

文章编号: 1007-4627(2009)02-0168-04

不同LET $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子对生防菌BJ1的辐射诱变效应*

马爽^{1,2}, 李文建^{1, #}, 王菊芳¹, 周利斌¹, 余丽霞¹,
董喜存^{1,2}, 陆栋^{1,2}, 刘敬¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 选取高低两个LET点(40和60 keV/ μm), 剂量点分别为50, 100, 200, 400, 600 Gy进行辐照处理, 研究了生防菌的存活率与突变率的关系, 抑菌谱以及活性等。结果表明, 在高LET条件下, 低剂量辐照就可以得到较多的突变体, 并且BJ1有较高的存活率和突变谱, 有利于筛选优良的正突变体。因此高LET较低LET有更为明显的辐射诱变效应。

关键词: 传能线密度; C离子; 生防菌BJ1; 辐射; 诱变效应

中图分类号: O571.5 **文献标识码:** A

1 引言

重离子是一种致密的电离辐射, 与传统的X射线和 γ 射线相比, 具有能量沉积密集、局部剂量大和相对生物学效应高等特点^[1, 2]。当能量高于0.1 MeV/u的重离子通过介质时, 主要与介质的核外电子发生作用, 造成电子碰撞阻止, 这时将单位路程上的能量损失率称为传能线密度(LET)。重离子束在能量沉积过程中, 其射程末端存在一个尖锐的能量损失峰, 即Bragg峰^[3]。LET值在很长一段行进路程上相对较小, 到最终骤然增大。因此离子能量沉积的空间分布很有利于使生物体的局部系受到严重影响。从生物体系总体来看, 能有更多生物学效应, 同时还可以提高存活率, 有利于获得更多突变体。同时, 这种受损的部位可以随离子能量的高低而变化, 是可以调控的和选择的, 这有利于改变过去传统的无方向性的随机诱变, 提高育种效率。

我国自1994年报道了离子注入链霉菌的诱变效应以来, 在这一领域进行了深入的研究探讨。庆大霉素产生菌绛红小单孢菌, 红霉素产生菌, 高产壮观链霉菌等经不同重离子辐照后, 经均筛选得到了高产突变菌株^[4-6]。利用N离子对天冬氨酸转氨酶高产菌株^[7], 米曲霉WJ0521^[8]进行辐照诱变, 得

到了酶活性提高的优良突变菌株。20世纪80年代甚至更早, 哺乳动物细胞的离子束辐射LET效应基础研究就已在海外展开^[9]。到了90年代, 日本开始探索不同能量的离子束辐射对植物体的LET效应^[10-12], 而在国内对于微生物的LET效应研究还鲜有报道。

本文研究了生防菌BJ1经C离子照射后的生防效果的变化, 分析了不同LET的C离子辐照对生防菌BJ1的诱变效应, 为C离子辐照生防微生物进行诱变育种提供基础数据, 同时从生防菌的角度进行微生物LET效应研究, 探索生防菌生防效果随LET的变化规律。

2 材料与方法

菌株 (1)实验菌: 生防菌BJ1; (2)指示菌: 黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*)、棉花枯萎菌(*Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*)、辣椒丝核病菌(*Rhizoctonia solani*); (3)检测菌: 黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*)。

培养基 PDA培养基: 用于检测菌培养和抑菌活性测定; NB培养基: 用于生防菌的培养, 牛肉胨3.0 g, 蛋白胨5.0 g, 葡萄糖2.5 g, 琼脂17 g,

* 收稿日期: 2008-11-07; 修改日期: 2008-12-10

* 基金项目: 中国科学院西部之光人才培养计划资助项目(O606180XB0)

作者简介: 马爽(1978-), 女(汉族), 河北衡水人, 博士研究生, 从事生物物理研究; E-mail: mashuang006@impcas.ac.cn

通讯联系人: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

水1000 ml。

重离子辐射 (1)取一环在NB斜面上活化好的生防菌出发菌株,加入40 ml NB培养液在28 ℃, 120 revolutions/min培养18 h,吸取1.5 ml至一次性培养皿中,将皿安装在辐照盘上,备用;(2)辐照在中国科学院近代物理研究所重离子加速器研究装置(HIRFL)上进行,选取40 keV/ μm 和60 keV/ μm 两个LET点,设定5个不同的剂量点,分别为50, 100, 200, 400, 600 Gy。辐照完毕后,取下培养皿将菌液转入无菌的小离心管中,加入350 μl 甘油,放入-20 ℃冰箱保存。

生防菌存活测定 用浓度梯度法进行测定。将经过辐照处理过的菌液用无菌水进行稀释,然后取不同浓度涂布于平板,室内培养96 h,统计平板上长出的菌落数,计算存活率。

每毫升菌落数=(平板上的活菌落数 \times 稀释倍数/平板上加菌液的量ml) \times 100

存活率=(辐照处理平板上的活菌落数/未辐照平板上的活菌落数) \times 100%

生防菌抑菌活性测定 用PDA平板对峙法进行测定。将辐照处理过的生防菌活化后,取一环菌接入40 ml NB培养液,28 ℃,120 revolutions/min培养48 h。按一定比例加入培养皿后,迅速倒入灭菌后冷却至45 ℃左右的NB培养基混匀,制成菌液稀释浓度为200 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的平板,打成直径7 mm的菌饼,并等距离置于PDA平板四周。将直径7 mm指示菌菌饼接入平板中央,以不接生防菌为对照(将指示菌菌饼接入平板中央)。每处理重复三皿。25 ℃恒温箱中培养数天,待对照组菌落长至皿边缘时,十字交叉法测量抑菌圈直径,计算突变菌株抑菌能力的大小(R 值), $R=(\text{CK中菌落的半径}-\text{病原菌向生防菌生长的长度})/\text{CK中菌落的半径}\times 100\%$ 。

3 结果与分析

3.1 存活率的LET效应

由图1可知,用不同LET离子辐照后,BJ1的存活率与剂量的关系也存在着典型的马鞍型变化,但由于离子的能量不同也存在差异,表现为在相同的剂量下,能量越低其能量沉积效应即LET越大,致死率越高,LET为40 keV/ μm 时的C离子辐射半致死剂量(50% lethal dose, LD_{50})约在400—600 Gy之间,而LET为60 keV/ μm 的 LD_{50} 约在200—400

Gy之间。同时在剂量大于100 Gy的条件下,低LET的存活曲线下降平滑,而高LET的存活曲线很陡,随着剂量的增加而显著降低。这说明在高LET的离子辐照条件下,需要较低的剂量即有可能得到我们所需要的突变材料。

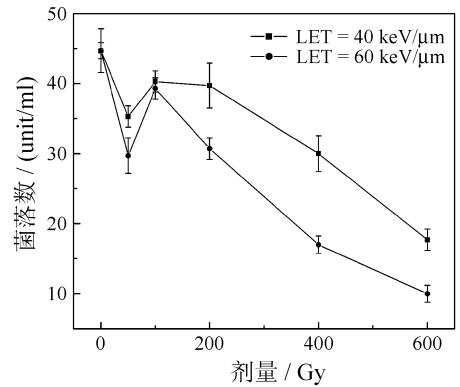


图1 菌株BJ1存活率的LET效应

3.2 不同LET离子辐照BJ1突变率统计

不同LET时辐照的剂量均为50, 100, 200, 400和600 Gy,每个剂量点分别选取35个单菌落进行抑菌实验,结果以抑菌圈14.00 mm为标准。高于14.5为负突变;低于13.5为正突变;13.5—14.5为无变异菌株,结果见图2和图3。由图中可知,对于LET为40 keV/ μm 时的突变率(包括正负突变)在

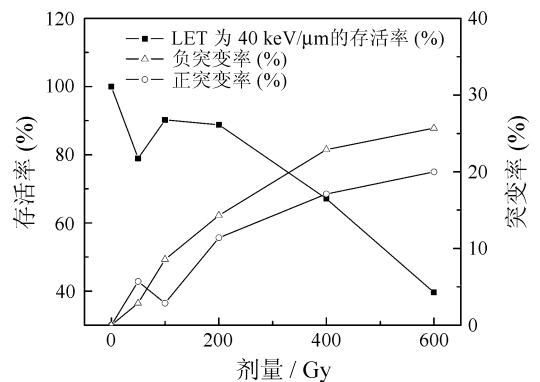


图2 菌株BJ1存活和突变率的低LET效应

存活率为39.6%时是最高的,其中正突变率达到了20%;LET为60 keV/ μm 的存活率为38%时,正负突变最高,其中正突变率为25.7%,比低LET的高出了28.5%。说明在存活率相当条件下,高LET离子辐照可以得到更高的总突变率和正突变率,具有更为明显的辐射诱变效应。

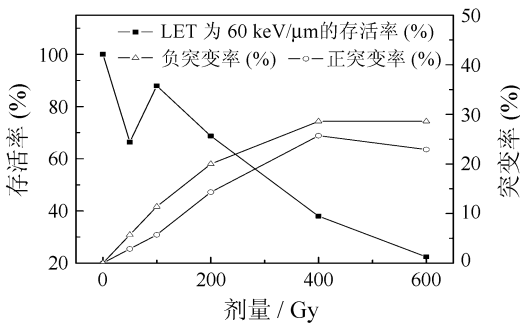


图3 菌株BJ1存活和突变率的高LET效应

3.3 生防效果的LET效应

表1和表2列出了辐照发生防菌BJ1对3种病原菌

的抑菌活性。由表可以看出，不同LET辐照后，生防菌BJ1的抑菌效果有比较大的差别。高LET辐照后，抑菌谱较广，它对3种病原菌的抑菌活性均有不同程度的提高，其中又以对*Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*的抑菌效果最好，最高的活性提高到了26%，并且在400 Gy时，3种病原菌的抑菌活性提高都达到了最大的幅度；相对于高LET离子，低LET辐照后的抑菌活性变化较大，它仅对两种病原菌具有抑菌活性，并且提高幅度最大的也只有2%，同时抑菌活性提高时的剂量也都在600 Gy。对于*Rhizoctonia solani*反而失去了抑菌活性。

表1 LET为60 keV/μm时的生防菌BJ1对3种病原菌的抑菌活性

剂量/Gy	黄瓜枯萎病菌2		棉花枯萎菌3		辣椒丝核病菌4	
	菌落半径 /cm	R(%)	菌落半径 /cm	R(%)	菌落半径 /cm	R(%)
0	1.4	38	1.67	5	1.9	53
100	1.4	38	1.7	3	2.2	45
200	1.57	30	1.63	7	1.8	55
400	1.3	42	1.3	26	1.8	55
600	2.53	—	2.5	—	4.0	—
CK	2.25		1.75		4.0	

表2 LET为40 keV/μm时的生防菌BJ1对3种病原菌的抑菌活性*

剂量/Gy	黄瓜枯萎病菌2		棉花枯萎菌3		辣椒丝核病菌4	
	菌落半径 /cm	R(%)	菌落半径 /cm	R(%)	菌落半径 /cm	R(%)
0	1.4	38	1.67	5	1.9	53
100	1.89	16	1.7	3	2.4	40
200	1.67	29	1.68	4	2.8	30
400	1.4	38	1.71	2	3.1	23
600	1.37	39	1.63	7	3.8	—
CK	2.25		1.75		4.0	

* R=(CK中菌落的半径-病原菌向生防菌生长的长度)/CK中菌落的半径×100%。

4 讨论

重离子辐照与其它电离辐射一样，对DNA的损伤有直接效应和间接效应两种途径。DNA链受到辐照的一个严重的生物学后果是链断裂。链断裂包括DNA单链断裂(single-strand break, 简称SSB)和双链断裂(double-strand break, 简称DSB)，各类DNA损伤中DSB是致死损伤的关键^[13, 14]。有报道证实，高LET辐照能够诱发DNA高的DSB并导致错修复^[15]。荧光原位杂交也证明高LET辐照将产生染色体结构的复杂重组，而低LET辐照只有在剂量很高时产生染色体的结构改变。辐射诱导遗传物

质的变化，将影响微生物的生长和抑菌能力。在本实验中生防菌BJ1经不同的LET离子辐照后，其存活以及各种生防效果参数均有比较大的变化，尤其是在抑菌谱上，高LET辐照后的抑菌谱不但较低LET的广，而且抑菌活性较对照也有较大提高；对于高LET，在存活率较高的条件下，低剂量就可得到较多的突变体，有利于筛选优良的正突变体。

近年来，国内外对重离子束辐照微生物诱变育种的研究和应用日趋加快，采用不同LET的重离子对微生物进行诱变也成了这个领域的研究热点，我们的实验可为此提供一些基础数据和理论参考。

参考文献 (References):

- [1] Li Wenjian. Nuclear Physics Review, 2005, 22(1): 39(in Chinese).
(李文建. 原子核物理评论, 2005, 22(1): 39.)
- [2] Dang Bingrong, Wei Zengquan, Li Wenjian, *et al.* Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 2001, 21: 255(in Chinese).
(党秉荣, 卫增泉, 李文建等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21: 255.)
- [3] Wei Zengquan. Acta Laser Biology Sinica, 2003, 12(5): 321(in Chinese).
(卫增泉. 激光生物学报, 2003, 12(5): 321.)
- [4] Xie Hongmei, Wei Zhengquan, Li Wenjian, *et al.* Chinese Journal of Antibiotics, 1998, 23(6): 462(in Chinese).
(颜红梅, 卫增泉, 李文建等. 中国抗生素杂志, 1998, 23(6): 462.)
- [5] Zhao Hongying, Li Yan. Journal of Tianjin Institute of Technology, 2001, 17(1): 14(in Chinese).
(赵洪英, 李彦. 天津理工学院学报, 2001, 17(1): 14.)
- [6] Xiang Di, Li Jiong, Yao Jianming, *et al.* Acta Laser Biology Sinia, 2002, 11(4): 276.
- [7] Yang Lifeng, Yu Long, Zhang Ning. Chemistry & Bioengineering, 2005, (1): 16(in Chinese).
(杨立峰, 虞龙, 张宁. 化学与生物工程, 2005, (1): 16.)
- [8] Wu Qingxun, Gu Haixian, Zhao Guangao. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(1): 15(in Chinese).
(吴庆勋, 谷海先, 赵光鳌. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 15.)
- [9] Kiefer J. International Journal of Radiation Biology, 1985, 48: 873.
- [10] Tanaka A, Shikazono N, Yokota Y. International Journal of Radiation Biology, 1997a, 72: 121.
- [11] Tanaka A, Tano S, Chantes T. Genes & Genetic Systems, 1997b, 72: 141.
- [12] Hase Y, Yamaguchi M, Inoue M. International Journal of Radiation Biology, 2002, 78: 799.
- [13] Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blocher D. Radiation Research, 1981, 88(3): 524.
- [14] Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D. International Journal of Radiation Biology, 1990, 58(4): 569.
- [15] Brenner D J, Ward J F. International Journal of Radiation Biology, 1992, 61: 737.

Mutagenic Effects of Biocontrol Bacterium-BJ1 Irradiated by Different LET of $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beam*

MA Shuang^{1,2}, LI Wen-jian^{1, #}, WANG Ju-fang¹, ZHOU Li-bin¹, YU Li-xia¹,
DONG Xi-cun^{1,2}, LU Dong^{1,2}, LIU Jing¹

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To explore the effects of different linear energy transfer(LET)of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion Beam irradiation on BJ1, survivals and biocontrol effects were cultured and treated with $LET=40$ and $60\text{ keV}/\mu\text{m}$ at the doses of 50, 100, 200, 400 and 600 Gy, respectively. The results showed more mutations and biocontrol charts and higher survivals were obtained with high LET($60\text{ keV}/\mu\text{m}$) irradiations at lower dose, which was useful to screen good positive mutations. Based on the results above, it could be concluded that the condition of high LET($60\text{ keV}/\mu\text{m}$) had obvious mutagenic effects than that of low LET($40\text{ keV}/\mu\text{m}$).

Key words: linear energy transfer; $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam; biocontrol bacterium BJ1; irradiation; mutagenic effect

* Received date: 7 Nov. 2008; Revised date: 10 Dec. 2008

* Foundation item: Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(O606180XBO)

Corresponding author: Li Wen-jian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn