

文章编号: 1007-4627(2013)04-0477-06

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照菘蓝干种子当代效应

陆锡宏^{1,2}, 石广亮³, 李雪虎², 梁剑平², 辛志君²

- (1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730000;
2. 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;
3. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 利用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照菘蓝干种子(辐照剂量为10, 35, 60, 90和140 Gy, 剂量率20 Gy/min), 探讨了重离子束辐照对菘蓝M1代的生物学效应。研究发现, 不同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后, 菘蓝种子的发芽率、成苗率、株高、根长和根冠比等生物学性状以及对菘蓝中靛玉红和4(3H)喹唑酮含量均发生了变化, 其中株高和根长随辐照剂量的增加而降低; 菘蓝叶和根中的4(3H)喹唑酮和靛玉红的含量随辐照剂量增加呈马鞍形增加关系。这表明: $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束辐照菘蓝种子具有明显的当代损伤效应, 并可显著提高菘蓝中靛玉红和4(3H)喹唑酮的含量, 其辐照适宜诱变剂量为35 Gy。

关键词: 菘蓝; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束; 诱变育种; 生物性状

中图分类号: Q691 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.30.04.477

1 引言

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort)系十字花科(*Cruciferae*)菘蓝属两年生草本植物。菘蓝叶和菘蓝根是我国的常用中药, 是清热解毒的代表药物和常用药物。现代药理学研究证明, 菘蓝根与菘蓝叶具有较好的治疗流行性感冒、咽喉肿痛和痈肿疮毒等症之功效, 是我国常用的40种大宗中药材品种之一^[1]。菘蓝的栽培面积逐年扩大, 但栽培品种及产地气候不同, 产量和有效成分含量存在较大差异, 且质量不稳定。现有品种抗病性和抗虫性较差, 个别产地品种退化严重, 影响农民栽培积极性和制剂质量。因此如何生产出产量和质量全优的药材, 成为菘蓝栽培育种的方向^[2]。

重离子是一种新兴的诱发突变源, 由于其在诱变生物学方面的传能线密度(LET)高和独特的电离峰(Bragg峰)、突变谱广、突变性状易稳定且正向突变率高、可精确控制入射深度和部位等独特优势, 而倍受人们的关注, 在生命科学研究领域具有重要的地

位^[3-7]。近年来, 开展了多种植物材料的辐照研究, 在植物诱变育种领域取得了较大的经济和社会效益, 现已成为植物育种的新途径。

在菘蓝栽培育种上多采用电离辐射对菘蓝进行诱变育种, 冯文新等^[8]利用激光辐照菘蓝种子, 种子的生化效应受激光影响较大, 幼苗抗氧化酶系统等均有变化^[8]。陈怡平等^[9-10]利用激光辐照处理板蓝根种子, 均能不同程度提高菘蓝中主要生物碱靛蓝、靛玉红含量和大青叶产量, 但还未有重离子辐照菘蓝的报道。我们利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照菘蓝种子, 系统研究了其对M1植株的生物学性状和次生代谢产物含量等方面的影响, 探讨其在菘蓝品种改良上的应用。

2 材料与方法

2.1 材料

菘蓝种子(已经过两个世代的纯化试验)2008年6月采于兰州复兴厚药材有限责任公司的古浪标准化中药材种植基地, 经甘肃农业大学农学院药用植物研室

收稿日期: 2012-12-21; 修改日期: 2013-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11105194), 中国科学院百人计划资助项目(O861010ZY0)

作者简介: 陆锡宏(1974-), 男, 江苏无锡人, 硕士研究生, 助理研究员, 从事辐照药物学及新药研发研究。

通信作者: 梁剑平, E-mail: liangjp100@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>

晋小军研究员鉴定为十字花科(*Cruciferae*) 菘蓝属两年生草本植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort) 于 4 °C 冰箱保存待用, 植物种子标本保存于中国科学院近代物理研究所重离子辐照药物研发中心。

2.2 辐照方法

辐照实验在兰州重离子研究装置(HIRFL)生物辐照终端上进行。初始能量为 270 MeV/u 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束经过束流管道的镍窗、电离室、空气和降能片后照射样品(植物种子), 用空气电离室监测注入量, 样品更换和数据获取均由计算机控制, 全部过程在室温和大气环境条件下进行, 辐照剂量分别为 10, 35, 60, 100 和 140 Gy, 剂量率为 20 Gy/min, 没有辐照的种子为对照。

2.3 大田实验

把不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子照射的菘蓝种子(10 Gy: 1 200 粒, 35 Gy: 1 142 粒, 60 Gy: 1 214 粒, 100 Gy: 1 080 粒, 140 Gy: 1 025, 对照: 1 500 粒), 于 2011 年 4 月 8 日播种在中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所的试验田。每个辐照剂量的种子先温室育苗 40 d 后按辐照剂量随机移栽入试验田小区。每小区面积约 4 m×6 m, 行距 15 cm, 株距 8 cm。试验地肥力均匀, 地形平整, 每小区除种子的辐照剂量有差异外, 其他各条件基本保持一致。

2.4 菘蓝醇溶性提取物制备

种植 6 个月后即当年十月中旬一次采收菘蓝。每次随机抽取 10 株进行产量和品质指标的测定。本文按照 2010 年版《中华人民共和国药典》附录 XA, 用乙醇热浸法进行提取计算 60 °C 水浴蒸干, 提取物用色谱甲醇定容于 25 mL 容量瓶中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液作为供试菘蓝根菘蓝叶样品溶液, 做好标记, 冰柜(-20 °C)保存备用。

2.5 指标测定

(1) 发芽率的测定

根据《农作物种子检验规程》GB/T 3543.4-1995 标准的规定, 测定种子发芽试验的材料有无菌滤纸和细沙, 特殊情况用土壤。本试验采用直径 9 cm 培养皿纸上发芽法 5 次重复, 每重复 50 粒种子放于一个平皿中, 25 °C 下进行发芽。6 d 后统计发芽势, 14 d 后统计发芽率。发芽率 = 正常发芽的种子数/供测定

种子粒 × 100%。

(2) 辐照后幼苗的株高、根长测定

测量培养 7 d 的幼苗, 生长点以下为根长, 以上为株高, 每个辐照剂量组随机统计 20 株。

(3) 菘蓝中靛玉红、喹唑酮含量测定

高效液相色谱法测定, 仪器: WATERS2695 型高效液相色谱仪, WATERS 2998 PAD (Photodiode Array Detector) 检测器, 色谱柱: WATERS-Xterra@MS-C18 型(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 高效液相色谱柱, Part No: 186000494; LOT No.0280392251。靛玉红的含量测定色谱条件: 流动相为甲醇-水(75:25; 流速为 1.0 mL/min、柱温为 35 °C、检测波长为 289 nm。

4(3) H 喹唑酮的含量测定色谱条件: 乙腈: 甲醇: 水(5:20:75)、流速为 0.8 mL/min、检测波长为 225 nm。

(4) 菘蓝重量的测定

种植 6 个月后即当年十月中旬, 根据不同辐照剂量, 在大田每小区随机选取 30 株收取, 各称 3 组, 求平均重量。

2.6 数据处理方法

利用 Excel2003 统计分析软件对不同剂量辐照后的数据进行处理、作图。运用 SPSS 11.5 软件进行方差分析(ANOVA), 数据平均值在 $P = 0.05$ 水平上进行显著性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 高能重离子辐照对菘蓝干种子发芽率的影响

$^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照对发芽率基本没有影响(图 1), 无论是低剂量辐照还是高剂量辐照, 与空白对照相比均无显著差异, 在所选剂量范围均无显著影响。

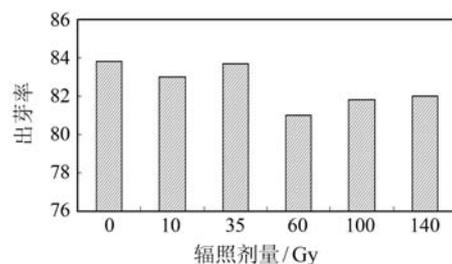


图 1 重离子辐照对发芽率的影响

3.2 高能重离子辐照对菘蓝干种子出苗率的影响

随辐照剂量的增加(图 2) 出苗率呈明显的下降趋

势, 10 Gy 的出苗率较对照降低约 5% ($P < 0.05$), 35, 60 和 100 Gy 的出苗率比对照降低约 50% ($P < 0.01$), 140 Gy 处理的仅有 5% 的出苗率。高剂量辐照处理即使对幼苗萌动没有影响, 但萌动后的幼芽也不能正常生长, 这或许是因为高剂量影响到幼芽的正常代谢, 使其不能继续生长成苗。

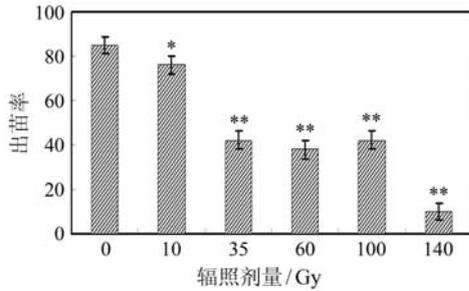


图 2 重离子辐照对出苗率的影响
与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 高能重离子辐照对菘蓝干种子成苗率的影响

幼苗成活率随辐照剂量的增加而逐渐降低(图3), 且各个剂量较空白对照有显著差异, 对照成活率为 82.6%, 10, 35, 60, 100 和 140 Gy 辐照成活率分别为 70.9%, 38.6%, 34.8%, 13.1% 和 0 ($P < 0.01$), 其中 140 Gy 处理观察期内全部死亡, 可见 35 Gy 辐照剂量接近菘蓝种子经辐照后的半致死剂量, 成苗率下降的趋势与出苗率基本一致。

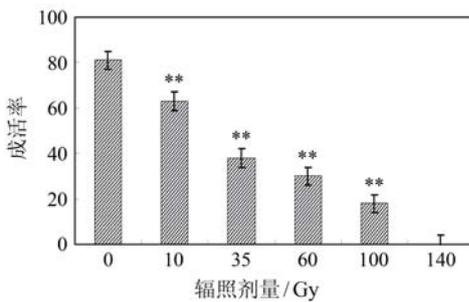


图 3 重离子辐照对成活率的影响
与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.4 高能重离子辐照对菘蓝幼苗根长的影响

$^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照对菘蓝幼苗根长影响显著(图4), 10 Gy 的幼苗根长低于对照约 50% ($P < 0.01$), 35, 60, 100 和 140 Gy 的根长仅为对照的 25% ($P < 0.01$)。可见, 不同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照后, 菘蓝的根长明显低于对照。

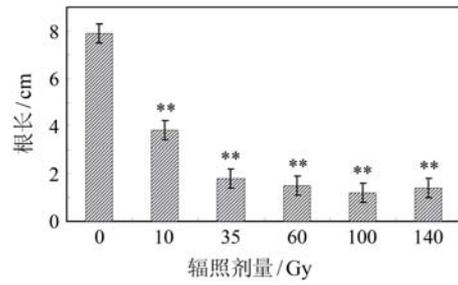


图 4 重离子辐照对幼苗根长的影响
与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.5 高能重离子辐照对菘蓝幼苗株高的影响

$^{12}\text{C}^{6+}$ 不同辐照组与空白对照(0 Gy)相比均显著降低 ($P < 0.05$), 但株高并不随剂量的增加而呈显著相关降低(图5)。10, 35 和 60 Gy 3 个辐照之间差异不显著, 35 Gy 与剂量 100 和 140 Gy 辐照之间差异显著, 140 Gy 辐照与 10 Gy 和 35 Gy 辐照之间差异显著, 与 60 Gy 和 100 Gy 辐照之间不显著。

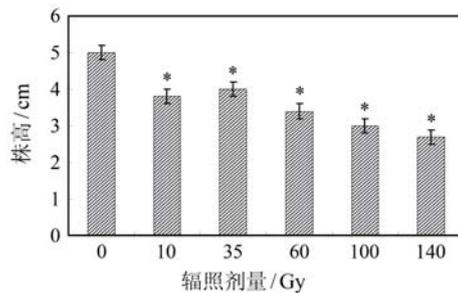


图 5 重离子辐照对株高的影响
与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.6 高能重离子辐照对菘蓝幼苗根冠比的影响

从图6可以看出, 高能重离子辐照对菘蓝幼苗根冠比的影响, 所有辐照与空白对照(0 Gy)相比均显著降低 ($P < 0.05$), 10 Gy 与 35, 60, 100 和 140 Gy 辐照的根冠比差异显著, 但是 35, 60, 100, 140 Gy 4 个辐照之间并无显著差异。

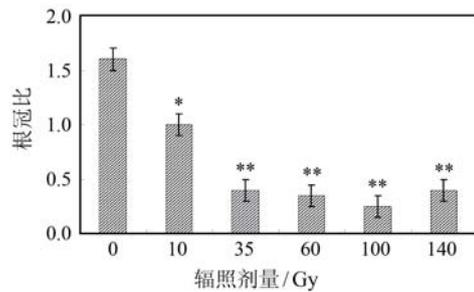


图 6 重离子辐照对幼苗根冠比的影响
与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.7 辐照对菘蓝次生代谢产物积累的影响

辐照对菘蓝次生代谢产物积累的影响数据结果详见表 1。中国药典规定一般采用乙醇浸提物质量代表药材总的次生代谢产物含量。由表 1 可见, 重离子辐照后, 菘蓝根浸出物有所减少, 且随剂量增加, 减少幅度增大, 平均降幅为 5.76%; 低剂量 (10 和 35 Gy) 辐照后叶浸出物含量有微弱增加,

高剂量辐照 (100 Gy) 后叶浸出物含量降低。根靛玉红、根喹唑酮、叶靛玉红和叶喹唑酮的含量变化趋势, 表现为低剂量 (10 和 35 Gy) 显著提高 ($P < 0.01$), 高剂量有所降低。总体看来, 辐照对根喹唑酮的促进作用 (最高增加 122.78%, 平均 60.22%) > 根靛玉红 (98.15%, 44.10%) > 叶靛玉红 (72.92%, 15.55%) > 叶喹唑酮 (18.62%, 1.01%)。

表 1 辐照对菘蓝次生代谢产物积累的影响[#]

剂量/Gy	根靛玉红/%	根喹唑酮/($\mu\text{g/g}$)	根醇浸出物/%	叶靛玉红/%	叶喹唑酮/($\mu\text{g/g}$)	叶醇浸出物/%
CK(0 Gy)	0.004 3	6.78	44.04	0.075	30.82	38.93
10	0.008 6**	14.59**	43.85	0.10	38.56*	39.03
35	0.007 7**	15.12**	41.79	0.13	32.96	39.98
60	0.005 5*	8.28*	40.75	0.068	29.30	38.26
100	0.003 1*	5.50*	39.61	0.041	25.70	38.93

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.8 辐照对鲜、干菘蓝重量的影响

经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束均匀辐照之后, 菘蓝单株叶鲜重、单株根鲜重随 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照剂量的增加呈下降趋势 (表 2), 叶鲜重最高减少 68.92%, 平均减少 52.13%,

各剂量均较对照组有显著差异 ($P < 0.01$); 根鲜重最高下降 70.32%, 平均下降 45.14%, 低剂量 (10 Gy) 辐照后即与对照产生了显著差异 ($P < 0.01$)。而叶、根折干率均未见明显剂量效应。

表 2 辐照对鲜、干菘蓝重量的影响[#]

剂量/Gy	叶鲜重/g	叶折干率/%	根重/g	根折干率/%
CK (0 Gy)	53.36 \pm 2.41	12.86 \pm 0.87	69.68 \pm 3.44	30.06 \pm 4.67
10	34.66 \pm 5.31**	12.42 \pm 0.47	58.08 \pm 2.51**	30.24 \pm 3.77
35	29.61 \pm 4.53**	12.54 \pm 0.98	44.80 \pm 5.85**	29.91 \pm 4.03
60	21.31 \pm 1.06**	12.32 \pm 1.22	29.33 \pm 4.71**	31.13 \pm 2.45
100	16.58 \pm 2.67**	12.57 \pm 1.52	20.68 \pm 4.97**	30.90 \pm 5.07

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

$^{12}\text{C}^{6+}$ 注入菘蓝叶干种子后, 能量和质量的沉积作用于种子内部的遗传物质、营养物质, 首先发生物理直接辐照损伤, 随后发生复杂的物理变化、化学反应和染色体遗传单位损伤, DNA 遗传物质发生重组, 在菘蓝生命活动中必将会引起一系列诱变效应, 这些诱变效应可能是生理性的暂时损伤, 也可能是根本的遗传变异, 研究高能重离子辐照产生的宏观生物学 (长势、产量和形态等农艺学性状) 效应在离子束诱变育种领域有着重要的现实意义和指导作用。

本实验中以菘蓝干种子为材料, 选取了辐照生物学效应中宏观观测指标富有代表性的几个指标进行研

究, 从辐照后菘蓝叶种子生活力的高低和幼苗生长情况两个方面进行评价, 共选取了发芽率、出苗率、株高、成苗率和次生代谢产物含量等指标。实验结果表明, 无论低剂量辐照还是高剂量辐照, 对种子发芽率基本无影响, 同时也未观测到许多文献报道的低剂量辐射促进生长; 所谓的低剂量敏感效应或者兴奋效应认为, 在低辐照剂量下植物生长发育增加, 对出苗率和成苗率影响显著, 一般表现为发芽率提高和生长速度增快以及发芽时间提前等。经高剂量高能重离子辐照 (100 和 140 Gy) 的菘蓝叶干种子, 其生存率较对照组受到了明显的抑制, 出苗率降低显著, 成苗率与空白对照相比差异极显著, 这表明高剂量辐照可能给菘蓝幼苗造成了较大的生理损伤, Yamaguchi 等^[1]在离

子辐照蔷薇科植物和玉米的生物学效应研究中也发现类似结果。大剂量的辐照降低了作物存活率, 同时也不能增加作物的突变频率^[12]。此外, 中等剂量(35和60 Gy)的高能重离子辐照后, 苘蓝幼苗的存活率仍然在40%以上, 接近半致死剂量(LD50), 通过对苘蓝叶幼苗的株高测量发现, 无论是低剂量辐照(10 Gy)还是高剂量辐照(140 Gy), 均显著地抑制了幼苗的生长。其中, 60 Gy辐照的一部分苘蓝叶幼苗虽然能够存活, 但其株高显著降低。另外, 与对照组相比, 高剂量辐照根部容易腐烂, 幼苗萌发过程中根生长受阻。M1出现的上述变化多数为“损伤效应”, 能否获得遗传突变需要持续观察M2分离世代。

本实验中, 高能重离子辐照对苘蓝在半干旱地区栽培苘蓝根、叶的质量影响较大, 具体表现在苘蓝根、叶生物碱含量对辐照敏感, 低剂量辐照对提高根中喹啉酮的含量有促进作用。小剂量辐照(10 Gy)即可造成苘蓝体内主要次生代谢产物的大幅增加。综合上述结果, 进而确定对十字花科植物苘蓝的高能重离子最佳辐照剂量为35 Gy。

参考文献(References):

- [1] DANZ H, STOYANOVA S, WIPPICH P, *et al.* *Planta Medica*, 2001, **67**(5): 411.
- [2] LIANG Jianping, LI Xuehu, LU Xihong, *et al.* *Nuclear Physics Reviews*, 2010, **27**(3): 284. (in Chinese)
(梁剑平, 李雪虎, 陆锡宏, 等. 原子核物理评论, 2010, **27**(3): 284.)
- [3] WU Zhenhua, ZHANG Hong, WANG Xinyu, *et al.* *Nuclear Physics Reviews*, 2010, **27**(3): 335. (in Chinese)
(武振华, 张红, 王新宇, 等. 原子核物理评论, 2010, **27**(3): 335.)
- [4] YU Zengliang. *On Ion Beam Applied to Bio-tech*[M]. Hefei: Anhui Sci Tech Press, 1998, 195–222. (in Chinese)
(余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998, 195–222.)
- [5] DONG Xichun, LI Wenjian, HE Jinyu, *et al.* *Nuclear Techniques*, 2009, **32**(2): 146. (in Chinese)
(董喜存, 李文建, 何金玉, 等. 核技术, 2009, **32**(2): 146.)
- [6] JIA Yanyan, DENG Chuanliang, GAO Jun, *et al.* *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2011, **25**(5): 904. (in Chinese)
(贾彦彦, 邓传良, 高俊, 等. 核农学报, 2011, **25**(5): 904.)
- [7] ZHOU Libing, LI Wenjian, QU Ying, *et al.* *Nuclear Physics Reviews*, 2008, **23**(2): 165. (in Chinese)
(周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 原子核物理评论, 2008, **23**(2): 165.)
- [8] FENG Wenxin, ZHANG Shumei. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 1997, **17**(1): 21. (in Chinese)
(冯文新, 张素梅. 山西农业大学学报, 1997, **17**(1): 21.)
- [9] CHEN Yiping, WANG Xunling, HAN Jing. *Chinese Herbal Medicines*, 2003, **34**(11): 1054. (in Chinese)
(陈怡平, 王勋陵, 韩静. 中草药, 2003, **34**(11): 1054.)
- [10] CHEN Yiping, WANG Xunling. *Laser Technology*, 2004, **28**(1): 42. (in Chinese)
(陈怡平, 王勋陵. 激光技术, 2004, **28**(1): 42.)
- [11] YAMAGUCHI H, NAGATOMI S, MORISHITA T. *Nucl Instr and Meth B*, 2003, **206**: 561.
- [12] YAMAGUCHI H, MORISHITA T, DEGI K, *et al.* *Nippon Genshiryoku Kenkyujo JAERI*. 2002, **1**: 36.

M1 Biological Effects of *Isatis indigotica* Fort Irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ions

LU Xihong^{1, 2}, SHI Guangliang³, LI Xuehu², LIANG Jianping², XIN Zhijun²

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

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

3. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the M1 biological effects of heavy ions on *Isatis indigotica* Fort, its dry seeds were irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ beam with the dose of 0, 10, 35, 60, 90 and 140 Gy respectively, at the rate of 20 Gy/min delivered by the Heavy Ion Research Facility in Lanzhou (HIRFL). The results showed that biological characters such as germinating rate, germinating potential, survival rate, plant height, root height and root-shoot ratio were changed after irradiation. Moreover, the plant height and root height decreased in a dose dependent manner. The indirubin and 4(3H) quinazolinone content of *Isatis indigotica* Fort was improved and exhibited obviously “saddle” trends with irradiation dose increasing. Data suggest that exposure with low-dose $^{12}\text{C}^{6+}$ to seeds of *Isatis indigotica* Fort has obvious injury effects at the first generation, and the active ingredient content of *Isatis indigotica* Fort may be improved by carbon ion beam irradiation. It is concluded that the suitable irradiation dose of mutation breeding is 35 Gy for the seeds of *Isatis indigotica* Fort.

Key words: *Isatis indigotica* Fort; $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam; mutation breeding; biological character

Received date: 21 Dec. 2012; Revised date: 5 Feb. 2013

Foundation item: National Natural Science Foundation (11105194); Hundred Talents Program of Chinese Academy of Sciences (O861010XY0)

Corresponding author: LIANG Jianping, E-mai: liangjp100@impcas.ac.cn

<http://www.npr.ac.cn>