

文章编号: 1007-4627(2008)02-0191-05

低能离子诱导拟南芥基因组不稳定性的研究^{*}

刘萍, 李方华, 徐敏, 卞坡[#], 吴跃进, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程学重点实验室, 安徽合肥 230031)

摘要: 体细胞同源重组产生的 DNA 重排、缺失和复制等是基因组不稳定的重要指标, 以拟南芥菜 GUS 基因重组报告系 R2L100 和 R3L66 为实验材料, 以体细胞同源重组频率(每个植株上的 GUS 斑点数目)作为评估标准, 研究低能 Ar⁺ 离子和 α 粒子辐射对植物基因组稳定性的影响。结果表明: 30 keV 的 Ar⁺ 离子辐照拟南芥干种子, 在 $500 \times 10^{13} - 3\,000 \times 10^{13}$ ions/cm² 剂量范围内, 同源重组频率与对照相比明显升高, 最大值是对照的 2.4 倍; 3.3 MeV 的 α 粒子辐照萌发 4 d 后的幼苗, 同源重组频率随着剂量的增加呈先增后降的变化趋势, 最大值是对照的 1.9 倍, 对应的辐照剂量是 10 Gy。以上实验结果表明, 低穿透能力的辐射能有效增加植物基因组的不稳定性。 α 粒子辐照拟南芥菜幼苗的根, 未受到辐照的地上部分的同源重组频率较对照增加 2.5 倍, 表明低能离子诱导的基因组不稳定信号在植物个体水平是可以长程运输的。以上结果从另一个侧面解释了低能离子的诱变机制。

关键词: 低能离子辐照; 体细胞同源重组; 基因组不稳定

中图分类号: Q947.9

文献标识码: A

1 引言

低能离子辐射作为一种新的诱变源已经被广泛应用于植物、微生物和动物诱变育种实践, 表现出生理损伤小、突变率高和突变谱宽的特点^[1]。但是长期以来, 低能离子辐射的诱变机制却存在着许多争议^[1, 2]。根据理论计算, 几十 keV 能量的重离子在生物组织内的穿透深度小于 1 μ m, 不足以穿过种皮和相应的组织到达植物种胚产生直接的诱变损伤^[3]。为了解释低能离子的诱变效应, 相继提出了一些理论, 如离子通道、特征 X 射线、次级电子和热穗效应等^[1, 4, 5]。一些实验也证明低能离子辐射中, 少数离子也能够辐射到几十甚至上百个 μ m 的深度^[1]。到目前为止, 人们对低能离子诱变机理的解释还更多的集中在原初的物理过程, 在生物层面上的解释还比较少。

研究表明, 电离辐射不但能直接损伤遗传物质 DNA, 导致各种类型的突变(直接靶效应), 也能够产生非靶效应, 即在没有辐射暴露的细胞中仍然表

现出辐射后的特性^[6]。旁观者效应和基因组不稳定性都属于非靶效应。在植物组织中, 电离辐射通过旁观者效应导致远程器官和组织的生理和发育改变^[7], 但是基因组水平的改变并没有被证实, 而辐射诱导的远程基因组不稳定性已经在多个植物系统上得到证明^[8, 9]。处于基因组不稳定性的细胞主要表现为染色体异常、倍数变化、基因突变和扩增以及随机重复序列的不稳定性等^[10-12]。植物在发育早期没有明确的性系细胞, 它的顶端生长模式决定了生殖细胞一定来自体细胞, 这样体细胞中产生的遗传突变就能传递到最后的生殖细胞, 进而传递到子代个体^[13]。另外, 植物固定生长的特性, 使它们持续不断地接受各种环境压力, 如紫外线和除草剂等。在植物的诱变育种中, 突变体筛选一般在 M₁ 和 M₂ 代, 植物体有足够的时间进行突变的积累。更有趣的是基因组不稳定性是可以跨代遗传的, 即辐照后代也有加速的 DNA 突变积累^[14]。因此电离辐射诱导的基因组不稳定性在辐照后代的突变积累

^{*} 收稿日期: 2008-01-04; 修改日期: 2008-03-11

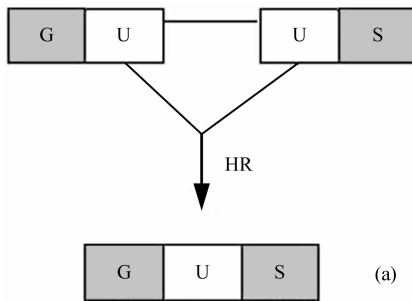
^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10705029)

作者简介: 刘萍(1982-), 女(汉族), 山东德州人, 硕士, 从事低能离子诱变效应的研究; E-mail: liuping07@yahoo.cn

[#] 通信联系人: 卞坡, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn

中也应该有一定的贡献。然而,在传统的辐射育种中,如 γ 射线辐照育种,人们关注更多的是其直接的靶效应,或者把非靶效应产生的遗传改变误认为是直接作用的结果。但是,对于低穿透能力的低能离子辐照,能接触到种子分生细胞的离子毕竟是少数,大多数离子都沉积在表层部位或者是消耗在“离子通道”的制造上。因此低能离子辐照植物能否诱导基因组不稳定性,以及不稳定性信号是否能传递到远程组织并诱导细胞的基因组不稳定性等问题的解决,对解释低能离子诱变机理是较有意义的。

我们选用同源重组 GUS 转基因报告系 R2L100 和 R3L66 作为实验材料,以体细胞同源重组频率(Homologous Recombination Frequency, 简称 HRF)作为基因组不稳定性的检测终点,用低能



Ar^+ 离子和 α 粒子为主要的电离辐射源,研究低能 Ar^+ 离子和 α 粒子对拟南芥种子和幼苗的基因组不稳定性诱导及相关信号在个体水平的传递。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料和生长条件

实验材料 GUS 同源重组报告系 R2L100 和 R3L66。GUS 基因含 3 个内含子,编码葡萄糖苷酸酶,经过葡萄糖苷酸染色后可以观察到蓝色斑点,运用基因工程技术将断裂并且重叠的 GUS 基因转入植物细胞,通过斑点显示判断 GUS 基因是否进行了重组,以此反映基因组的稳定性。GUS 基因的重组原理和 GUS 斑点见图 1。

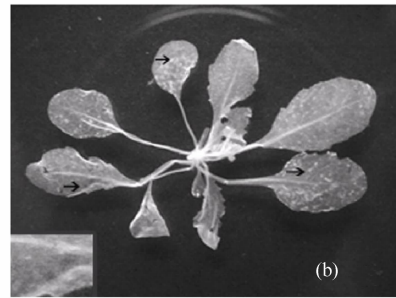


图 1 (a)同源重组 GUS 报告基因的重组原理,(b)重组发生后产生的蓝色斑点

生长条件 (1)光照培养间,温度 20—22 $^{\circ}\text{C}$;光照周期,白 16 h/黑 8 h;光强 100($\mu\text{mol photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$);培养基质,花卉营养土。(2)光照培养箱,温度 22 $^{\circ}\text{C}$;光照周期,光 16 h/暗 8 h;光强 100($\mu\text{mol photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)。

2.2 组织化学染色

植株生长到 22—24 d 时,开始取样、检测,具体操作过程参考 Lingling Li 等^[15]的方法流程。

2.3 低能 Ar^+ 离子辐照实验

低能 Ar^+ 离子辐照实验在中国科学院等离子体物理研究所低能离子注入机上进行,注入 Ar^+ 离子。注入时,靶室真空度 2.0×10^{-2} Pa,能量 30 keV。辐照剂量为 500×10^{13} , $1\,000 \times 10^{13}$, $2\,000 \times 10^{13}$, $3\,000 \times 10^{13}$ 和 $4\,000 \times 10^{13}$ ions/ cm^2 。同时设空白对照(0 剂量)和真空对照[0(v)]。每个剂量设 3 个重复,每个重复辐照种子 60 粒。辐照后种子 4 $^{\circ}\text{C}$ 春化 2 d,然后种植于光照培养箱。

2.4 α 粒子辐照实验

整体辐照 使用中国科学院等离子体物理研究所的 α 粒子辐照源(^{241}Am , 活度 7.4 MBq, 剂量率 1.07 cGy/s, 1 Gy=100 cGy),辐射窗口出射的 α 粒子经过两层 Mylar 膜(厚度 3.5 μm)和一小段空气到达样品的平均能量为 3.3 MeV,辐照剂量分别为 1, 5, 10, 50 和 100 Gy。在 MS 培养基上萌发 4 d 后的幼苗被转移到 Mylar 膜上,放在辐射窗口上,幼苗上方覆盖一层湿润的滤纸(防止辐照过程中水分挥发损伤小苗)。辐照完成后,在辐照样品上加入少量的水,以便于样品从膜上取下。样品取出后重新置于 MS 培养基表面,在培养箱中缓苗 12 h,后移栽至营养土中。

局部根辐照 萌发 7 d 后的幼苗被转移到部分覆有锡箔纸(厚度为 0.5 mm)的 Mylar 膜上,保证根部位于辐照窗口上,小苗上部置于锡箔纸上避免 α 粒子辐照。辐照装置和处理过程与整体辐照相同,

辐照剂量为 10 和 100 Gy。

3 实验结果

3.1 低能离子辐照拟南芥种子引起同源重组频率的升高

因为低能 Ar^+ 离子辐照需要在真空条件下进行, 我们选取同源重组报告系 R3L66 的种子进行辐照实验。实验结果如图 2 所示。辐照过程中真空条件对同源重组频率的影响与对照相比没有明显的差别 ($p=0.59$), 在 500×10^{13} , $1\ 000 \times 10^{13}$, $2\ 000 \times 10^{13}$ 和 $3\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm² 辐射剂量下, 同源重组频率与对照相比均有明显的提高, 同源重组频率增加的倍数分别为 2.29 倍 ($p<0.01$), 2.06 倍 ($p<0.01$), 2.18 倍 ($p<0.01$) 和 2.42 倍 ($p<0.01$)。在 $4\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm² 剂量点, 同源重组频率又下降到对照的水平 ($p=0.38$)。 500×10^{13} — $4\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm² 是低能离子辐照育种中经常使用的辐照剂量, 在 500×10^{13} — $3\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm² 剂量范围内, 同源重组频率并不依赖于辐照剂量的增

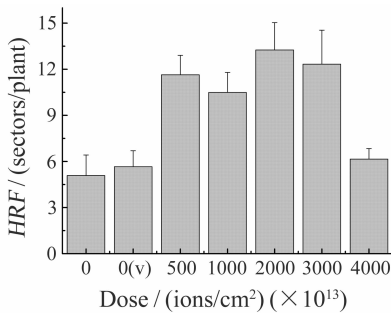


图 2 低能 Ar^+ 离子注入对拟南芥菜同源重组频率的影响

加, 而且又明显高于对照, 可能的原因是在这一剂量范围内, 大部分离子的能量和质量都沉积在一个相对集中的区域, 影响到的是同一部分的组织细胞, 如胚的表层细胞。当辐照剂量增加到 $4\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm², 同源重组频率有所下降, 但是这个下降并不代表基因组不稳定程度的减弱, 而是同源重组作为一种 DNA 链断裂修复精度的降低, 或者是启动了另外链断裂修复机制的结果^[16]。

3.2 α 粒子整体辐照拟南芥幼苗引起同源重组频率的变化

因为 α 粒子辐照实验能在常压条件下进行, 因此选取代谢活跃的拟南芥小苗 (R2L100) 作为整体

辐照对象, 实验结果如图 3 所示。同源重组频率在 1—10 Gy 范围内是剂量依赖性增加, 在 10—100 Gy 范围内, 同源重组频率和辐照剂量的增加是负相关的。同源重组频率的最大值出现在 10 Gy, 与对照比较, 同源重组频率增加了 1.9 倍 ($p<0.05$)。同样剂量大于 10 Gy 时, 同源重组频率的降低也不是基因组不稳定程度降低的原因, 而是随着损伤的加剧, 链断裂修复机制发生了变化^[16]。另外, 在低能离子和 α 粒子辐照中, 几乎所有的 GUS 斑点都位于辐照后新增长的真叶上, 斑点规模也很小, 如图 1(b) 所示。该结果表明我们统计的同源重组事件不是辐射的直接结果, 而是延迟的, 经多代细胞分裂后表现出的辐射效应。

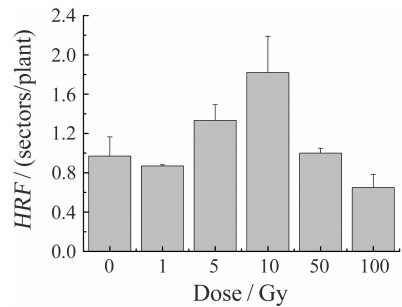


图 3 α 粒子整体辐照对拟南芥同源重组频率的影响

3.3 α 粒子辐照拟南芥幼苗根部导致地上部分同源重组频率的变化

因为植物是顶端生长的发育模式, 胚的生长点细胞是植物地上部分的最初组织来源。在低能离子和 α 粒子整体辐射中, 因为“离子通道”和一些次级效应的存在, 我们不能确定胚生长点细胞产生的基因组不稳定性是否是辐射直接诱导的结果。为此设计了 α 粒子辐照拟南芥根的部分辐照实验, 避免了辐射对小苗地上部分的直接作用。实验品系为 R2L100 萌发 7 d 后的小苗。实验结果如图 4 所示, 用 10 Gy α 粒子辐照拟南芥根部导致地上部分同源重组频率有 2.5 倍 ($p<0.01$) 的升高, 说明在辐照部位(根部)能够产生一种不稳定信号传输到顶端分生组织, 从而诱导了地上部分的基因组不稳定性。更有趣的是, 在 100 Gy 的部分辐照实验中, 植物地上部分的同源重组频率与对照相比是没有显著性差异的 ($p=0.97$), 这一点和整体辐照的结果是一致的, 说明高剂量的辐照下, 受照部位(在本实验中是根)产生并传输了更强的不稳定信号。

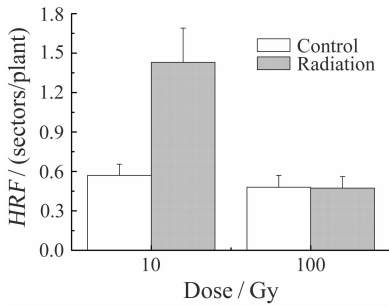


图 4 α 粒子部分辐照对拟南芥同源重组频率的影响

4 讨论

低能离子辐射的诱变机制一直是人们比较关心的课题,主要是低能离子在生物组织内较短的射程不足以使能量沉积到关键的分生细胞(植物种子)^[1]。对于传统的辐射源,如 γ 射线、X射线等,也存在相似的问题。以植物为例,植物的顶端生长模式决定了分生组织(或细胞)是植物地上部分的最初的组织来源^[13],然而,无论是种子或者小苗,其分生细胞的数量是非常少的^[17]。在辐照过程中,绝大部分能量还是沉积在非分生细胞的组织和器官内,对这类能量沉积引起的生物效应,人们考虑更多的是生理损伤,它们对分生细胞基因组水平的影响并没有给予过多的关注。

在组织穿透辐射中,因为电离辐射能直接作用到分生组织细胞,对非靶效应的忽视似乎是“可以接受的”。然而对于低穿透性辐射,如低能离子束和 α 粒子等,它们的非靶效应对可遗传突变的产生就有着更加重要的意义。低能离子辐照休眠的种子和 α 粒子辐照代谢活跃的小苗都引起了同源重组频率的显著提高,说明低能离子辐照能够有效诱导植物细胞基因组不稳定性。尽管低能离子和 α 粒子在生物组织中的穿透深度很小,但是并不能排除它们借助“离子通道”或“次级效应”直接或间接的作用到分生细胞,因此在低能离子和 α 粒子整体辐照中,分生细胞基因组不稳定性产生的原因是不确定的。在 α 粒子辐照小苗根部的实验中,植物地上部分同源重组频率有明显的提高,并且增加的倍数与整体辐照的结果相比并没有明显的差别,表明低能离子辐照诱导的分生组织基因组不稳定性主要来源于其它受照射组织中的信号传输。以上的分析不但从另一个侧面解释了低能离子的诱变机制,而且对低能

离子的诱变育种实践也有一定的指导意义,即辐照处理的过程中,除了使胚生长点细胞尽可能受到直接作用外,其它部位也应该有尽可能多的辐射暴露。

低能离子能够诱导植物细胞基因组不稳定性虽然得到验证,但是有以下两个问题还需要阐明:一是低能离子诱导可遗传突变的积累上,是直接的靶效应还是诱导的基因组不稳定性起主导作用?二是不同组织和器官响应辐射产生的基因组不稳定信号的敏感性是否相同,如果不同,哪些更敏感?相信对这两个问题的解决,能够更好地推进低能离子在植物育种实践上的应用。

参考文献 (References):

- [1] Yu Zengliang. An Introduction of Ion Beam Biotechnology. New York: Springer Press, 2006, 135—180.
- [2] Feng Huiyun, Zhu Jianhao, Yu Zengliang. Materials Science and Engineering, R; Reports, 2006, **54**: 49.
- [3] Bian Po, Zhan Yanfeng, Wu Jian. Journal of Zhengzhou University, 2001, **33**: 45(in Chinese). (卞坡, 张艳峰, 吴健. 郑州大学学报, 2001, **33**: 45.)
- [4] Wei Zengquan, Xie Hongmei, Han Guangwu, et al. Nucl Instr and Meth, 1995, **B95**: 371.
- [5] Wei Zengquan, Han Guangwu, Zhou Guangming, et al. Nucl Instr and Meth, 1998, **B134**: 191.
- [6] Little J B. Journal of Radiological Protection, 2003, **23**: 173.
- [7] Yang Gen, Wu Lijun, Chen Lianyun, et al. Radiation Research, 2007, **167**: 298.
- [8] Olga Kovalchuk, Andrey Arkhipov, Igor Barylyak, et al. Mutation Research, 2000, **449**: 47.
- [9] Jody Filkowski, Allan Yeoman, Olga Kovalchuk, et al. The Plant Journal, 2004, **38**: 1.
- [10] Clutton S M, Townsend K M S, Walker C, et al. Carcinogenesis, 1996, **17**: 1 633.
- [11] Morgan W F, Day J P, Kaplan M I, et al. Radiation Research, 1996, **146**: 247.
- [12] Little J B, Li C, Nagasawa H, et al. J Chim Phys Chim Biol, 1996, **93**: 157.
- [13] Walbot V. Trends Genet, 1985, **1**: 165.
- [14] Jean Molinier, Gerhard Ries, Cyril Zipfel, et al. Nature, 2006, **442**: 1 042.
- [15] Li Liangliang, Ayotte S S, Boivin E B, et al. The Plant Journal, 2004, **40**: 1 007.
- [16] Igor Kovalchuk, Olga Kovalchuk. Nature Biotechnology, 1998, **16**: 1 054.

- [17] Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology* (2nd Ed). Sunderland, 1998, 250—360.
Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc. Publishers,

Study of Genomic Instability of *Arabidopsis Thaliana* Induced by Low-energy-ion Radiation^{*}

LIU Ping, LI Fang-hua, XU Min, BIAN Po[#], WU Yue-jin, YU Zeng-liang
(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: The somatic homologous recombination was frequently used to evaluate genome stability because it can result in DNA changes, such as rearrangement, deletion and duplication. In this paper, we used *Arabidopsis thaliana* transgenic for GUS recombination substrate (R2L100 and R3L66) to study the genomic instability induced by low energy ion and α particle characteristic of short-penetrating properties. The dry seeds of R3L66 line were irradiated by 30 keV Argon ion, the Homologous Recombination Frequency (HRF) had a significant increase at dose range of $500 \times 10^{13} - 3\ 000 \times 10^{13}$ ions/cm². The highest level of HRF was 2.42-fold over the control. The 3.3 MeV α particles were used to radiate 4-day-old seedlings of R2L100 line. The HRFs had a dose-dependent increase at dose of 1—10 Gy, and a dose-dependent decrease at 10—100 Gy. The highest level of HRF induced by α particle was 1.9-fold over control at the dose of 10 Gy. These results indicate that short-penetrating irradiation can effectively trigger the plant genomic instability at the level of plant. The local irradiation on the roots of R2L100 by α particle resulted in a 2.5-fold increase of HRF in non-irradiated aerial plant, which indicates that a signal of genomic instability generated by α particle radiation can systemically travel in whole plant. It is possible that the genome instability induced by low-energy ion is a major part of its mutagenic mechanism.

Key words: low-energy ion irradiation; somatic homologous recombination; instability of genome

* Received date: 4 Jan. 2008; Revised date: 11 Mar. 2008

* Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10705029)

Corresponding author: Bian Po, E-mail: bianpo@ipp.ac.cn