

^{60}Co 辐照对水稻基因组 DNA 诱变的分子生物学效应*

向太和^{1, 2)}** 杨剑波²⁾ 杨前进³⁾ 朱启升³⁾

李莉²⁾ 倪大虎²⁾ 汪秀峰²⁾ 黄大年^{4, 1)}

(¹⁾浙江大学生命科学院, 杭州 310012; ²⁾安徽省农业科学院水稻研究所, 农业部水稻遗传育种重点开放实验室, 合肥 230031;

³⁾安徽省农业科学院绿色食品工程研究所, 合肥 230031; ⁴⁾中国水稻研究所, 杭州 310006)

摘要 以水稻品种农林 8 号及其 ^{60}Co γ 射线辐照突变体农林 8 号 m 为研究材料, 选用 360 个 10 碱基寡核苷酸随机引物, 利用随机扩增多态性 DNA 标记技术筛选出 1 个引物 OPG18 在农林 8 号和农林 8 号 m 之间表现出共显性的多态性. 通过对该共显性标记的克隆和序列分析表明, 突变体农林 8 号 m 与农林 8 号相比有 29 bp DNA 片段的缺失. 研究结果为 ^{60}Co γ 射线辐照导致植物基因组 DNA 缺失提供了一个最直接明确的证据.

关键词 辐照, 水稻, 基因组 DNA, 诱变, DNA 缺失

学科分类号 Q345, Q691.8

^{60}Co γ 射线诱变在农作物育种中起着非常重要的作用, 通过 ^{60}Co 辐照已选育出很多在生产上广为应用的农作物品种或特殊的育种材料^[1, 2]. 辐照育种的理论基础是辐照处理能诱发生物体各种遗传变异, 有研究报道辐照可导致细胞中染色体数目或结构的变化, 以及 DNA 分子大片段的缺失、重排等^[3~12], 但这些报道多集中在动物和微生物中. 水稻由于具有较小的基因组而成为单子叶植物研究的模式植物^[13]. 本文以水稻品种农林 8 号 (Norin 8, N8) 及其辐照突变体农林 8 号 m (Norin 8m, N8m) 为研究材料, 利用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术和序列分析, 研究 ^{60}Co γ 射线辐照对高等植物基因组 DNA 的分子生物学效应.

1 材料和方法

1.1 实验材料

水稻品种农林 8 号及农林 8 号 m 由日本育种学会原会长武田元吉先生赠送、安徽省农业科学院绿色食品工程研究所隔离繁殖.

1.2 基因组 DNA 的提取

参见卢扬江、郑康乐的方法^[14]. 供试种子 26℃发芽至 4 叶期, 取幼苗 1~2 g 剪碎, 立即加液氮研碎后置于 50 ml 离心管中, 加 20 ml DNA 抽提液 (100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA,

500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS), 60℃水浴 1 h 后, 37℃振荡 (60 r/min) 20 min, 加等体积的氯仿:乙醇:异戊醇 (80:16:4) 轻轻摇匀, 离心 10 min (4℃、11 000 r/min), 取上层液相用等体积的异丙醇沉淀, 70% 乙醇清洗 2 次, 用 RNase 酶降解 RNA, 纯化后溶于无菌的双蒸馏水中、贮于 -20℃备用.

1.3 RAPD 反应及电泳

方法同文献 [15], 即 RAPD 反应体积为 35 μL , 其中包括 0.1 mmol/L dNTP 混合物, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 10 碱基寡核苷酸随机引物 (美国 Operon 公司产品), 2U Taq DNA 聚合酶和 50 ng 左右水稻基因组 DNA, 用 PE9600 DNA 扩增仪 (美国 Perkin-Elmer 公司产品) 进行扩增, 反应程序为: 94℃ 1 min、36℃ 1 min、72℃ 2 min, 35 个循环, 循环结束后在 72℃下延伸 5 min. 扩增产物在 1.4%~2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5~4 h (5 V/cm), 以 λ DNA/ (EcoRI + Hind III) 为 DNA 分子质量标记, 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色, 紫外灯下观察, 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad

* 国家自然科学基金 (19890300) 和安徽省自然科学基金资助项目 (00041110).

** 通讯联系人.

Tel: 0551-5146549, E-mail: bioinfo@mail.hf.ah.cn

收稿日期: 2002-03-04, 接受日期: 2002-04-15

公司产品) 拍照记录.

1.4 RAPD 标记的重扩增和克隆

RAPD 标记产物电泳后, 用干净的解剖刀片切下含多态性标记的琼脂糖胶块, 放入 1.5 ml Eppendorf 管中, 于 -20°C 冰箱中过夜冻融, 取上层液相作为模板在相同的 RAPD 反应条件下再扩增 1 次, 重扩增产物电泳后切取含标记带的琼脂糖胶块, 用 QIAEX II DNA 提取试剂盒 (美国 Qiagen 公司产品) 提纯. 多态性片段经连接反应连接到载体 pCR^{TM2.1} (美国 Invitrogen 公司产品), 按使用说明进行连接反应, 分别用 CaCl_2 法和冻融法^[16] 制备和转化感受态细胞 InVaF', 在 LB+ Km (50 mg/L) + X-gal 的培养基上筛选白色单菌落, 用质粒提取试剂盒 (上海 Sangon 公司产品) 提取质粒 DNA, 用于酶切鉴定和测序.

1.5 多态性标记的序列测定

用 ABI3700 型 DNA 自动测序仪 (美国 Perkin Elmer 公司产品) 测定多态性标记的 DNA 碱基序列.

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记

利用 360 个 10 碱基寡核苷酸随机引物 (美国 Operon 公司编号为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z 系列引物) 进行 RAPD 分析. 有 344 个引物能扩增出 1~10 余条不等、肉眼可辨的谱带, 有 11 个引物未能扩增出任何条带, 有 5 个引物扩增结果弥散 (smear), 其中有 1 个引物 OPG18 在农林 8 号和农林 8 号 m 之间扩增出共显性的多态性标记 (图 1), 分别记作

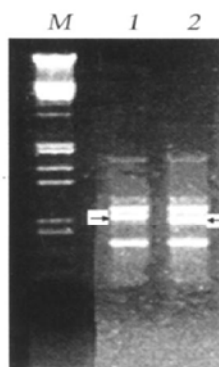


Fig. 1 Co-dominant polymorphic markers amplified with OPG18 from Norin8 and Norin8m

polymorphic fragments noticed with arrows; M: λ DNA/ (*EcoRI* + *HindIII*) DNA marker; 1: Norin8; 2: Norin 8m.

OPG18/972 和 OPG/943.

2.2 多态性标记的克隆

OPG18/972、OPG/943 经重扩增、纯化, 连接到质粒载体 pCR^{TM2.1}, 转化感受态细胞 InVaF', 在 LB+ Km (50 mg) / L+ X-gal 上筛选白色单菌落, 经提取质粒 DNA、*EcoRI* 酶切鉴定表明筛选的单菌落为阳性克隆子 (图 2).

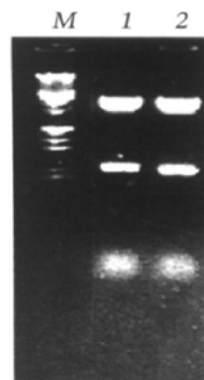


Fig. 2 Plasmid DNA of OPG18/972 and OPG18/943 clones from Norin8 and Norin8m cut with *EcoRI*

M: λ DNA/ (*EcoRI* + *HindIII*) DNA marker; 1: Norin8; 2: Norin 8m.

2.3 多态性标记的序列测定和分析

多态性标记经 DNA 自动序列分析仪测定结果见图 3. 多态性标记 OPG18/972 和 OPG18/943 两端起始 10 bp 均与引物 OPG18 碱基相同或反向互补. 其中 OPG18/972 和 OPG18/943 的 1~862 bp、OPG18/972 的 892~972 bp 和 OPG18/943 的 863~943 bp 完全相同, OPG18/943 比 OPG18/972 仅少连续的 29 bp (TGGAACGGAAGAAGTATAT-ATACACCCTA), 特别值得注意的是该缺失片段中含有启动子 TATA box 序列, 此外 OPG18/943 和 OPG18/972 中均含有 (AC)₈、(CA)₈、(ATCC)₄、(AATT)₅、TA₈TA₈ 等微卫星 (microsatellite) 重复序列 (图 3 中以黑体标出). 通过联网到美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 使用 Blast 软件与 GenBank 中序列进行同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)^[17], 其 748~799 bp 与水稻 BAC 克隆 OJ111-G12 (序列登记号 AP003337) 62 424~62 373 bp 比较, 52 bp 中有 51 bp 相同, score 得分为 91.1; 其 748~803 bp 与水稻 *adh1*~*adh2* (序列登记号 AF172282) 中 208 655~208 710 比较,

56 bp 中有 53 bp 相同, score 得分为 89.7, 未发现高度同源性的功能基因或序列. 通过 ORF Finder 软件分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>), 两个序列最大的 ORF (open reading frame) 是 6~134 bp, 仅含 129 bp, 对应的氨基酸序列为 MCMHAYCVTDQFIFIFFKNTHTHTNTMYST-

TIVDRYLRAVV; 而其 524~327 bp 的互补链为含 198 bp 的 ORF, 对应的氨基酸为 MDGWIDR-KLETMELSLARVLLVQGPDPDALHVCAMEA-TPPPLLQRRRPDVAMTPTPTPFSFLSF. 经与 GenBank 中进行同源性搜索, 未发现同源性的肽或蛋白质.

OPG18/972	GGCTCATGTGCATGCATGCTTACTGTGTAACCGATCAGTTCATATTTATCTTTTTTTTAAAAACACACACACACACAATACC	86
OPG18/943	GGCTCATGTGCATGCATGCTTACTGTGTAACCGATCAGTTCATATTTATCTTTTTTTTAAAAACACACACACACACAATACC	86
OPG18/972	ATGTACTCCACTACAATTGTAGATAGATACCTTAGAGCAGTGGTGTAGTTAGAATTTCTCACGCCTAAAGCACAAGTAGTATAAT	172
OPG18/943	ATGTACTCCACTACAATTGTAGATAGATACCTTAGAGCAGTGGTGTAGTTAGAATTTCTCACGCCTAAAGCACAAGTAGTATAAT	172
OPG18/972	TTACATAATTTACCTTTATTTTTCGTGTGTTTGAAGTTTTTAAATGTAACTTTAAATAGATATTTAAGCTTAGGGCAACAGCCCTAA	258
OPG18/943	TTACATAATTTACCTTTATTTTTCGTGTGTTTGAAGTTTTTAAATGTAACTTTAAATAGATATTTAAGCTTAGGGCAACAGCCCTAA	258
OPG18/972	CTGCCCTACCCAGTTTTTCGTCACCTGCGCCTAGAGAAATATACCTTTTTTTTTTAAAAAAGAAAAACACTAAAAAGAAAGAAAGA	344
OPG18/943	CTGCCCTACCCAGTTTTTCGTCACCTGCGCCTAGAGAAATATACCTTTTTTTTTTAAAAAAGAAAAACACTAAAAAGAAAGAAAGA	344
OPG18/972	AAAAGGAGTAGGAGTCGGCGTCATGGCCACGTCAGGCCGGCGTCGCTGCAGCAGCGGGTGGCGTGGCCTCCATTGCGCATACAT	430
OPG18/943	AAAAGGAGTAGGAGTCGGCGTCATGGCCACGTCAGGCCGGCGTCGCTGCAGCAGCGGGTGGCGTGGCCTCCATTGCGCATACAT	430
OPG18/972	GGAGAGCATCCGGCTGATCTGGTCCCTGTACTAGCAGAACCTAGCTAAGCTTAGCTCCATTGTCTCCAACCTGCGATCGATCCAT	516
OPG18/943	GGAGAGCATCCGGCTGATCTGGTCCCTGTACTAGCAGAACCTAGCTAAGCTTAGCTCCATTGTCTCCAACCTGCGATCGATCCAT	516
OPG18/972	CCATCCATCCATTAATTTCCGCGATCCAATCGAACACGATATGTGTAAAGCTATAGCATATCTACAGTCACTCCATGCTGCACCG	602
OPG18/943	CCATCCATCCATTAATTTCCGCGATCCAATCGAACACGATATGTGTAAAGCTATAGCATATCTACAGTCACTCCATGCTGCACCG	602
OPG18/972	CACAAAACACTCTAATCAGAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	688
OPG18/943	CACAAAACACTCTAATCAGAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	688
OPG18/972	TGTCGTTTGACCGCACATCTTATTTAACGAATTTATAAAAAAATAAAAAAAGTCGCGCATAAAAATATTATTCATGTTTTATCAT	774
OPG18/943	TGTCGTTTGACCGCACATCTTATTTAACGAATTTATAAAAAAATAAAAAAAGTCGCGCATAAAAATATTATTCATGTTTTATCAT	774
OPG18/972	CTAATAGCAACAAAAATACTAATCAAAAAGTTTAAACAAAACGAACGATCAAACTTTAGACATAGAAATCCACATACATACTTAA	860
OPG18/943	CTAATAGCAACAAAAATACTAATCAAAAAGTTTAAACAAAACGAACGATCAAACTTTAGACATAGAAATCCACATACATACTTAA	860
OPG18/972	AATGGAACGGAAGAAGTATATATACACCTAGTTTACGACCTTAATTAGTCTACTCCCCTGGACACTGCCCTCTTCTTTAATTAA	946
OPG18/943	AA-----GTTTACGACCTTAATTAGTCTACTCCCCTGGACACTGCCCTCTTCTTTAATTAA	946
OPG18/972	CTAAATAATTAATTAACACATGAGCC	1032
OPG18/943	CTAAATAATTAATTAACACATGAGCC	1032

Fig. 3 Sequences of polymorphic fragments OPG18/972 and OPG18/943 (5' → 3')

通过与中国科学院基因组信息中心公布的水稻全基因组框架序列进行 blast 比较 (<http://www.genomics.org.cn> 和 <http://btn.genomics.org.cn/rice>). OPG18/972、OPG18/943 的序列与水稻全基因组框架序列中的 contig10968 的 826~1805 bp

高度同源 (图 4); 并且 contig10968 和 OPG18/972 一致, 与突变体农林 8 号 m OPG18/943 序列相比, OPG18/943 在相同位置表现 29 bp 的缺失 (缺失片段部分在图 4 中用黑斜体标出).

```

OPG18/972 : 2      GCTCATGTGCATGCATGCTTACTGTGTAACCGATCAGTTCATATTTATCTTTTTTTTAA 61
|||
Contig10968:826   GCTCATGTGCATGCATGCTTACTGTGTAACCGATCAGTTCATATTTATCTTTTTTTTAAA 885

OPG18/972 : 62      AAACACACACACACACAAATACCATGTACTCCACTACAATTGTAGATAGATACCTTAG 121
| |||
Contig10968:886   ACACACACACACACACAAATACCATGTACTCCACTACAATTGTAGATAGATACCTTAG 945

OPG18/972 : 122     AGCAGTGGTGTAGTTAGAATTTCTCAGCCTAAAGCACAACTAGTATAATTTACATAAT 181
|||
Contig10968:946   AGCAGTGGTGTAGTCAGAATTTCTCAGCCTAAAGCACAACTAGTATAATTTACATAAT 1005

OPG18/972 : 182     TTACCTTTATTTTCGTGTTTTGAAGTTTTAAATGTAACTTTTAATAGATATTTAAGCT 241
|||
Contig10968:1006  TTACCTTTATTTTCATGTTTTGAAGTTTTAAATGTAACTTTTAATAGATATTTAAGCT 1065

OPG18/972 : 242     TAGGGCAACAGCCCTAACTGCCCTACCCAGTTTTTCGTCACTGCGCCTAGAGAAATATACC 301
|||
Contig10968:1066  TAGGGCAACAGCCCTAACTGCCCTACCCAGTTTTTCGTCACTGCGCCTAGAGAAATATACC 1125

OPG18/972 : 302     TTTTTTTT--AAAAAAAAGAAAAACACTAAAAAGAAAGAAAAAGAAAGGAGTAGGAGT 359
|||
Contig10968:1126  TTTTTTTTAAAAAAAAGAAAAACACTAAAAAGAAAGAAAAAGAAAGGAGTAGGAGT 1185

OPG18/972 : 360     CGGCGTCATGGCCACGTCAGGCCGGCGTCGCTGCAGCAGCGCGGTGGCGTGGCCTCCAT 419
|||
Contig10968:1186  CGGCGTCGTCGGCCACGTCAGGCCGGCGTCGCTGCAGCAGCGCGGTGGCGTGGCCTCCAT 1245

OPG18/972 : 420     TGGCATAACATGGAGAGCATCCGCTGATCTGGTCCCTGTACTAGCAGAACCCCTAGCTAA 479
|||
Contig10968:1246  TGGCATAACATGGAGAGCATCCGCTGATCTGGTCCCTGTACTAGCAGAACCCCTAGCTAA 1305

OPG18/972 : 480     GCTTAGCTCCATTGTCTCCAACCTGCGATCGATCCATCCATCCATTAATTTCCGCG 539
|||
Contig10968:1306  GCTTAGCTCCATTGTCTCCAACCTGCGATCGATCCATCCATCCATTAATTTCCGCG 1365

OPG18/972 : 540     ATCCAATCGAACCACGATATGTGTAAAGCTATAGCATATCTACAGTCACTCCATGCTGCA 599
|||
Contig10968:1366  ATCCAATCGAACCACGATATGTGTAAAGCTGTAGCATATCTACAGTCACTCCATGCTGCA 1425

OPG18/972 : 600     CCGCACAAAACACTCTAATCAG-----AATTAATTAATTAATTAATTATATAATCAT 651
|||
Contig10968:1426  CCGCACAAAACACTCTAATCAGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTATATAATCAT 1485

OPG18/972 : 652     CCATCCTATTTTAAATACATTAGCGGGTTTCCGTGTTTGTGCTTTGACCGCACATCTTAT 711
|||
Contig10968:1486  CCATCCTATTTTAAATACATTAGCGGGTTTCCGTGTTTGTGCTTTGACCGCACATCTTAT 1545

OPG18/972 : 712     TTAACGAATTTATAAAAAAATAAAAAAAGTCGCGCATAAATATTATTCATGTTTTAT 771
|||
Contig10968:1546  TTAACGAATTTATAAAAAAATAAAAAAAGTCGCGCATAAATATTATTTATGTTTTAT 1605

OPG18/972 : 772     CATCTAATAGCAACAAAAATACTAATCAAAAAGTTTAAACAAAACGAACGATCAAACTT 831
|||
Contig10968:1606  CATCTAATAGCAACAAAAATACTAATCAAAAAGTTTAAACAAAACGAACGATCAAGCTT 1665

OPG18/972 : 832     TAGACATAGAAATCCACATACATACTTAAAA TGGAAACGGAAGATATATATACACCCTA 891
|||
Contig10968:1666  TAGACATAGAAATCAACATACATACTTAAAA TGGAATGGAAGATATATATACACCCTA 1725

OPG18/972 : 892     GTTTACGACCTTAATTAGTCCTACTCCCTGGACACTGCCCTCTTCTTTAATTAACATAA 951
|||
Contig10968:1726  GTTTACGACCTTAATTAGTCCTACTCCCTGGACACTGCCCTCTTCTTTAATTAACATAA 1785

OPG18/972 : 952     TAATTAATTAACACATGAGC 971
|||
Contig10968:1786  TAATTAATTAACACATGAGC 1805

```

Fig. 4 Sequences of OPG18/972 blast with rice contig10968 from a draft sequence of the rice genome

3 讨 论

RAPD 标记技术是 1990 年 Williams 等建立的一种分子标记技术, RAPD 标记通常是显性的, 带的缺失可能是由于引物结合位点的缺失、改变或在引物结合位点间有碱基插入使距离过大而不能扩增^[18]. 虽然多数 RAPD 标记是显性, 但也有共显性的 RAPD 标记报道^[19, 20], 共显性多态性可能是在引物结合位点之间具有一个或多个插入或缺失片段. 本研究结果证实, 突变体农林 8 号 m OPG18/943 比其辐照前亲本农林 8 号 OPG18/972 位点有 29 bp 的缺失. 我们将报道 OPG18/972 和 OPG18/943 为一对等位点, 且在基因组中为单拷贝序列. 并且, 农林 8 号 OPG18/972 和其突变体农林 8 号 m OPG18/943 位点分别在不同的水稻品种, 如恢复系 H121 和其近等基因系 Hben 121 (Hben 121 为 H121 与农林 8 号 m 杂交后再回交选育所得) 中稳定遗传和表现 (《植物学报》2002 年第 44 卷待发表). 特别是与中国水稻基因组计划公布的水稻全基因组框架序列进行生物信息学比较分析表明, 突变体 OPG18/943 与同源性跨叠克隆群 contig10968 及 OPG18/972 相比, 在相同位置均表现 29 bp 的缺失. 因此, 可以说明, 突变体农林 8 号 m OPG18/943 比其辐照亲本农林 8 号 OPG18/972 位点缺失 29 bp 是由⁶⁰Co γ 射线辐照所致. 该结果为⁶⁰Co γ 射线辐照导致植物基因组 DNA 较大片段的缺失提供了一个最直接明确的证据.

值得一提的是, 农林 8 号 m 和农林 8 号在性状上表现为对除草剂苯达松 (Bentazon) 反应的差异, 即农林 8 号 m 表现为对苯达松敏感致死, 农林 8 号及其他水稻品种均表现为抗性^[21]. 本研究表明农林 8 号 m 比农林 8 号在基因组 DNA 的等位点表现出 29 bp 的缺失, 而该缺失片段含有启动子中的保守序列 TATA box, 其缺失是否影响某种功能基因的正常转录, 进而导致农林 8 号 m 对苯达松抗性的丧失, 我们将作进一步深入研究.

致谢 安徽省农业科学院赵成松研究员对序列的分析提供帮助, 深表谢忱.

参 考 文 献

- 王琳清. 我国辐射育成的农作物品种. 原子能农业应用, 1985, (1): 1~9
Wang L Q. Application of Atomic Energy in Agriculture, 1985, (1): 1~9
- 闵绍楷, 申宗坦, 熊振民. 水稻育种学, 北京: 中国农业出版社, 1995. 172~209
Min S K, Shen Z T, Xiong Z M. Rice Breeding. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1995. 172~209
- Nikonova L V, Neliporich P A, Umansky S R. The involvement of nuclear nucleases in rat thymocyte DNA degradation after gamma irradiation. Biochim Biophys Acta, 1982, **699** (3): 281~289
- Tindall K R, Stein J, Hutchinson F. Change in DNA base sequence induced by gamma-ray mutagenesis of lambda phage and prophage. Genetics, 1988, **118** (4): 551~560
- Jaberaboansari A, Landis M R, Wallen C A, *et al.* Alterations of neuronal nuclear matrix and chromatin structure after irradiation under aerobic and anoxic conditions. Radiat Res, 1989, **119** (1): 57~72
- Mudgett J S, Taylor W O. Recombination between irradiated shuttle vector DNA and chromosomal DNA in African green monkey kidney cells. Mol Cell Biol, 1990, **10** (1): 37~46
- Frisman E, Zarubina O. Effect of gamma irradiation on the conformation of the native DNA molecule. Biophys Chem, 1993, **46** (1): 37~46
- Ban N, Kai M, Kusama T. Chromosome aberrations in bone marrow cells of C3H/He mice at an early stage after whole-body irradiation. J Radiat Res (Tokyo), 1997, **38** (4): 219~231
- Takahashi N, Hied K, Morohoshi F, *et al.* Base substitution spectra of nalidixylate resistant mutations induced by monochromatic soft X and ⁶⁰Co gamma rays in Bacillus subtilis spores. J Radiat Res (Tokyo), 1999, **40** (2): 115~124
- Koide N, Matsumoto Y, Kosugi S, *et al.* Accumulation of recombinant chromosomes and low fidelity of transmission of chromosome X DNA markers in gamma-ray-induced lymphomas lacking p53. Mol Carcinog, 1999, **24** (1): 57~63
- Moreno S G, Dutrillaux B, Coffigny H. Status of p53, p21, mdm2, pRb proteins, and DNA methylation in gonocytes of control and gamma irradiated rats during testicular development. Biol Reprod, 2001, **64** (5): 1422~1431
- Fukamachi S, Shimada A, Naruse K, *et al.* Genomic analysis of gamma-ray-induced germ-cell mutations at the b locus recovered from the medaka specific-locus test. Mutat Res, 2001, **458** (1~2): 19~29
- Arumeganathan K, Eark E D. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Reporter, 1991, **9** (1): 208~218
- 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, **6** (1): 47~48
Lu Y J, Zheng K L. Chin J Rice Sci, 1992, **6** (1): 47~48
- 向太和, 汪秀峰, 李莉, 等. 利用 RAPD 标记对我国主栽的油优杂交稻和其亲本进行区别和鉴定. 作物学报, 2000, **26** (3): 292~296
Xiang T H, Wang X F, Li L, *et al.* Acta Agronomica Sinica, 2000, **26** (3): 292~296
- Sambrook F, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Clones: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Gold Spring Harbor Press, 1989. 1.74~1.104
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997, **25**: 3389~3402
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, **18**: 6531~6535
- Davis T M, Yu H, Haigis K M, *et al.* Template mixing: a method of enhancing detecting and interpretation of codominant

- RAPD markers. Theor Appl Genet, 1995, **91**: 582~ 588
- 20 郑翠明, 常汝镇, 邱丽娟. 大豆对 SMV3 号株系的抗性遗传分析及抗病基因的 RAPD 标记研究. 中国农业科学, 2001, **34** (1): 14~ 18
- Zheng C M, Chang R Z, Qiu L J. Scientia Agricultura Sinica, 2001, **34** (1): 14~ 18
- 21 陈忠明, 邹江石, 曾大力, 等. 水稻农林 8 号 m 苯达松敏感致死性的遗传及其应用前景. 杂交水稻, 1999, **14** (2): 39~ 40
- Chen Z M, Zou J S, Zeng D L, *et al.* Hybrid Rice, 1999, **14** (2): 39~ 40

Molecular Biological Effect of ^{60}Co Gamma-ray Irradiation on Rice Genome DNA*

XIANG Tai-He^{1,2)**}, YANG Jian-Bo²⁾, YANG Qian-Jin³⁾, ZHU Qi-Sheng³⁾,
LI Li²⁾, NI Da-Hu²⁾, WANG Xiu-Feng²⁾, HUANG Da-Nian^{4,1)}

(¹⁾ Life College of Zhejiang University, Hangzhou 310012, China; (²⁾ Rice Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding of The National Agriculture Ministry, Hefei 230031, China;

(³⁾ Natural Nourishing Food Engineering Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;

(⁴⁾ China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract A total of 360 arbitrary 10-mer oligonucleotide primers were screened using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique on the genome DNA of Norin 8 and its ^{60}Co gamma-ray irradiation mutant Norin 8m. One primer OPG18 produced co-dominant polymorphic markers OPG18/972 and OPG18/943 from Norin 8 and Norin 8m. Based on the clones and sequences of the OPG18/972 and OPG18/943, it shows that a 29 bp DNA fragment in the genome DNA of Norin 8m is deleted. The results directly confirmed the fact that ^{60}Co gamma-ray irradiation can induced a bigger DNA fragment deletion of plant genome DNA.

Key words ^{60}Co gamma-ray irradiation, rice (*oryza sativa*), genome DNA, mutagenesis, DNA fragment deletion

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation (19890300) and Anhui Province Natural Sciences Foundation (00041110).

** Corresponding author. Tel: 86-551-5146549, E-mail: bioinfo@mail.hf.ah.cn

Received: March 4, 2002 Accepted: April 15, 2002