第 35 卷 第 1 期
2018 年 3 月

原 子 核 物 理 评 论
Nuclear Physics Review

Vol. 35, No. 1
Mar., 2018

文章编号: 1007-4627(2018) 01-0094-06

碳离子束辐射诱变拟南芥突变体盐胁迫研究

骆善伟[1,2]，杜 艳[1]，余丽霞[1]，陈玉泽[1,3]，崔 涛[1,2]，冯 慧[1,2]，穆金虎[1,2]，李文建[1]，周利斌[1,3,†]

(1. 中国科学院近代物理研究所，兰州 730000;
2. 中国科学院大学，北京 100049;
3. 甘肃农业大学生命科学技术学院，兰州 730070)

摘要: 非生物逆境胁迫是影响植物生长的重要因素之一，植物耐盐研究是抗逆研究的一个重要组成部分。利用兰州重离子研究装置(HIRFL)产生能量为43.3 MeV/u的碳离子束辐射诱变拟南芥干种子，获得了稳定突变体#197，通过生理指标测定和实时荧光定量PCR技术对该突变材料进行盐胁迫相关研究，结果表明：#197在盐胁迫条件下萌发速率低于野生型，幼苗的绿胚率较野生型更高。基因表达方面，#197受到高盐胁迫后，*P5CS1*基因迅速转录，且表达水平显著高于野生型，而脯氨酸降解相关基因*ProDH*的表达量#197略低于野生型，该表达模式有利于脯氨酸的积累，从而缓解了#197受到的胁迫压力，使得*DREB2A*和*RD29A*的表达量低于同期野生型。

关键词: 碳离子束；拟南芥；突变体；耐盐；脯氨酸
中图分类号: Q691.5; Q947.9　　**文献标志码:** A　　**DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.35.01.094

1 引言

重离子束是指比氦重的原子核通过大型加速器装置加速产生的具有一定能量的粒子束流。近年来重离子束因其自身的物理学特性，成为了一种新兴的辐射源而在植物诱变育种研究领域显示出独特的优势。通过重离子束辐射植物筛选新品种的方法已经广泛应用于作物育种领域，并且取得了显著成效[1]。然而对重离子束辐射产生的突变体，如抗逆材料的后续研究相对较少，多数研究还集中在辐照的群体效应[2–4]。

土地盐碱化是全球面临的一个严峻问题，严重限制了植物的生长，直接导致粮食作物减产[5]。盐碱土中含有的主要阳离子包括：Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}，主要阴离子包括：Cl^-、SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, HCO_3^-，其中对植物危害最为普遍的是Na盐。植物对盐胁迫的适应过程中需要处理细胞内各种离子的平衡，盐生植物和甜土植物通过液泡中Na^+和Cl^-的调节来降低盐离子的积累[6–8]。通过调节细胞内Na^+和Cl^-有助于维持细胞内溶液的稳态，也有利于维持各组织和细胞器的渗透压[9]。

植物细胞中，参与植物盐胁迫响应的基因很多，其中*DREB2A*是调控植物参与抵抗非生物逆境胁迫相关基因表达的重要转录因子[10]，*RD29A*是受盐胁迫、水分胁迫诱导产生的转录因子，*P5CS1*是高等植物体内谷氨酸途径的限速酶，控制着体内脯氨酸积累的速度[11]，脯氨酸是植物体内最为常见的渗透保护物质，能调节植物细胞的渗透压，脯氨酸含量的升高有利于升高渗透压，降低Na^+等离子的吸收[12]，因此*P5CS1*被认为是一个重要的抗逆相关基因。*ProDH*是脯氨酸降解酶基因[13]，主要参与脯氨酸的降解。在植物细胞中这些基因的表达能够反映植物对盐胁迫的适应能力，当植物受到盐胁迫时，部分关键基因的表达量将发生变化，通过实时荧光定量PCR可以验证这些基因在植物细胞中的表达差异。

本文以碳离子束辐射诱变产生的拟南芥稳定突变体#197为实验材料，通过萌发率、绿胚率的统计，以及多个盐胁迫响应基因的转录水平测定，以期从生理和基因转录层面比较#197与野生型的耐盐能力。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料和生长条件

供试材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*Columbia*生态型野生型种子。拟南芥突变体#197为碳离子

收稿日期: 2017-04-21;　**修改日期:** 2017-05-20
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11275171)；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引进计划资助项目(29Y506020)；中国科学院青年创新促进会(2015337)
作者简介: 骆善伟(1989–)，男，江西赣州人，博士研究生，从事诱变育种基础研究；E-mail: luoshanwei@impcas.ac.cn
† **通信作者:** 周利斌，E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn。

束 200 Gy 剂量辐照后筛选获得，碳离子束由兰州重离子研究装置 (HIRFL) 提供，能量为 43.3 MeV/u，平均传能线密度为 50 keV/μm。碳离子束诱变拟南芥干种子，M_1 单株收种得到 M_2 种子，突变体从 M_2 群体筛选得到，表现为幼嫩叶片深绿色，叶片成熟后回复正常，M_2 突变体经连续自交纯化 3 代后得到稳定 M_5 突变体。培养条件为 (22±1) ℃，光周期为光 16 h /暗 8 h，光照强度约为 6 000 lux。

2.2　植物材料的 NaCl 处理

平板处理：拟南芥种子用体积分数 20% NaClO 进行表面消毒，然后均匀播种到 NaCl 终浓度为 50，75，100，125 mmol/L 的 MS (Murashige and Skoog) 培养基中，连续 8 天统计其萌发率，发芽率=萌发种子数/播种种子总数，重复 3 次。

拟南芥种子播种到 MS 培养基上，将生长 4 天的幼苗转移至含有 150 和 175 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上，垂直培养 7 天观察，幼苗保持绿色为 1 个绿胚，绿胚率=绿胚数/幼苗总数，重复 3 次。

离体植株 NaCl 处理：将在营养土中生长 3 周的植株地上部分放入终浓度 175 mmol/L NaCl 的 MS 液体培养基中，不含 NaCl 的 MS 液体培养基为对照，处理 0，2 和 4 h 取样并液氮冻存。

2.3　实时荧光定量 PCR

使用植物 RNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A.TM HP Plant RNA Kit, OMEGA) 提取拟南芥野生型和 #197 总 RNA，然后使用反转录试剂盒 (Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo) 反转录第一条 cDNA 链。实时荧光定量 PCR 所使用的模板是将获得的 cDNA 链稀释 10 倍，引物稀释到终浓度为 5 μmol/L 的使用液，使用荧光定量试剂盒 (Scientific SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo) 进行实时荧光定量 PCR 反应，反应体系为引物 1.5 μL X 2(Forward 和 Reverse)，模板 5 μL，SYBR Green Qpcr Master Mix 12.5 μL，nuclease-free water 4.5 μL，总体积为 25 μL。PCR 程序为 95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，40 个循环。我们测定的基因为 *DREB2A*, *RD29A*, *P5CS*, *ProDH*，基因序列通过 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 获得，采用 Primer3.0 软件设计引物，内参基因为 β-*actin*[14]，引物序列见表 1。定量 PCR 结果采用 Livak 中 $2^{-\Delta C_t}$ 公式进行计算[15]，$\Delta C_t = C_{t,target} - C_{t,actin}$，$C_{t,target}$ 表示目标基因的 C_t 值，$C_{t,actin}$ 表示内参基因的 C_t 值。

表 1　荧光定量 PCR 所使用的的引物名称及其序列

gene ID	Primer sequence
β-actin-F	AGATGCCCAGAAGTCTTGTTCCAG
β-actin-R	CTTTGCTCATACGGTCAGCGATAC
DREB2A-F	TTGGCTGAGCGAGTTTGAAC
DREB2A-R	CGGTCCTGATTTAAGCCTGC
RD29A-F	GAAACAGAGTCTGCCGTGAC
RD29A-R	TGCTGCCTTCTCGGTAGAGA
P5CS-F	AGCGCATAGTTTCTGATGCA
P5CS-R	ACTCCCATGTCGGTGAATGT
ProDH-F	GTTGGTGAGAGGGGCTTACA
ProDH-R	AACGACACCGAAACCAGAAC

2.4　实验数据统计分析

所有试验均进行 3 次重复实验，数据处理采用 SPSS17.0 统计分析软件，均数间的比较采用 *t*-test 法，以 $P < 0.05$ 为显著性差异水平，用“*”表示，$P < 0.01$ 为极显著差异水平，用“**”表示，显示数据均为“平均数 ±SE”。

3　实验结果

3.1　NaCl 胁迫对拟南芥突变体 #197 萌发的影响

野生型和突变体 #197 干种子培养在 NaCl 终浓度为 50，75，100，125 mmol/L 的 MS 平板中，连续 7 天统计其萌发率 (图 1)。未施加 NaCl 胁迫情况下，#197 第 1 天的萌发率为 58.53%，低于野生型，而第 3 天开始野生型和 #197 各自的萌发率均高于 60%。NaCl 胁迫严重抑制了野生型和 #197 的萌发，50 mmol/L NaCl 处理组，野生型第 1 天的萌发率从对照组

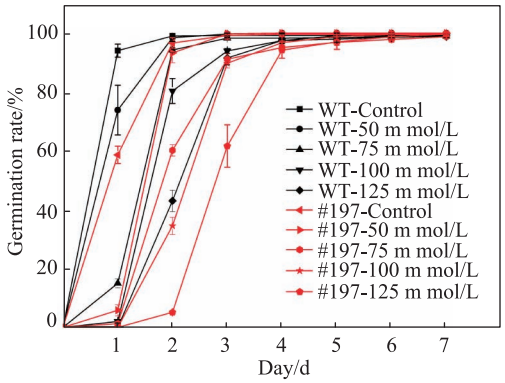

图 1　(在线彩图) 不同浓度的 NaCl 对 #197 萌发率的影响

的93.86% 下降到73.72%，#197下降幅度更大，从58.53%降低至5.81%。随着NaCl浓度的升高，抑制作用也随之增强。在75 mmol/L浓度时，野生型第一天已经开始萌发，萌发率为14.97，而#197萌发率为1.27%，几乎没有萌发。当盐浓度升高到125 mmol/L时，野生型和#197第一天基本不萌发，第二天野生型萌发率到达42.93%，而#197仅为5.12%，第三天时野生型萌发率为91.37，而#197仅为61.52%。0～125 mmol/L的NaCl处理，并没有影响拟南芥的最终萌发率，即使是在浓度高达125 mmol/L时，#197的最终萌发率也可达到94%，但萌发速率会降低。

3.2 NaCl胁迫对拟南芥突变体#197幼苗的影响

将在MS培养基上生长4天的野生型和#197幼苗转移至终浓度为150和175 mmol/L NaCl的培养基上，连续培养7天，观察其对NaCl胁迫的响应。结果如图2所示，黑色基线代表最初移苗时根尖所在的位置，野生型和#197的根在150和175 mmol/L的NaCl培养基中都几乎停止生长，但野生型植株的叶片出现黄化，#197植株叶片仍然保持绿色，野生型平均绿胚率为45.00%，#197的平均绿胚率为93.75%(图2)，两者存在显著差异。当NaCl浓度增加到175 mmol/L时，野生型植株的叶片全部发黄甚至出现植株死亡，#197植株叶片则刚开始变黄，野生型平均绿胚率仅为2.08%，而#197的平均绿胚率为64.97%(图3)，两者差异极显著，以上结果表明，#197对NaCl的耐受能力高于野生型。

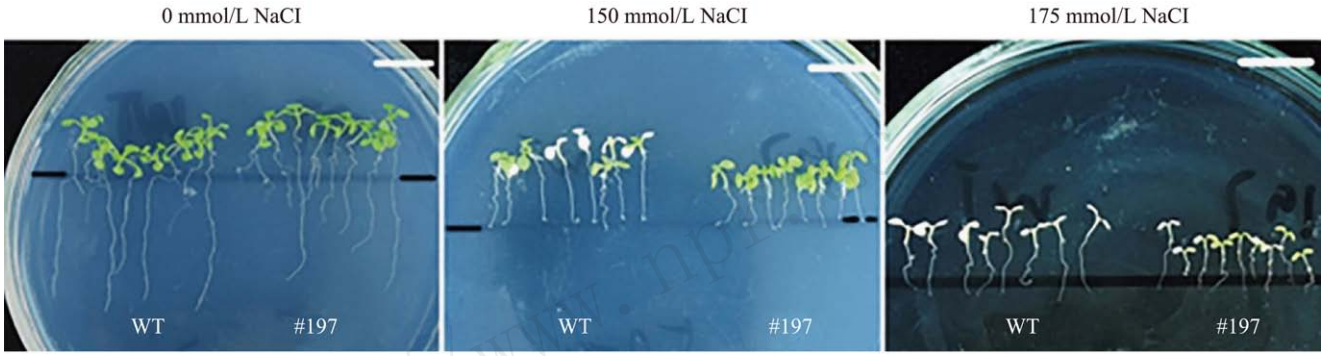

图 2 (在线彩图) 不同浓度的NaCl对突变体#197幼苗生长的影响

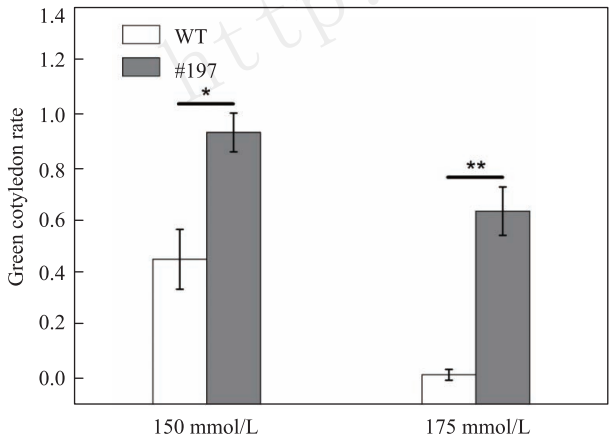

图 3 不同浓度的NaCl胁迫对突变体#197幼苗绿胚率的影响 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

3.3 盐胁迫响应基因的表达水平检测

如图4所示，在无NaCl处理的情况下部分胁迫响应基因均维持本底表达水平，*DREB2A*在#197中的本底水平与野生型相当，*RD29A*和*P5CS1*在#197中的本底水平显著低于野生型，*ProDH*在#197中的本底水平是野生型的1.4倍，但差异不显著。随着胁迫时间推移，*DREB2A*, *RD29A*, *P5CS1*, *ProDH*基因均迅速转录。*DREB2A*在盐胁迫处理2 h时，野生型和#197表达量无显著差异，在4 h处#197表达量持续升高，但是升高幅度低于野生型，#197的表达量是野生型的86.0%，两者有显著差异。在盐胁迫处理4 h范围内，野生型中*RD29A*基因表达水平持续上升，在4 h时其表达量上升到本底表达水平的20.27倍，而*RD29A*基因在#197中的表达量增幅较野生型小，2 h与4 h表达量差异不显著。胁迫处理2 h和4 h时*P5CS1*在#197中的表达水平显著高于野生型，分别为野生型的1.55和1.53倍，而*ProDH*基因的表达水平在#197和野生型之间无显著差异。

4 讨论

在萌发实验中，NaCl盐胁迫降低了野生型与#197种子的萌发速率却并没有抑制拟南芥的最终萌发率，即使在125 mmol/L时，#197的最终萌发率也可达到94%。盐胁迫能够引起植物发育迟缓，抑制植物组织的生长，在幼苗期会对植物的生长造成严重的伤害[16]，

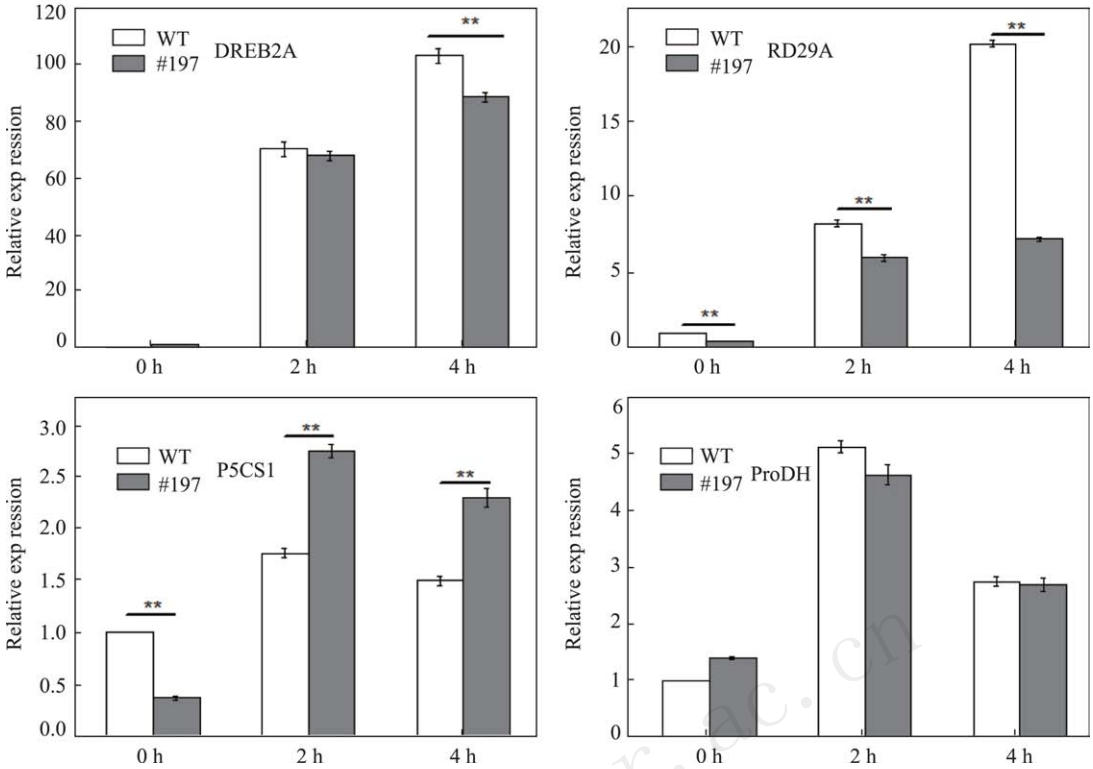

图 4　NaCl 胁迫下拟南芥几个关键基因的表达量检测 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

图 2 表明了高浓度的盐胁迫强烈抑制了野生型和 #197 的主根生长。盐胁迫能够改变类囊体的结构和数量，使叶绿素含量降低，叶片出现黄化[17]，#197 绿胚率比野生型高，表明在幼苗期 #197 在高盐胁迫下类囊体和叶绿素受损程度较野生型小。因此，从表型上看，#197 对盐胁迫适应能力强于野生型。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性，脯氨酸含量的升高能够保护植物细胞内细胞器处于比较稳定的状态，避免蛋白失水失去活性，从而使细胞器避免丧失功能。脯氨酸作为植物细胞质内渗透调节物质，在解除氨毒和能量库调节细胞氧化还原势等方面起重要作用，因此测定脯氨酸合成及降解相关基因的表达响应水平可以作为抗性判断的重要分子证据[18, 19]。

盐胁迫处理后，#197 的 *P5CS1* 表达水平在两个时间点均显著高于野生型，表明 #197 植株中脯氨酸合成相关通路基因的表达正在进行，以增加脯氨酸的含量，脯氨酸浓度的升高可以缓解盐胁迫对植株的伤害，从而使得 #197 在高盐胁迫下表现出更高的绿胚胎率。同时在盐胁迫中，*DREB2A* 和 *RD29A* 在 #197 中的表达量均低于野生型，推测可能是因为脯氨酸在细胞中大量积累缓解了细胞的盐胁迫压力。脯氨酸除作为植物体内重要的渗透调节物质外，同时也具有清除活性氧，调节细胞内氧化还原态平衡的生物学功能[20, 21]。*DREB2A* 基因在逆境胁迫条件下高表达能够提高植物体的应激反应，但是这个过程具体是怎么发生的，尚未研究清楚。有研究表明，*DREB2A* 基因在逆境胁迫条件中是被需要的，然而却不是必须的，有些通路可以不需要通过 *DREB2A* 介导就可以发生作用[22]。在植物经受逆境胁迫时，脯氨酸可大量累积，缓解渗透压胁迫，#197 积累脯氨酸的基因 *P5CS1* 高度表达，表明积累了大量的脯氨酸，因此对植物细胞起到保护作用，降低了细胞的耐盐应激反应，从而使 *RD29A* 的表达量低于野生型，这个结果与 Liu[23] 报告的 sos1 突变体的情形类似。ProDH 是脯氨酸转化为谷氨酸的关键酶[24]，能够降低线粒体的活性，从而促进 ATP 的产生，这或许能够提供更多的氮源，*ProDH* 与 *P5CS1* 共同作用能促进细胞的三羧酸循环[25, 26]。*ProDH* 基因在 #197 中的表达量略低于野生型，但差异不显著，这也意味着高脯氨酸积累条件下 #197 中脯氨酸降解基因并没有随之增高，而是表现出与野生型相近水平，因此推测 #197 耐盐能力强于野生型可能是 *ProDH* 与 *P5CS1* 共同作用的结果。

5　结论和展望

通过对 #197 的耐盐初步研究，发现 #197 萌发速率低于野生型，这个过程可能是 #197 适应盐胁迫的过

程更长，为后期生长适应盐胁迫打下基础。#197 的绿胚率显著高于野生型，表明 #197 的耐盐性高于野生型，可能是由于 *P5CS1* 基因高度表达，而脯氨酸降解关键基因 *ProDH* 的表达量并没有随之升高，两者共同作用促进了脯氨酸积累，缓解了 #197 的盐胁迫，从而使得 *DREB2A* 和 *RD29A* 表达低于野生型。接下来我们要对 #197 的突变基因进行定位，寻找其耐盐的基因通路。

参考文献：

[1] ZHOU Libin, LI Wenjian, QU Ying, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 165. (in Chinese)
(周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 165.)

[2] ISHIKAWA S, ISHIMARU Y, IGURA, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, **109**: 19166.

[3] 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.)

[4] 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.)

[5] FLOWERS T J, YEO A R. Australian Journal of Plant Physiology, 1995, **22**: 875.

[6] BLUMWALD E, AHARON G S, APSE M P. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2000, **1465**: 140.

[7] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, ZHU J K, *et al.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, **51**: 463.

[8] NIU X M, BRESSAN R A, HASEGAWA, *et al.* Plant Physiology, 1995, **109**: 735.

[9] YOKOI S, QUINTERO F J, CUBERO B, *et al.* Plant Journal, 2002, **30**: 529.

[10] MASUDA S, TOKAJI Y, KOBAYASHI Y, *et al.* Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2014, **78**: 647.

[11] YOSHIBA Y, NANJO T, MIURA S, *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, **261**: 766.

[12] KASUGA M, MIURA S, SHINOZAKI K, *et al.* Plant and Cell Physiology, 2004, **45**: 346.

[13] FENG X J, LI J R, QI S L, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, **113**: E8335.

[14] LI H, GAO Y, XU H, *et al.* Plant Growth Regulation, 2013, **70:** 207.

[15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Methods, 2001, **25**: 402.

[16] KHAVARI-NEJAD R A, MOSTOFI, Y. Photosynthetica, 1998, **35**: 151.

[17] SAKURABA Y, LEE S H, KIM Y S, *et al.* Journal of Experimental Botany, 2014, **65**: 3915.

[18] BOHNERT H J, JENSEN R G. Trends in Biotechnology, 1996, **14**: 89.

[19] TROTEL P, BOUCHEREAU A, NIOGRET M F, *et al.* Plant Science, 1996, **118**: 31.

[20] HARE P D, CRESS W A, VAN STADEN J. Journal of Experimental Botany, 1999, **50**: 413.

[21] HONG Z L, LAKKINENI K, ZHANG Z M, *et al.* Plant Physiology, 2000, **122**: 1129.

[22] MORIMOTO K, MIZOI J, QIN F, *et al.* Plos One, 2013, **8**: e80457

[23] LIU J. Plant physiology, 1997, **114** (2): 591.

[24] CECCHINI N M, MONTEOLIVA M I, ALVAREZ, M. E. Plant Physiology, 2011, **155**: 1947.

[25] HARE P D, CRESS W A. Plant Growth Regulation, 1997, **21**: 79.

[26] SZABADOS L, SAVOURE A. Trends in Plant Science, 2010, **15**: 89.

http://www.npr.ac.cn

Research on Salt Stress Tolerance Mutant of *Arabidopsis thaliana* Irradiated by Carbon Ion Beam

LUO Shanwei[1,2], DU Yan[1], YU Lixia[1], CHEN Yuze[2,3], CUI Tao[1,2], FENG Hui[1,2], MU Jinhu[1,2], LI Wenjian[1], ZHOU Libin[1,3,†]

(*1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 703370, China)

Abstract: Abiotic stress can reduce the growth of plant heavily, and the research of salt tolerance of plant mutant is valuable to the study plant stress resistance. Dry seeds of *Arabidopsis thaliana* were irradiated by carbon ion beams with energy of 43.3 MeV/u provided by Heavy Ion Research Facility in Lanzhou (HIRFL). One stable mutant #197 was obtained from the progenies of the irradiated populations, the study of tolerance to salt stress of this mutant were carried out through physiological and gene transcription anlaysis. The results demonstrated: mutant #197 shown a relatively lower germination rate than wild type in salt stress conditions, meanwhile, the mutant acquired a higher ratio of green embryo than the wild type. In the molecular level, NaCl with high concentrations prompted the transcription of $P5CS1$ gene rapidly both in #197 muatant and the wide type, and the expression level in mutant was significantly higher than wild type. The expression of $ProDH$, related to proline degradation, in mutant #197 was slightly less than the wide type. Such expression patterns improved the accumulation of proline, and protect the #197 mutant from salt stress, which may lead to a lower expression of $DREB2A$ and $RD29A$ in mutant compared with wide type.

Key words: carbon ion beam; *Arabidopsis thaliana*; mutant; salt stress tolerance; proline

http://www.npr.ac.cn

Received date: 24 Apr. 2017;　**Revised date:** 20 May 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (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(2015337)

† **Corresponding author:** ZHOU Libin, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn.