16	2.4
13	3272	655	8	1.2
	兰考4号总计	663	25	3.8
	总计	733	121	16.5

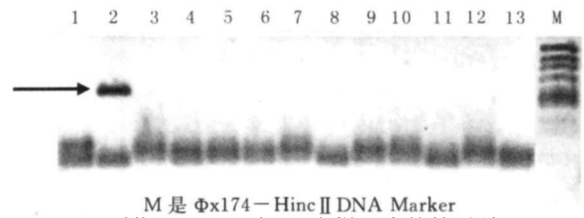
2.1.2 SSR标记 29对SSR引物在13个样品中共检测到了83条清晰的条带(表3),其中有22个片断在所有样品中都被检测到,有57个片断在13个样品间表现出多态性,多态片断比率为68.7%。从各受体品种和它的变异株系之间的多态性分析结果可以看出,所有受体品种和变异株系的多态性均低于各类群内总计多态性,且明显低于总体多态性(68.7%)。各受体品种的多态性亦都稍低于变异株系的多态性,但还是济麦17例外,多态性(13.7%)高于3145的多态性(8.3%)。在所有株系当中,兰考906的变异株系1090和2094多态性最高,多态片段比率均为29.1%;济麦17的变异株系3145多态性最低,多态片段比率为8.3%。就4个受体品种和各自的变异株系而言,也是兰考906类群内的总计多态性最高,多态片段比率为54.5%。

表3 SSR标记样品间多态性分析

编号	样品	扩增片段数	多态片段数	多态片段比率/%
1	兰考906	52	13	25.0
2	1042	51	12	23.5
3	1090	55	16	29.1
4	2094	55	16	29.1
	兰考906总计	55	30	54.5
5	周麦16	51	5	9.8
6	2303	55	9	16.4
7	2383	52	6	11.5
	周麦16总计	55	12	21.8
8	济麦17	51	7	13.7
9	3145	48	4	8.3
10	3271	53	9	17.0
	济麦17总计	53	14	26.4
11	兰考4号	49	8	16.3
12	3176	53	12	22.6
13	3272	51	10	19.6
	兰考4号总计	53	20	37.7
	总计	83	57	68.7

2.2 超矮株系1042分子标记差异片段的序列同源性分析

2.2.1 SSR标记差异片断的BLAST结果 SSR引物Rht-B1b(4BS)在13个样品中的扩增结果见图1,其中从兰考906的超矮变异株系1042中扩增到了一个特异性片断。



M是Φx174-HincⅡDNA Marker

图1 引物Rht-B1b在13个样品中的扩增结果

将该特异片断回收纯化,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,结果如下:

5′-TCGCTCTCCTCCCTCCCCACCCCAACCTTTCGGTTTTCCTCCTCTTCCTCCTCTCCCCGACCCTGGA
TCCAAATCCCGGCCCGCCCCAGAGCCGGAATCGAGGCAAGCAAAAGCTTGAGATAGATAGAGAGGCG
AGGTAGGGAGGCGAGAGGCGAGATCATGAAGCGCGAGTACCAGGACGCCGGAGGGAGCGGCGGTGG
CGGGGGAGGCATGGGCTCGTCCGAGGACAAGATGATGGTGTCGGGGTCGGCGGCGGCGGGGGAGGG
GGAGGAGGTGGACGAGCTGCTGGCGGCGCTCGGGTACAAGGTGCGGGCGTCCGACATGGCGGACGT
GGCGCAGAAGCTGGAGTAGCTCGAGATGGCCATGGGGAGG-3′

特异片断全长共372 bp,用该序列在NCBI的BLAST中进行同源序列比较,结果如图2。

从图2可以看到,兰考906的超矮株系扩增到的特异片断是高秆基因*Rht-D1a*中的部分序列,引物

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Rht-B1b 也扩增到了基因 *Rht-B1b* 的标记片段，因此，SSR 引物 Rht-B1b 在超矮株系中同时扩增到了 *Rht-B1b* 基因和 *Rht-D1a* 基因的部分序列，超矮株系的矮源基因型是 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1a* 型。

```
SSR差异片断 160  ATGAAGCGCGAGTACCAGGACGCCGGAGGGAGCGGCGGTGGCGGGGGAGGCATGGGCTCG 219
                 ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||| || ||||||||||||
Rht-Dla基因 1    ATGAAGCGGGAGTACCAGGACGCCGGAGGGAGCGGCGGCGGCGGTGGCGGCATGGGCTCG 60

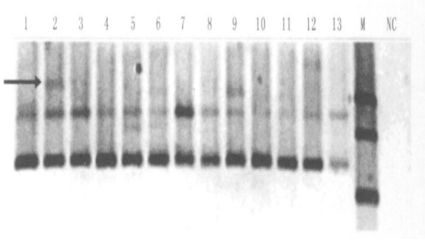
SSR差异片断 220  TCCGAGGACAAGATGATGGTGTCGGGGTCGGCGGCGGCGGGGGAGGGGGAGGAGGTGGAC 279
                 ||||||||||||||||||||        ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Rht-Dla基因 61   TCCGAGGACAAGATGATGGT-------GTCGGCGGCGGCGGGGGAGGGGGAGGAGGTGGAC 114

SSR差异片断 280  GAGCTGCTGGCGGCGCTCGGGTACAAGGTGCGGGCGTCCGACATGGCGGACGTGGCGCAG 339
                 |||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||
Rht-Dla基因 115  GAGCTGCTGGCGGCGCTCGGGTACAAGGTGCGCGCCTCCGACATGGCGGACGTGGCGCAG 174

SSR差异片断 340  AAGCTGGAGTAGCTCGAGATGGCCATGGGGA 370
                 ||||||||| ||||||||||||||||||||||
Rht-Dla基因 170  AAGCTGGAGCAGCTCGAGATGGCCATGGGGA 205
```

图 **2**　引物 **Rht-B1b** 的差异片断与 ***Rht-D1a*** 基因的同源性比较

2.2.2　RAPD 标记差异片断的 BLAST 结果　RAPD 随机引物 F07 在 13 个样品中的扩增结果见图 3，其中兰考 906 的超矮变异株系 1042 中亦有 1 个特异性片断，如箭头所示。



M 是 DL2000 Marker，NC 是空白对照

图 **3**　**RAPD** 引物 **F07** 在 **13** 个样品中的扩增结果

将该特异片断回收后克隆，连接到质粒 pMD-18 上，送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序，用该序列在 NCBI 的 BLAST 中进行同源序列分析可知，该特异片断(865 bp)与面包小麦 BAC 克隆中 LTR-retrotransposon Angela-3s 转座子的部分片断序列同源性最高，同源性达到 83%。

3　讨论

3.1　离子束介导遗传转化后小麦突变体分子标记的遗传差异

RAPD 标记的差异分析结果表明，M_4 代变异材料之间的遗传变异比较小，各样品间的多态片断比率均较低，最大为 5.8%，最小只有 0.8%，明显低于总计多态片断比率(16.5%)。本试验中 SSR 标记检测到的 M_4 代变异材料和所有受体材料之间的遗传变异比较大，13 个样品内多态片断比率最大为 29.1%，最小为 8.3%。但它们也明显低于总计多态性片断比率(68.7%)。此结果表明，SSR 标记的多态性要高于 RAPD 标记。吴卫等[10] 在利用 SSR 标记分析小麦强优势组合亲本遗传差异时，多态性片断比率高达 0.7935。许多研究结果都表明，SSR 标记的多态性要高于 RAPD 标记[11]。受体品种和各自的变异株系的多态性较低，表明受体品种与其变异株系间的遗传变异较小，而本试验中的总体多态性可以表示受体品种之间的遗传差异，各类群株系间的多态片段比率与总体多态片断比率结果表明，离子束诱变的遗传差异明显小于小麦品种之间的遗传差异。这一变异特点和诱变育种自身的特点相吻合。诱变育种多为点突变，离子束介导外源遗传物质转化可能会有少量的异源 DNA 片断杂交，这些和杂交育种相比，遗传变异要小得多。这也正是诱变育种具有早代稳定特性的遗传学基础。

本试验结果表明，各类群间的多态性也存在着差异，由此可见，不同的小麦品种对离子束介导的遗传转化诱发变异存在着敏感性差异。SSR 和 RAPD 标记的结果中，都是兰考 906 的多态性最高，此结果表明，兰考 906 对离子束介导遗传转化更敏感。与本试验中的其他 3 个材料相比较，兰考 906 更适宜于离子束介导的遗传转化试验。

3.2　超矮株系 1042 标记差异片断同源序列比较结果

SSR 引物 Rht-B1b 在兰考 906 的超矮株系中扩增到的特异片断，在 NCBI 中 BLAST 的结果表明，这个特异片断是高秆基因——赤霉素应答调控基因 *Rht-D1a*(基因登录号：AJ242531)的部分序列。*Rht-D1a* 是矮秆基因 *Rht-D1b* 的等位变异基因，由该引物扩增的结果表明，兰考 906 中筛选到的超矮株系的矮源基因型应该为 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1a* 型。Ellis 等[12] 的试验表明，基因型为 *Rht-B1b* 和 *Rht-D1a* 矮秆材料的株高在 72.4 cm 左右，这比兰考 906 的正常株高(80 cm)稍低，而兰考 906 的超矮株系的平均株高只有 42 cm。同时 Ellis 等在设计 SSR 引物 Rht-B1b、Rht-B1a、Rht-D1b 和 Rht-D1a 时，认为这些引物的特异性非常好。引物 Rht-B1b

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在19个试验材料中仅能扩增到*Rht-B1b*片断，没有扩增到其他任何一个等位基因的片断。而本试验中用Rht-B1b却同时扩增到了*Rht-B1b*和*Rht-D1a*2个等位基因的片断。按Ellis等的试验结果推测，兰考906的超矮株系中高秆基因*Rht-D*1*a*非常保守的序列发生了突变，使变异株系1042的基因组中表达了2个矮秆基因，这可能就是导致1042株高降低的原因。

RAPD引物Opt-15在兰考906的超矮株系中扩增到的特异片断，在NCBI中BLAST的结果表明，该特异片断是面包小麦BAC克隆中LTR-retrotransposon Angela-3s转座子的部分序列。LTR(反转录)转座子大量存在于真核生物的基因组中，LTR转座子更是占小麦基因组组成的90%左右，它可以通过在染色体上的移动，直接或间接启动基因组的重排。反转录转座子受宿主基因组的调控，通常情况下没有转座活性，或转录活性较低。研究发现，一些沉默的反转录转座子可以被包括机械损伤、水杨酸(SA)、茉莉酮酸(JA)、氧胁迫、病原感染、组织培养等在内的生物和非生物的胁迫激活其转座并参与植物的防御反应[13,14]。Ya Hui-yuan等[15]的研究结果表明，小麦经低能离子束辐照后，小麦中的反转录转座子的转录活性也成倍地提高，来应答低能离子束辐射的刺激，并产生转座效应，这可能是离子束诱导产生遗传变异的主要原因。

参考文献：

[1] John G K Williams, Anne R Kubelik, Kenneth J Livak. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 22(18): 6531-6535.

[2] Kazan K, Manners J M, Cameron D F. Genetic relationships and variation in the stylosanthes guianensis species complex assessed by random amplified polymorphic DNA[J]. Genome, 1993, 36: 43-49.

[3] 孙岩，尹静. 小麦抗秆锈突变系龙辐03D51的筛选及其抗病性的遗传分析与RAPD标记[J]. 核农学报，2007，24(2)：120-123.

[4] Senior M L, Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer[J]. Genome, 1993, 36: 884-889.

[5] Marion S, Roder, Victor Korzun, Katja Wendehake. A microsatellite map of wheat[J]. Genetics, 1998, 149(8): 2007-2023.

[6] Gregan J, The abstract of molecular biology symposium[M]. Amsterdam: The Nether-lands, 1994: 1846.

[7] Feng Hui-yun, Yu Zeng-liang, Paul K. Ion implantation of organisms[J]. Materials Science and Engineering, 2006, 54: 49-120.

[8] 姚建铭，朱皖宜，王纪，等. 离子注入利福霉素产生菌诱变选育研究[J]. 激光生物学报，1999，8(3)：214-216.

[9] Murray Y H G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4326.

[10] 吴卫，郑有良，魏育明，等. 利用SSR标记分析小麦强优势组合亲本遗传差异[J]. 西南农业学报，2002，15(3)：1-6.

[11] 李娜，焦浈，秦广雍. DNA分子标记技术及其在小麦育种及遗传研究中的应用[J]. 核农学报，2005，22(4)：322-326.

[12] Ellis M H, Spielmeyer W, Gale K R, *et al*. "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 1038-1042.

[13] Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, *et al*. A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposons Tto1 is involed in responsiveness to tissue culture, wounding, methyljasmonate and fungal eliecitors[J]. Plant J, 1999, 18: 383-393.

[14] 周国丽. 离子速诱变技术研究进展[J]. 现代农业科技，2009(19)：238-239.

[15] Ya Hui-yuan, Jiao Zhen, Gu Yun-hong, *et al*. Imapact of low-energy ion beam implantation on the expression of Ty1-copia-like retrotransposons in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Plasma Science and Technology, 2007, 9: 626-633.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net