

野生型莱茵衣藻及其不同突变株的抗 NaCl 能力检测

古力孜拉 史博 热依汗古丽 吾甫尔·米吉提*

新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

Determination of Salt-tolerance of Wild-type and Different Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*

GULZIRA, SHI Bo, RAYHANGUL, GH-MIJIT*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046

摘要 检测莱茵衣藻的2种野生型 CC-124、CC-125 和 15 个不同突变株对 NaCl 抗性的结果表明, 野生型品系 CC-124 和 CC-125 对 NaCl 的抗性达到 $260 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中叶绿素 b 缺失的 *cbn1-48 mt⁺* 和 *cbn1-48 mt⁻* 基因突变株品系对 NaCl 最为敏感(即对 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上浓度的 NaCl 表现敏感)。用紫外线照射诱变法, 对野生型品系 CC-124 进行诱导, 初步筛选出对 $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 敏感的突变株 6 个, 对 $350 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 有抗性的突变株 2 个。

关键词 莱茵衣藻; 突变株; NaCl 抗性

莱茵衣藻作为研究植物分子生物学的模式材料, 具有操作简便、遗传背景较清楚、易获得突变株、遗传性状分析方法较标准等优点。Prieto 等^[1]用硝酸盐还原酶(*Nit1*)插入突变的方法, 曾分离获得莱茵衣藻盐敏感性基因突变株。本文对莱茵衣藻野生型和其不同突变株抗 NaCl 能力做了检测, 现报道如下。

材料与方 法

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)品系的特性和来源如表 1 所示。培养藻的 TAP 培养基、 $L_2\text{min}$ 基本培养基、 $L_2\text{min N}^-$ 培养基配制和培养均按 Harris^[2]的方法。在光养和混合营养条件下, 用印迹法检测莱茵衣藻野生型和突变株对 NaCl 的抗性范围。筛选突变株前, 将野生型品系的莱茵衣藻 CC-124 的细胞悬浮液按 $0.1 \text{ mL}\cdot\text{皿}^{-1}$ 的量接种到 $L_2\text{min}$ 固体培养基上, 打开培养皿盖子并按不同时间段用紫外线进行照射。为了防止光的重激活, 紫外线照射后的培养皿置于暗室中 24 h, 然后移置于光照培养架上培养 7~10 d 后, 统计细胞存活率。

结果与讨论

1 光下野生型莱茵衣藻和其突变株对 NaCl 的抗性

检测光下莱茵衣藻的 2 种野生型和 15 种突变株对不同浓度 NaCl 的抗性的结果(表 2)表明, 野生型品系 CC-124、CC-125 对 $260 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 显示出抗性或弱抗性, 对 $290 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性。叶绿素 b 缺失的 7 种

突变株中, CC-1355(*cbn1-48 mt⁻*)和 CC-1354(*cbn1-48 mt⁺*)对 NaCl 最敏感, 对 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 显示出抗性或弱抗性外, 对 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的 NaCl 则显示出敏感性; 其它 5 种突变株——CC-1641b(*cbn1-43 mt⁺*)、CC-2455(*arg7 cbn1-48 mt⁻*)、CC-3872(*arg2 cbn1 mt⁺*)、CC-2419(*arg2 cbn1-113 mt⁻*)和 CC-1916(*arg7 cbn1-48 mt⁺*)中, 除了 CC-3872 外都对 $230 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出抗性或弱抗性, 对 $260 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性。精氨酸依赖型突变株 CC-2423(*arg7-8 ery3b*)和 CC-48(*arg2 mt⁺*)对 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出抗性, 对 $230 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性; 精氨酸依赖型突变株 CC-1930(*arg2 mt⁻*)和 CC-1826(*arg7-8 mt⁻*)分别对 260 和 $290 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出抗性, 对高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性。精氨酸依赖型及硝酸盐还原酶缺失型双基因突变株 CC-2986(*arg2 nit1 mt⁺*)和 CC-3379(*arg7 nit1 mt⁻*)对 $230 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出抗性, 对 $260 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出弱抗性, 对 $290 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性。细胞壁缺失突变株 CC-406(*cw15 mt⁻*)和 CC-400(*cw15 mt⁺*)分别对 230 和 $260 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 显示出抗性或弱抗性, 对高于此浓度的 NaCl 显示出敏感性。

收稿 2004-05-31 修定 2004-09-15

资助 国家自然科学基金(30060035)和新疆生物资源基因工程重点实验室开放基金。

* 通讯作者(E-mail:gmi.jit2001@yahoo.com.cn, Tel:0991-8585677)。

表1 莱茵衣藻不同品系的特性和来源

| 品系代码 | 基因型 | 表型 | 来源 |
|----------|--------------------------------------|-----------------|------------|
| CC-48 | <i>arg2 mt</i> ⁺ | 精氨酸依赖型(营养缺失型) | 美国 Duke 大学 |
| CC-124 | wild type <i>mt</i> ⁻ | 野生型(原养型) | 俄罗斯圣彼得堡大学 |
| CC-125 | wild type <i>mt</i> ⁺ | 野生型(原养型) | 美国 Duke 大学 |
| CC-400 | <i>cw15 mt</i> ⁺ | 细胞壁缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-406 | <i>cw15 mt</i> ⁻ | 细胞壁缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-1354 | <i>cbn1-48 mt</i> ⁺ | 叶绿素 b 缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-1355 | <i>cbn1-48 mt</i> ⁻ | 叶绿素 b 缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-1641b | <i>cbn1-43 mt</i> ⁺ | 叶绿素 b 缺失 | 俄罗斯圣彼得堡大学 |
| CC-1826 | <i>arg7-8 mt</i> ⁻ | 精氨酸依赖型 | 美国 Duke 大学 |
| CC-3872 | <i>arg2 cbn1 mt</i> ⁺ | 精氨酸依赖型 | 美国 Duke 大学 |
| CC-1916 | <i>arg7 cbn1-48 mt</i> ⁺ | 精氨酸依赖型、叶绿素 b 缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-1930 | <i>arg2 mt</i> ⁻ | 精氨酸依赖型 | 美国 Duke 大学 |
| CC-2419 | <i>cbn1-113 arg2 mt</i> ⁻ | 精氨酸依赖型、叶绿素 b 缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-2423 | <i>arg7-8 ery3b</i> | 精氨酸依赖型、红霉素抗性 | 美国 Duke 大学 |
| CC-2455 | <i>cbn1-48 arg7 mt</i> ⁻ | 精氨酸依赖型、叶绿素 b 缺失 | 美国 Duke 大学 |
| CC-2986 | <i>arg2 nit1 mt</i> ⁺ | 精氨酸依赖型、硝酸还原酶缺失型 | 美国 Duke 大学 |
| CC-3379 | <i>arg7 nit1 mt</i> ⁻ | 精氨酸依赖型、硝酸还原酶缺失型 | 美国 Duke 大学 |

表2 莱茵衣藻野生型及各种突变品系在光下对NaCl的抗性

| 突变株 | NaCl浓度/mmol·L ⁻¹ | | | | | | | |
|----------|-----------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 30 | 50 | 100 | 200 | 230 | 260 | 290 | 300 |
| CC-124 | + | + | + | + | + | + | - | - |
| CC-125 | + | + | + | + | + | ± | - | - |
| CC-400 | + | + | + | + | + | ± | - | - |
| CC-406 | + | + | + | + | + | - | - | - |
| CC-1641b | + | + | + | + | + | - | - | - |
| CC-1355 | + | + | ± | - | - | - | - | - |
| CC-1354 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| CC-2455 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-2423 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| CC-48 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| CC-1930 | + | + | + | + | + | + | - | - |
| CC-3872 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| CC-1826 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| CC-2419 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-3379 | + | + | + | + | + | ± | - | - |
| CC-1916 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-2986 | + | + | + | + | + | ± | - | - |

+: 对NaCl显示抗性; ±: 对NaCl显示弱抗性; -: 对NaCl敏感。

2 混合营养条件下野生型莱茵衣藻和其突变株对NaCl的抗性

表3表明,混合营养条件下莱茵衣藻的野生型CC-124、CC-125对260 mmol·L⁻¹ NaCl显示出抗性或弱抗性,对290 mmol·L⁻¹和高于此浓度的NaCl显示出敏感性。在叶绿素b缺失的7种突变株中,CC-1355和CC-1354同样对NaCl最敏感,即对100 mmol·L⁻¹ NaCl显示出抗性,CC-1355对200

mmol·L⁻¹和高于此浓度显示出敏感性,CC-1354对200 mmol·L⁻¹的NaCl显示出弱抗性,对230 mmol·L⁻¹和高于此浓度的NaCl显示出敏感性;叶绿素b缺失的CC-1916、CC-1641b、CC-2455、CC-3872和CC-2419突变株中,除了CC-3872外都对230 mmol·L⁻¹ NaCl显示出弱抗性,对260 mmol·L⁻¹和高于此浓度的NaCl显示出敏感性。精氨酸依赖型突变株CC-1930、CC-2423和CC-48对

表3 混合营养条件下莱茵衣藻的野生型及其突变株对NaCl的抗性

| 突变株 | NaCl浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | | | | |
|----------|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 30 | 50 | 100 | 200 | 230 | 260 | 290 | 300 |
| CC-124 | + | + | + | + | + | + | - | - |
| CC-125 | + | + | + | + | + | ± | - | - |
| CC-400 | + | + | + | ± | - | - | - | - |
| CC-406 | + | + | + | ± | - | - | - | - |
| CC-1641b | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-1355 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| CC-1354 | + | + | + | ± | - | - | - | - |
| CC-2455 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-2423 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-48 | + | + | + | + | + | - | - | - |
| CC-1930 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-3872 | + | + | + | + | - | - | - | - |
| CC-1826 | + | + | + | + | + | + | + | - |
| CC-2419 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-3379 | + | + | + | ± | - | - | - | - |
| CC-1916 | + | + | + | + | ± | - | - | - |
| CC-2986 | + | + | + | + | + | ± | - | - |

+: 对NaCl显示抗性; ±: 对NaCl显示弱抗性; -: 对NaCl敏感。

230 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出抗性或弱抗性,对260 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的NaCl显示出敏感性;而CC-1826突变株对290 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出抗性,对300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的NaCl显示出敏感性。精氨酸依赖型及硝酸还原酶缺失型双基因突变株CC-3379对100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出抗性,对200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出弱抗性,对230 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的NaCl显示出敏感性;CC-2986对230 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出抗性,对260 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出弱抗性,对290 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的NaCl显示出敏感性。细胞壁缺失突变株CC-406和CC-400对100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出抗性,对200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl显示出弱抗性,对230 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和高于此浓度的NaCl显示出敏感性。

3 诱变莱茵衣藻突变株的最适紫外线强度

为了检测和确认在我们的实验条件下,用紫外线照射和诱变莱茵衣藻突变株的最佳条件,我们又不同时间段对野生型品系CC-124进行紫外线照射处理并统计细胞的存活率。结果(图1)表明,0 s时3个培养皿中的藻落平均数为175个;4~6 s,细胞存活率保持在50%左右;8 s后细胞存活率的下降速度加快;480 s后细胞全部死亡。

一般紫外线照射强度控制在能保持50%左右细胞的存活率时,莱茵衣藻野生型(137c⁺)品系即可获得较好的诱发突变效率^[3]。为了获得对NaCl

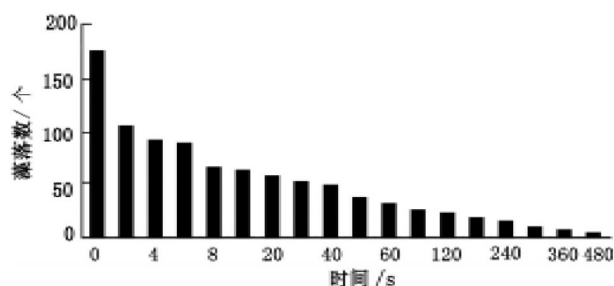


图1 诱变莱茵衣藻突变株的最适紫外线强度

具有敏感性和抗性的莱茵衣藻突变株,在上述实验结果基础上按4~6 s时间段对莱茵衣藻野生型品系CC-124进行紫外线照射诱导,初步筛选获得了对150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl具有敏感性的6个突变株和对350 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl具有抗性的2个突变株,其相关性质有待进一步检测。本研究结果在耐盐性性状相关基因突变株的性质分析以及抗盐碱基因分离工作中有一定的参考价值。

参考文献

- Prieto R, Pardo JM, Niu X et al. Salt-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* isolated after insertional tagging. *Plant Physiol*, 1996, 112:99~104
- Harris EH. The *Chlamydomonas*. San Diego: Academy Press, 1989. 701~780
- Никулина КВ, Чекунова ЕМ, Чунаев АС и др. Генетический анализ ревертантов от мутантов лишенных хлорофилла у *Chlamydomonas reinhardtii*. *Генетика*, 1997, 33(5): 577~582