

文章编号: 1007-4627(2011)02-0349-05

# $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照番茄种子当代效应\*

司婧<sup>1, 2, 3</sup>, 张红<sup>1, 2, 3, #</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院重离子束辐射生物医学重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

3 甘肃省重离子束辐射医学应用基础重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 利用辐射能量为 80 MeV/u 的  $^{12}\text{C}^{6+}$  重离子束辐照番茄种子, 辐照剂量分别为 30, 60, 90, 120 和 160 Gy 研究其对番茄 M1 代的生物学效应。结果表明, 随着辐照剂量的增大, 番茄的发芽率和成苗率降低, 且成苗率明显低于发芽率, 发现辐照损伤主要抑制了根的生长; MDA 和脯氨酸含量变化的总体趋势为随着辐照剂量的增大先升后降再升高, 说明高剂量 C 离子辐照对生物膜造成更严重的损伤; APX 活性随着辐照剂量的增大呈先升后降再升高的趋势, 表明 APX 在清除活性氧中起主要作用; POD 和 SOD 活性的总体趋势是随着辐照剂量的增大而降低, 且明显低于对照组。综合分析表明,  $^{12}\text{C}^{6+}$  重离子束辐照番茄种子, 对 M1 代具有明显的损伤效应, 高剂量辐照对番茄种子造成的损伤更大, 使酶的活性降低, 抑制植株生长。

**关键词:** 番茄;  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束; 生物学效应; 抗氧化酶

**中图分类号:** Q691      **文献标识码:** A

## 1 引言

近年来发展起来的重离子束辐照与传统的紫外线、X 射线和  $\gamma$  射线相比具有更高的传能线密度 (Line energy transfer, 简称 LET)、相对生物学效应 (RBE) 和更尖锐的电离峰 (Bragg 峰) 等特点, 能够在低伤害前提下得到较高的诱变率和较宽的突变谱, 突变体更稳定<sup>[1]</sup>, 已广泛应用于作物改良和诱变育种。我国利用离子束诱变育种技术已经在棉花、芸豆、大豆、玉米、小麦、水稻、烟草、甘薯、谷子、拟南芥、甜菊、茶树、杨树和银杏等植物品种改良方面取得了不同程度的进展<sup>[2-7]</sup>。

植物体内活性氧 (ROS) 自由基的研究已经引起了越来越多的关注。当代谢过程中产生的 ROS 及其清除系统的平衡被打破时, 过量的 ROS 在植物体内积累, 会导致蛋白质、膜脂和其它细胞组分的氧化损伤<sup>[8]</sup>, 严重时导致植物死亡。MDA 是多不饱和脂肪酸氧化的中间产物, 通常作为反映膜脂过氧化程度<sup>[9]</sup> 和细胞膜稳定性的重要生理指标<sup>[10]</sup>。植物体内的抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxi-

dase, 简称 APX)、过氧化物酶 (peroxidase, 简称 POD)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, 简称 SOD) 等抗氧化酶类可以有效清除植物体内过多的 ROS, 修复 ROS 对植物造成的损伤, 其活性反映植物体内清除活性氧自由基的能力或抗逆能力。

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 为一年生或多年生草本植物, 其分布范围广、产量高、含有丰富的维生素、糖类、番茄红素和胡萝卜素, 有延迟衰老和预防癌症的作用, 番茄的食用和保健价值越来越受到人们的关注<sup>[11]</sup>。随着需求量的增大和对品质要求的提高, 番茄遗传育种方面的研究已取得很大进展, 但采用  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束进行番茄辐照育种的研究在国内外还未见报道。本文研究了不同剂量  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束辐照对番茄种子存活和相关酶活性的影响, 为番茄辐射育种提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

材料为兰州当地所售津鑫农樱桃番茄种子。

\* 收稿日期: 2010-11-03; 修改日期: 2010-12-03

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (2010CB834202); 甘肃省青年科技基金资助项目 (1107RJYA006)

作者简介: 司婧 (1981-), 女 (汉族), 河南郑州人, 助理研究员, 博士, 从事辐射生物学研究; E-mail: sijing@impcas.cn

# 通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

## 2.2 辐照处理

番茄种子经水浸湿 4 h 后, 利用兰州重离子加速器国家实验室 (NLHIRFL) 重离子研究装置 (HIRFL) 提供的中能 C 离子束对进行辐照处理, 能量为 80 MeV/u, 辐照剂量分别为 30, 60, 90, 120 和 160 Gy, 以未辐照的种子为对照组。

## 2.3 实验方法

### (1) 种子萌发实验

将不同剂量辐照处理的番茄种子和对照组各 320 颗, 用水浸泡过夜, 70% 酒精消毒 2 min, 用无菌水冲洗 2 次, 且用 15% 次氯酸钠消毒 15 min, 最后用无菌水冲洗 5 次, 放入已灭菌的 MS 固体培养基中 (Murashige and Skoog, 1962), 每皿 40 粒, 光照条件为 16 h 光照和 8 h 黑暗, 室温下发芽。统计发芽率 (种子萌发 15 d 统计发芽种子数, 以发芽数与供试种子数之比表示) 和成苗率 (种子萌发 35 d 调查成活种子数, 以成活苗数与供试种子数之比表示)。

### (2) 丙二醛 (malondialdehyde, 简称 MDA) 含量的测定

MDA 的检测按照 Dhindsa 等 (1981) 的方法<sup>[12]</sup>。MDA 含量 ( $\mu\text{M}$ ) =  $6.45 (OD_{532} - OD_{600}) - 0.56 \times OD_{450}$ <sup>[13]</sup>。

### (3) 脯氨酸含量的测定

0.2 g 番茄叶片用 1 ml 3% 磺基水杨酸研磨, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 3000 g 离心 10 min, 取 200  $\mu\text{l}$  上清液加入 200  $\mu\text{l}$  蒸馏水、200  $\mu\text{l}$  冰乙酸和 400  $\mu\text{l}$  2.5% 酸性茚三酮试剂后, 沸水浴中显色 1 h, 冷却后加入 400  $\mu\text{l}$  甲苯, 振荡 30 s, 静置分层, 吸取红色甲苯相于 520 nm 处测吸光值 (脯氨酸做标曲  $\mu\text{g}/\text{ml}$  级)。

### (4) 几种抗氧化酶活性测定

0.5 g 番茄叶片用 1.5 ml 磷酸钾缓冲液 (50 mM, 含 1% PVP, pH 7.8) 冰浴研磨提取, 提取液于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15000 g 离心 20 min, 上清液备用。用于酶活性分析, 用 BCA 法测定蛋白浓度。

APX 活性的测定采用 Nakano 的方法, 在 290 nm 处测定每分钟 AsA 的减少量<sup>[14]</sup>。POD 活性的测定采用愈创木酚显色法<sup>[15]</sup>。SOD 活性的测定采用氮蓝四唑 (NBT) 光化还原法<sup>[16]</sup>, 以单位时间内抑制光化还原 50% 的 NBT 为一个酶活单位 (U)。

## 3 结果

### 3.1 不同剂量 C 离子辐照对番茄种子发芽率及成苗率的影响

统计表明, 番茄种子在培养皿中 5 d 开始萌发。0 Gy 对照组和 30 Gy 辐照组的种子萌发明显早于较大剂量 60, 90, 120 和 160 Gy 辐照组的萌发。在种子播种后第 15 d 的发芽率统计表明随着  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束辐照剂量的增大, 番茄种子的发芽率明显呈降低趋势 (图 1)。与对照组相比, 30 Gy 辐照组的发芽率降低不明显, 仅为 8%; 而 60, 90, 120 和 160 Gy 辐照组的发芽率则明显降低, 其中 60 Gy 辐照组发芽率的降低达到了 34%。

观察发现, 辐照处理组的番茄种子萌发后, 无明显幼根生长, 其幼苗长至 1 cm 左右时停止生长并逐渐腐烂。在播种后第 35 d 统计成苗率, 结果如图 1 所示, 发现对照组的成苗率与发芽率差别不大, 辐照处理组的成苗率明显低于发芽率, 30 Gy 辐照组的成苗率与对照组相比减少 54%。随着  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束剂量的增大, 番茄种子的成苗率逐渐降低。

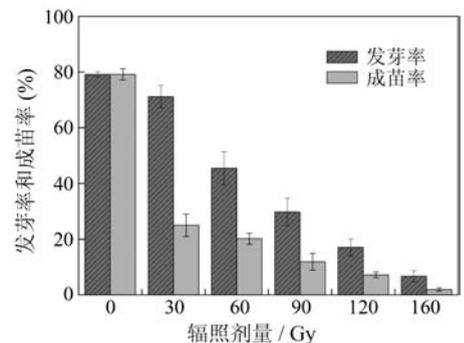


图 1 不同剂量  $^{12}\text{C}^{6+}$  离子束辐照对种子发芽率及成苗率的影响

### 3.2 不同剂量 C 离子辐照对番茄 MDA 含量和脯氨酸含量的影响

作为细胞的膜脂过氧化产物, MDA 的含量变化反映了质膜受损伤的程度。如图 2 所示, 随着辐照剂量的增大, 番茄的 MDA 含量先升高, 在 60 Gy 辐照处理组达到最大值, 与对照组相比升高 40% ( $P < 0.01$ ); 90 Gy 辐照处理组的 MDA 含量有所降低, 比对照组仅增加了 5.3% ( $P < 0.05$ ); 120 和 160 Gy 辐照处理组的 MDA 含量又上升, 分别比对照组升高了 29.9% 和 32.3% ( $P < 0.01$ )。

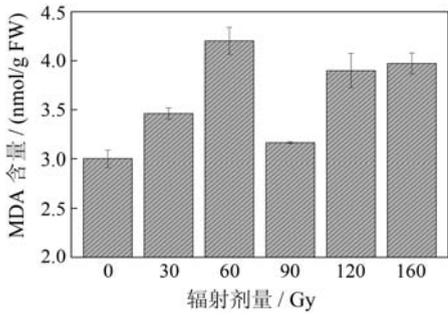


图2 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对MDA含量变化的影响

经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后,不同辐照剂量处理的番茄脯氨酸含量变化如图3所示。与对照组相比,30 Gy辐照组的脯氨酸含量略微下降;60 Gy辐照组的脯氨酸含量显著升高,是对照组的1.79倍( $P < 0.01$ )。虽然90和120 Gy辐照组的脯氨酸含量较60 Gy辐照组有所降低,但与对照组相比仍明显提高( $P < 0.05$ )。160 Gy辐照组的脯氨酸含量达到最高值,是对照组的2.08倍( $P < 0.01$ )。

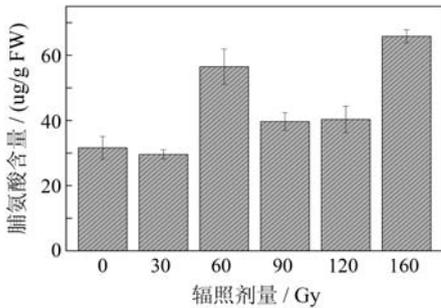


图3 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对脯氨酸含量变化的影响

### 3.3 不同剂量C离子辐照对番茄几种抗氧化酶活性的影响

不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照组番茄的APX活性均较对照组有所提高(图4)。随着辐照剂量的增大,

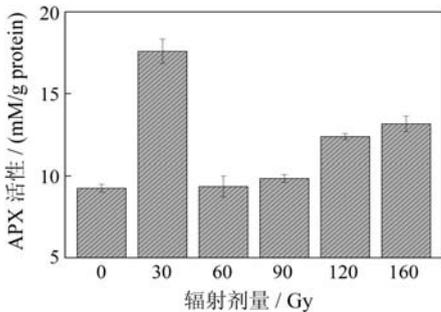


图4 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对APX活性变化的影响

APX活性呈现先升高后降低再升高的趋势。

30 Gy辐照组的APX活性达到最高值,为对照组的1.9倍。120和160 Gy辐照组的APX活性也比对照组显著升高,分别为对照组的1.34倍和1.42倍。如图5所示,不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照组的番茄POD活性均明显低于对照组( $P < 0.05$ )。随着0,30,60和90 Gy辐照剂量的增高,辐照组POD活性逐渐降低,在90 Gy时达到最小值,仅为对照组的58%( $P < 0.01$ )。120和160 Gy辐照组的POD活性有所升高,但仍明显低于对照组。

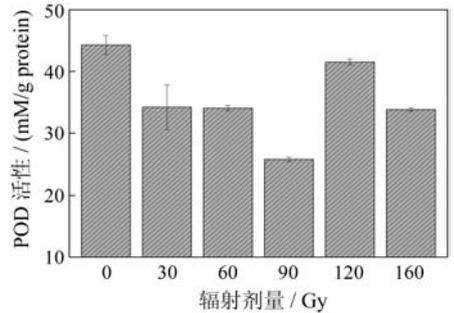


图5 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对POD活性变化的影响

如图6所示,与0 Gy对照组相比,30 Gy辐照组的SOD活性略有升高,而大剂量的60,90,120和160 Gy辐照组的SOD活性明显低于对照组,160 Gy辐照组的SOD活性最低,仅为对照组的59%( $P < 0.01$ )。

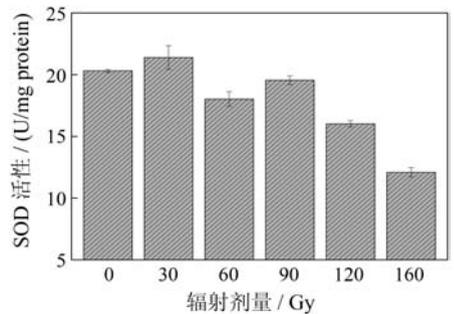


图6 不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对SOD活性变化的影响

## 4 讨论

辐照当代种子的发芽率和成苗率是反映辐照损伤的重要指标。本研究中,经过不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照的番茄种子,随着辐照剂量的增大,发芽率及成苗率呈明显下降趋势,与已报道的在玉米和牧草中辐照剂量越大,辐照抑制越强,发芽率越低的趋势相一致<sup>[17-18]</sup>,但有些学者则认为低剂量的C离子辐照能够促进种子的发芽和生长,仅有高剂量

的辐照对其有抑制作用<sup>[19-20]</sup>。这可能是由于辐射源和所选的实验材料不同所造成的,不同种属的实验材料其生长特性不同,对 C 离子辐照的耐受能力不同,所受的损伤类型和程度也不尽相同。如重离子辐照处理拟南芥种子后 M1 植株的不同营养器官表现为株高降低、叶片长度变短和叶片宽度变窄<sup>[21]</sup>。武振华等<sup>[22]</sup>研究发现,<sup>12</sup>C<sup>6+</sup> 离子束辐照紫苏种子后植株矮化、成活率降低、开花时间显著提前、花期明显延长、叶缘皱缩和分支数增多。在本实验过程中发现辐照组的种子正常萌发后,其幼根停止生长,幼苗和幼根逐渐腐烂导致死亡,由此推测番茄种子根生长点是重离子辐照的敏感区域。

现在普遍认为,植物体内自由基的积累首先攻击膜系统,使得膜脂脂肪酸的不饱和键被氧化,造成 MDA 含量的增加,损伤膜结构,严重时导致植物死亡<sup>[23-24]</sup>。本研究中,辐照处理组的 MDA 含量明显高于对照组。脯氨酸是一种重要的渗透调节物质,几乎所有的逆境损伤都会引起其在植物体内的积累,起到保护生物大分子结构和功能的稳定,维持生物膜稳定性的作用。与 MDA 类似,除 30 Gy 辐照处理组的脯氨酸含量略微降低外,其他辐照处理组的脯氨酸含量明显高于对照组,这说明高剂量 C 离子辐射对生物膜造成损伤。另一方面,MDA 和脯氨酸含量的变化趋势并不与辐照剂量成正比相关,其机理有待进一步研究。

植物体内过量的 ROS 积累,ROS 代谢平衡被打破,造成氧化损伤。植物体内的抗氧化防御系统能有效清除 ROS,修复氧化损伤,它包括酶促和非酶促防御系统两类。前者包括各种抗氧化酶如 APX、POD、SOD、AT 和谷胱甘肽还原酶 GR 等<sup>[25]</sup>。后者包括脂溶性抗氧化剂和水溶性抗氧化剂。抗氧化酶类的活性反映植物体内清除活性氧自由基的能力。本实验中,APX 活性随着辐照剂量的增大,呈现先升高后降低再升高的趋势,但都较对照组有所提高,表明 APX 是清除活性氧中起主要作用的抗氧化酶类。POD 活性在辐照组中明显较对照组降低,这可能与辐照引起的某种机制相关,造成这种现象的机理目前还不清楚,有待进一步研究。SOD 活性先上升再下降,大剂量 120 和 160 Gy 辐照组中的 SOD 活性明显低于对照组。说明低剂量的辐照对植物有一定的促进作用,高剂量的辐照对生物造成更严重的损伤,使得酶活降低。

## 参考文献 (References):

- [1] Yu Zengliang. On Ion Beam Applied to Bio-tech. Hefei: Anhui Sci Tech Press, 1996, 223-240(in Chinese). (余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥:安徽科学技术出版社, 1996, 223-240.)
- [2] Jiang Zehui, Peng Zhenhua. Journal of Anhui Agricultural University, 1994, **21**(3): 295(in Chinese). (江泽慧, 彭镇华. 安徽农业大学学报, 1994, **21**(3): 295.)
- [3] Hou Suiwen, Qian Pingping, Guan Liping, *et al.* Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, **22**(1): 9(in Chinese). (侯岁稳, 钱平平, 管利萍, 等. 核农学报, 2008, **22**(1): 9.)
- [4] Luo Hongbing, Zhao Kui, Guo Jiyu, *et al.* Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2004, **30**(4): 385 (in Chinese). (罗红兵, 赵葵, 郭继宇, 等. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, **30**(4): 385.)
- [5] Zhang Zhihong, Du Liqun, Li Hongjie. Acta Biophysica Sinica, 1998, **14**(4): 762(in Chinese). (张志宏, 杜立群, 李洪杰. 生物物理学报, 1998, **14**(4): 762.)
- [6] Liang Qianjin, Hu Yulian, Zhang Genfa. Acta Biophysica Sinica, 2002, **18**(2): 251(in Chinese). (梁前进, 胡玉莲, 张根发. 生物物理学报, 2002, **18**(2): 251.)
- [7] Ding Liang, Chen Muzhuan, Shen Mingshan, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1999, **15**(4): 798(in Chinese). (丁亮, 陈睦传, 沈明山, 等. 生物物理学报, 1999, **15**(4): 798.)
- [8] Scandalios J G. Plant Physiol, 1993, **101**: 712.
- [9] Hodges D M, Delong J M, Forney C F, *et al.* Planta, 1999, **207**: 604.
- [10] Posmyk M M, Bailly C, Szafrńska K, *et al.* J Plant Physiol, 2005, **162**: 403.
- [11] Wan Qun. Influence Lycopene Content Through *Lcy* Gene Silencing Mediated by RNAi (Doctoral Thesis). Chongqing: Southwest University, 2007, 32-33(in Chinese). (万群. RNAi 介导的 *Lcy* 基因沉默对番茄果实中番茄红素含量的影响(博士论文). 重庆: 西南大学, 2007, 32-33.)
- [12] Dhindsa R S, Matowe W. J Exp Bot, 1981, **32**: 79.
- [13] Quan R, Shang M, Zhang H, *et al.* Plant Sci, 2004, **166**: 141.
- [14] Nakano Y, Asada K. Plant Cell Physiol, 1981, **22**: 867.
- [15] Chance B, Maehly A C. Methods Enzymol, 1955, **2**: 764.
- [16] Beauchamp C, Fridovich I. Anal Biochem, 1971, **44**: 276.
- [17] Xie Hongmei, Hao Jifang, Wei Zenquan, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2004, **22**(1): 61(in Chinese). (颜红梅, 郝冀芳, 卫增泉, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22**(1): 61.)

- [18] Luo Hongbing, Zhao Kui, Guo Jiyu, *et al.* Nuclear Physics Review, 2004, **21**(3): 238(in Chinese).  
(罗红兵, 赵葵, 郭继宇, 等. 原子核物理评论, 2004, **21**(3): 238.)
- [19] Sun Landi, Zhang Yingcong, Wu Dali, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 182(in Chinese).  
(孙兰弟, 张颖聪, 吴大利, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 182.)
- [20] Qian Pingping, Hou Suiwen, Wu Dali, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2007, **25**(4): 211(in Chinese).  
(钱平平, 侯岁稳, 吴大利, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(4): 211.)
- [21] Wu Dali, Hou Suiwen, Li Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, **25**(3): 287(in Chinese).  
(吴大利, 侯岁稳, 李文建, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(3): 287.)
- [22] Wu Zhenhua, Zhang Hong, Wang Xinyu, *et al.* Nuclear Physics Review, 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.)
- [23] Prasad T K, Anderson M D, Martin B A. The Plant Cell, 1994, **6**: 65.
- [24] Xu Kangyang, Ye Wanhui, Shen Hao, *et al.* Ecologic Science, 2006, **25**: 139(in Chinese).  
(许凯扬, 叶万辉, 沈浩, 等. 生态科学, 2006, **25**: 139.)
- [25] Zhou B Y, Guo Z F, Liu Z L. Crop Sci, 2005, **45**: 599.

## Effects of Irradiation with $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Beam on M1 Characters of *Lycopersicon esculentum* Mill. \*

SI Jing<sup>1, 2, 3</sup>, ZHANG Hong<sup>1, 2, 3, #</sup>

(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2 Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

3 Key Laboratory of Heavy Ion Radiation Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** To investigate the M1 biological effects of heavy ions irradiation on *Lycopersicon esculentum* Mill., its seeds were irradiated by  $^{12}\text{C}^{6+}$  heavy ions (80 MeV/u) with the dosages of 30, 60, 90, 120 and 160 Gy respectively. The results showed that with doses increased gradually, germination rate and seedling rate of *Lycopersicon esculentum* Mill. were decreased, and the latter was lower than the former, mainly due to the inhibition of root growth. The irradiation increased the content of MDA and proline evidently, showing irradiation could damage biomembrane, and also decreased the activities of POD and SOD with distinct inhibition pattern. However, the low dose and high dose irradiation promoted APX activity, illustrating APX was induced to protect irradiation injury. In brief, exposure to  $^{12}\text{C}^{6+}$  heavy ions had obvious injury effects on the seeds of *Lycopersicon esculentum* Mill.. Heavy ions irradiation damaged biomembrane, inhibited activities of enzymes, and finally inhibited the growth of the first generation of these seeds.

**Key words:** *Lycopersicon esculentum* Mill.;  $^{12}\text{C}^{6+}$  ion beam; biological effect; antioxidant enzyme

\* Received date: 3 Nov. 2010; Revised date: 3 Dec. 2010

\* Foundation item: Major State Basic Research Program of China(973 Program)(2010CB834202); Youth Science Foundation of Gansu Province(1107RJYA006)

# Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn