

拟南芥营养突变体的初步筛选

崔晓勇^① 曹一平 张福锁

(中国农业大学资源与环境学院)

摘要 采用发芽和幼苗试验探索了筛选拟南芥抗某些抑制性物质的适宜浓度,其中 2,4-D,6-BA,NaCl, Al^{3+} , Cu^{2+} , CrO_4^{2-} 或 2,4-DNP 分别是 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$, $5 \mu mol \cdot L^{-1}$, $200 mmol \cdot L^{-1}$, $500 \mu mol \cdot L^{-1}$, $20 \mu mol \cdot L^{-1}$, $500 \mu mol \cdot L^{-1}$ 和 $18 \mu mol \cdot L^{-1}$ 。在该浓度下对经化学诱变处理获得的 M_2 种子进行了发芽法筛选,得到了在高浓度抑制物存在时表现不同的可能突变株。

关键词 拟南芥; 诱导突变; 植物营养

分类号 Q945

Screening of Nutritional Mutants of *Arabidopsis thaliana*

Cui Xiaoyong Cao Yiping Zhang Fusuo

(College of Resource and Environmental Sciences, CAU)

Abstract Effects of 2,4-D,6-BA,NaCl, Al^{3+} , Cu^{2+} , CrO_4^{2-} , 2,4-DNP on germination and growth of *Arabidopsis thaliana* were studied and the corresponding concentrations for screening mutants were determined as $10 \mu mol \cdot L^{-1}$, $5 \mu mol \cdot L^{-1}$, $200 mmol \cdot L^{-1}$, $500 \mu mol \cdot L^{-1}$, $20 \mu mol \cdot L^{-1}$, $500 \mu mol \cdot L^{-1}$ and $18 \mu mol \cdot L^{-1}$ respectively. Several putative mutants were selected by germination screening method.

Key words *Arabidopsis thaliana*; mutagenesis; plant nutrition

拟南芥是十字花科拟南芥属一年生草本植物,由于它具有其他植物所无法比拟的很多优点,所以正越来越成为人们广泛应用的实验材料^[1~3],成为继果蝇、酵母、爪蟾、玉米之后的又一模型生物材料^[4],在经典遗传学和现代分子遗传学研究领域中有重要的作用。

植物吸收利用矿质元素的机理与调节是植物营养研究的重要领域,包括对养分缺乏和过剩的适应、对重金属的抵抗、对盐分及铝毒等的忍耐等方面。近年来有人利用拟南芥诱导产生了氮^[5,6],磷^[7,8],钾^[9]营养及对铝^[10],镉^[11]敏感的突变体,对研究磷,钾营养及植物耐铝,镉毒害的机理和遗传控制起了很大的促进作用。但总的来说,植物营养界利用拟南芥的工作还很少。

磷是植物必需的营养元素之一,低磷、铝毒、盐渍化及重金属毒害是很多土壤上限制植物生长的主要障碍因素^[12,13],在拟南芥上还没有得到确认的突变体;生长素和细胞分裂素参与调节植物的许多重要生理过程,包括对矿质营养的调控^[13],虽然已有激素含量异常的拟南芥突变体,但没有应用于植物营养的研究;所以筛选这些方面的突变体将有助于深入研究植物对环境的适应机理及其调节机制。发芽法是一种快速简便的筛选方法,在发芽阶段就筛选抗盐

收稿日期: 1998-01-12

①崔晓勇,中国林业科学院森林生态环境与保护研究所,100091

和耐铝毒的突变体和品系是过去常用的方法^[14,15],它既适宜于直接筛选抗某种元素过量的突变体^[11],也可以间接地筛选一些养分敏感型的突变体^[14,15]。本试验就是通过化学诱变的手段诱导产生拟南芥突变体,并设法从中筛选植物营养性状改变的突变体。

1 材料与方 法

1.1 供试植物

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的生态型 Columbia。

1.2 种子的诱变与 M₁ 植物的培养

本试验采用甲基磺酸乙酯(EMS)为诱变剂,方法根据 Wilson 等^[16]略作改动。种子预先在 4 C 下用去离子水浸泡 8 h,之后在室温下用 pH7.0 的 0.01 mol·L⁻¹磷酸缓冲液配制的质量分数为 0.3%的 EMS 浸泡 16 h,清水冲洗 4 h。

处理后的种子(M₁)播种到蛭石中,每天浇一次营养液。营养液的组成(mmol·L⁻¹)为:KNO₃,5;KH₂PO₄,2.5;MgSO₄,2;Ca(NO₃)₂,2;以及(μmol·L⁻¹):Fe-EDTA,50;H₃BO₃,70;CuSO₄,0.5;ZnSO₄,1;NaMoO₄,0.3;MnCl₂,10;CoCl₂,0.01。植物生长期间采用日光灯进行 24 h 连续光照。培养室温度控制在 20~24 C。待种子成熟后混合收获,即为 M₂ 种子,供下面的筛选使用。

1.3 抗性突变体的筛选

①拟南芥对某些毒性物质的浓度-效应反应采用发芽试验检验这些物质对拟南芥发芽的影响。各处理浓度如下:2,4-D 为 0,1,2,5,10,20,50 μmol·L⁻¹;6-BA 为 0,1,2,2.5,5,10 μmol·L⁻¹;NaCl 为 0,50,100,200,250 mmol·L⁻¹;Al³⁺(pH3.0)为 0,50,100,200,500,1 000 μmol·L⁻¹;Cu²⁺为 0,10,20,40,50 μmol·L⁻¹;CrO₄²⁻为 0,50,100,500 μmol·L⁻¹;2,4-DNP 为 0,5,7,10,15,20 μmol·L⁻¹。

在 100 mL 三角瓶中,放置各浓度溶液 20 mL,每瓶放入野生型种子约 100 粒,在 20 C 下 115 r·min⁻¹的摇床上发芽。第 5 天计算发芽率并在显微镜下测定植株的长度。

②将 M₂ 种子用清水浸泡 4 h 后,分别在上述确定的浓度下做发芽试验,从中选出可能的突变株,并将其移栽到蛭石中,每日浇一次营养液。营养液的组成与培养条件同前所述。种子成熟后分株收获。

2 结果与分析

2.1 生长素和细胞分裂素的影响

如表 1 所示,浓度在 1 μmol·L⁻¹以上的生长素和细胞分裂素都会明显影响拟南芥野生型种子的发芽率和幼苗的生长。随着 2,4-D 浓度的提高,幼苗生长受抑制的程度不断加强,幼苗总长度呈下降趋势。同时幼苗间的差异加大,长度的变异系数增加。这说明环境压力的加大会使遗传异质性的群体表现出更大的不均一性,因为混合收获的种子是遗传不均一的。而 BA 浓度由 1 μmol·L⁻¹上升到 5 μmol·L⁻¹时,幼苗长度变化不大,当 BA 浓度提高到 10 μmol·L⁻¹后,拟南芥种子的发芽受到严重抑制,发芽率下降为零。一般认为,如果选择压力过小,则突变体的表现容易被正常植株掩盖,筛选不出突变体。相反,如果选择压力过大,则可能一些突变体

因受到损伤而死亡或生长不良,不易发芽和成活。据此,筛选耐高浓度 2,4-D 和 BA 突变体的浓度分别为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 2,4-D 和 6-BA 对拟南芥种子发芽及幼苗生长的影响

项目	2,4-D, $c/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$						6-BA, $c/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					CK
	1	2	5	10	20	50	1	2	2.5	5	10	
长度 l/mm	13.1	10.6	10.3	8.6	5.8	3.7	23.2	22.4	21.6	22.1	0	43.9
变异系数/%	14.1	20.8	27.2	27.9	25.9	37.8	12.9	12.5	20.8	8.5	0	13.4

2.2 NaCl 和 Al^{3+} 对拟南芥种子发芽和幼苗生长的影响

随着 NaCl 和 Al^{3+} 浓度的提高,拟南芥幼苗的生长受到明显的抑制,250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 或 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al^{3+} 都会完全抑制种子的发芽(表 2)。可以将筛选抗 NaCl 与 Al^{3+} 毒害的浓度分别定为 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 2 NaCl 和 Al^{3+} 对拟南芥幼苗生长的影响

项目	NaCl, $c/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$					Al^{3+} , $c/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					CK
	0	50	100	200 ^①	250	50	100	200	500 ^②	1 000	
长度 l/mm	12.0	9.3	5.1	1.4	0	12.2	9.9	4.8	0	0	12.5
变异系数/%	23.1	12.9	9.8	100	0	12.3	9.1	20.8	0	0	5.6

①200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理的种子发芽率为 53.3%,幼苗长度都在 3 mm 以下。

500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al^{3+} 处理的种子只露白,胚根不伸长,而 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后种子发芽率为零。

2.3 Cu^{2+} 浓度对拟南芥发芽与幼苗生长的影响

试验发现,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的 Cu^{2+} 即完全抑制拟南芥种子的萌发,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 存在时,幼苗生长受到强烈抑制,幼苗长度只为对照的 25.5%(表 3)。据此,我们将 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 作为筛选抗 Cu^{2+} 毒害的浓度。

表 3 Cu^{2+} 对拟南芥种子发芽和幼苗生长的影响

项目	Cu^{2+} , $c/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	0	10	20	40	50
幼苗长度 l/mm	10.2	4.1	2.6	0	0
变异系数/%	5.9	31.7	42.3	0	0

2.4 CrO_4^{2-} 对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响

CrO_4^{2-} 是 HPO_4^{2-} 的类似物,高浓度 CrO_4^{2-} 会毒害植物的生长,试验发现,浓度超过 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着 CrO_4^{2-} 浓度的提高,植株长度也明显下降(表 4)。试验表明, CrO_4^{2-} 对植

物的毒害作用不是因为竞争抑制了植物对磷的吸收,因为培养液中磷的浓度达 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,而此时 CrO_4^{2-} 浓度只有 $50 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据本试验,确定 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为筛选耐 CrO_4^{2-} 毒害与磷营养变异的拟南芥突变体浓度。

表4 CrO_4^{2-} 与拟南芥幼苗生长的关系

项 目	$\text{CrO}_4^{2-} \text{ c}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	0	50	100	500
幼苗长度 l/mm	12	9	4.4	2.4
变异系数/%	12.5	15.6	13.6	20.8

2.5 2,4-DNP 对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响

2,4-DNP 是氧化磷酸化抑制剂,与矿质养分的主动吸收有关。随着浓度的增加,拟南芥幼苗长度减短,浓度小于 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随浓度增加幼苗长度降低的幅度变化不大。 $19 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,即严重抑制种子发芽和幼苗伸长(表5,6)。

表5 2,4-DNP 浓度对拟南芥种子发芽与幼苗伸长的影响

项 目	2,4-DNP $c/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$					
	0	5	7	10	15	20
幼苗长度 l/mm	12.3	10.1	8.7	11.1	8.7	1.0
变异系数/%	6.5	12.9	14.9	9.0	18.4	140

注: $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-DNP 处理时种子发芽率为 50%。

表6 不同浓度 2,4-DNP 对拟南芥种子发芽与幼苗生长的影响

项 目	2,4-DNP $c/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				
	16	17	18	19	CK
幼苗长度 l/mm	6.0	5.0	4.6	0.8	14.8
变异系数/%	36.7	36.0	47.8	117.6	5.4

注:除 CK 外,各处理的发芽率随 DNP 浓度提高而降低。

3 讨论

突变体在机理研究中具有很大的优越性^[17],应用诱导突变技术已经获得了许多拟南芥突变体,但植物营养领域的工作开展得很少,这与其基础研究发展缓慢有关。突变体的筛选需要有明确的鉴定指标和一定的选择压力。对其他性状,如生长、发育、开花及抗药性等方面的筛选,很多时候用外观表现就可以较容易鉴定可能的突变株,并且较易配置培养基质。而植物营养突变体的筛选则不同,首先必需寻找适当的培养方法,包括培养基质中元素的组成等;其次,

必须有对某元素缺乏或过量的明确的反应。这两者目前在拟南芥上都不很明确。原因是,一方面,由于拟南芥的种子和植株个体都很小,水培比较困难,故对其矿质营养研究不足;由于它的生物量小,分析单株的养分含量不容易,需要有先进的测试手段,如 X-射线荧光分析仪等。另一方面,除磷和铁以外,其他矿质养分缺乏或不足时植物的适应性反应还不明确,可利用的指标少,尤其对拟南芥这样的个体小的物种反应更不明显。本试验曾试图用各种方法对拟南芥进行水培,但存活率很低,要获得大批一致的植株很困难。试验中发现拟南芥对氮、磷、钾、铁的反应明显,缺乏时出现明显的症状。当植株生长到一定大小时,可以用显色法观察根系对缺铁的反应。但是,将种子直接播种到含有显色剂的缺铁培养基上时,却看不到根系的适应性反应。这可能是由于单株植物的根系反应太弱,而琼脂中可能含有微量铁的缘故。因为突变体的筛选是基于单株植物的,所以对拟南芥这样的个体极小的物种来说,就必须有非常灵敏的选择反应。采用 HLC 和 HNC,即寻找植株所能忍受的最高和最低浓度的方法可以一次筛选出对某元素敏感和具有抗性的突变体^[18]。但由于拟南芥水培不易,所以一直没有找到各矿质养分的 NHC 和 HLC 点。而且这种负选择法容易损伤突变体的生活力,使之难以成活。

已经得到的拟南芥累积磷的“可能”突变体的筛选是通过分析植株叶片磷浓度获得的^[7,8],该方法要求有精密的仪器,植株长得较大,本文采用磷的有毒类似物可以更简便、更早地筛选磷营养突变体。筛选对低浓度铝敏感^[10]及耐盐^[15]和镉毒害^[11]的突变体则是直接将植株种植在含有上述物质的琼脂中,根据根系的长度判断的。Werner 和 Finkelstein^[15]发现培养基上 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 完全抑制野生型种子发芽,这与本文在溶液中得到的结果一致。而本文采用高浓度铝、盐、重金属铜在溶液中发芽筛选的方法,比琼脂上种植更简便易行,在适宜的浓度下可以更早更快地得到“可能”突变株。

激素参与调节植物的萌发至开花结实的全过程,植株对矿质营养的反应也认为是激素直接或间接地起着信号传导的作用。因此,研究激素突变体以了解植物对矿质营养反应的调节过程就有十分重要的意义。毕竟起信号作用的激素含量是很低的,只是整个含量中的某一部分,而且波动较大,直接测定不易揭示激素与矿质养分间的真正联系,外源添加又改变了植株的许多过程,采用突变体就可以避免这些问题^[17]。以往根据植物的生长情况曾筛选出了 5 类激素的多种突变体^[19~21],但没有应用它们来研究矿质营养的调节机理。本试验试图将激素突变体应用于植物营养机理研究,用发芽法看到了一些表现不同的植株,是否即是激素突变体需要进一步鉴定。

参 考 文 献

- 1 Estelle M A, Somerville C R. The mutants of *Arabidopsis*. Trends Genet, 1986, 2:89~93
- 2 Hofte H, et al. An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1993,4:1051~1061
- 3 Meyerowitz E M. *Arabidopsis thaliana*. Ann Rev Genet, 1987,21:93~112
- 4 Somerville C R, Meyerowitz E M. Introduction. In: Meyerowitz E M, Somerville C R, eds. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 1~6
- 5 Doddema H, Hofstra J, Feenstra W. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate: I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. Physiol Plant, 1987, 43:343~350

- 6 Tsay Y F, et al. The herbicide sensitivity gene CHL 1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell*, 1993,72:705~713
- 7 Delhaize E, Randall P J. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995,107:207~213
- 8 Poirier Y, et al. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol*, 1991, 97:1087~1093
- 9 Sheahan J J, Ribeiro-Nete L, Sussman M R. Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 1993,3:647~656
- 10 Larsen P B, et al. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. *Plant Physiol*, 1996, 110:743~751
- 11 Howden R, Cobbett C S. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1992,99: 100~107
- 12 鲁如坤. 我国土壤氮、磷、钾的基本概况. *土壤学报*,1989,26(3):280~286
- 13 Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1995
- 14 Allen S G, et al. Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seed. *Agro J*, 1985,77:99~104
- 15 Werner J E, Finkelstein R R. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant*, 1995,93:659~666
- 16 Wilson A K, et al. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet*. 1990,222:377~383
- 17 King J. The genetics basis of plant physiological progress. New York: Oxford University Press, Inc. , 1991
- 18 Angus M, Taiz L. The vertical mesh transfer technique: A new method for the rapid isolation of metal resistant and sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994,105:30
- 19 Estelle M, Klee H J. Auxin and cytokinin in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz E M, Somerville CR, eds. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1994,555~578
- 20 Ecker J R, Theologis A. Ethylene: A unique plant signaling molecule. In: Meyerowitz E M, Somerville CR, eds. *Arabidopsis*, 1994,485~523,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 21 Finkelstein R R, Zeevaart J A D. Gibberellin and Abscisic acid Biosynthesis and Response. In: Meyerowitz E M, Somerville CR, eds. *Arabidopsis*, 1994,523~554, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor