

盐芥 EMS 突变体创制的探讨

高秀华, 孔祥强, 赵彦修, 张慧 (山东师范大学生命科学院, 山东济南 250014)

摘要 利用 EMS 诱变的策略, 对盐芥 EMS 突变体的创制进行探讨。结果表明: 盐芥种子的灭菌方法中, 用浓度为 0.6% 的 NaClO 并添加浓度为 0.1% 的吐温灭菌 10 min, 即能节省灭菌时间, 又能达到理想的灭菌效果; 确定盐芥 EMS 诱变处理的浓度为 0.4%, 处理时间为 24 h; 采用 Root-bending 的方法, 确定了幼苗期盐芥盐敏感突变体的筛选条件为 200 mmol/L NaCl, 并获得了 208 株可能的盐芥盐敏感突变体。另外, 对突变体通过表型分析获得 1 株叶型明显改变的突变体。

关键词 盐芥; EMS; 突变体

中图分类号 Q813.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)20-5189-02

Primary Research on the Establishment of *Thellungiella halophila* EMS Mutants

GAO Xiu-hua et al (School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014)

Abstract The primary research on the establishment of *T. halophila* EMS mutants was made. 1) The sterilization method of *T. halophila* seeds was optimized with 0.6% NaClO appended 0.1% tween for 10 minutes. 2) The concentration of EMS mutagenesis was 0.4% and the mutagenesis time was 10 minutes in the experiment. 3) According to the root-bending assay methods, the selection condition for the isolation of the salt sensitive mutants was 200 mM NaCl and 208 putative salt sensitive mutants were isolated. Furthermore, we got one probable mutant with the altered shape of rosette leaf.

Key words *Thellungiella halophila*; EMS; Mutant

盐芥是极端耐盐的十字花科植物, 具有许多与拟南芥相似的优点, 如基因组小, 生活周期短, 严格自花授粉并且具非常多的种子, 易于转化和突变发生等。盐芥被认为是一种很有前景的植物耐盐模式系统, 现在已被很多实验室采纳用于植物耐逆生理生化机制的研究^[1-3]。笔者对盐芥 EMS 突变体的创制进行了探讨, 旨在为研究这一新的耐盐模式植物, 克隆相关的耐逆基因并阐明盐芥耐盐机理提供良好的试验系统。

1 材料与方法

1.1 材料 盐芥种子, 取自山东东营盐碱地。

1.2 方法

1.2.1 灭菌方法的优化。将盐芥种子置于 EP 管中, 用浓度为 0.6% 的 NaClO 添加浓度为 0.1% 的吐温) 灭菌 10 min, 用无菌水冲洗 6 次; 种子播种于 MS 固体培养基中(MS 盐+3%蔗糖+1.2%琼脂, pH 值为 5.8)^[4], 4℃条件下春化 1 周, 正向放置于光照培养箱架上(温度为 20℃±2℃, 光照时间为 16 h) 进行培养。

1.2.2 诱变浓度及时间的选择。称取 0.1 g 种子(大约 5 000 粒), 放入 250 ml 的三角瓶中, 加入 200 ml 浓度为 0.15% 的吐温, 放于搅拌器上浸泡 30 min, 使种子被充分的浸润; 将吐温倒掉, 加入 200 ml 双蒸水, 然后加入适量 EMS 原液至终浓度, 分别为 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%; 室温下, 于搅拌器上分别轻摇 16, 24, 36 和 48 h(注意转动速度不要太快, 否则种子会被绞碎); 将三角瓶从搅拌器上取下, 静止 10 min, 仔细地将种子中的 EMS 溶液除去; 加与处理液相近体积的水洗种子 10 次; 收集所有的 EMS 溶液及废水于废水罐中, 加 NaOH 至浓度为 1 mol/L, 以消除 EMS; 将处理好的种子均匀播种在育苗介质中。

1.2.3 盐敏感突变体的筛选方法及浓度的建立。采用弯根法^[5]筛选盐芥盐敏感突变体, 即以根在重力下的弯曲生长为指标。将盐芥野生型的种子播种于 MS 培养基上, 待其根

长至 1 cm 时转至含 150, 200, 250, 300 mmol/L NaCl 的 MS 固体培养基上, 对盐芥进行 Root-bending 试验, 以确定其盐敏感突变体筛选的最适盐浓度。对获得的 M2 代株系在不含 NaCl 的 MS 固体培养基上萌发后, 在 200 mmol/L NaCl 条件下进行筛选, 将鉴定为可能的盐芥盐敏感突变体首先转移到不含盐的 MS 固体培养基上, 待其生长恢复一段时间后转移到盛有育苗介质的小盆中培育, 待苗长大后于 4℃下进行春化。

1.2.4 其他表型突变体的筛选。将收获的诱变好的 M2 代种子直接播种于育苗介质或 MS 固体培养基上, 待苗长至 1 个月时, 直接观察突变体的表型, 如根的长短, 苗的大小, 叶型和花序改变的突变体。

2 结果与分析

2.1 盐芥种子灭菌方法的优化结果 当在浓度为 0.6% 的 NaClO 溶液中添加浓度为 0.1% 的吐温, 灭菌 10 min 时种子发芽率大大提高, 达 90% 以上, 且降低了污染率, 对种子的萌发没有影响(图 1)。

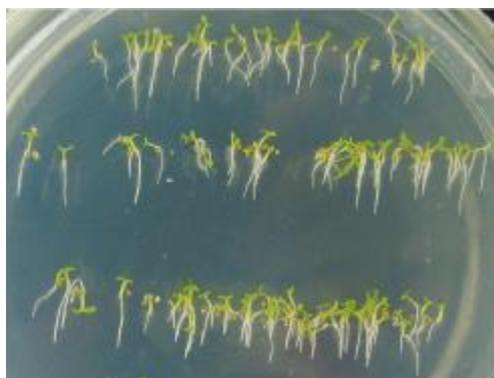


图 1 盐芥种子在 MS 培养基上萌发 3-4 d 的生长情况

2.2 盐芥种子的诱变结果 由图 2 可知, 当采用 0.2% 和 0.3% 的浓度诱变 16 h 时, 对种子的萌发率影响不大, 种植的 M1 代出现黄化嵌合叶的苗相对较少; 当采用 0.4% 的浓度诱变 24 h 时, 种子的萌发率约为 50% 左右, 生长比野生型缓慢, M1 代出现相对较多的黄化嵌合叶的苗。当采用

作者简介 高秀华(1978-), 女, 山东寿光人, 博士研究生, 研究方向: 植物耐逆分子生物学。

收稿日期 2006-06-09

0.4%和0.5%的浓度诱变36和48h,时种子几乎不萌发。



注:A为野生型种子萌发对照;B为诱变后的种子萌发;C为诱变后M1中出现的嵌合体。

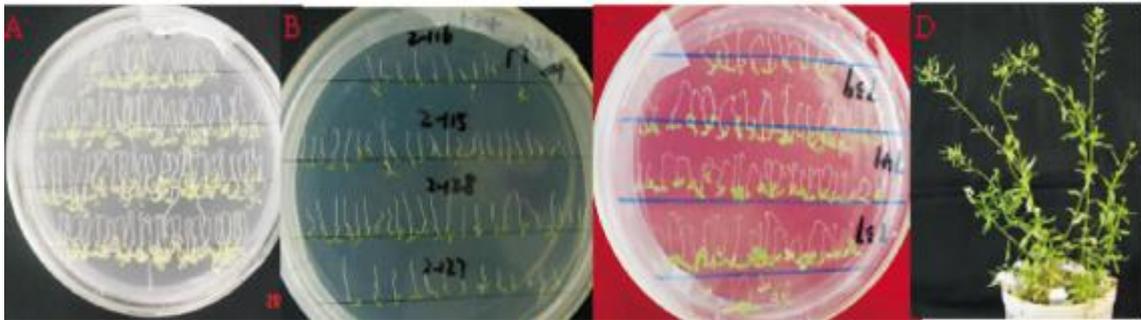
图2 盐芥种子 EMS 诱变后的萌发及生长情况

2.3 盐芥盐敏感突变体筛选浓度的确定及盐敏感突变体的筛选结果 由图3可知,浓度为200 mmol/L NaCl为盐芥

进行 Root-bending 试验的最佳浓度,野生型盐芥的幼苗在此浓度下生长不受抑制。NaCl 浓度太高,苗子受伤严重;NaCl 浓度太低,难以检测到对盐敏感的苗子。

通过 Root-Bending 试验,获得了6000多个M2代株系,进行筛选后,获得了208株可能的盐芥盐敏感突变体。处理1个月之后,开花结果收获M3代种子。

2.4 其他表型突变体的获得 由图4可知,对收获的M2代种子,直接播种于MS固体培养基上,发现有些植株根系特别长且叶片增厚;有些植株叶子变的细长;有些植株长势较快;还有些植株叶型明显改变,表面皱缩、卷曲、植株生长缓慢。目前只有长势较快的突变体和叶型改变的突变体获得了种子,这些突变体的进一步验证正在进行中。



注:A为野生型幼苗在200 mmol/L NaCl上生长的对照;B为诱变后萌发的小苗移入NaCl培养基生长1~2d的结果;C为诱变后萌发的小苗移入NaCl培养基生长7d的结果;D为可能的盐敏感突变体开花结果。

图3 在200 mmol/L NaCl培养基上采用Root-Bending筛选盐敏感突变体



注:①代表长根;②代表细叶;A为长根和细叶的突变体;B为长势快的突变体;C为B苗移入土中开花结果情况;D为叶型突变体;E为叶型突变体的大苗。

图4 诱变盐芥种子可能的其他表型突变体

3 讨论与结论

盐芥是拟南芥的近缘,比拟南芥更耐盐,但是到目前为止,仍未揭示其耐盐的具体机制。盐敏感突变体的分离为寻找耐盐相关基因提供了很好的思路与方法。要得到合适的突变体,选用的植物种类、诱变处理的效率、筛选条件和筛选的指标至关重要。合适的研究材料是工作基础,而有效的诱变处理、筛选条件和筛选指标是突变体筛选成败的关键。

盐芥的种子萌发不一致,所以采取降低NaClO的浓度和减少灭菌时间并添加少量的吐温的方法,这节省了灭菌时间,提高了工作效率,降低了污染率。吐温的作用原理是使NaClO溶液更好地与种子表面接触,促进NaClO与种子的粘合,加快消毒进程,使消毒效果更好。而低温春化1周大大增加了种子萌发的一致性,利于后期统一移苗。所以该

试验的方法大大提高了盐芥种子的萌发率和一致性。

诱变剂量的选择对突变体的筛选起着重要的作用。在该试验中,在室温下,浓度为0.4%的EMS溶液浸泡种子24h得到最佳的诱变效率(统计萌发率在50%左右);根据NaCl对根生长的影响确定筛选的NaCl的浓度为200 mmol/L NaCl。Inan等对EMS诱变的盐芥种子的T2代分离的后代进行了耐盐性降低的突变体的筛选,鉴定了大约160个可能的缺失了极端耐性的突变体(let),利用弯根试验对其中的50个进行再次筛选,证实其中4个突变株系降低了耐盐性(let1-let4)^[6],证明了利用弯根试验进行盐敏感突变体筛选的可行性。该试验中,筛选到可能的盐敏感突变体为208株,对于这些突变体,由于只是进行了1代的筛选,也许并

(下转第5193页)

(上接第 5190 页)

不是真正的突变体,因此,必须对筛选得到的突变体进行进一步的筛选。具体的做法是要连续多代种植并尽量保证环境条件的一致以观测其“突变性状”是否具有遗传稳定性。在种植的过程中,还发现了一些其他表型改变的突变体,如长势快的盐芥突变体和叶型明显改变的突变体,对这些突变体仍需进一步的研究。

该试验对盐芥 EMS 突变体的创制进行了探讨,并筛选出了一些可能的盐敏感突变体,这为探索这一新的耐盐模式植物,克隆相关的耐逆基因并阐明盐芥耐盐机理提供了良好的试验系统,同时也为植物耐盐研究打下了坚实的试验基础,但是植物的耐盐是多基因控制的,其耐盐机理还需进一步深入研究。

参考文献

[1] AMTMANN A,BOHNERT H J,BRESSAN R A. Abiotic stress and

plant genome evolution.Search for new models [J]. Plant Physiol, 2005 138): 127-130.

[2] WONG C E,LI Y,WHITTY B R,et al. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold,drought and salinity shows little overlap [J]. Plant Molecular Biology,2005,58:561-574.

[3] WONG C E,LI Y,LABBE A,et al. Transcriptional Profiling Implicates Novel Interactions Between Abiotic Stress and Hormonal Responses in *Thellungiella*,a Close Relative of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology,2006 140):1 437-1 450.

[4] MURASHIGE T,SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures[J]. Physiology Plant,1962 (15):473-497.

[5] WU S J,DING L,ZHU J K. SOS1,a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition [J]. The Plant Cell,2006 (8):617-627.

[6] INAN G,ZHANG Q,LI P,et al. Salt Cress:A Halophyte and Cryophyte *Arabidopsis* Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles [J]. Plant Physiology,2004 135):1-20.