

文章编号: 1007-4627(2008)04-0409-05

不同辐照源对黑松花粉粒的生物学效应^{*}

黄群策¹, 梁秋霞¹, 李国平²

(1 郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052;

2 莆田学院环境与生命科学系, 福建 莆田 351100)

摘要: 研究了 N^+ 离子束、紫外线和 γ 射线辐照对黑松花粉粒的影响, 对3种辐射源在诱发花粉粒细胞出现损伤效应上的差异性进行了比较分析。研究表明, 3种辐照源对黑松花粉粒萌发和花粉管生长所表现出的效应存在明显的差异。 γ 射线的剂量效应曲线表现为近S型; 紫外线辐照的剂量效应曲线呈现出近L型; 离子束的生物学效应主要在两个方面表现出特异性, 即离子束所导致的剂量-效应曲线呈“马鞍型”趋势和 N^+ 离子束注入后会诱发花粉管顶端产生出明显的肿胀现象。

关键词: 黑松; 花粉粒; 不同辐照源; 生物学效应

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

离子束生物工程作为一门新兴的交叉学科已经显现出其应有的技术特色, 其技术的实用性已经被大量的实验结果所证实, 离子注入对生物体所导致的遗传改良效果的普遍性已经引起了研究者的高度重视。关于离子束生物工程在未来的发展趋势, 前人的探索性研究结果已经引起了有关学者的关注^[1]。长从广义上讲, 辐射引起活的生命有机体的任何特征及特性变异都是辐射的生物学效应。在辐射生物学的研究中, 人们比较集中于研究辐照损伤引发的最终结果, 比如致死效应和农艺性状变异等。在辐射生物学效应的研究领域内, 对有关物理阶段、物理-化学阶段和化学阶段所出现的生物学效应的研究还比较少。由于实验技术和测量方法的原因, 很难对生物有机体在这几个阶段所产生的过程进行直接的观察和测量, 而圆满回答这个问题是辐射生物学研究的重要内容之一^[2-5]。很多研究采用生物大分子系统进行模拟性实验, 通过模拟实验所获得的试验结果只能对整体的生物学效应进行推测性解释, 其研究的局限性显而易见^[6, 7]。我们认为, 花粉粒是种子植物的雄配子体, 属单倍体, 对辐射处理比较敏感, 易于进行直接的观察和测量,

是研究辐射生物学效应机理的比较好的实验系统。基于这一认识, 我们以黑松花粉粒为试验材料, 初步研究了 N^+ 离子束、紫外线和 γ 射线辐照对黑松花粉粒萌发和花粉管生长的影响, 旨在比较3种辐射源在诱发花粉粒细胞出现损伤效应的差异性, 进而为研究离子束生物学效应的机理积累研究资料。

2 材料与方法

试验中所采用的黑松雄球花采自于河南省郑州市滨河公园内人工栽培的成熟黑松树。2005年4月中旬, 当黑松处在花粉粒散发期, 采集刚开始散粉的雄球花, 将其置于室内自然干燥, 让花粉粒散出。随后, 将收集的花粉粒置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存备用。

N^+ 离子注入按照常规方法进行^[1]。离子注入机为俄罗斯产Titan脉冲式注入机, 离子源为 N^+ 离子, 能量为30 keV, 离子注入剂量依次为 1×10^{15} , 3×10^{15} , 5×10^{15} , 7×10^{15} , 9×10^{15} 和 11×10^{15} ions/cm²。在进行离子注入前, 将待处理的花粉粒均匀地撒布在涂有少量胶水的培养皿表面, 将其放入真空小靶室内, 试验材料的表面与离子束发射方向垂直。离子注入机的工作条件采用正常的参数,

* 收稿日期: 2008-01-14; 修改日期: 2008-08-04

* 基金项目: 国家十五科技攻关资助项目(2001BA302B)

作者简介: 黄群策(1958-), 男(汉族), 广西全州人, 教授, 博士, 博士生导师, 河南省特聘教授, 从事离子束生物技术的研究;

E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn

即真空度为 5×10^{-2} Pa、采用脉冲注入(频率25 Hz)方式、束流为200 mA。

对试验材料进行 γ 射线的辐照是由河南省农业科学院辐照中心按照正规的试验程序完成的。照射剂量分别为10, 30, 50, 100, 200和500 Gy, 剂量率为900 rad/min。

对试验材料进行紫外线辐照是在郑州大学河南省离子束生物工程重点实验室按照正规的试验程序完成的。辐照源是功率30 W的紫外灯, 照射距离为30 cm, 照射时间分别为2, 4, 6, 8, 10, 15和20 min。

试验中, 以不进行任何辐照的试验材料作为对照组, 其中包括在进行离子束处理试验中的真空对照组。各个处理重复3次。采用SPSS软件对试验数据进行差异显著性分析, 以便对试验结果作出更客观的评价。对花粉粒的培养与观察按照所建立的研究方法进行^[8]。首先将花粉粒置于含0.01%硼酸+0.01%氯化钙+0.25%蔗糖的液体培养基中, 在28 °C条件下振荡培养。经过72 h培养后检查花粉粒的萌发率, 测量花粉管的长度和宽度。对已经萌

发的花粉粒, 经过4%多聚甲醛固定, 利用10 μ g/ml DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, 美国Sigma公司产品)对其进行染色处理。最后, 利用Leica TCS-SP2型激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, 简称 LSCM)观察花粉粒与花粉管在形态结构上的特异性, 其中包括花粉粒外观形态、花粉管的伸长状态及其膨大率。在测量花粉管的长度和宽度时所采用的每份样本的数量为1 000粒, 在显微镜物镜为40倍条件下观察。

3 试验结果及其分析

辐射生物学的研究结果已经肯定, 生物体对辐射处理均会表现出一定的效应, 其效应的明显程度与生物体所接受的辐射剂量呈正相关关系。本试验的研究结果表明, 3种辐照源处理对黑松花粉粒萌发和花粉管生长均表现出一定的损伤效应, 其损伤效应的大小因不同辐照源而异。对于同一种辐照源而言, 黑松花粉粒受到损伤效应的大小因不同剂量而异。然而, 3种辐照源对黑松花粉粒萌发和花粉管生长所表现出的效应存在着一定的差异。

表1 紫外线和 γ 射线对黑松花粉萌发和花粉管生长的影响*

处理	花粉管大小/ μ m		花粉粒萌发率(%)
	长度	宽度	
对照	154.00 \pm 29.65	19.04 \pm 3.48	77.70 \pm 8.59
γ 射线/Gy	10	132.0 \pm 10.35	57.0 \pm 2.23 ^a
	30	128.5 \pm 6.96	53.9 \pm 3.17 ^a
	50	125.8 \pm 9.34	49.9 \pm 1.39 ^a
	100	113.2 \pm 7.92 ^a	45.9 \pm 5.39 ^a
	200	69.3 \pm 3.98 ^a	31.3 \pm 1.53 ^a
	500	50.9 \pm 3.94 ^a	28.7 \pm 4.85 ^a
紫外线/min	2	76.6 \pm 4.28 ^a	30.3 \pm 3.04 ^a
	4	68.3 \pm 5.56 ^a	11.8 \pm 1.59 ^a
	6	55.9 \pm 4.34 ^a	9.8 \pm 1.57 ^a
	8	54.9 \pm 3.57 ^a	22.3 \pm 2.36 ^a
	10	53.7 \pm 4.22 ^a	24.6 \pm 3.04 ^a
	15	50.9 \pm 3.12 ^a	41.1 \pm 4.51 ^a
	20	50.0 \pm 3.55 ^a	44.7 \pm 5.47 ^a

* a 表示与对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。

以 γ 射线和紫外线为辐照源的试验结果有其特点。在以 γ 射线为辐照源的处理中, 随着处理剂量

的增加黑松花粉粒的萌发率不断地降低, 花粉管的长度随着处理剂量的增加而依次缩短, 花粉管的宽

度随着处理剂量的增加而依次变宽。当 γ 射线的剂量为500 Gy时，辐照对黑松花粉粒萌发和花粉管生长的效应特明显。以紫外线为辐照源的处理中，黑松花粉粒表现出的效应也很明显。随着紫外线处理

时间的延长，黑松花粉粒的萌发率依次降低。当处理时间为20 min时，黑松花粉粒的萌发率仅为4.7%。随着紫外线处理时间的延长，黑松花粉管的长度依次缩短，花粉管的宽度依次变宽(表1)。

表2 离子注入对黑松花粉萌发和花粉管生长的影响*

处理	花粉管大小/ μm		花粉粒萌发率(%)	花粉管膨大率(%)
	长度	宽度		
真空对照	154.00 \pm 29.65	19.04 \pm 3.48	77.70 \pm 8.59	0.58 \pm 0.16
剂量 / (ions/cm ²)				
1×10^{15}	134.16 \pm 29.14	18.57 \pm 2.61	71.67 \pm 7.35	2.48 \pm 0.48 ^a
3×10^{15}	62.75 \pm 11.70 ^a	24.36 \pm 3.49 ^a	39.58 \pm 4.13 ^a	4.17 \pm 0.90 ^a
5×10^{15}	71.00 \pm 10.49 ^a	22.70 \pm 2.43 ^a	44.64 \pm 9.32 ^a	10.36 \pm 1.57 ^a
7×10^{15}	88.34 \pm 13.6 ^a	27.18 \pm 2.99 ^a	62.10 \pm 6.13 ^a	19.29 \pm 5.36 ^a
9×10^{15}	55.21 \pm 6.46 ^a	26.06 \pm 3.12 ^a	10.85 \pm 4.22 ^a	0.78 \pm 0.47
11×10^{15}			0	

* a 显著差异 ($P < 0.05$), b 无显著差异 ($P < 0.01$)。

以 N^+ 离子束为辐照源的试验结果值得进一步分析。在试验中真空对照材料的花粉粒的萌发率和花粉管的膨大率分别为77.70%和0.58%，这说明处理对黑松花粉粒的萌发率和花粉管的伸长有一定的效应，但这种效应不是特别明显。经过离子注入之后，黑松花粉粒的生物学效应通过其萌发率和花粉管的膨大率得到表现，但其效应的明显程度并没有随着离子注入剂量的增加而依次降低或增大。从花粉管的长度和宽度来看，离子注入的效果很明显，但随着离子注入剂量的增加花粉管的长度并没有依次缩短，花粉管的宽度也没有依次增宽(见表2)。这些观察鉴定结果表明，离子注入对黑松花粉粒的生物学效应有其特殊性。

量的继续增大，曲线又趋于平缓；当剂量增大到一定程度时，曲线又直线下降(见图1)。紫外线辐照的剂量效应曲线呈现出近L型，即在照射时间比较短时，曲线就急剧下降，几乎成一条直线；随着照射时间的延长，曲线又趋于平缓(见图2)。离子注入所表现的剂量效应曲线与前两种辐照源所表现的剂量效应曲线完全不同，离子注入所表现的剂量效应曲

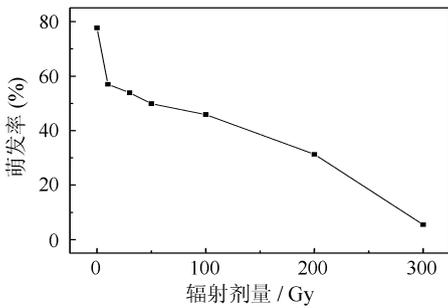


图1 γ 射线对黑松花粉粒萌发的影响

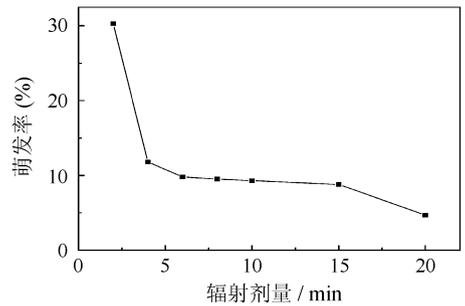


图2 紫外线辐照对黑松花粉粒萌发的影响

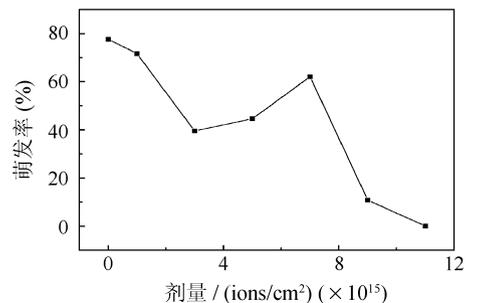


图3 离子注入后对黑松花粉粒萌发的影响

通过将3种辐照源对黑松花粉粒萌发所表现出的效应分别绘成曲线图，可以更好地比较其生物学效应的特殊性。 γ 射线的剂量效应曲线表现为近S型，即在剂量比较小时，曲线直线下降；随着剂

线近似于“马鞍型”，即呈现出先下降、后回升、再下降的趋势(见图3)。除此之外，在经过离子束注入的试验材料中花粉管顶端发生异常膨大的畸形现象(见图4)比较常见。然而，花粉管顶端的这种异常膨大的现象在经过 γ 射线或紫外线辐照的试验材料中并没有观察到。

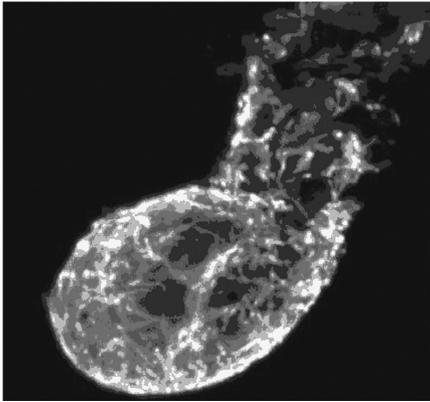


图4 离子注入后黑松的花粉管顶端膨大的现象

4 讨论

离子束作为一种新的物理诱变源已经引起了一些植物遗传改良者的关注，其实用性已经被大量的研究结果所证实。然而，关于不同种类的物理诱变源导致生物学效应上的差异性值得深入研究。前人利用不同的生物个体对多种诱变源所诱发的生物学效应进行过比较研究。吴健等比较了离子束、紫外线和 γ 射线对绦红小单孢菌的剂量存活效应及其诱变效果，结果发现，离子注入的存活曲线与紫外线、 γ 射线辐照所导致的存活曲线完全不同，即紫外线和 γ 射线照射对绦红小单孢菌的剂量存活曲线均为指数曲线，而离子注入导致的存活曲线呈先下降、后上升、再下降的趋势。而且，3种辐射源在诱变效应上也存在着很大的差异^[9]。杜海彪等利用agarose电泳技术和图像处理技术比较了 γ 射线、紫外线和 N^+ 离子注入对pUC19 DNA超螺旋结构的损伤效应。研究结果表明，离子注入比 γ 射线和紫外线对DNA超螺旋的损伤更加明显^[10]。

本试验的研究结果表明，3种辐照处理对黑松花粉粒的损伤效应均很明显，但 N^+ 离子注入对黑松花粉粒萌发和花粉管生长的影响与其它两种辐射源的效应存在着一定的差异。经过不同辐射源的辐照处理会产生出不同的剂量效应曲线，这说明不

同辐照源对花粉粒有不同的损伤机制，即花粉粒对不同的辐照处理的敏感性存在着一定的差异。我们认为，在花粉粒内可能存在不同的辐射敏感区域“靶”，不同的“靶”被击中后会产生出不同的物理效应、化学效应和生物学效应。另外，经过不同辐照源的辐照处理后产生出不同的剂量效应曲线也说明 N^+ 离子束、紫外线和 γ 射线的物理特性不同，它们与生物体的相互作用机制也完全不同。 γ 射线的剂量效应曲线表现为近S型，紫外线辐照的剂量效应曲线呈现出近L型。然而，离子束的生物学效应主要在两个方面表现出特异性，即离子束所导致的剂量一效应曲线呈“马鞍型”趋势和 N^+ 离子束注入后会诱发花粉管顶端产生出明显的肿胀，这样的研究结果与我们以前报道的研究结果相吻合^[7]。

值得注意的是，在经过离子束注入的试验材料中花粉管顶端发生异常膨大的畸形现象比较常见，而在经过 γ 射线或紫外线辐照的试验材料中并没有观察到花粉管顶端的这种异常膨大的现象。对于这样的试验结果，其机理还有待于进一步研究。

参考文献 (References):

- [1] Yu Zengliang. Introduction to Ion Beam Biotechnology. New York, USA: Springer Science Business Media, Inc. 2006, 110.
- [2] Li Xingling, Wei Zengquan, Li Weijian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2001, **18**(2): 125(in Chinese).
(李兴林, 卫增泉, 李文建等. 原子核物理评论, 2001, **18**(2): 125.)
- [3] Huang Qunce, Qin Guangyong. Journal of Zhengzhou University, 2003, **35**(4): 31(in Chinese).
(黄群策, 秦广雍. 郑州大学学报, 2003, **35**(4): 31.)
- [4] Huang Qunce. Journal of Zhengzhou University, 2007, **39**(2): 167(in Chinese).
(黄群策. 郑州大学学报, 2007, **39**(2): 167.)
- [5] Huang Qunce, Liang Qiuxian, Li Guoping. Nuclear Physics Review, 2008, **25**(3): 282(in Chinese).
(黄群策, 梁秋霞, 李国平. 原子核物理评论, 2008, **25**(3): 282.)
- [6] Gu Yuehua. Nuclear Technques, 2000, **23**(8): 587(in Chinese).
(顾月华. 核技术, 2000, **23**(8): 587.)
- [7] Huang Qunce. Nuclear Physics Review, 2007, **24**(1): 59(in Chinese).
(黄群策. 原子核物理评论, 2007, **24**(1): 59.)

- [8] Li Guoping, Huang Qunce, Yang Lusheng, *et al.* Plasma Science & Technology, 2006, **8**(5): 618.
- [9] Wu Jian, Su Mingjie, Dai Guifu, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2003, **21**(2): 120(in Chinese).
(吴 键, 苏明杰, 戴桂馥等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(2): 120.)
- [10] Du Haibiao, Qiu Guanying, Du Yanhua. Acta Biophysics Sinica, 1997, **13**(2): 261(in Chinese).
(杜海彪, 邱冠英, 杜严华. 生物物理学报, 1997, **13**(2): 261.)

Effects of Pollen of *Pinus thunbergii* Induced by Different Radiant Factors^{*}

HUANG Qun-ce^{1, 1)}, LIANG Qiu-xia¹, LI Guo-ping²

(1 *Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;*

2 Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

Abstract: The effects of pollens and pollen tubes of *Pinus thunbergii* induced respectively by N⁺ beam, γ -ray and ultraviolet ray were measured, and the differences of the effects caused by the different radiant factors were distinguished. The results showed that there was obvious difference in the damages of the pollen germination and the pollen tube growth led by the radiant factors. The curve of dose effects from γ -ray irradiation was similarly S type, and that from ultraviolet ray treatment approximately L type. The effects from ion implantation expressed the two characteristics, the curve of the saddle type and the top inflation of pollen tube.

Key words: *Pinus thunbergii*; pollen; different radiation source; biological effect

* **Received date:** 14 Jan. 2008; **Revised date:** 4 Aug. 2008

* **Foundation item:** National Key Technologies R & D Program of China During the 10th Five-year Plan(2001BA302B)

1) E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn