

文章编号: 1007-4627(2016)04-0494-06

不同 LET 碳离子束辐照拟南芥干种子的当代损伤效应

陈玉泽^{1,2}, 杜艳², 余丽霞², 骆善伟^{2,3}, 冯慧^{2,3}, 穆金虎^{2,3}, 司怀军¹, 李文建², 周利斌^{1,2}

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州 730070;

2. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究以拟南芥 (*Columbia* 野生型) 干种子为材料, 利用兰州重离子研究装置 (HIRFL) 产生的碳离子束对材料进行辐射处理, 统计其存活率、根长、下胚轴长及每果荚种子数, 以探讨不同传能线密度 (Linear Energy Transfer, LET) 的碳离子束辐照对拟南芥当代损伤效应的影响。结果表明, 在相同 LET 辐射条件下, 随着辐射剂量的增大, 拟南芥的存活率、根长、下胚轴长度、每果荚种子数都呈现下降趋势。在相同剂量不同 LET 辐射处理情况下, 随着 LET 的增大, 存活率、根长、下胚轴长、每果荚种子数都显著下降, 可见高 LET 辐射严重抑制了拟南芥的生长和发育。研究表明, 当 LET 为 50 keV/ μm 时, 碳离子束辐照拟南芥干种子对应的最佳诱变剂量为 200 Gy, 为后续开展碳离子束辐射的诱变效率研究奠定了前期基础。

关键词: 碳离子束; 拟南芥; LET; 辐射诱变

中图分类号: Q691.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.33.04.494

1 引言

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 属于双子叶植物纲, 十字花科, 鼠耳芥属。拟南芥作为植物科学研究中的重要模式植物之一被广泛应用于植物遗传学、发育生物学和分子生物学等多种领域, 被誉为“植物中的果蝇”。其主要原因是^[1-3]: (1) 植株个体小, 成熟植株高度一般为 30 cm 左右, 可在温室中大量培养; (2) 生育周期短, 仅为 7~8 周左右, 大大缩短了培养时间; (3) 自花授粉, 单株可收获数千粒种子; (4) 基因组小, 结构简单, 仅有 5 对染色体, 整个基因组大小约为 125 Mb, 其全基因组的测序结果和分析报告也于 2000 年底公布。

电离辐射对生物体的损伤作用, 一方面体现在能量直接作用于生物分子, 引起生物分子的电离和激发, 使 DNA、RNA 或蛋白质发生断裂, 亦可使酶类失活, 从而破坏了有机体具有生命功能的物质; 另一方面电离辐射可以引起水分子产生大量自由基, 这些自由基间接作用于生物分子, 最终造成机体细胞及遗传物质结构的破坏。近年来, 重离子束因其独特的物理学和生物学特性而备受关注。它具有较高的传能线密度 (Linear

energy transfer, LET), 即在单位贯穿路径上沉积的能量大, 属致密电离辐射; 而低 LET 射线 (如 X 射线、 γ 射线) 的能量沉积是均匀分布在靶体上, 属稀疏电离辐射^[4]。因此, 相同剂量辐射下, 重离子束比常规电离辐射具有更高的相对生物学效应 (Relative biological effectiveness, RBE)^[5-6], 而 RBE 的异同受各种参数影响, 如细胞的敏感性、辐射的剂量、离子种类等, LET 在这些参数中尤为重要^[7-9]。重离子的种类及参数十分丰富, 不同离子种类、不同 LET 的重离子束辐射对植物体及动物细胞的辐射损伤研究已有报道。如 Suzuki 等^[10]利用不同 LET 的氦离子辐射处理人正常细胞后发现, 细胞死亡和染色质断裂的发生具有明显的 LET 效应。Aoki-Nakano^[11]利用重离子辐射 B 淋巴细胞后发现, DNA 双链断裂修复路径会受到影响, 从而发生错误修复。在植物育种领域, 不同 LET 的重离子束可诱发不同类型的 DNA 突变类型, 较低的 LET 主要引发点突变和小片段的插入缺失, 随着 LET 的增加, 染色体重排时间发生几率也随之增多^[12-13]。因此, 为积累基础数据, 探索合适的重离子辐射诱变育种参数, 本试验依托国内唯一能提供中高能重离

收稿日期: 2016-05-16; 修改日期: 2016-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11275171, 11205218); 中国科学院战略性科技先导专项项目(XDA08040111); 中国科学院西部之光人才培养资助项目(29Y506020); 中国科学院青年创新促进会(29Y506030)

作者简介: 陈玉泽(1990-), 男, 甘肃武威人, 硕士, 从事诱变育种基础研究, E-mail: 704031952@qq.com

通信作者: 周利斌, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn; 司怀军, E-mail: hjsi@gsau.edu.cn.

子束的兰州重离子研究装置(HIRFL), 采用能量分别为43.3, 13.0和10.3 MeV/u(平均LET分别为50, 150和200 keV/ μm)的碳离子束辐照拟南芥的干种子, 通过对辐照当代存活率、幼苗长势、植株高度、结实率等损伤指标的调查, 研究不同LET的碳离子束辐照对拟南芥当代各个生长发育时期(幼苗期、生长期、生殖期和成熟期)的损伤效应, 以期获得丰富的拟南芥突变体提供最佳重离子辐射条件, 同时也为重离子辐射诱变拟南芥的机理研究提供基础数据。

2 材料与方 法

2.1 试验材料及培养条件

供试植物材料拟南芥野生型(Columbia)种子由中国科学院上海生命科学研究院植物生态研究所崔晓峰提供。培养条件: $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 16 h光照/8 h黑暗, 光照强度为5 000 lux, 相对湿度为60%。

2.2 方 法

2.2.1 辐 射 处 理

拟南芥干种子用封口膜包裹, 利用HIRFL提供的碳离子束进行样品辐射处理, 具体辐射参数见表1。

表1 碳离子束辐射参数

Energy / (MeV/u)	LET / (keV/ μm)	Dose/Gy	Number of samples/dose
43.3	50	0, 100, 200, 300, 500	7 000
13.0	150	0, 20, 40, 60, 100, 200	7 000
10.3	200	0, 20, 40, 60, 100, 200	7 000

2.2.2 萌 发 率 统 计

每个剂量随机选取100粒种子, 经20% NaClO溶液表面消毒15 min, 无菌水冲洗5次, 播种于培养皿内的湿滤纸上, 置于培养间。第2天开始统计萌发率, 连续统计5 d。

2.2.3 存 活 率 统 计

每个剂量随机选取100粒种子, 于4 $^\circ\text{C}$ 下避光春化3 d后点播于土壤中, 置于培养间并覆盖塑料薄膜进行保温, 1周揭掉薄膜。培养30 d后以长出莲座叶为存活标准统计存活率(%), 计算公式如下:

$$\text{存活率} = \frac{\text{30 d后长出莲座叶的株数}}{\text{供试种子总数}} \times 100\%。$$

2.2.4 根 长 及 下 胚 轴 长 度 测 定

根长测定: 辐射后的种子(45粒/剂量)经20% NaClO溶液表面消毒15 min, 无菌水冲洗5次, 点播

于MS(Murashige and Skoog)培养基上, 置于4 $^\circ\text{C}$ 避光条件下春化, 3 d后垂直置于培养间中, 待其生长7 d后, 数码相机(G9, Canon)取像, 用微标尺结合Image J软件测量根长(根尖到下胚轴的长度)。

下胚轴长度测定: 辐射后的种子(45粒/剂量)消毒、点播、春化步骤与根长测定实验相同。春化结束后转移至22 $^\circ\text{C}$ 培养间并用锡纸包裹培养皿进行避光处理, 待其生长7 d后, 拍照取像, 用与上述相同的方法测量下胚轴长度。

2.2.5 结 实 情 况

以果荚种子数指标代表辐照当代的种子结实情况, 待拟南芥生长60 d, 果荚成熟时, 每个剂量随机抽取10株, 每株剪取3个成熟未开裂的果荚, 统计每个果荚的种子数。

2.3 数 据 统 计 分 析

以上各实验均重复3次, 数据采用SPSS 17.0软件中Post-Hoc(Duncan)进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异水平, 显示数据均为“平均数 \pm SE”, 字母不同表示差异有统计学意义。使用Origin 8.0软件进行图表绘制。

3 结 果 与 分 析

3.1 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥萌发率的影响

图1显示的是不同LET的碳离子束辐照拟南芥种子萌发率的剂量-效应曲线。结果表明: 对照萌发率为98.3%, 不同LET的碳离子束随着剂量的增加, 萌发率与对照相比均有所降低, 但并不显著。即使在不同LET的碳离子束的最高辐照剂量下, 种子仍可正常萌发, 其萌发率分别为96.3%, 97.0%, 97.0%。这表明不同LET的碳离子束辐照对拟南芥种子萌发的影响较小。

3.2 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥存活率的影响

由图2可以看出, 辐射剂量为50 Gy时, 在LET 50, 150, 200 keV/ μm 辐射条件下拟南芥的存活率均无显著性差异。辐射剂量高于150 Gy时, 存活率呈现出显著下降趋势, 但在不同辐射条件下的变化幅度有所不同: LET 150和LET 200 keV/ μm 在200 Gy辐射剂量点时, 存活率分别由82.0%和88.0%急剧下降到17.0%和11.0%; 而LET 50 keV/ μm 辐射条件下的存活率仅由94.0%下降到61.3%。LET 50 keV/ μm 在500 Gy照射剂量点时, 存活率由94.0%下降到10.3%左右。由此

可见，碳离子束辐射对拟南芥存活率有一定的抑制作用，且 LET 值越高，抑制程度也越严重。

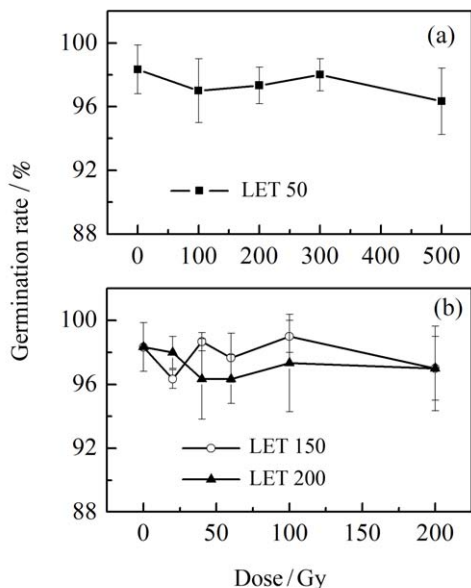


图 1 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥萌发率的影响

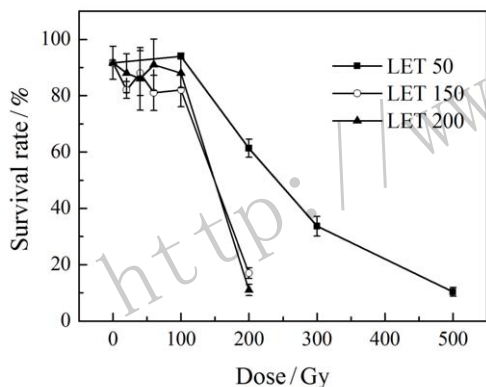


图 2 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥存活率的影响

3.3 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥根长及下胚轴的影响

根是植物长期适应陆地生活而在进化过程中逐渐形成的重要器官之一，它的主要功能是起吸收作用。通过根植物可以吸收土壤中的水分、无机盐等物质，并将其运输到茎。图 3(a) 和图 4(a) 分别显示了拟南芥干种子辐射后生长 7 d 的幼苗主根表型的变化情况和根长的统计结果。结果表明，不同LET的碳离子束辐射对根长有抑制作用，且在同一辐射条件下，剂量越大，抑制程度越强。LET 越大，达到相似的抑制程度所需的辐射剂量越小。

下胚轴是连接植物根和茎的重要器官。图 3(b) 和图 4(b) 分别显示了辐射后生长 7 d 的拟南芥幼苗下胚轴

表型的变化情况和其长度统计结果。结果表明，在 LET 50, 150, 200 keV/μm 的最高辐照剂量组，下胚轴长与对照相比分别下降了 52.9%, 46.8%, 41.8%；在 LET 50、150 keV/μm 情况下碳离子束辐射对拟南芥的下胚轴的抑制作用均具有明显的剂量效应和 LET 效应。

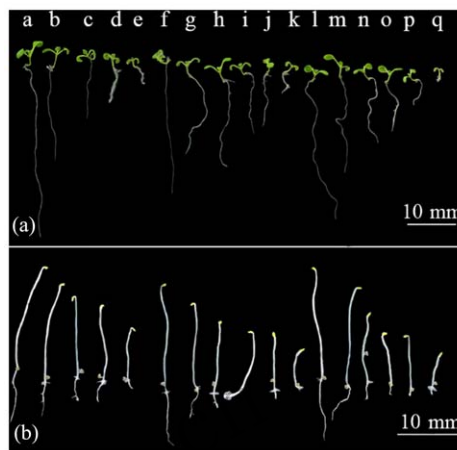


图 3 (在线彩图) 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥根长(a)及下胚轴(b)表型变化的影响

a~e分别为LET 50 keV/μm的对照, 100, 200, 300和500 Gy; f~k分别为LET 150 keV/μm的对照, 20, 40, 60, 100和200 Gy; l~q分别为LET 200 keV/μm的对照, 20, 40, 60, 100和200 Gy。

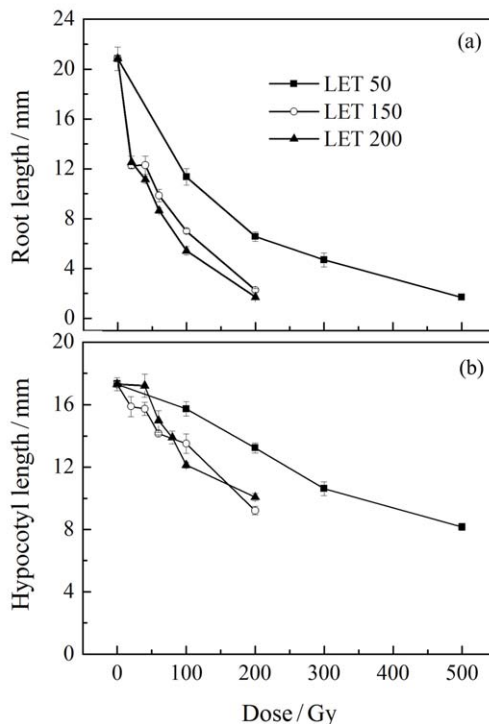


图 4 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥根长(a)及下胚轴(b)表型变化的影响

同时, 研究结果还表明根比下胚轴对碳离子束更为敏感。以每个LET的最低辐射剂量为例: 与对照相比, 根长分别下降了45.6%, 41.1%, 39.9%; 而下胚轴仅分别下降了9.1%, 8.2%, 0.6%。

3.4 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥结实率(每果荚种子数)影响

育性是作物得到稳定遗传后代的重要前提。为了探究不同LET碳离子束辐射对拟南芥育性的影响, 选取辐射后生长60 d的植株进行每果荚种子数的调查。由表2可知, 在LET 50 keV/ μm 辐射条件下, 随着照射剂量的增加, 各剂量组之间每果荚种子数差异不显著; 但LET为150和200 keV/ μm 时, 每果荚种子数随剂量增大而显著的减少。150 keV/ μm 辐射条件下最高剂量每果荚种子数较对照降低了57.7%, 200 keV/ μm 辐射条件下最高剂量较对照降低42.1%。

表2 不同LET的碳离子束辐射对拟南芥每果荚种子数的影响

LET/(keV/ μm)	Dose/Gy	Seed number/silique
50	0	41.57 ± 1.17 a
	100	34.93 ± 2.45 b
	200	39.33 ± 2.32 b
	300	36.23 ± 2.97 b
	500	32.80 ± 2.73 b
150	0	41.57 ± 1.17 a
	20	42.70 ± 0.79 a
	40	34.06 ± 0.64 c
	60	38.36 ± 0.31 b
	100	22.20 ± 1.41 d
200	0	41.57 ± 1.17 a
	20	39.33 ± 1.24 b
	40	32.63 ± 1.56 c
	60	35.03 ± 2.01 c
	100	23.67 ± 2.00 d
	200	24.05 ± 2.11 d

* 表中同列不同字母表示各处理之间差异显著 ($P < 0.05$); 相同字母表示各处理之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

4 讨论

辐照损伤效应包含原初损伤和遗传变异, 原初损伤主要是生理及形态学方面的变化, 不能遗传到下一代; 而遗传变异是由于引起DNA的改变进而影响性状的变化, 它能够进行稳定的遗传。生理损伤和遗传变异的综合效应构成了辐照引发的当代效应^[2,14]。重离子束属于高LET辐射, 它能引起细胞内一系列生理及遗传学

变化, 因而逐渐被应用于多种高等植物的诱变育种研究及实践中。获得丰富的突变体材料是深入研究重离子辐射诱变育种机理的重要前提。目前化学诱变(Ethyl methane sulfonate, EMS等)、物理诱变(X, γ 射线等)和生物手段诱变等方法已广泛地应用于植物学研究中, 产生了大量的突变体^[15]。不同的诱变方法都有其特点, 如EMS诱发点突变为主^[16], 且主要为G-C \rightarrow A-T的转换; X、 γ 射线对基因组DNA的损伤则是相对随机性的, 包括碱基替换、删除和染色体交换等^[5]; 生物手段诱变主要是将一段特定的且已知的DNA序列插入到植物基因组中的某基因中, 从而诱发基因突变, 且主要用于反向遗传学^[17-18]。相比之下, 重离子辐射植物种子产生的生物学效应比低LET辐射更显著^[13]。因此, 重离子辐射就成为了一种更为有效的诱变技术。

本研究以拟南芥干种子为材料, 研究了不同LET的碳离子束辐射对M1代样品生物学指标(萌发率、存活率、根长、下胚轴长和育性)的影响, 为下一步突变体的筛选提供了照射剂量等参数选择的依据。经不同LET的碳离子束辐射后, 照射剂量在0~100 Gy时, 存活率无显著变化; 照射剂量超过100 Gy时, 存活率随剂量的增大而下降, 而且在LET 50 keV/ μm 与LET 150, 200 keV/ μm 辐射条件下相比, LET 150, 200 keV/ μm 的存活率呈急剧下降趋势, 这一结果与Shikazono等^[19]的报道相似, 这可能是因为重离子辐射对植物生命活动的影响具有双重效应, 低剂量常表现为刺激效应, 而高剂量则表现为抑制效应, 且高LET辐射造成的效果更为明显。主根长度和下胚轴长度的剂量曲线趋势基本一致, 随剂量的增加, 根和胚轴的生长受到了明显的抑制, 且根的生长对碳离子束辐射更为敏感, 抑制程度较下胚轴更为严重。胚由受精卵发育而来, 是种子中最重要的组成部分。胚中影响植物生长和生殖发育的主要区域为顶端分生组织(apical meristem), 由多个原初细胞组成, 这些细胞被认为是离子束辐射生物学效应的靶细胞^[20]。这些细胞的损伤导致植物的生长和发育受到影响, 特别是对根长和胚轴的生长尤为明显。这是因为辐射不仅引起细胞DNA损伤, 影响DNA修复, 而且可能影响有关基因的表达, 从而导致细胞中各种物质含量和组成以及与生长相关的酶的信号通路的变化^[21-22], 根和下胚轴的生长和发育受这些变化的影响最大, 所以辐射损伤效应明显。每果荚种子数随剂量变化趋势中, 相同照射剂量下, LET 50 keV/ μm 与LET 150, 200 keV/ μm 辐射条件下相比, 相同辐射剂量的每果荚种子数下差异显著, 可见LET是影响育性的重要因素之一, 相同剂量下高LET离子束辐射会严重影响物的生殖。

通过以上的初步研究,发现高 LET 辐射拟南芥干种子造成的损伤可以严重抑制其后续的生长和生殖,50 keV/ μm 辐照条件下 200 Gy 和 300 Gy 都很接近半致死剂量,但 300 Gy 处理组所表现的生理损伤要大于 200 Gy。因此下一步计划通过此次试验结果选取 LET 50 keV/ μm 的最佳诱变剂量 200 Gy,批量种植 M1 代,并获取 M2 突变体库,量化分析各自的突变效率及突变谱,并获得稳定遗传的突变体,对表型稳定的突变体进行全基因组测序,以期更为深入地探索离子束诱变机理。

参考文献:

- [1] DU Yan. Mutation screening and mutagenic effects research of carbon-ion irradiation on *Arabidopsis thaliana*[D]. Graduate University of Chinese Academy of Sciences(Institute of Modern Physics), 2015. (in Chinese)
(杜艳. 碳离子束辐照拟南芥突变体筛选及诱变效应研究[D]. 中国科学院研究生院(近代物理研究所), 2015.)
- [2] FENG Hui, LUO Shanwei, DU Yan, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2016, **34**(1): 10401.(in Chinese)
(冯慧, 骆善伟, 杜艳, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2016, **34**(1): 10401.)
- [3] WU Dali, HOU Suiwen, LI Wenjian. Nuclear Physics Review, 2008, **25**(3): 287. (in Chinese)
(吴大利, 侯岁稳, 李文建. 原子核物理评论, 2008, **25**(3): 287.)
- [4] QU Ying, LI Wenjin, ZHOU Libin, *et al.* Nuclear Physics Review, 2007, **24**(4): 294. (in Chinese)
(曲颖, 李文建, 周利斌, 等. 原子核物理评论, 2007, **24**(4): 294.)
- [5] KIKUCHI S, SAITO Y, RYUTO H, *et al.* Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2009, **669**(1-2): 63.
- [6] NAOYA S, YUKIHIKO Y, SATOSHI K, *et al.* Genetics, 2003, **163**(4): 1449.
- [7] ROMANO F, CIRRONE G A P, CUTTONE G, *et al.* Physics in Medicine & Biology, 2014, **59**(12): 2863.
- [8] BELLI M, CERA F, CHERUBINI R, *et al.* International Journal of Radiation Biology, 1998, **74**(4): 501.
- [9] GERWECK L E, KOZIN S V. Radiotherapy & Oncology Journal of the European Society for Therapeutic Radiology & Oncology, 1999, **50**(2): 135.
- [10] SUZUKI M, KASE Y, KANAI T, *et al.* International Journal of Radiation Biology, 1997, **72**(5): 497.
- [11] MIZUHO A N, YOSHIYA F. J Radiat Res, 2013, **54**(6): 1029.
- [12] KAZAMA Y, HIRANO T, SAITO H, *et al.* BMC Plant Biology, 2011, **11**(1): 284.
- [13] HIRANO T, KAZAMA Y, OHBU S, *et al.* Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012, **735**(1-2): 19.
- [14] ZHOU Libin, LI Wenjian, QU Ying, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2007, **25**(4): 232(in Chinese)
(周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(4): 232.)
- [15] ATSUSHI T, NAOYA S, YOSHIHIRO H. J Radiat Res, 2010, **51**(3): 223.
- [16] GREENE E A, CODOMO C A, TAYLOR N E, *et al.* Genetics, 2003, **164**(2): 731.
- [17] KRYSAN P J, YOUNG J C, SUSSMAN M R. Plant Cell, 1999, **11**(12): 2283.
- [18] ALONSO J M, STEPANOVA A N, LEISSE T J, *et al.* Science, 2003, **301**(5633): 653.
- [19] SHIKAZONO N, TANAKA A, KITAYAMA S, *et al.* Biophysik, 2002, **41**(2): 159.
- [20] QIN H L, XUE J M, LAI J N, *et al.* Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, 2006, **245**(1): 314.
- [21] QIANG Weiya, TANG Hongguan, HOU Zongdong, *et al.* Acta Ecologica Sinica, 2004, **24**(4): 852.(in Chinese)
(强维亚, 汤红官, 侯宗东, 等. 生态学报, 2004, **24**(4): 852.)
- [22] WEI Zengquan, XIE Hongmei, LIANG Jianping, *et al.* Nuclear Physics Review, 2003, **20**(1): 38. (in Chinese)
(卫增泉, 颜红梅, 梁剑平, 等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 38.)

Research on Contemporary Damage Effects of Carbon Ion Beams with Different LET Irradiation on Dry Seeds of *Arabidopsis thaliana*

CHEN Yuze^{1,2}, DU Yan², YU Lixia², LUO Shanwei^{2,3}, FENG Hui^{2,3},
MU Jinhu^{2,3}, SI Huaijun¹, LI Wenjian², ZHOU Libin^{1,2}

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 703370, China;

2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Aimed to study the biological effects of carbon ion beams with different linear energy transfer (LET) values provided by Heavy Ion Research Facility in Lanzhou (HIRFL), dry seeds of *Arabidopsis thaliana* (Columbia-WT) were irradiated and a series of biological effects of postembryonic development, such as survival rate, primary root length, hypocotyls length and number of seeds per silique, were investigated. The results showed that, under the radiation condition of the same LET value, the survival rate, root length, hypocotyls length and number of seeds per silique were decreased with the increasing dose. In addition, under the radiation conditions with different LET values, but same dose, the extent of the decline of the survival rate, root length, hypocotyls length and number of seeds per silique were reinforced with the increasing LET. It was also found that high LET radiations inhibited the subsequent growth and development of *Arabidopsis thaliana* severely. In brief, it was suggested that the optimum dose of carbon ion beam with 50 keV/ μm value on *Arabidopsis thaliana* dry seeds was 200 Gy. This research complemented the preliminary theoretical foundation for the comparative study of the highest mutation efficiency of carbon ion beam irradiations at IMP, CAS(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences).

Key words: carbon ion beam; *arabidopsis thaliana*; linear energy transfer; irradiation

Received date: 16 May 2016; **Revised date:** 26 Jul. 2016

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(11205218, 11275171); Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences(XDA08040111); CAS Light of West China Program(29Y506020); Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences(29Y506030)

Corresponding author: ZHOU Libin, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn; SI Huaijun, E-mail: hjsi@gsau.edu.cn.