

文章编号: 1007-4627(2019)04-0499-06

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照黄花蒿干种子当代生物学效应

石紫薇^{1,2}, 李雪虎², 梁妍³, 姜婷婷², 梁剑平², 贾宁^{1,†}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070;

2. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

3. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

摘要: 利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束对黄花蒿干种子辐照后, 利用发芽率、根长、下胚轴长和株高4个指标研究不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿的生物学效应。结果表明, 随着辐照剂量的增加, 黄花蒿的存活率和根长都呈现逐渐降低的趋势, 而下胚轴长先上升后下降, 株高总体呈现下降的趋势, 但在60和90 Gy同时存在矮化与增高的植株。利用SRAP(sequence related amplified polymorphism)技术对辐照后M1代的黄花蒿植株进行研究, 结果表明对照组和处理组之间的差异体现为特异性条带的变化。综合分析表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 的重离子辐照黄花蒿干种子可以产生显著的当代损伤效应, 同时引起植物DNA的多态性变化。

关键词: $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束; 辐照; 黄花蒿; 生物学效应; SRAP

中图分类号: Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.36.04.499

1 引言

青蒿是一年生草本植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的干燥全草^[1], 是抗疟药物青蒿素的唯一天然来源, 青蒿素及其衍生物被世界卫生组织推荐为治疗疟疾的首选药物^[2]。疟疾是全球的三大传染病之一^[3], 因此青蒿素市场需求非常巨大, 但世界上绝大多数地区所产黄花蒿中的青蒿素的含量低于0.2%, 并无利用价值^[4]。中国向世界提供约90%的青蒿素及其衍生物的青蒿原材料, 而我国黄花蒿种质资源中青蒿素含量具有显著生态地域性, 表现为北高南低的趋势, 其中含量较高的黄花蒿主要生长在西南地区^[5-6]。随着青蒿素及其衍生物适用于新适应症地发现, 如双氢青蒿素片治疗免疫性疾病系统性红斑狼疮、青蒿素及其衍生物对颈头癌的治疗等^[7-8], 对黄花蒿原料药材的需求显著提升。目前, 黄花蒿的传统育种方法存在育种周期长、效率低等问题^[9], 因此迫切需要通过有效育种方法来提高青蒿原料的品质和产量, 并结合新型分子育种技术缩短育种周期从而筛选出优质、高产、抗性强的黄花蒿新品种。

重离子束具有传能线(Liner Energy Transfer, LET)密度高和尖锐的电离峰(Bragg峰)等特点, 因此重离子辐照生物体可以使得细胞核中DNA损伤比例增加且损伤不易修复, 并且重离子的作用区域更集

中。因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, 被广泛应用于植物育种中^[10]。DNA分子标记已被广泛用于植物遗传分析中, 其中SRAP分子标记技术已成熟, 是一种辨识度高且结果可靠稳定的分子标记技术。本研究利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照黄花蒿干种子, 通过测定发芽率、根长和下胚轴长等指标, 并结合SRAP技术对辐照后黄花蒿的基因组DNA进行分析, 探讨不同剂量的碳离子束辐照对黄花蒿种子当代损伤效应及分子多态性的影响, 为黄花蒿辐射诱变育种奠定一定理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料

黄花蒿种子采自湖南永州地区, 经兰州大学第二附属医院王晓飞博士鉴定为 *Artemisia annua* L. 的新鲜嫩叶, 4 °C 储存于中国科学院近代物理研究所药物研发中心。

2.2 辐照方法

将干种子置于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/u, 辐照剂量分别为0, 15, 25, 40, 60, 90, 120 Gy, 剂量率

收稿日期: 2019-05-10; 修改日期: 2019-07-31

基金项目: “十三五”国家重大科技专项重大新药创制项目(2017ZX09101002-003-001)

作者简介: 石紫薇(1994-), 女, 陕西兴平人, 硕士在读, 从事兽医研究; E-mail: shizwei100@163.com

† 通信作者: 贾宁, E-mail: 1963jianing@163.com.

为 10 Gy/min。计算机终端控制样品更换与数据的获取，实验过程在室温和大气环境中进行。

2.3 发芽率测定

每个辐照剂量随机选取 100 粒种子，在 4 °C 条件下春化 3 d，后播种于土壤中，在 25 °C、相对湿度为 50% 的环境中覆膜培养 7 d，于播种 35 d 之后测定存活率。

2.4 根长的测定

每个辐照剂量选取 45 粒种子，用 20% 的 NaClO 溶液进行表面消毒后用 ddH₂O 冲洗 5~6 遍，每个培养基中放置 20 粒种子，并点播于 MS 固体培养基上，在 4 °C 避光条件下春化，3 d 后垂直置于培养架上，8 d 后测量根长。

2.5 下胚轴长度测定

分别选取每个剂量的 45 粒种子，进行消毒，消毒方法同上，点播于 MS 培养基上并用锡箔纸包裹培养皿，放置于 4 °C 避光条件下春化，3 d 后垂直置于培养架上，8 d 后测量根长。

2.6 株高的测定

分别选取不同剂量的 30 粒种子，在 4 °C 条件下春

化 3 d，后播种于土壤中，并覆膜发芽，待发芽后揭去覆膜，于播种后 50 d 后，测量植株地上部分的高度。

2.7 总 DNA 提取

黄花蒿生长 60 d 后，0, 15, 25, 40, 60, 90 和 120 Gy 组随机选取同株黄花蒿嫩叶各 10 片，采用天根公司植物基因组 DNA 提取试剂盒，提取 DNA，并测定基因组浓度检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值，比值需在 1.7~1.9 之间则证明 DNA 样品纯度较高，可用于后续实验。将 DNA 稀释至 50 ng/μL，置于 -20 °C 保存。

2.8 基因组 SRAP 分析

引物序列参考 Li 及 Riaz 和 Quiros 所设计的 SRAP 引物序列^[11-12]，包括 4 个上游引物和 5 个下游引物(表 1)。SRAP-PCR 反应体系为 25 μL，扩增程序为：预变性 94 °C (5 min)；变性 94 °C (1 min)、复性 35 °C (1 min)、延伸 72 °C (1 min) 共 5 个循环；变性 94 °C (1 min)、复性 50 °C (1 min)、延伸 72 °C (1 min) 共 35 个循环；延伸 72 °C (1 min) 保存在 16 °C^[11]。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，缓冲液采用 1×TAE，电泳电压采用 3 V/cm，电泳时间为 47 min。

表 1 SRAP 引物序列

正向引物	引物序列	反向引物	引物序列
Me-1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em-1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me-2	TGACTCCAAACCGGAGC	Em-2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me-3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em-3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me-4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em-4	GACTGCGTACGAATTTGA
—	—	Em-5	GACTGCGTACGAATTAAC

2.9 数据统计与分析

所有实验在相同条件下重复进行 3 次，利用统计学软件 SPSS 19.0 进行数据分析，采用 Duncan 法进行不同组数据之间的相互比较，P 值小于 0.05 则认为差异显著。统计 SRAP 扩增出的条带，并进行差异分析。

3 结果

3.1 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照对黄花蒿存活率的影响

黄花蒿种子经过不同剂量的 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照，存活率与表型情况(图 1、图 2)，随着辐照剂量的增加，黄花蒿的存活率逐渐降低，但存活率降低趋势变缓。表明 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照对黄花蒿存活率具有显著的抑制作用。辐照的半致死剂量约为 40 Gy，在 40 Gy 及之后的试验组别发芽率与对照组相比均有显著性差

异 ($P < 0.01^{**}$)，且当辐照剂量上升至 120 Gy 时，发芽率仅为对照组的 17.1%。

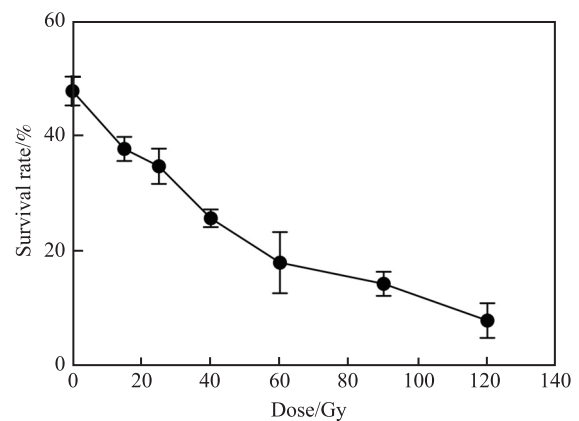


图 1 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照对黄花蒿存活率的影响

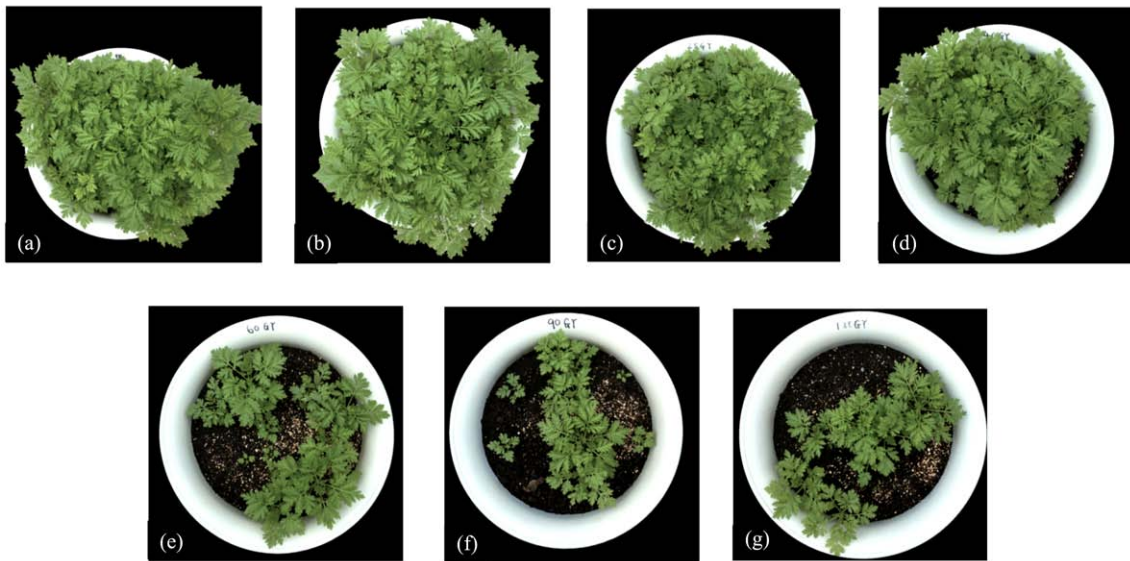


图 2 (在线彩图) $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照 35 d 黄花蒿的存活情况及表型变化 (a)~(g) 依次表示对照组, 15, 25, 4, 6, 9, 120 Gy。

3.2 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿根长的影响

根长统计结果(图 3), 随着辐照剂量的增加, 黄花蒿根长呈现逐渐变短的趋势, 低辐照剂量对根长影响不明显, 当辐照剂量增加至 40 Gy 后, 根长的长度迅速变短, 与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.01^{**}$), 在 120 Gy 时根长最短; 在 40~60 Gy 之间, 根长的减少趋势最为显著, 当辐照剂量为 60, 90, 120 Gy 时, 根长约为对照组的 39.7%, 35.1% 和 17.0%。

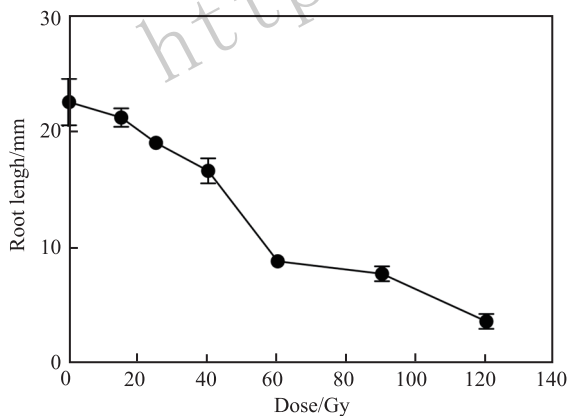


图 3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿根长的影响

3.3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿下胚轴长的影响

统计下胚轴长发现(图 4), 在低辐照剂量时, 随着辐照剂量的增加, 下胚轴长与对照组相比呈现上升的趋势, 且当辐照剂量达到 25 Gy 时, 与对照组下胚轴长相比差异明显 ($P < 0.05^*$)。而当辐照剂量增至 40 Gy 时, 与对照组相比, 实验组黄花蒿的下胚轴长度变短, 并随着辐照剂量的增加下胚轴长呈现逐渐降低的趋

势。且当辐照剂量达到 90 Gy 后, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01^{**}$), 仅为对照组的 67.3% 和 53.6%。

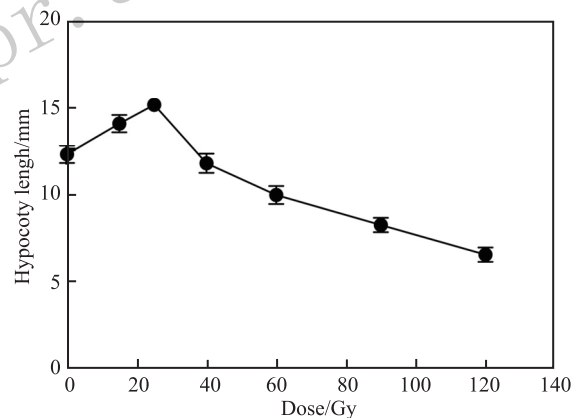


图 4 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿下胚轴长的影响

3.4 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿株高的影响

辐照后 M1 代植株株高是反映植株辐射损伤的重要标志之一, 统计株高发现(图 5), 黄花蒿株高在低剂量辐照时受影响较小, 但当辐照剂量上升到 60 Gy 时, 同时出现增高和矮化的变化, 而这种变化在剂量为 90 Gy 时最为明显, 且与对照组存在显著差异 ($P < 0.01^{**}$), 在 120 Gy 时也有出现。

3.5 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对黄花蒿基因组 DNA 的 SRAP 分析

为了进一步研究生物学性状的改变是否因为 DNA 分子水平的变化所致, 应用 SRAP 分子标记技术, 随机选取 20 对引物进行多态性分析。对已提取的不同剂量辐照后黄花蒿种子的 M1 代黄花蒿的基因组经核

酸蛋白仪测定, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 数值为 1.85, 1.83, 1.76, 1.71, 1.85 和 1.82, 对照组与全部实验组提取后的基因组 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均满足在 1.7~1.9 之间, 表明提取的黄花蒿基因组纯度较好, 可用于后续试验。图 6, 7 为其中两对引物的 SRAP 扩增图谱, 由表 2 的统计数据可以得出, 辐照剂量为 40 Gy 时, 扩增出的条带总数最多; 当辐照剂量为 120 Gy 时, 多态率最高, 为 38.0%。20 对引物共扩增出 679 条条带, 其中差异性条带为 202 条。15 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数为 21, 减少的条带数为 13; 25 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数为 16, 减少的条带数为 18; 40 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数为 19, 减少的条带数为 15; 60 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数为 15, 减少的条带数为 17; 90 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数为 13, 减少的条带数为 20; 120 Gy 与对照组条带相比, 新增条带数

为 15, 减少的条带数为 20。辐照组与对照组相比, 基因位点既有增加也存在原有位点的缺失, 证明重离子辐照影响黄花蒿 DNA 分子水平变化。

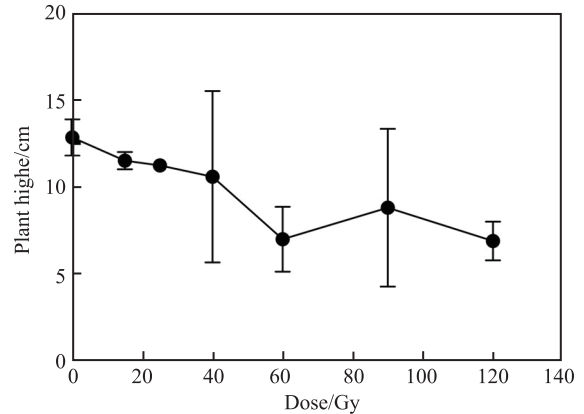


图 5 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照对黄花蒿株高的影响

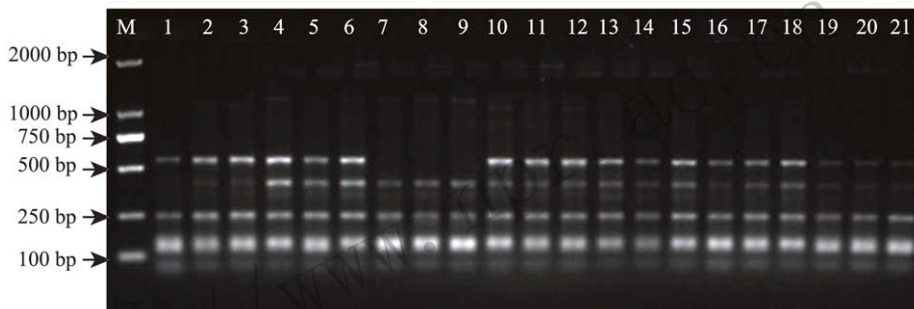


图 6 引物组合 Me-1+Em-4 的扩增条带

M: DL2000 分子量标记; 1~3、4~6、7~9、10~12 依次为 0, 15, 25, 40, 60, 90, 120 Gy 样品扩增结果。

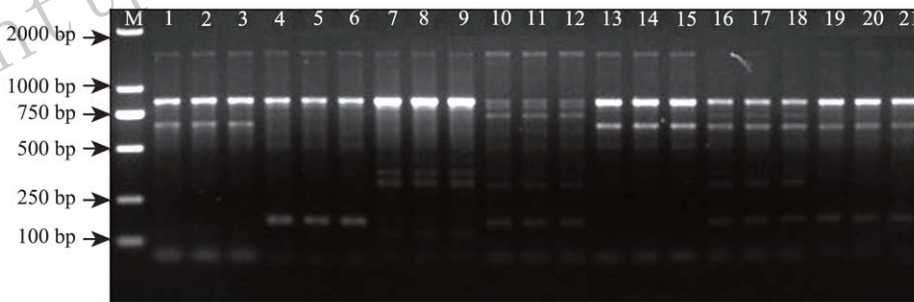


图 7 引物组合 Me-3+Em-2 的扩增条带

M: DL2000 分子量标记; 1~3、4~6、7~9、10~12 依次为 0, 15, 25, 40, 60, 90, 120 Gy 样品扩增结果。

表 2 随机引物扩增条带分析

剂量/Gy	总条带数	增加的条带数	减少的条带数	多态率/%
	97	—	—	—
15	105	21	13	32.4
25	94	16	18	36.2
40	106	19	15	32.1
60	95	15	17	33.7
90	90	13	20	36.7
120	92	15	20	38.0

4 讨论

重离子辐照可产生可遗传的突变效应, 且优势在于具有较高的突变率, 可以提高育种效率并缩短育种进程^[13]。重离子辐照可选择不同核素离子束进行辐照, 在 1970 年, Hirono 等^[14]用多种重离子辐照拟南芥种子, 证明了重离子辐照对植物体有显著的生物学效应。目前 ¹²C 离子束已被广泛应用于微生物与植物育种中, 罗红兵等^[15]用 ¹²C 离子束辐照得到了雄性不育的玉米

新品种;冯岩等^[16]利用 ^{12}C 离子束辐照得到了新的番茄突变品种;有学者研究发现^[17-19]小麦等作物经辐照诱变后,同种作物的不同性状对辐照剂量的敏感性不同,而离子束产生的突变既有正向诱变效应也有反向诱变效应。辐照诱变需确定适宜的辐照剂量,从而获得靶向性状的诱变。一般情况下,突变率随着辐照剂量的增加而增加,相应地也会提高畸变率^[20]。因此,研究黄花蒿种子辐照后M1代的生物学性状是研究黄花蒿辐射育种的基础。

利用分子标记进行辅助选择,是目前较常用的提高育种效率的方法,分子标记不会受到基因表达时间及基因中的内含子和外显子的影响,也不会被环境所干扰。可以在育种的早期进行选择,且对表达性状的基因和控制数量的基因均有效^[21]。SRAP与RAPD、AFLP、SSR、ISSR均属于二代分子标记,而SRAP相较于其他二代分子标记技术具有可靠性高、操作简易、成本低的优势^[22]。植物分子育种是改善黄花蒿植物品质的重要途径。通过SRAP分子标记技术,为高效筛选出优质高产且抗性强的黄花蒿新品种提供了可靠的技术手段^[4]。

本研究利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照黄花蒿干种子并对其M1代进行相关的生物学性状。结果显示,黄花蒿的存活率随着辐照剂量的增加而降低,在吸收剂量为15 Gy时,与对照组相比没有明显差异;在120 Gy时存活率最低,仅为对照组的16.8%,这表明较高剂量的辐照,对黄花蒿的生长造成了较大影响。从试验结果来看,随着辐照剂量的增加,根长逐渐变短,而当辐照剂量为15和25 Gy时,根长与对照组无明显差异,且当辐照剂量达到120 Gy时,根长仅为对照组的17%。下胚轴长随着辐照剂量的增加呈现先升后降的趋势,在25 Gy时,下胚轴长达到最长,与对照组有显著差异,当辐照剂量达到至60 Gy,下胚轴长与对照组相比,长度变短且差异显著,这表明25 Gy的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束能促进黄花蒿下胚轴的生长,但高剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对下胚轴的生长存在抑制作用。对植物株高进行测量后发现,高辐照剂量会对株高产生双向影响,与对照组相比,即有株高增高的植株,也有矮化的植株,这对黄花蒿的育种有一定的参考作用。

重离子束的辐照效应包括原初损伤和遗传变异,原初损伤指的是形态及生理学方面的改变,不具有遗传性;而造成遗传变异结果的则是由于分子水平的DNA损伤,具有遗传性。而辐照所引发的当代效应是由生理和遗传的综合效应共同构成。通过SRAP扩增,可以观察到DNA片段的改变,而碱基的改变是造成这种现象

的根本原因,结合实验结果分析得到,经过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照的青蒿种子,不同辐照剂量M1代的基因组发生了变异,在分子水平上证明了重离子辐照对黄花蒿产生的损伤作用,为黄花蒿的诱变育种提供了参考依据。

参考文献:

- [1] LIU Tianwei, QU Lingbo, XIANG Bingren. *Chinese Medical Journal*, 2003(06): 399. (in Chinese)
(刘天伟, 屈凌波, 相秉仁. *中国医药导刊*, 2003(06): 399.)
- [2] WAN-SU K, WOO JIN C, SUNWOO L, *et al.* *Korean Journal of Physiology & Pharmacology Official Journal of the Korean Physiological Society & the Korean Society of Pharmacology*, 2015, 19(1): 27.
- [3] BUTLER D, MAURICE J. *Nature*, 1997, 386(6625): 535.
- [4] MA Tingyu, XIANG Li, ZHANG Dong, *et al.* *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(15): 3041. (in Chinese)
(马婷玉, 向丽, 张栋, 等. *中国中药杂志*, 2018, 43(15): 3041.)
- [5] CHEN Shilin, XIANG Li, LI Lin, *et al.* *Science China Press*. 2017, 62(18): 1982. (in Chinese)
(陈士林, 向丽, 李琳, 等. *科学通报*, 2017, 62(18): 1982.)
- [6] ZHANG Qin, WEN Jian, GUO Jie, *et al.* *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(03): 503. (in Chinese)
(张琴, 文检, 郭杰, 等. *植物保护学报*, 2018, 45(03): 503.)
- [7] YANG Lan, ZHANG Dong. *Science China Press*, 2017, 62(18): 2007. (in Chinese)
(杨岚, 张东. *科学通报*, 2017, 62(18): 2007.)
- [8] LIANG Yizhou, NONG Xiaolin. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg(China)*, 2018, 32(19): 1519. (in Chinese)
(梁毅舟, 农晓琳. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 32(19): 1519.)
- [9] LIANG Huiling, WEI Xiao, TANG Hui, *et al.* *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2007(11): 1349. (in Chinese)
(梁惠凌, 韦霄, 唐辉, 等. *中药材*, 2007(11): 1349.)
- [10] OKAMURA M, YASUNO N, OHTSUKA M, *et al.* *Nucl Instr and Meth B*, 2003, 206(03): 574.
- [11] LI G, QUIROS C F. *Theoretical & Applied Genetics*, 2001, 103(2-3): 455.
- [12] PEZZOTTI G, YAMADA K. *Plant Breeding*, 2010, 120(5): 411.
- [13] ZHANG Qiuying, YU Lixia, Li yansheng, *et al.* *Seed, Soybean Science*, 2013, 32(05): 587 (in Chinese)
(张秋英, 余丽霞, 李彦生, 等. *大豆科学*, 2013, 32(05): 587.)
- [14] HIRONO Y, SMITH H H, LYMAN J T, *et al.* *Radiation Research*, 1970, 44(1): 204.
- [15] LUO Hongbing, ZHAO Kui, ZHOU Wenxin, *et al.* *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008(03): 296. (in Chinese)
(罗红兵, 赵葵, 周文新, 等. *核农学报*, 2008(03): 296.)
- [16] FENG Yan, WEI Zengquan, LI Wenjian, *et al.* *ACTA LASER BIOLOGY SINICA*, 2002(06): 442. (in Chinese)
(冯岩, 卫增泉, 李文建, 等. *激光生物学报*, 2002(06): 442.)
- [17] LIU Qingfang, YU Lixia, DU Yan, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2013, 31(01): 26. (in Chinese)
(刘青芳, 余丽霞, 杜艳, 等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2013,

- 31(01): 26.)
- [18] GENG Jinpeng, LI Duofang, CAO Tianguang, *et al.* *Journal of Maize Sciences*, 2013, **21**(02): 66. (in Chinese)
(耿金鹏, 李多芳, 曹天光, 等. *玉米科学*, 2013, **21**(02): 66.)
- [19] YU Lixia, LI Wenjian, DU Yan, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2014, **32**(02): 55. (in Chinese)
(余丽霞, 李文建, 杜艳, 等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2014, **32**(02): 55.)
- [20] MELKI M, MAROUANI A. *Environmental Chemistry Letters*, 2010, **8**(4): 307.
- [21] ZHOU Libin, LI Wenjian, QU Ying, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2008, **25** (02): 165. (in Chinese)
(周利斌, 李文建, 曲颖, 等. *原子核物理评论*, 2008, **25**(02): 165.)
- [22] SUN Jiaqi, LIANG Jianguo, SHI Shaochuan, *et al.* *Molecular Plant Breeding*, 2010, **8**(03): 577. (in Chinese)
(孙佳琦, 梁建国, 石少川, 等. *分子植物育种*, 2010, **8**(03): 577.)

Biological Effects of $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beams on Dry Seeds of *Artemisia annua* L.

SHI Ziwei^{1,2}, LI Xuehu², LIANG Yan³, JIANG Tingting², LIANG Jianping², JIA Ning^{1,†}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

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

3. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To study the biological effects of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams on dry seeds of *Artemisia annua* L, there are four indicators: survival rate, root length, hypocotyls length, plant height. The results showed that survival rate and root length decreased with increasing doses. While the hypocotyl length first increased and then decreased, the plant height showed a trend of overall decrease, but the plant height increased and decreased at 60 and 90 Gy. After studying the application of M1 generation after irradiation of artemisinin SRAP(sequence related amplified polymorphism) technique, the results showed that the differences between control group and treatment group are embodied at the change of specific bands. All the results indicated that M1 seedlings of *Artemisia annua* L. irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion has obvious biological effects on both the plant developments and genomic DNA variations.

Key words: $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams; irradiation; *Artemisia annua* L.; biological effects; SRAP

Received date: 10 May 2019; Revised date: 31 Jul. 2019

Foundation item: National Major Scientific and Technological Special Project for Significant New Drugs Development During the Thirteenth Five-year Plan Period(2017ZX09101002-003-001)

† Corresponding author: JIA Ning, E-mail: 1963jiaoning@163.com.