

碳离子束辐照百脉根的当代生物学效应

杜艳^{1,2} 李文建¹ 余丽霞^{1,2} 刘青芳^{1,2} 陈刚³
刘瑞媛¹ 骆善伟^{1,2} 周利斌¹

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 (兰州大学药学院 兰州 730020)

摘要 利用初始能量为 80 MeV/u 的碳离子束辐照百脉根(生态型: MG20)干种子, 通过对 M1 代植株株高, 干鲜重, 光合色素含量的测定及 DNA 指纹图谱分析来研究高 LET 碳离子束辐照对百脉根 M1 代的相关生物学效应。结果表明, 碳离子束辐照对百脉根的干鲜重、株高具有显著的抑制作用; 叶绿素 a、总叶绿素和类胡萝卜素含量均呈现出先升高后降低的趋势, 叶绿素 b 的含量则表现出随剂量增加而逐渐降低的趋势; 运用 RAPD 技术对辐照后百脉根的 DNA 指纹图谱进行分析, 总多态性为 15.483%, 各辐照处理组之间的相似性系数在 0.710—0.863 之间, 各处理组间的相似性系数与辐照剂量无明显的规律性, 但是对照组与辐照组之间存在一定的差异性。综合分析表明: 碳离子辐照百脉根干种子, 具有明显的当代损伤效应, 高 LET 辐照对百脉根具有严重的抑制生长效果, 同时也对百脉根基因组 DNA 造成了一定程度的分子多态性差异。

关键词 碳离子束, 百脉根, 生物学效应 (RAPD)

中图分类号 TL99, Q691.5

百脉根 (*Lotus japonicas*) 又名牛角花、五叶草和乌足豆, 为多年生豆科百脉根属草本植物, 原产于欧亚湿润地区, 在世界多地广泛种植, 因其对不利环境的耐受性及本身营养价值高等优势成为优良牧草之一^[1,2]。同时百脉根也是常用的豆科植物模式植物, 其模式特征主要表现为: 植株小, 生长茂密; 自花授粉; 生长周期短, 一个世代约 3 个月; 基因组大小相对较小, 约为 472.1 Mb, 基因组结构简单, 单倍体基因组由六条染色体组成, 已完成基因组测序^[3-5]; 易受农杆菌感染, 转基因苗可经潮霉素或卡那霉素筛选后再生, 转化再生的条件和步骤也已经成熟^[6]。百脉根作为豆科模式植物, 其根瘤固氮作用受到广泛关注, 近年来通过对百脉根共生固氮系统的研究, 植物根瘤形成及数量控制机理得以阐明, 越来越多的功能基因相继被克隆^[7-11]。目前大多数的百脉根栽培品种存在苗期生长缓慢, 种子硬实率高, 抗逆性差等局限性, 而常规育种周期较长, 因此寻求一种新型快速而高效的育种方式对百脉根进行遗传改良具有深远意义。

辐射诱变育种是人为地利用各种物理的诱变因素, 诱发植物产生遗传变异, 从而在较短的时间内获得有价值的突变体, 根据育种目标选育出新品种。在过去的几十年中, 国内外在辐射诱变育种工作中取得了显著成绩, 获得了许多性状优良的植物新品种, 但是早期的辐射育种工作主要是采用 X 射线、 γ 射线等常规辐射源。近年来, 重离子以其独特的物理和生物学特性而成为一种备受关注的新兴辐射诱变源。重离子在单位贯穿路径上沉积的能量较大, 即具有较高的传能线密度 (Linear energy transfer, LET), 其诱发的生物学损伤程度更大, 因此相同剂量辐照下, 重离子比常规电离辐射 (如 X 射线、 γ 射线) 具有较高的相对生物学效应 (Relative biological effectiveness, RBE)^[12,13]。正因为重离子具有 LET 大, RBE 高, 辐射损伤修复效应小等特点, 在植物种质诱变育种研究中, 其单位剂量的诱变效率较 X 射线、 γ 射线等低 LET 辐射的诱变效率高出 10 倍^[14]。重离子也因其其在植物诱变育种中具有突变率高, 突变谱广, 突变体稳定周期短等优势

基金项目: 国家自然科学基金 (11205218)、中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KJCX2-EW-N05, KJCX2-YW-N34)、中国科学院西部行动计划项目 (KZCX2-XB3-05, KZCX2-XB3-07)、所长基金项目 (Y006090ZY0) 资助

第一作者: 杜艳, 女, 1983 年 12 月出生, 2010 年于中国科学院西双版纳热带植物园获理学硕士学位, 植物学专业, 现为中国科学院近代物理研究所辐射生物学博士研究生, 从事辐射育种工作, E-mail: duyuan@impcas.ac.cn

通讯作者: 周利斌, 博士, 副研究员, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2013-01-17, 修回 2013-03-08

而被广泛应用于作物育种领域,许多新突变体在多种植物中相继获得,如拟南芥、玫瑰、康乃馨、烟草、大米和矮牵牛等^[15]。辐射诱变机理研究表明,离子束辐射引起的核酸水平上的改变包括倒位,易位及片段缺失;最新研究结果提出了缺失片段的大小可以通过控制离子束的相关参数来控制的可能性,这将使得离子束更有效地应用于植物诱变育种领域^[16]。本文利用¹²C⁶⁺重离子束辐照百脉根干种子,从M1代的株高、干鲜重、叶绿素含量及DNA指纹图谱等方面研究了重离子束对百脉根的当代损伤效应,以期为重离子辐射诱变百脉根育种提供基础数据。

1 实验材料与方法

1.1 植物材料培养

百脉根(生态型:MG20)种子由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所杨军惠赠。用浓硫酸处理百脉根种子10 min,蒸馏水冲洗5—8遍,晾干后播种于直径为16 cm的花盆中,播种深度为0.5—0.8 cm,在其上盖上一薄层干的细土并压实。培养条件为:(22±2)℃,16 h光/8 h暗,5000 lux光照强度,60%相对湿度。

1.2 辐射处理方法

干种子放置于35 mm×10 mm的培养皿中,利用中国科学院近代物理研究所兰州重离子加速器(HIRFL)提供的碳离子束进行辐射处理,初始能量为80 MeV/nucleon,辐射剂量分别为0、20、50、100、150、200和300 Gy。

1.3 生长生理指标检测

1.3.1 干鲜重及株高测定 剪取生长35 d的百脉根植株地上部分,装入已知重量的容器中,用分析天平称取鲜重。将称过鲜重的材料放入烘箱,105℃杀青10 min,然后85℃烘24 h,称取干重。对生长40 d的百脉根植株测定其地上部分茎的长度,以表示株高。

1.3.2 光合色素含量的测定 光合色素含量测定采用直接浸提法提取叶绿素:取各处理组相同部位的叶片称取重量(FW)后加入80%丙酮溶液,避光震荡过夜以充分浸提。以80%丙酮溶液为参照,用SP-756PC型紫外可见分光光度计分别测定样品在645、663、470 nm处的光密度值,叶绿素a(Chla),叶绿素b(Chlb),总叶绿素(Chl)及类胡萝卜素

(Car)浓度(mg/g)按以下公式计算:

$$\text{Chla} = (12.7A_{663} - 2.69A_{646}) / \text{FW}$$

$$\text{Chlb} = (22.9A_{646} - 4.68A_{663}) / \text{FW}$$

$$\text{Chl} = (8.02A_{663} + 20.21A_{645}) / \text{FW}$$

$$\text{Car} = (1000A_{470} - 3.27\text{Ca} - 104\text{Cb}) / 229 / \text{FW}$$

1.3.3 数据统计分析 所有试验设3次重复,数据处理采用SPSS17.0统计分析软件,均数间的两两比较采用Duncan法,以 $p < 0.05$ 为显著性差异水平,显示数据均为“平均数±SE”,不同字母代表在0.05水平上有显著差异。

1.4 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 分析

1.4.1 DNA提取与检测 采用CTAB法从生长30天的百脉根叶片中提取基因组总DNA:(1)65℃预热2×CTAB(1 mol/L Tris-HCl pH8.5, 0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 3.5 mol/L NaCl, 2%CTAB, 0.1%的β-巯基乙醇)提取液;(2)各剂量随机选取5株百脉根最顶端的嫩叶混合提取,液氮研磨后加入650 μL的2×CTAB,于65℃金属浴中恒温1 h,中间晃动几次;(3)加入等体积氯仿-异戊醇(24:1)并摇匀,静置10 min,12000 r/min离心10 min;(4)取上清后重复上一步,加入350 μL NaCl(5 mol/L)和500 μL异丙醇,摇匀并置于-20℃中沉淀2 h;(5)12000 r/min离心10 min,管底可见絮状DNA沉淀,75%乙醇洗涤沉淀2次后晾干,加入30 μL的TE(10 mol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.01 mol/L Na₂-EDTA, pH8.0)溶解;(6)用1.0%琼脂糖凝胶电泳对DNA质量进行检测,条带清晰可见的样品DNA置于-20℃冰箱保存备用。

1.4.2 PCR扩增及检测 供试随机引物均由上海生工合成,PCR反应试剂(Golden easy PCR system)购自天根生化科技(北京)有限公司。PCR扩增使用美国Bio-RAD公司MyCycler™ ThermalCycler设备。PCR反应总体积为20 μL:2×Reaction Mix 10 μL, DNA模版1 μL,引物1.5 μL, Taq DNA聚合酶U, 无菌水7.2 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,35℃退火1 min,72℃延伸2 min,45个循环;72℃延伸10 min,4℃保存。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行分离。

1.4.3 数据统计与分析 统计扩增出的条带数,按照琼脂糖凝胶相同位置上DNA带的有无进行数据记录,有带记为“1”,无带记为“0”,所得数据用NTsys2.10e软件进行相似性计算。

2 结果

2.1 不同剂量的碳离子束对百脉根干鲜重的影响

植株鲜重(干重+水分)反映了植株的自然状态,干重代表干物质的积累,所以植株的干鲜重是衡量作物营养生长快慢的重要指标之一。不同剂量的碳离子束辐射对百脉根单株干鲜重具有显著的抑制作用(图1)。20 Gy 处理组与对照组在干鲜重上

均无显著性差异,当剂量 ≥ 50 Gy 时,干鲜重均随剂量升高而降低,且明显低于对照组。与对照组相比,50、100、150、200 Gy 处理组其干重和鲜重分别降低了39.4%、58.9%、61.4%、65.6%和40.3%、51.5%、55.3%、62.2%。高剂量300 Gy 处理组的生物量积累与对照组相比,几乎停止生长,其干鲜重分别仅为对照组的18.1%和18.8%。

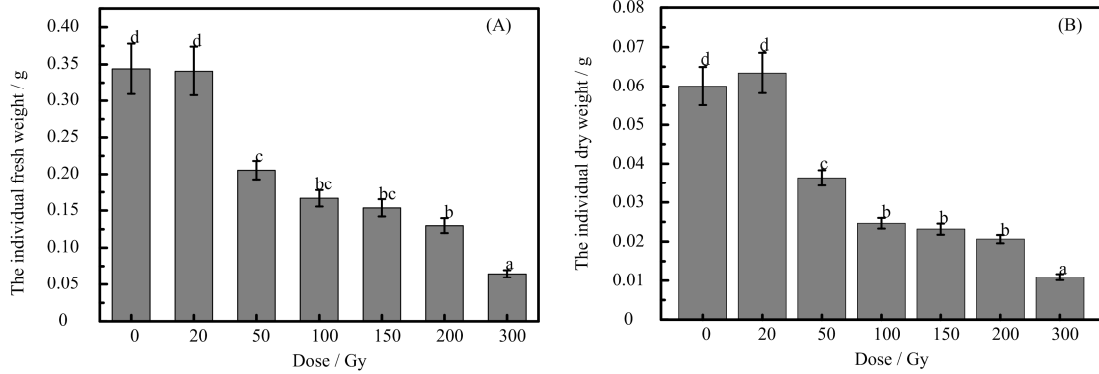


图1 碳离子辐射对百脉根单株鲜重(A)和干重(B)的影响. a-d 代表在 0.05 水平上有显著差异
Fig.1 Effects of carbon ions irradiation on individual fresh weight (A) and dry weight (B) of *Lotus japonicas*. Compared with each other, ^{a-d} $p < 0.05$

2.2 不同剂量的碳离子束对百脉根株高的影响

株高是作物重要农艺性状之一,本研究对生长40天的百脉根株高进行统计分析,结果表明碳离子束辐射对百脉根株高具有明显的抑制作用,株高呈现出随辐射剂量升高而逐渐降低的趋势(图2)。与对照组相比,20 Gy 辐照组的株高无明显降低趋势,而其余辐射组的株高则显著低于对照组。其中,50、100、150 和 200 Gy 处理组株高分别降低了20.6%、21.8%、38.6%和62.5%;与植株干鲜重趋势一致,最高剂量300 Gy 处理组的植株生长受到严重抑制,株高仅为对照组的8.1%。

2.3 不同剂量的碳离子束对百脉根光合色素含量的影响

作为植物光合作用中吸收与转化光能的主要色素和辅助色素,叶绿素和类胡萝卜素的含量对外界环境的响应较为敏感。表1显示了不同剂量的碳离子束辐照对百脉根叶片光合色素含量的影响。由表1可知,辐射处理后,百脉根叶片的叶绿素a、总叶绿素和类胡萝卜素含量均呈现出先升高后降低的趋

势,即在 <150 Gy 辐射时,以上3种光和色素含量均有一个峰值出现,且明显高于对照组,高剂量200和300 Gy 处理组的色素含量则与对照保持相同水平或明显低于对照。叶绿素b的平均含量则表现出随吸收剂量增加而逐渐降低的趋势,但是20、50、100 和 150 Gy 处理组与对照组无明显差异,而200、300 Gy 处理组叶绿素b的含量则明显低于对照组。

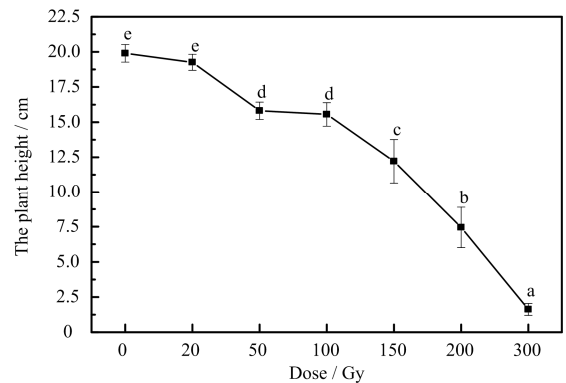


图2 碳离子辐射对百脉根株高的影响. a-e 代表在 0.05 水平上有显著差异
Fig.2 Effects of carbon ions irradiation on plant height of *Lotus japonicas*. Compared with each other, ^{a-e} $p < 0.05$

表 1 碳离子辐照对百脉根光合色素含量的影响

Table 1 Effect of carbon ions on the photosynthetic pigments contents of *Lotus japonicus*

剂量/ Gy Dose	叶绿素 a / mg·g ⁻¹ Chl a	叶绿素 b / mg·g ⁻¹ Chl b	总叶绿素 / mg·g ⁻¹ Chl	类胡萝卜素 / mg·g ⁻¹ Car
0	0.322±0.049 ^{ab}	0.141±0.021 ^b	0.464±0.028 ^{bc}	0.065±0.005 ^{ab}
20	0.413±0.010 ^c	0.136±0.002 ^b	0.549±0.009 ^d	0.078±0.003 ^{bc}
50	0.434±0.008 ^c	0.139±0.004 ^b	0.573±0.013 ^d	0.083±0.001 ^c
100	0.383±0.024 ^{bc}	0.125±0.005 ^b	0.507±0.029 ^{cd}	0.072±0.004 ^{bc}
150	0.391±0.028 ^b	0.127±0.010 ^b	0.516±0.034 ^{cd}	0.076±0.007 ^{bc}
200	0.347±0.030 ^{abc}	0.089±0.019 ^a	0.436±0.024 ^b	0.070±0.006 ^{bc}
300	0.2707±0.014 ^a	0.089±0.006 ^a	0.360±0.017 ^a	0.055±0.002 ^a

注: a-d 代表在 0.05 水平上有显著差异。

Note: Compared with each other, ^{a-d} $p < 0.05$.

2.4 不同剂量的碳离子束对百脉根基因组 DNA 的 RAPD 分析

生理或遗传物质的改变可以引起植物发生农艺性状及生理指标的改变, 为了进一步验证百脉根生

长指标及生理变化是否由 DNA 水平上的变异所引起的, 应用 RAPD 技术对对照组和处理组 DNA 进行了指纹图谱分析, 从 100 条 10 碱基引物中筛选出 59 条扩增条带稳定, 清晰的引物用于后续分析。表 2 为用于 RAPD 分析的 59 条随机引物的序列信息。

表 2 RAPD 分析所用得到引物及其序列

Table 2 Primers used and their respective base sequences

引物 Primer	序列 Sequence	引物 Primer	序列 Sequence
P1	GTTGCGATCC	P31	AACGGTGACC
P2	AGGATACGTG	P32	TGTAGCTGGG
P3	AAATCGGAGC	P33	GGGAGACATC
P4	TTGTCTCAGG	P34	ACCCGGTCAC
P5	CCGAATTCCC	P35	TGGCGTCCTT
P6	GTCCTTAGCG	P36	GAGTGGTGAC
P7	TGCGCGGATC	P37	ACCTGGACAC
P8	AACGTACGCG	P38	GGATGAGACC
P9	GCACGCCGGA	P39	TCGGCGATAG
P10	TGATCCCTGG	P40	GTTGCGATCC
P11	TGCTCTGCCC	P41	GGTGACGCAG
P12	GGTGACGCAG	P42	CTGCTGGGAC
P13	CTGCTGGGAC	P43	GGGCATCGGC
P14	CAGGCCCTTC	P44	TGTCGGGAAC
P15	TGCCGAGCTG	P45	GTGCGTCCTC
P16	GTGACGTAGG	P46	GTTTCGCTCC
P17	ACGCACAACC	P47	CAAACGTCGG
P18	CCCTAGACTG	P48	GGTACTCCAG
P19	GGATGCCACT	P40	AGGGAACGAG
P20	AGACCCAGAG	P50	CCACAGCAGT
P21	ACATGCCGTG	P51	CCGAATTCCC
P22	AGCCAGCGAA	P52	ACCTGCCGTT
P23	CCCCTACAC	P53	CATACCTGCC
P24	CTGCTTAGGG	P54	TGGGGCTGTC
P25	CAAGGGCAGA	P55	TCCTCGTGGG
P26	CAGAGGTCCC	P56	CCACTCGTCT
P27	CCCAGCTGTG	P57	CTGCCACGAG
P28	ACGTAGCGTC	P58	CACAGCGACA
P29	AGCGAGCAAG	P59	GTTGTTTGCC
P30	GGATCTGAAC		

图 3 为其中 4 个引物的扩增谱。由表 2 可知 59 条引物共扩增出 1974 条带,其中 400 条为差异性条带。与对照组相比较, 20、50、100、150、200 和 300 Gy 处理组的 RAPD 扩增条带多态率在 15.232%—28.625% 之间。59 条 RAPD 随机引物扩增获得 20 Gy 的 DNA 总条带 276 条,其中新增带(原始对照种没有而自身具有的 DNA 条带)26 条,缺失带(自身没有而原始对照种有的 DNA 条带)40 条。50 Gy 的 DNA 总条带 274 条,其中新增带 31 条,缺失带 47 条。100 Gy 的 DNA 总条带 269 条,其中新增带 28 条,缺失带 49 条。150 Gy 的 DNA 总条带 285 条,其中新增带 29 条,缺失带 34 条。200Gy

的 DNA 总条带 302 条,其中新增带 29 条,缺失带 17 条。300 Gy 的 DNA 总条带 278 条,其中新增带 29 条,缺失带 41 条。与对照组的材料 DNA 扩增条带总数目相比,辐照处理组扩增条带数目有增有减(表 3 和图 3),这表明离子束辐照对基因组位点在发生缺失的同时也产生了新增位点。采用 NTsys2.10e 软件统计分析不同剂量碳离子束辐射处理的百脉根的相似性系数,结果见表 4。由表 4 可知 7 种处理间的相似性系数在 0.710—0.863 之间,其值的大小与辐射剂量无明显的规律性,但是对照组与辐射组之间存有一定的差异性,这表明碳离子束辐照在一定程度上改变了百脉根的遗传多样性。

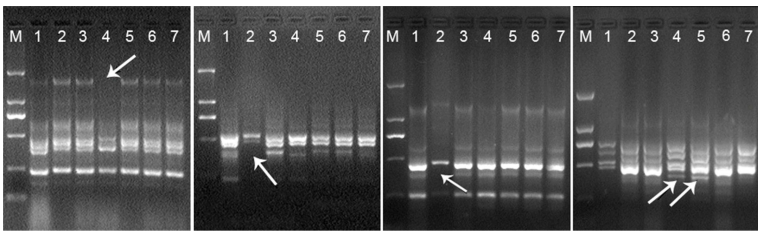


图 3 四条引物对辐照材料的扩增条带(从左至右: P1, P5, P30, P45): M, DL2000; 1—7, 0, 20, 50, 100, 150, 200, 300 Gy. 白色箭头指示为多态性条带

Fig.3 Amplified band patterns of carbon ions irradiated Lotus japonicas by 4 primers (from left to right: P1, P5, P30, P45). M: DL2000; 1-7: 0, 20, 50, 100, 150, 200, 300 Gy. The white arrows indicate the polymorphic bands

表 3 59 条随机引物的扩增条带分析
Table 3 Analysis of amplified bands of irradiated Lotus japonicus by 59 arbitrary primers

剂量/ Gy Dose	总条带 Total bands	增加的条带 Increasing bands	减少的条带 Flawing bands	多态率 / % Polymorphism rate
0	290	-	-	-
20	276	26	40	23.913
50	274	31	47	28.467
100	269	28	49	28.625
150	285	29	34	22.105
200	302	29	17	15.232
300	278	29	41	25.180

表 4 不同处理组之间的相似性矩阵
Table 4 Similarity matrix of Lotus japonicus irradiated by carbons

剂量/ Gy Dose	0	20	50	100	150	200	300
0	1.000	-	-	-	-	-	-
20	0.803	1.000	-	-	-	-	-
50	0.767	0.737	1.000	-	-	-	-
100	0.770	0.770	0.710	1.000	-	-	-
150	0.803	0.779	0.755	0.758	1.000	-	-
200	0.862	0.809	0.815	0.811	0.863	1.000	-
300	0.788	0.776	0.728	0.802	0.770	0.842	1.000

3 讨论

长期以来,利用卫星搭载进行空间诱变的育种已取得显著效果,目前国内关于百脉根的空间辐射育种有过报道,但是由于空间诱变的复杂及不稳定性,想要探明其产生变异的机理还需要进一步的研究。近年来,重离子束因其具有较常规辐射诱变源更高的 LET 和 RBE,能够诱发更多的 DNA 发生双链断裂及簇损伤,同时也因其在剂量和射程上的可控性使得其在一些高等植物的诱变育种研究中得到越来越多的应用。本研究以百脉根为材料,研究了高 LET 碳离子束对其 M1 代生长、生理指标及 DNA 指纹图谱的影响,为下一步探索高 LET 射线辐射诱变育种、性状改良的分子生物学机制提供参考与材料基础。

植物的干鲜重是反映植株生长状况的重要指标之一;作物的辐射诱变育种操作中,矮化是一个重要的正向优势突变性状,也是辐射引起的作物农艺性状改变比较普遍的现象之一。百脉根作为一种重要的牧草,保持合适的高度以防止倒伏是育种过程中需要考虑的目标之一,因此寻找一个不影响大部分植株正常生殖发育而又能对植株有一定程度的诱变作用的剂量,在百脉根的辐射育种中起着重要作用。本研究结果表明碳离子束辐射对百脉根株高及干鲜重均有抑制效应,这与离子束对水稻和玉米生长的影响一致^[17]。小剂量 20 Gy 处理组与对照无显著差异,当剂量在 50 Gy 以上时,株高及干鲜重均随剂量增加而降低,且与对照组差异显著。这些结果为研究碳离子束对百脉根的诱变效应提供了剂量参考:在本研究的剂量范围内,20 Gy 的碳离子束并不足以对百脉根的生长状况产生明显的影响,从 50 Gy 起,百脉根的株高及干鲜重开始受到显著的影响,而当剂量为 300 Gy 时,植株的生长已经受到严重的抑制。因此 100 Gy 左右的碳离子束辐射较适合百脉根干种子的诱变处理。

作为植物光合作用中吸收与转化光能的主要色素和辅助色素,叶绿素和类胡萝卜素的含量变化与植株的生理活性以及植物对环境的适应性有关^[18],因此这些色素的含量对碳离子束辐射的响应也较为敏感。韩蕾等对草地早熟禾进行空间处理后发现有两个株系的叶绿素含量、光合能力均有所下降;另外一个突变株系叶绿素含量显著增加^[19]。我们的研究结果显示百脉根叶片的叶绿素 a、总叶绿素和类胡萝卜素含量均呈现出先升高后降低的趋势,在较低剂量处色素含量较对照组高。实验证明,大剂量

的辐射对有机体有显著的损伤作用,而低剂量辐射诱发机体产生刺激及适应性反应^[20-22]。所以我们推测这可能是因为重离子辐照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,而高剂量则带来抑制效应:一方面低剂量的碳离子束辐射使百脉根植株产生了适应性反应,刺激了光合色素的合成;而另一方面植物对辐射的耐性是有一定限度的,随着剂量的不断增加,植株光合色素的合成受到抑制及干扰,从而显著降低了光合色素的含量。

辐射损伤效应包括原初损伤和遗传物质变异,前者主要是诱发形态畸变及生理指标改变等生物学效应;而后者是指辐射引起的 DNA 水平上的变异,辐射引发的当代效应是生理损伤和遗传物质损伤的综合效应^[12]。RAPD 技术已经成功应用于离子束辐射引起的 DNA 多态性分析^[23-25]。在空间辐射育种分子生物学水平上的研究中,邢金鹏等^[26]运用 RAPD 技术对卫星搭载获得的“农垦 58”大粒型水稻突变系进行多态性分析发现,在扩增的 200 多条 DNA 片段中有 5 个片段显示了多态性。本文采用 RAPD 技术对不同剂量碳离子束辐射的百脉根基因组 DNA 进行指纹图谱分析,结果表明各处理组与对照组间均存在差异性。基因组差异主要表现为 RAPD 扩增条带数目的减少和增多,扩增谱带亮度上的差异。可能的原因是因为重离子束能引起碱基突变, DNA 片段插入及缺失,而这些因素都可能引起引物结合位点的改变从而导致差异片段的出现。RAPD 分析结果充分表明辐射处理的确引起了当代百脉根基因组 DNA 的变化,这为研究离子束辐射百脉根的辐射损伤效应提供了分子水平的证据,但是扩增条产物中的差异条带是否会对 M2 代植株的性状产生作用,目前还不清楚。因此,从扩增产物中分离纯化某些差异条带,将有助于进一步研究碳离子束辐射对百脉根诱变的分子机理。

综上所述,碳离子辐射百脉根干种子具有明显的当代损伤效应,辐射不仅影响了百脉根的生长发育,同时也引起了其遗传物质的改变。纵观全局,重离子对百脉根的诱变机理研究仍需进一步的完善与拓展。首先为了更精确地探索离子束对百脉根的诱变效应,将对重离子辐射的辐射质、LET 尺度、剂量梯度等进行优化组合,摸索更具效率的重离子辐射条件,以期更快获得有效突变体;其次,在现有研究基础上,如果 RAPD 条带中有变异是可遗传的有益突变,便可进行该片段的克隆,测序以及基因定位,通过正反向遗传学手段相结合的方式筛选出优良品种,力图对离子束诱变机理进行深入探索。

参考文献

- 1 Živković B, Radović J, Sokolović D, *et al.* Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis [J]. *Ind Crop Prod*, 2012, **40**: 285-291
- 2 Bruel D C, Carpentieri-Pípolo V, Gerage A C, *et al.* Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize [J]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2006, **41**(10): 1491-1498
- 3 Young N D, Cannon S B, Sato S, *et al.* Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicas* [J]. *Plant Physiol*, 2005, **137**(4):1174-1181
- 4 Sato S, Kaneko T, Nakamura Y, *et al.* Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 Mb regions of the genome [J]. *DNA Res*, 2001, **8**(6): 311-318
- 5 Ito M, Miyamoto J, Mori Y, *et al.* Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicas* [J]. *J Plant Res*, 2000, **113**(4): 435-442
- 6 Lombardi P, Ercolano E, El Alaoui H, *et al.* A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Plant cell report*, 2003, **21**(8): 771-777
- 7 Handberg K, Stougaard J. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics [J]. *Plant J*, 2005, **2**(4): 487-496
- 8 Krusell L, Madsen L H, Sato S, *et al.* Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase [J]. *Nature*, 2002, **420**(6914):422-426
- 9 Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S, *et al.* A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals [J]. *Nature*, 2003, **425**(6958): 637-640
- 10 Nishimura R, Ohmori M, Fujita H, *et al.* A *Lotus* basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proceedings of the National [J] Acad Sci*, 2002, **99**(23): 15206-15210
- 11 Oka-Kira E, Tateno K, Miura K, *et al.* klavier (klv), A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction [J]. *Plant J*, 2005, **44**(3): 505-515
- 12 周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 离子束辐照结合组织培养在植物诱变中的研究进展 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2007, **25**(004): 232-236
- ZHOU Libin, LI Wenjian, QU Ying, *et al.* Research progress in plant mutation by combining ion beam irradiations and tissue culture [J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2007, **25**(004): 232-236
- 13 卫增泉, 颜红梅, 梁剑平, 等. 重离子束在诱变育种和分子改造中的应用[J]. *原子核物理评论*, 2003, **20**(1): 38-41
- WEI Zengquan, XIE Hongmei, LIANG Jianping, *et al.* Application of heavy ion beams in induced mutation breeding and molecular modification[J]. *Nucl Phys Rev* 2003, **20**(1): 38-41
- 14 Arase S, Hase Y, Abe J, *et al.* Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants [J]. *Plant Biotechnol*, 2011, **28**(3): 323-329
- 15 Tanaka A. Establishment of ion beam technology for breeding[M]//Shu Q Y. Induced plant mutations in the genomics era. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009: 216-219
- 16 Hase Y, Yoshihara R, Nozawa S, *et al.* Mutagenic effects of carbon ions near the range end in plants [J]. *Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutagen*, 2012, **731**(1-2):41-47
- 17 Mei M, Deng H, Lu Y, *et al.* Mutagenic effects of heavy ion radiation in plants [J]. *Adv Space Res*, 1994, **14**(10): 363-372
- 18 苏行, 胡迪琴, 林植芳, 等. 广州市大气污染对两种绿化植物叶绿素荧光特性的影响 [J]. *植物生态学报*, 2002, **26**(5): 599-604
- SU Xing, HU Diqin, LIN Zhifang, *et al.* Effect of air pollution on the chlorophyll fluorescence characters of two afforestation plants in Guangzhou [J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 2002, **26**(5): 599-604
- 19 韩蕾, 孙振元, 巨关升, 等. 空间环境对草地早熟禾诱变效应研究 II -光合特性和叶绿素含量 [J]. *核农学报*, 2005, **19**(6): 413-416
- HAN Lei, SUN Zhenyuan, JU Guansheng, *et al.* Mutagenic effects of aerospace on *Poa pratensis* L. II -Photosynthesis characters and chlorophyll contents[J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2005, **19**(6): 413-416
- 20 Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine [J]. *Science*, 1984, **223**(4636): 594
- 21 Liu S, Cai L, Sun S. Induction of a cytogenetic adaptive

- response by exposure of rabbits to very low dose-rate γ -radiation [J]. *Int J Radiat Biol*, 1992, **62**(2):187-190
- 22 周利斌, 李文建, 李强, 等. 重离子及电子辐照沙打旺干种子的辐射生物学效应 [J]. *激光生物学报*, 2003, **12**(5): 350-354
- ZHOU Libin, LI Wenjian, LI Qiang, *et al.* Radiobiological effects of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion and electron beams with different fluence on astragalus adsurgens pall dry seeds[J]. *Acla Laser Biol Sinica*, 2003, **12**(5): 350
- 23 侯岁稳, 孙兰弟, 张颖聪, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照油菜诱变效应研究 [J]. *核技术*, 2008, **31**(6): 449-454
- HOU Suiwen, SUN Landi, ZHANG Yingcong, *et al.* Mutagenic effects of Brassica napus by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam [J]. *Nucl Tech*, 2008, **31**(6): 449-454
- 24 余丽霞, 李文建, 董喜存, 等. 碳离子辐射大丽花矮化突变体的 RAPD 分析 [J]. *核技术*, 2008, **31**(11): 830-833
- YU Lixia, LI Wenjian, DONG Xicun, *et al.* RAPD analysis on dwarf mutant of Dahlia pinnata Cav induced by 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ ions [J]. *Nucl Tech*, 2008, **31**(11): 830-833
- 25 董喜存, 李文建, 余丽霞, 等. 用随机扩增多态性 DNA 技术对重离子辐照大丽花花色突变体的初步研究 [J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2007, **25**(1): 62-64
- DONG Xicun, LI Wenjian, YU Lixia, *et al.* Preliminary study on flower color mutant induced by 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ ions in Dahlia pinnata Cav using RAPD technique [J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2007, **25**(1): 62-64
- 26 邢金鹏, 陈受宜, 朱立煌, 等. 水稻种子经卫星搭载后大粒型空变系的分子生物学分析 [J]. *航天医学与医学工程*, 1995, **8**(2): 109-112
- XING Jinpeng, CHEN Shouyi, ZHU Lihuang, *et al.* Molecular biological analysis of large-grained rice mutant induced by outer space condition in recoverable satellite[J]. *Space Med Med Eng*, 1995, **8**(2): 109-112

Biological effects of carbon ion irradiations on M1 generation of Lotus japonicus

DU Yan^{1,2} LI Wenjian¹ YU Lixia^{1,2}

LIU Qingfang^{1,2} CHENG Gang³ LIU Ruiyuan¹ LUO Shanwei^{1,2} ZHOU Libin¹

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 Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT To investigate the M1 biological effects of carbon ions on *Lotus japonicas* (MG20), dry seeds were exposed to 80MeV/nucleon carbon ions at doses of 0 Gy, 20 Gy, 50 Gy, 150 Gy, 200 Gy and 300 Gy. The dry and fresh weight, and plant height of M1 seedlings were significantly inhibited by carbon ions. The contents of chlorophyll a, total chlorophyll, and carotenoid showed the same trend with an initial increase, followed by a decrease with each dose increment; meanwhile the content of chlorophyll b showed consecutive drops. By using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, the variations of genomic DNA fingerprints of the seedlings in control and treatment groups were examined. The 2,238 bands were amplified by using 59 primers, and 400 bands showed differences, and the total percentage of polymorphism was 15.483%. The genetic similarity coefficient among the control and treatment groups were 0.710—0.863, and there were no obvious correlations between the similarity coefficients and dosages, however, differences indeed existed between the control and treatment groups. In brief, all the results showed that exposure to carbon ions had obvious biological effects on both the development and genomic DNA of the M1 seedlings of *Lotus japonicus*.

KEYWORDS Carbon ions, *Lotus japonicus*, Biological effects, Random amplified polymorphic DNA(RAPD)

CLC TL99, Q691.5