

小麦微核心种质 γ 射线辐射敏感性分析

孙云云^{1,2}, 古佳玉², 赵林姝², 郭会君², 谢永盾², 赵世荣², 赵紫伟^{1,2}, 宋希云¹, 刘录祥²

(¹青岛农业大学生命科学学院, 山东 青岛 266109; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081)

摘要:以 259 个小麦微核心种质为材料进行剂量为 0、100、150、250 Gy 的⁶⁰Co γ 射线辐照处理, 探讨小麦微核心种质的 γ 射线辐射敏感性分布, 以及 DNA 损伤修复基因 *TaKu70* 和 *TaKu80* 对辐照的应答模式。结果表明, 小麦微核心种质的苗高损伤率与 γ 射线辐照剂量间存在着 3 种函数关系: 对数、线性、幂函数。以苗高损伤率为 50% 时的辐照剂量 HD_{50} 作为主要的辐射敏感性分型指标, 分别统计不同函数关系的微核心种质落入不同剂量区间的基因型个数, 并依此将 259 份微核心种质分为敏感型(10)、较敏感型(96)、较钝感型(101)、钝感型(52)。对数函数关系中以敏感型和较敏感型为主, 随着 γ 射线辐照剂量的增加 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比总体升高, 但变化不明显; 线性函数关系中以较敏感型和较钝感型为主, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比总体升高, 随剂量的增加而逐渐递增; 幂函数关系中以较钝感型和钝感型为主, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比总体升高, 但随剂量的增加呈现先增加后降低的趋势, 一般相对表达量的峰值出现在 150 Gy。

关键词:小麦; 微核心种质; 辐射敏感性; *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因表达

Radiation Sensitivity Analysis of Wheat Mini Core Collections Based on γ -rays Irradiation

SUN Yun-yun^{1,2}, GU Jia-yu², ZHAO Lin-shu², GUO Hui-jun², XIE Yong-dun²,
ZHAO Shi-rong², ZHAO Zi-wei^{1,2}, SONG Xi-yun¹, LIU Lu-xiang²

(¹ Academy of Life Science Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement, Beijing 100081)

Abstract: To study the distribution of radiation sensitivity and expression patterns of *TaKu70* and *TaKu80* genes that are core factors in DNA repair process, 259 wheat mini core collection genotypes were irradiated by γ -rays with 0, 100, 150 and 250 Gy doses. Through germination test, the damage rate of seedling height showed 3 types of function relationships with the doses of γ -rays irradiation: logarithmic, linear and power function. Using HD_{50} as the measurement of radiation sensitivity, the 259 mini core collection genotypes could be divided into four categories: sensitive (contained 10 genotypes), medium sensitive (contained 96 genotypes), medium insensitive (contained 101 genotypes), and insensitive (contained 52 genotypes). There were more sensitive and medium sensitive genotypes in the logarithmic function relationship. And the expression levels of *TaKu70* and *TaKu80* genes were up-regulated by increasing of γ -rays doses compared with 0 Gy, but not affected significantly. There were more medium sensitive and medium insensitive genotypes in the linear function relationship. And the expression levels of *TaKu70* and *TaKu80* genes were gradually up-regulated by increasing of γ -rays doses compared with 0 Gy. There were more me-

收稿日期: 2015-04-23 修回日期: 2015-05-06 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1540.028.html>

基金项目: 国家“863”计划(2012AA101202); 国家支撑计划(2014BAA03B04); 国家自然科学基金项目(1130526); 农业部公益性行业项目(201103007)

第一作者研究方向为小麦诱变突变与生物技术育种。E-mail: sunyunyun0326@163.com

通信作者: 刘录祥, 主要从事作物诱变突变与生物技术育种研究。E-mail: liuluxiang@caas.cn

dium insensitive and insensitive genotypes in the power function relationship. And the expression levels of *TaKu70* and *TaKu80* were up-regulated compared with 0 Gy, but up-regulated firstly and then down-regulated with the increasing of γ -rays doses, and the general expression peaked at 150 Gy.

Key words: Wheat; Mini core collection; Radiation sensitivity; Expression pattern of *TaKu70* and *TaKu80* gene

小麦是世界第 1 大粮食作物,是我国粮食系统的重中之重,在国内的粮食作物中小麦的栽培面积和总产量居第 3 位,仅次于玉米、水稻;小麦的品质以及持续增产关系到人民生活水平以及农业生产效益的提高^[1]。多年来,诱变育种已成为传统杂交育种的重要补充以及难以取代的育种手段。辐射诱变育种相比于传统育种,能够扩大遗传变异,获得罕见突变基因种质资源^[2],更快得到可以稳定遗传的有利性状,加速育种进程^[3-4]。

我国是小麦的次生起源地,小麦种质资源丰富,现保存原产于中国的普通小麦种质资源约 2 万余份^[5]。为了有效地利用这些丰富的小麦种质资源,1999 年,我国开始构建普通小麦的核心种质^[5];小麦核心种质的构建为重要功能基因的遗传多样性分析、重要性状的精细鉴定和筛选奠定了基础^[6]。将小麦核心种质进一步压缩精简成微核心种质,微核心种质的样本数仅占基础种质资源总份数的 1%,代表基础种质的多样性可达 70%^[7],即数万份的小麦种质资源中蕴藏的基因多样性被富集到 200 ~ 300 份的微核心种质中,为后续的研究工作奠定了重要的基础。

辐射敏感性是指生命体、组织器官、细胞、细胞内含物或者生物分子在一定剂量射线的影响下,在形态上、机能上产生的相应变化的大小;即在辐射条件相同的情况下,生物机体对辐射损伤作用的相对敏感程度^[1,8]。植物被辐照之后产生的各种生物学效应,称为辐射损伤效应,并有形态学、细胞学、生物化学等多种检测指标。植物种子经辐照后的损伤效应检测指标主要包括幼苗高度、根长、植株存活率、发芽率等^[1],目前常用的辐射敏感性指标主要有苗高损伤率、半致矮剂量(HD_{50})、产量降低 50% 的剂量(YD_{50})等^[9,10],在苗期检测植物的辐射敏感性试验中最常用的为 HD_{50} 。

辐射敏感性研究在诱变育种中具有重要的理论和实践意义^[11-12]。冯志杰等^[9]研究敏感性不同的小麦时发现,造成同一植物品种间辐射敏感性差异的主要原因是 DNA 修复能力的差异所致。电离辐射引起 DNA 损伤有多种,如嘌呤/嘧啶突变、DNA 单链断裂(single-strand breaks, SSBs)、DNA 双链断

裂(double-strand breaks, DSBs)^[13]以及 DNA 交联等。其中 DSBs 是辐射引起的生物损伤效应中最重要的原初损伤。研究表明,参与 DNA 修复途径中的大部分基因同样也参与到 DSBs 修复中^[14]。高等动植物中,DSBs 主要通过非同源末端连接(Non-homologous end-joining, NHEJ)来修复,其中 Ku70/Ku80 蛋白以异二聚体的形式在 NHEJ 修复途径的起始位点发挥作用。异二聚体中任何蛋白亚基突变或损坏,都会导致 NHEJ 修复过程中断或者减弱^[15-17],进而导致植物体辐射敏感性的变化。P. Bundock 等^[18]通过研究拟南芥 *Ku70* 基因 T-DNA 插入缺失突变体,发现 *Ku70* 基因缺失导致生物体产生超敏性反应。J. riesner^[19]通过研究拟南芥 T-DNA 插入缺失突变体,发现拟南芥 *Ku80*、*LIG4* 缺失突变体对 100 Gy 的 Cs^{137} γ 射线非常敏感,所有种子都萌发的情况下,*Ku80*、*LIG4* 缺失突变体种子出现了萌发迟缓的现象。

关于小麦 Ku 蛋白的研究,朱彩霞等^[20]首次完整的克隆了小麦 *Ku70* 和 *Ku80* 基因的 cDNA 序列,并命名为 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因。J. Y. Gu 等^[21]首次克隆了小麦 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因 A、B、D 基因组序列,并证实小麦 *TaKu70* 和 *TaKu80* 蛋白在 DNA 损伤修复中发挥重要作用,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因被 γ 射线辐照后诱导表达明显。王庆等^[22]以京 411 和济麦 22 为试验材料,研究了 γ 射线、质子和中子等不同辐照方式处理的小麦品种 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达模式,研究表明不同辐照方式下 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的响应模式不相同。崔孟等^[23]以 γ 射线处理的邯 6172 和京 411 为试验材料,结果表明不同小麦品种的 *TaKu70* 基因相对表达量变化不明显,*TaKu80* 基因相对表达量上调的。韩冰等^[24]以 γ 射线辐射处理的 63 份小麦基因型(系)中的 16 份风干种子为试验材料,试验表明 5 日龄的小麦幼苗 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因在敏感型基因型中诱导表达显著,钝感型基因型中除了少数基因型之外,处理组的相对表达量与对照组相当,诱导表达不显著。

本研究以中国小麦微核心种质为试验材料,对 γ 射线辐照后的辐射敏感性进行分型;并结合 DNA

损伤修复基因 *TaKu70* 和 *TaKu80* 在小麦微核心种质中对 γ 射线辐照的应答模式,探讨小麦微核心种质间的辐射敏感性差异、DNA 损伤修复相关基因的表达模式,为解析辐射敏感性的形成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国小麦微核心种质种子 259 份,由中国农业科学院作物科学研究所张学勇研究员提供。包括 154 个地方基因型、88 个选育基因型、17 个国外引进基因型,其中的 242 个中国小麦基因型分布在中国 10 大麦区,以黄淮冬麦区的基因型最多。

1.2 试验方法

1.2.1 田间种植 259 份小麦微核心种质于 2013 年 10 月 2 日播种于中国农业科学院内试验田;每份材料根据种子量种植 1~2 行,按南北行种植,每行 20 粒,行长 2 m,行距 30 cm,单粒点播,正常的田间管理。成熟时分材料单独收获,种子风干后作为后续试验材料。

1.2.2 水分平衡与辐照处理 以甘油/水 = 1:1 的配比对小麦微核心种质风干种子进行水分平衡,使种子含水量平衡至 13% 左右。在北京大学辐照中心对试验种子进行 γ 射线辐照处理,剂量分别为 0、100、150 和 250 Gy,剂量率为 7.5 Gy/min,其中 0 Gy (未辐照) 的样品作为对照。

1.2.3 发芽试验及苗高损伤率计算 γ 射线辐照后种子每个基因型每个剂量取 20 粒,设 3 次重复。21℃ 萌动 16h,采用发芽架培养法,21℃ 条件下进行水培发芽试验。7 日后,使用万深 SC-G 型自动考种分析软件统计幼苗苗高,每个剂量苗高测量值记作 S_n ($n = 0、100、150$ 和 250 Gy),3 次重复苗高测量值分别记作 S_{n-1} 、 S_{n-2} 、 S_{n-3} ;苗高损伤率记作 ΔS_n ,根据公式 $\Delta S_n = (S_0 - S_n) / S_0$ 计算苗高损伤率, ΔS_n 即为 7 日龄幼苗苗高损伤率。

1.2.4 辐射敏感性分类及 HD_{50} 的计算 利用 Microsoft Excel 2010,以每个基因型不同辐照剂量下的苗高损伤率随辐照剂量的变化做散点图,拟合趋势线,利用趋势线计算苗高损伤率 $\Delta S_n = 0.5$ 时对应的辐照剂量,即半致矮剂量,记作 HD_{50} 。SAS 8.01 软件 ($mean = 5$, $std = 10$) 分别对小麦微核心种质的苗高损伤率 ΔS_n 聚类分析。将聚类分析结果与 HD_{50} 比较,发现各个基因型的 HD_{50} 与聚类后的结果存在相关性。根据聚类分析结果及 HD_{50} 大小,对

259 份小麦微核心种质进行敏感性分型。

1.2.5 RNA 提取及反转录 选取 γ 射线辐照后具有代表性的 9 份小麦微核心种质基因型为试验材料,每个基因型每个剂量取 20 粒,21℃ 萌动 16h,采用发芽架培养法,21℃ 条件下进行水培发芽试验。第 5 日取样 (包括幼苗、幼根),每个基因型每个剂量设置 3 个生物性重复,液氮速冻, -80℃ 保存材料备用。TRNzol-A + (TIANGEN, DP421) 法提取 RNA,1% 的琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性,条带亮度 28s: 18s = 2:1 则证明提取的模板 RNA 完整性良好。Nanodrop2000 (Thermo, USA) 检测其 RNA 纯度,iScript™ cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行反转录。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 使用 iQTM SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, 170-8882, USA)、SsoFast™ EvaGreen® supermix (BIO-RAD, 170-8891, USA) 两种试剂盒、CFX96 (BIO-RAD, USA) 荧光定量 PCR 仪进行 qPCR,BIO-RAD CFX manger 2.0 分析软件分析试验结果,软件输出表达分析的数值及柱状图。以 *Actin* 和 *18s rRNA* 为双内参基因,DNA 损伤修复基因 *TaKu70* 和 *TaKu80*^[24,27] 的表达分析结果由分析软件 BIO-RAD CFX manger 2.0 输出,Microsoft Excel 2010 分析试验结果。采用 2- $\Delta\Delta CT$ 算法分析试验结果,分析辐照后诱导表达趋势。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of primer used in the Quantitative Real-time PCR

引物名称 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	目的 Object
<i>18s</i> QF	CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT	内参基因 <i>18s</i> rRNA 的 F 引物
<i>18s</i> QR	CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC	内参基因 <i>18s</i> rRNA 的 R 引物
<i>TaActin</i> QF	GTAGGAAATGGCTGACGGTG	内参基因 <i>Actin</i> 的 F 引物
<i>TaActin</i> QR	ATGCTAGGGAAAACAGCCCT	内参基因 <i>Actin</i> 的 R 引物
<i>TaKu70</i> QF	CTACCTCATAGACGCCTCGC	目的基因 <i>TaKu70</i> 的 F 引物
<i>TaKu70</i> QR	GCAACTTCATCACGGGATCT	目的基因 <i>TaKu70</i> 的 R 引物
<i>TaKu80</i> QF	GGCTGTTCTGCTGCTGGATG	目的基因 <i>TaKu80</i> 的 F 引物
<i>TaKu80</i> QR	GCCAACCTCGTCGCTCCTATG	目的基因 <i>TaKu80</i> 的 R 引物

2 结果与分析

2.1 小麦微核心种质苗高损伤率与辐照剂量间关系

小麦微核心种质经 γ 射线辐照后,苗高随着辐照剂量的增大逐渐降低,不同基因型间苗高降低程度不同,部分基因型在 100 Gy 时的苗高大于 0 Gy,此时 ΔS_{100} 为负值,表现为促进效应。大部分基因型在 100 Gy 时的苗高小于 0 Gy,此时 ΔS_{100} 为正值,表现为损伤效应。 ΔS_n 随 γ 射线辐照剂量变化的拟合趋势线表明,不同基因型的 ΔS_n 与 γ 射线辐照剂

量之间存在 3 种函数关系:线性(共 128 个基因型)、对数(共 66 个基因型)和幂函数(共 65 个基因型),如图 1。线性函数关系中, ΔS_n 随着辐照剂量的增加呈线性增加;对数函数关系中, ΔS_n 随着辐照剂量增加在低剂量时增加较快,高剂量时增加减缓;幂函数关系中, ΔS_n 在低剂量时增加减缓,高剂量时出现较快的增长。随着辐照剂量的增加,不同小麦基因型的 ΔS_n 增加速度不同,苗高的降低程度亦存在差异。一定剂量范围内,苗高损伤率与辐照剂量之间大多呈线性函数关系。

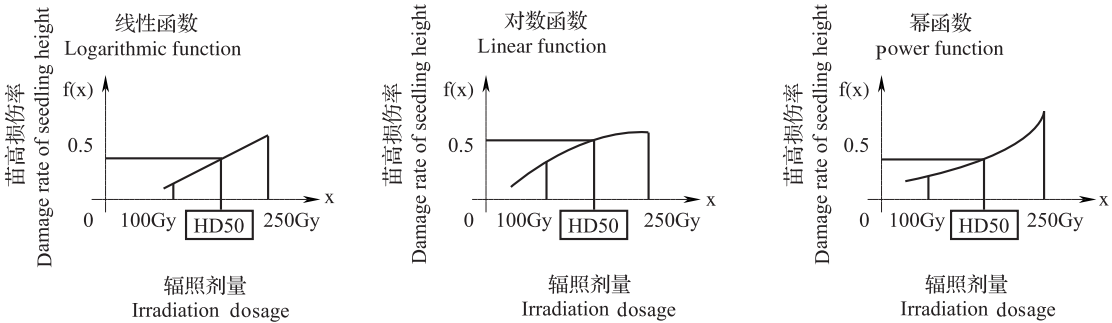


图 1 苗高损伤率随辐照剂量变化的三种函数关系示意图

Figure 1 Outline of the three types of function relationship between the damage rate of seedling height and the doses of γ -rays irradiation

2.2 小麦微核心种质 γ 射线辐射敏感性分型

SAS 8.01 软件(mean = 5, std = 10)对对数、线性、幂函数的 ΔS_n 各自聚类,并分别聚类为 3 类。聚类结果与 HD_{50} 对应分析,发现可将对数函数中的 3 类基因型的 HD_{50} 分为[127, 160 Gy]、[160, 185 Gy]、[185, 226 Gy] 3 个剂量区间;线性函数中的 3 类基因型的 HD_{50} 分为[160, 185 Gy]、[185, 210 Gy]、[210, 230 Gy] 3 个剂量区间;幂函数中的 3 类基因型的 HD_{50} 分为[180, 185 Gy]、[185, 210 Gy]、[210, 235 Gy] 3 个剂量区间(图 2)。图 2 可见,3 种函数关系中 HD_{50} 的剂量区间存在重叠,综合分析后将 HD_{50} 整

合为 4 个剂量区间[127, 160 Gy]、[160, 185 Gy]、[185, 210 Gy]、[210, 235 Gy]。统计不同函数关系的基因型落入各个剂量区间的个数,将 259 份小麦微核心种质分为 4 类:敏感型、较敏感型、较钝感型、钝感型(表 2)。 $[127, 160 \text{ Gy}]$ 区间内的基因型为敏感型,如藏冬 4 号、边巴春麦-6、墨脱小麦等 10 个基因型; $[160, 185 \text{ Gy}]$ 区间内的基因型为较敏感型,如抗锈 10 号、原冬 822、新冬 2 号等 96 个基因型; $[185, 210 \text{ Gy}]$ 区间内的基因型为较钝感型,如复壮 30、矮丰 3 号、台中 23 等 101 个基因型; $[210, 235 \text{ Gy}]$ 区间内的品种为钝感型,如高原 506、云麦 34、宁麦 4 号等 52 个基因型。

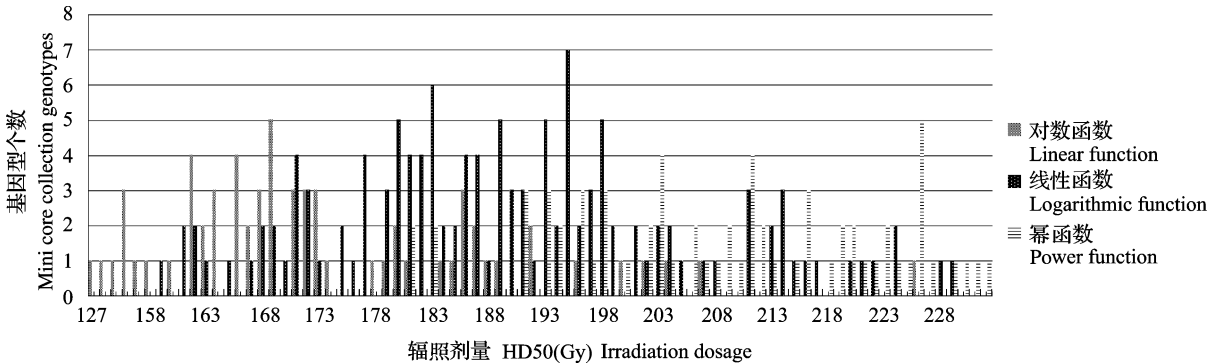


图 2 小麦微核心种质 γ 射线辐射敏感性分类

Fig. 2 Radiation sensitivity classification of wheat mini core collection based on γ -rays irradiation

表 2 不同敏感性的小麦微核心种质中不同函数关系的基因型个数

Table 2 The number of different function relationships about different radiation sensitivity of wheat mini core collection

函数	敏感型(个)	较敏感型(个)	较钝感型(个)	钝感型(个)
Function	Sensitive	Medium sensitive	Medium insensitive	Insensitive
对数函数	9	40	14	2
线性函数	1	52	57	18
幂函数		4	30	32
总计	10	96	101	52

由图 2 和表 2 可见,HD₅₀最小值 127 Gy,最大值 235 Gy。线性函数关系中 HD₅₀最小值 159 Gy,最大值 229 Gy,由于其基因型较多,HD₅₀在总的 HD₅₀数据中分布比较广泛,但是总体来说属于较敏感型、较钝感型的基因型偏多;幂函数关系中 HD₅₀最小值 181 Gy,最大值 235 Gy,HD₅₀总体来说偏大,属于较钝感型、钝感型的基因型偏多;对数函数关系中 HD₅₀最小值 127 Gy,最大值 226 Gy,HD₅₀值总体偏小,属于敏感型、较敏感型的基因型偏多。

2.3 γ 射线辐照后损伤修复 *TaKu70* 和 *TaKu80* 的表达模式

表 3 为本研究所选用的 3 种函数关系的 9 个基因型。由图 3、图 4 和图 5 知,以基因型的敏感性为分类标准进行分析,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量差异明显,但并没有存在明显的规律性。因此,以 3 种函数关系为分类标准对 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量进行分析。

表 3 不同函数关系的 9 个小麦微核心种质基因型
Table 3 The different genotypes of function relationship about 9 wheat mini core collection

编号	品种名称	函数关系	敏感性
Number	Name	Function relation	Radiation sensitivity
MC-18	假红麦	线性函数关系	钝感型
MC-55	蝉不歧	线性函数关系	较敏感型
MC-119	复壮 30	线性函数关系	较钝感型
MC-60	早小麦	幂函数关系	钝感型
MC-215	定西 24	幂函数关系	钝感型
MC-240	洋麦	幂函数关系	较钝感型
MC-187	边巴春麦-6	对数函数关系	敏感型
MC-238	鱼鳅麦	对数函数关系	较钝感型
MC-246	白冬麦	对数函数关系	较敏感型

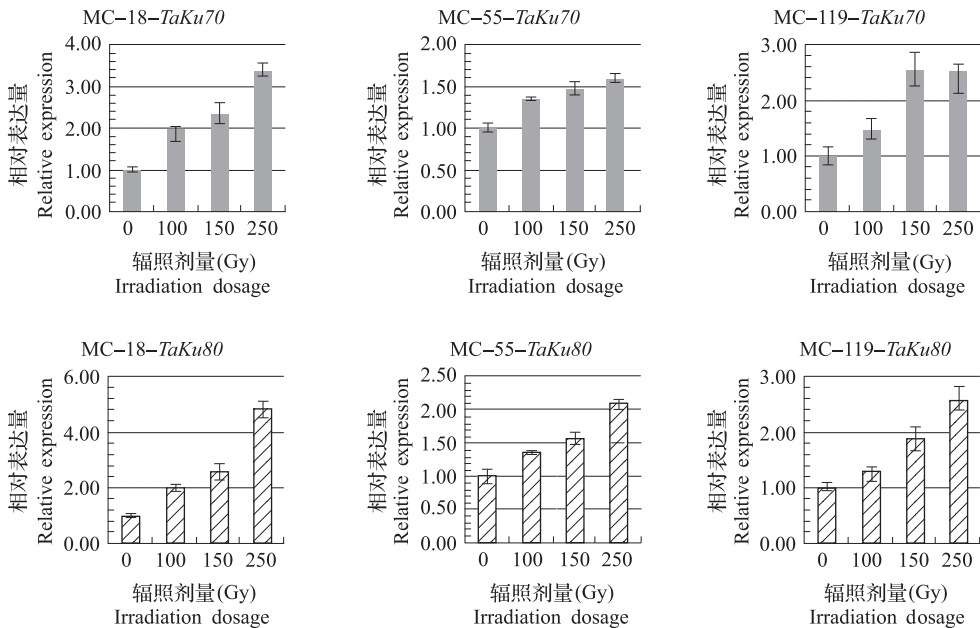


图 3 线性函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达模式
Fig. 3 The expression pattern of *TaKu70* and *TaKu80* genes in the linear function relationship of wheat mini core collections

2.3.1 线性函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 的表达模式 图 3 为线性函数关系的 3 个基因型 (MC-18、MC-55、MC-119) *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量。由图 3 可见, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比都表现为上调。3 个基因型的 *TaKu70* 基因相对表达量随着辐照剂量的增加都有逐渐增加趋势。但基因型 MC-119 的表现稍有不同, 其在 150 Gy 增加幅度最高, 约为 0 Gy 的 2.6 倍, 而在 250 Gy 约为 0 Gy 的 2.4

倍, 图 3 中 *TaKu80* 基因相对表达量的变化趋势与 *TaKu70* 基因相对表达量的变化趋势基本相似, 3 个不同基因型的 *TaKu80* 基因相对表达量随着辐照剂量的增加呈现逐渐增加的趋势, 在 250 Gy 剂量达到最高。

2.3.2 幂函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 的表达模式 图 4 为幂函数关系的 3 个不同基因型 (MC-60、MC-215、MC-240) *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量。由图 5 可见, *TaKu70*

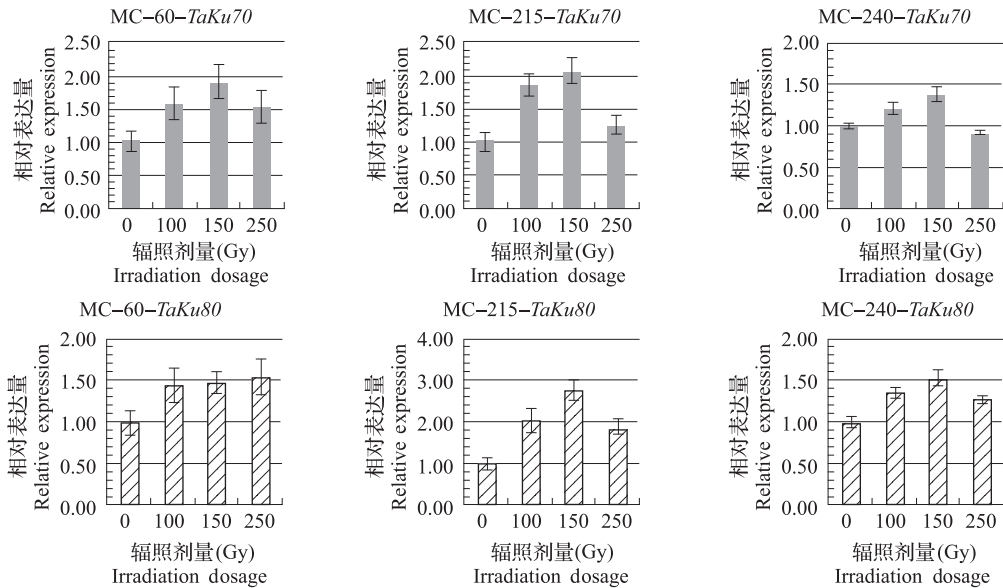


图 4 幂函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达模式

Figure 4 The expression pattern of *TaKu70* and *TaKu80* genes in the power function relationship of wheat mini core collections

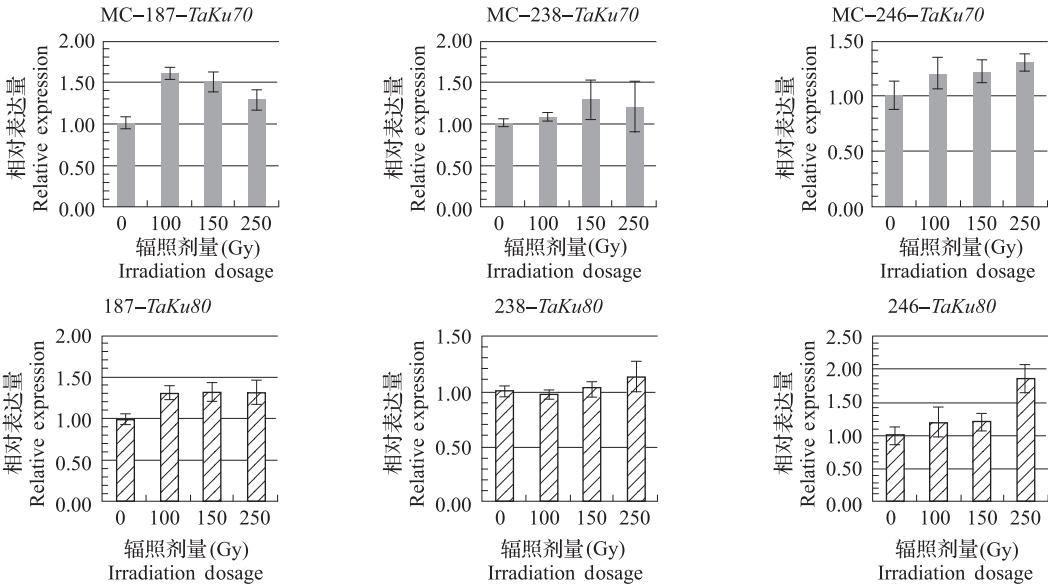


图 5 对数函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达模式

Figure 5 The expression pattern of *TaKu70* and *TaKu80* genes in the logarithmic function relationship of wheat mini core collections

和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比均表现为上调。*TaKu70* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加呈现先增加后降低的趋势,同一基因型内不同处理间 *TaKu70* 相对表达量的峰值一般出现在 150 Gy, 250 Gy 时 *TaKu70* 基因的相对表达量低于 150 Gy;图 4 中 *TaKu80* 基因的相对表达量的变化与 *TaKu70* 基因的相对表达量的变化基本相似,*TaKu80* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加呈现先增加后降低的趋势,相对表达量的峰值一般出现在 150 Gy。*MC-60* *TaKu80* 基因的相对表达量峰值出现在 250 Gy,约为 0 Gy 的 1.6 倍,150 Gy 时也约为 0 Gy 的 1.6 倍,但其余 2 个基因型 *MC-215* 和 *MC-249* 的 *TaKu80* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加呈现先增加后降低的趋势。

2.3.3 对数函数关系的小麦微核心种质 *TaKu70* 和 *TaKu80* 的表达模式 图 5 为对数函数关系的 3 个不同基因型 (*MC-187*、*MC-238*、*MC-246*) *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量。由图 5 可见,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与对照相比均表现为上调。*TaKu70* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加变化并不明显,3 个不同基因型 *TaKu70* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加呈现先增加后降低的趋势,相对表达量的峰值分别出现在 100 Gy、150 Gy、250 Gy。*TaKu80* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加变化也不明显,*TaKu80* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加呈现逐渐增加趋势,相对表达量的峰值出现在 250 Gy,*MC-246* *TaKu80* 基因的相对表达量在 250 Gy 约为 0 Gy 的 1.8 倍。

3 讨论

3.1 小麦微核心种质表现多种损伤剂量函数关系

本研究处理苗高数据时发现,小麦微核心种质的苗高损伤率随 γ 射线辐照剂量增加而变化的规律不同,苗高损伤率与辐照剂量间存在 3 种损伤剂量函数关系:对数、线性和幂函数。线性函数关系中,认为一定剂量范围内随着辐射剂量的增加,外界胁迫对苗高损伤率施加的影响是逐渐增加的;对数函数关系中,认为当外界施加胁迫时,苗高损伤率首先出现比较快速的增长,即苗高随着剂量的增加下降速度较大,而后增长速率较前期有所降低;幂函数关系中,认为随着辐照剂量的增加苗高损伤率在前期的增长缓慢,即苗高随着剂量的增加下降速度较小,当达到某一阈值后,苗高损伤率进入快速增长阶段。在一定剂量范围内,微核心种质的苗高损伤率

与辐照剂量间大多呈现线性函数关系。

3.2 小麦微核心种质间 γ 射线辐射敏感性差异明显

冯志杰等^[9-10]运用模糊聚类分析法,将 49 个小麦品种分为极迟钝型、迟钝型、中间型、敏感性、极敏感性 5 类,认为小麦品种间的辐射敏感性存在显著的差异,并呈正态分布。徐锡虎等^[25]将 23 个不同水稻品种(系)分为迟钝型、中间型和敏感型 3 类,以中间型居多,认为不同品种的水稻间辐射敏感性存在差异。韩冰^[8]将 63 个小麦基因型分为钝感型、较钝感型、较敏感性和敏感性 4 类,其中较钝感型和较敏感型可统称为中间型。本研究结合 SAS 软件聚类分析结果及 HD_{50} 值,将 259 份小麦微核心种质分为 4 类:敏感型、较敏感型、较钝感型、钝感型,4 者的比例约为 1:10:10:5。其中对数函数关系中敏感型和较敏感型的基因型居多,线性函数关系中较敏感型和较钝感型的基因型居多,幂函数关系中较钝感型和钝感型基因型居多。小麦微核心种质辐照敏感性差异明显,由于遗传多样性丰富,产生辐射敏感性差异的内在机制有待于进一步的研究。

3.3 γ 射线辐照后 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的应答模式与小麦基因型的损伤剂量函数关系有关

本研究中 DNA 损伤修复基因 *TaKu70* 和 *TaKu80* 在不同基因型中相对表达量呈现明显不同;同一基因型内,随着 γ 射线辐照剂量的增加,不同函数关系的基因型 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达呈现不同的趋势。线性函数关系中,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量随着辐照剂量的增加逐渐增加,认为 DNA 损伤修复系统在此类基因型中起到主要作用;随着辐照剂量的增加,DNA 的损伤加剧,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达也随之缓慢增加。幂函数关系中,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量随剂量的增加呈现先增加后降低的趋势,一般相对表达量的峰值出现在 150 Gy,认为 DNA 损伤修复系统在此类基因型中起到一定程度的作用;随着辐照剂量的增加,DNA 损伤加剧,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达在前期增加缓慢,150 Gy 达到峰值,此时 DNA 损伤严重程度超出 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对损伤 DNA 的修复能力,故而 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达出现降低,推测此类基因型中有其他损伤修复系统在起主要作用。对数函数关系中,随着辐照剂量的增加 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量变化并不明显,认为 DNA 损伤修复系统在此类基因型中发挥的作用有限,故而 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达

量在辐照处理后变化不明显。由此可见,由于不同的小麦基因型其苗高损伤率随剂量变化关系不同,*TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对 γ 射线辐照的响应模式也不同。这与我们前期的研究结果一致^[21-24]。

王庆^[22]以京 411 和济麦 22 为试验材料,研究了 γ 射线、质子和中子等不同辐照方式处理的小麦基因型 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达模式,研究表明不同辐照方式下 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的响应模式不同。京 411 中, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对 γ 射线辐照表现出抛物线型的响应模式;济麦 22 中, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对 γ 射线辐照表现出对数型的响应模式。与本研究结果中幂函数关系的基因型结果一致。崔孟^[23]以 γ 射线辐照的邯 6172 和京 411 为试验材料,研究表明邯 6172 和京 411 中 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对 γ 射线辐照应答模式并不相同;*TaKu70* 基因相对表达量变化不明显, *TaKu80* 基因相对表达量上调。与本研究中对数函数关系的基因型结果一致。韩冰等^[8]以 γ 射线辐照的 63 份小麦基因型(系)中的 16 份风干种子为试验材料,研究表明 5 日龄小麦幼苗 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因在敏感型基因型中诱导表达显著,钝感型的基因型中除了少数基因型之外,处理组的相对表达量与对照组相当,诱导表达不显;16 份试验材料中部分基因型 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的相对表达量与本研究结果一致。相比前期对 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因应答模式的研究,本研究以小麦微核心种质为试验材料,样本量大,遗传多样性复杂,并首次以损伤剂量函数的不同对 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达进行分析,探讨 DNA 损伤修复系统在不同基因型中的作用。

在 γ 射线对生物体造成的各种损伤中,DSBs 是最常见也是最严重的辐射损伤之一。在 DSBs 的修复途径中,Ku70、Ku80 蛋白以异源二聚体 Ku 蛋白的形式发挥关键作用。*Ku70* 和 *Ku80* 基因作为 NHEJ 中关键基因,如果产生突变或者损伤,会导致机体修复过程中断或者减弱。本研究结果表明, *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因在敏感型不同的基因型中表达明显不同;同一基因型内,随着 γ 射线辐照剂量的增加,不同函数关系的基因型 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的表达呈现不同的趋势。小麦微核心种质的损伤剂量函数关系不同,其辐射敏感性也不同,其 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因对 γ 射线辐照处理表现出不同的响应模式。

参考文献

- [1] 王琳清,陈秀兰,柳学余.小麦突变育种学[M].北京:中国农业科学技术出版社,2004;2-3
- [2] 刘录祥.航天工程育种技术创新与产业发展现状[J].蔬菜.2012(9):1-4
- [3] 郭会君,刘录祥,韩微波,等.高能混合粒子场辐照小麦的突变效应分析[J].中国农业科学.2008,41(3):654-660
- [4] 刘录祥,郭会君,赵林妹,等.我国作物航天育种 20 年的基本成就与展望[J].核农学报.2007,21(6):589-592
- [5] 郝晨阳,董玉琛,王兰芬,等.我国普通小麦核心种质的构建及遗传多样性分析[J].科学通报.2008,53(8):908-915
- [6] 张学勇,童依平,游光霞,等.选择牵连效应分析:发掘重要基因的新思路[J].中国农业科学.2006,39(8):1526-1535
- [7] 王重荣.中国水稻微核心种质遗传多样性分析与新基因发掘[D].华中农业大学,2011
- [8] 韩冰.基于 γ 射线辐照的不同小麦基因型辐射敏感性分析[D].青岛:青岛农业大学,2014
- [9] 冯志杰,王琳清.普通小麦基因型辐射敏感性及其诱变效应的研究[C].中国核科技报告,1986;818-838
- [10] 冯志杰.高等植物的辐射敏感性[C].中国核科技报告,1992:755-765
- [11] Singh B, Ahuja S, Singhal R K, et al. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization[J]. J Radioanal Nucl Ch, 2013, 298(1):249-257
- [12] Singh B, Ahuja S, Singhal R K, et al. Radiosensitivity Studies and Radiostability of Ribulose-1,5 Bis-Carboxylase and Gas Exchange Characteristics in Wheat, Garden Pea, Field Pea, Spinach, and Okra[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2014, 225(1):1815-1822
- [13] Kim J, Kim S H, Ha B, et al. Differentially expressed genes in response to gamma-irradiation during the vegetative stage in Arabidopsis thaliana[J]. Mol Biol Rep. 2014, 41(4):2229-2241
- [14] Hefner E, Preuss S B, Britt A B. Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1[J]. Exp Bot, 2003, 54, 669-680
- [15] Lisa P, Cristina G. Ku80 removal from DNA through double strand break induced ubiquitylation[J]. Mol Cell Biol, 2008, 3, 467-479.
- [16] Moore J K, Haber J E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end joining repair of double strand breaks in Saccharomyces cerevisiae[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(5):21,64-73.
- [17] Tamura K, Adachi Y, Chiba-K, et al. Identification of Ku70 and Ku80 homologues in Arabidopsis thaliana: evidence for a role in the repair of DNA double strand breaks[J]. The Plant J, 2002, 29(6):771-781.
- [18] Bundock P, AttiKum H V, HooyKaas P, et al. Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an Arabidopsis Ku70 mutant[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 15(30):3395-3400
- [19] Friesner J, Britt A B. Ku80-and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration[J]. Plant, 2003, 34, 427-440
- [20] 朱彩霞,古佳玉,刘录祥,等.小麦 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的克隆和分析[J].核农学报,2009,23(6):917-922
- [21] Gu J Y, Wang Q, Cui M, et al. Cloning and characterization of *Ku70* and *Ku80* homologues involved in DNA repair process in wheat[J]. Plant Genet Resour, 2014, 12(S1):99-103
- [22] 王庆.小麦 DNA 损伤修复基因 *TaXRCC4*, *TaKu70* 和 *TaKu80* 的克隆及分析[D].青岛:青岛农业大学,2011
- [23] 崔孟.小麦 NHEJ 途径中 *TaKu70* 和 *TaKu80* 基因的功能和表达分析[D].青岛:青岛农业大学,2012
- [24] 韩冰,古佳玉,赵林妹,等.不同小麦基因型对 γ 射线辐照敏感性的分子解析[J].植物遗传资源学报,2014,15(6):1342-1347
- [25] 徐锡虎,徐建龙.不同类型水稻基因型(系)的辐射敏感性研究[J].浙江农业科学,2000(6):3-5