

文章编号: 1007-4627(2012)01-0092-05

辐照诱变对小麦生理学效应的影响

张佳佳, 代西梅, 赵帅鹏, 陈雪能

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 以小麦品种小偃 81 为材料, 利用低能 N^+ 离子, ^{60}Co γ 射线以及紫外线 UV-C 等为诱变源, 对种子胚部进行辐照处理。研究其对小麦发芽势、发芽率、根长及苗高等生理指标的影响。以辐照后的幼苗为材料研究了低能 N^+ 注入对过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)含量的影响。研究结果表明: N^+ 注入后种子活力先升高后降低, 苗高在 $5 \times 10^{17} N^+ / cm^2$ 时显著低于对照; ^{60}Co 和紫外线辐照对种子活力有较显著的影响, 辐照后的根长和苗高均显著低于对照; N^+ 束辐照后的幼苗 CAT 酶活随剂量的变化规律性不明显, POD 和 SOD 酶活总体趋势随剂量的增加先升高后降低, GSH 含量随剂量的增大先降低后升高。由此可知, 辐照诱变可以诱导小麦一系列的生理变化。 ^{60}Co γ 射线和紫外线 UV-C 对小麦胚根的伤害较大, 导致幼苗在后期大量死亡。 N^+ 注入对小麦的损伤效应较 ^{60}Co 和紫外线 γ 射线和紫外线 UV-C 小, 一定注量的 N^+ 注入处理可促进小麦生长。

关键词: 小麦; 诱变; 种子活力; 酶活

中图分类号: Q6-33 **文献标志码:** A

1 引言

自余增亮首次发现低能离子注入诱发生物体变异以来, 辐射诱变效应已成为辐射生物学研究领域中的一个重要课题^[1]。能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换 4 种联合作用为一体的集体生物学效应是低能离子注入生物体后产生的, 因此低能离子注入作为一种新的生物品种改良诱变源可产生较高的突变频率和丰富的诱变图谱^[2-3]。经过 20 多年的发展, 低能离子诱变育种已广泛用于植物、动物及微生物。离子辐照可使植物体内产生大量活性氧自由基^[2], 这些自由基攻击生物大分子, 引起蛋白质和核酸等的损伤^[4]。但植物体内存在很多清除活性氧自由基的酶, 这些酶可与活性氧自由基发生反应, 从而使自由基得到清除, 以达到保护植物免受伤害的目的^[1, 5]。文中比较了 3 种辐照对生理学效应的影响, 对比研究了低能 N^+ 束、 ^{60}Co γ 射线以及紫外线 UV-C 等诱变源对小麦生理效应的影响。研究了离子束辐照对过氧化氢酶

(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)含量的影响。探讨低能离子注入对小麦的影响, 为离子束诱变育种提供理论基础^[6]。

2 材料与方法

2.1 材料处理与培养

选取饱满均一的小麦(小偃 81)种子, 插入盛有花泥的培养皿中, 胚部朝上并露在花泥外部, 使低能 N^+ 够直接照射。采用本实验室的 Titan 脉冲式离子注入机的靶室进行 N^+ 注入。离子注入能量为 30 keV, 真空度为 5×10^{-2} Pa, 采用脉冲式注入, 束流为 200 mA。注入量为: 真空 10 min, 1×10^{17} , 3×10^{17} 和 $5 \times 10^{17} N^+ / cm^2$, 以未注入种子为对照。 γ 射线辐照采用河南省科学院辐照中心的 ^{60}Co 放射源, 注入剂量为 100, 200, 300, 400 和 500 Gy, 剂量率为 10 Gy/min。紫外辐照采用 UV-C 进行连续照射, 照射时间为 2, 4 和 6 d。以上均以未经照射

收稿日期: 2011-07-23; 修改日期: 2011-10-13

基金项目: 河南省水稻重大专项项目(091100110401)

作者简介: 张佳佳(1987-), 女, 山西晋城人, 硕士, 从事离子束生物效应方面的研究; E-mail: jiajia08205635@163.com

通讯联系人: 代西梅, E-mail: daiximei@yahoo.com.cn

种子作为对照, 每处理均为 1 000 粒。将处理过的种子清洗后置于灭菌的培养皿中暗室培养, 待出芽后转至 hoagland 营养液进行光照培养。

2.2 种子发芽指数及幼苗根长苗长测定

在种子培养的第 3 天和第 7 天统计发芽势和发芽率。按照陶嘉龄等^[7]方法计算发芽指数。发芽指数 = $\sum G_t / D_t$ (G_t 是 t 时间内的发芽数, D_t 是相应的天数)。在第 7 天用直尺测量幼苗根长(测最长的侧根)与苗长。每组随机取 30 粒种子测量, 最后取平均值。

2.3 酶活性测定

CAT, POD 和 SOD 提取: 称取 1 g 幼苗, 加入 5 mL 提取缓冲液, 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4 °C, 4 000 rotations/min 离心 15 min, 收集上清液低温保存备用, 测量提取液总体积^[8]。还原型谷胱甘肽提取: 称取 1 g 幼苗, 置于研钵中, 加入 5 mL 经 4 °C 预冷的 50 g/L 三氯乙酸溶液(含 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$), 在冰浴条件下研磨成匀浆, 于 4 °C、10 000 rotations/min 离心 20 min。收集上清液, 测量提取液总体积^[8]。酶液活性测定方法及药品的配置均按照李玲等的方法^[8]。

3 结果与分析

3.1 辐照对小麦种子活力的影响

从表 1~3 可看出, N^+ 离子注入后发芽势呈先上升后下降的趋势, 处理的发芽势都低于对照, 而发芽率则呈现出下降再升高再下降的趋势, 且真空

表 1 低能 N^+ 离子注入后的发芽势、发芽率、发芽指数

注量 ($\times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$)	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数
对照	70.8	92.8	639.7
真空	46.4	80.0	434.4
1	63.2	94.8	722.4
3	50.8	78.8	581.1
5	1.6	8.4	41.7

处理和 $1 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$ 辐照时发芽率高于对照。发芽指数呈先升后降的趋势, 在 $1 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$ 时高于对照。紫外 UV-C 辐照与 $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线辐照下种子发芽势与发芽率均低于对照, 变化趋势不明显。发

芽指数呈现下降后上升的趋势。结果表明, N^+ 在低注量下可刺激种子发芽, 高注量时抑制发芽, 真空对发芽具有抑制作用。紫外 UV-C 与 $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线对种子发芽有抑制作用, 呈指数曲线, 可能由于辐照的杀菌作用和植物自身的修复作用, 使得发芽率在降至最低值后又随剂量的增加而升高。

表 2 紫外 UV-C 辐射后的发芽势、发芽率、发芽指数

辐照时间/d	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数
对照	70.8	92.8	639.7
2	27.6	30.0	240.6
4	18.0	20.4	157.5
6	28.4	32.0	199.1

表 3 $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线辐射后的发芽势、发芽率、发芽指数

剂量/Gy	发芽势 (%)	发芽率 (%)	发芽指数
对照	70.8	92.8	639.7
100	32.4	62.0	338.7
200	18.4	32.4	197.5
300	36.4	40.8	316.5
400	47.6	59.6	436.8
500	47.2	78.4	464.7

3.2 辐照对小麦根长与苗高的影响

从表 4 可以看出, 离子束辐照后小麦根长均略低于对照, 但只有 $5 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$ 处理后根长显著 ($P < 0.05$) 低于对照。从表 5 可以看出, $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线辐照后小麦根长在 100 Gy 时略低于对照, 而其他剂量处理根长均显著低于对照。从表 6 可以看出, 紫外线 UV-C 辐照后对照的小麦根长极显著高于胁迫下的根长。经 $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线辐照过的种子大多没有根, 还有部分根很短并且是在苗已经长出之后才生的根, 这可能是由于 $^{60}\text{Co} \gamma$ 射线辐照对胚根的影响较大的缘故。

表 4 离子束辐照后的平均根长和苗高

单位/cm	对照	真空	$1 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$	$3 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$	$5 \times 10^{17} \text{N}^+ / \text{cm}^2$
平均苗长	11.686	11.841	11.761	12.131	3.142**
平均根长	9.947	7.716**	8.845	8.244**	7.865**

表 5 ⁶⁰Co γ 射线辐照后的平均根长和苗高*

单位/cm	对照	100 Gy	200 Gy	300 Gy	400 Gy	500 Gy
平均苗长	11.686	9.307*	3.550**	1.833**	1.366**	1.715**
平均根长	9.947	7.958*	1.878**	0.843**	1.096**	1.169**

* 表示与对照相比具有显著性, ** 表示与对照相比具有极显著性。

表 6 紫外 UV-C 辐照后的平均根长和苗高*

单位/cm	对照	辐照 2 d	辐照 4 d	辐照 6 d
平均苗长	11.686	2.233**	1.806**	2.621**
平均根长	9.947	1.063**	1.406**	1.665**

* ** 同表 5。

离子束辐照过的苗高在 $5 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 显著低于对照, 在其他注量下略高于对照但没有显著性; ⁶⁰Co γ 射线辐照后对照苗高显著高于其他的苗; 紫外线 UV-C 辐照时对照苗高极显著高于其他处理下的苗高。紫外线 UV-C 辐照后出现很多白苗, 白苗的数量随辐照时间的延长而增加, 但发霉数减少。这可能是因为紫外线 UV-C 对叶绿素的合成进行抑制或对合成叶绿素的器官有一定程度的损伤。由以上表中数据可以看出, ⁶⁰Co γ 射线和紫外线 UV-C 对胚的损伤较大, 可能是由于辐照剂量过大所致, 离子注入对胚的损伤较小, 因此离子注入更适合作诱变源进行诱变育种。

3.3 N⁺注入对小麦各种酶活的影响

(1) N⁺注入对 CAT 活性的影响

由图 1 可看出, CAT 在注量为 1×10^{17} 和 $3 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时活性显著高于对照, 真空与 $5 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 低于对照。说明 N⁺注入对 CAT 活性的影响较明显, 适合的注入量可以提高其活性。

(2) N⁺注入对 POD 活性的影响

由图 2 可看出, 胁迫下 POD 活性均高于对照, 总体呈现先上升后下降的趋势, 在 $3 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时达到最大值。说明低注量注入可促使酶活性的提高, 但当注量增大到一定程度时就会抑制酶活。

(3) N⁺注入对 SOD 活性的影响

如图 3 所示, SOD 活性随注量的增大先上升后下降再上升, $5 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 低于对照, 其他注量下均高于对照, 在 $1 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时达到最大值, 但与 $3 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 相差不大。由此可以看出, 一

定注量的 N⁺注入处理, 可以诱导 SOD 酶活性升高。而高注量的 N⁺注入可以破坏 SOD 的合成。

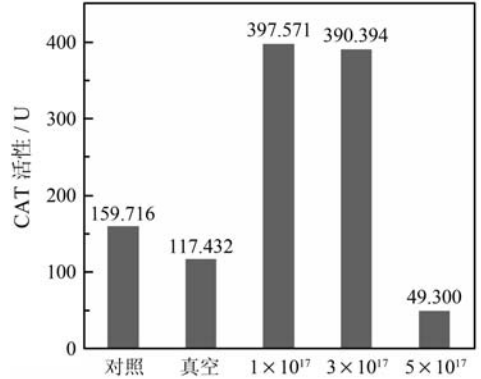


图 1 N⁺注入对 CAT 活性的影响

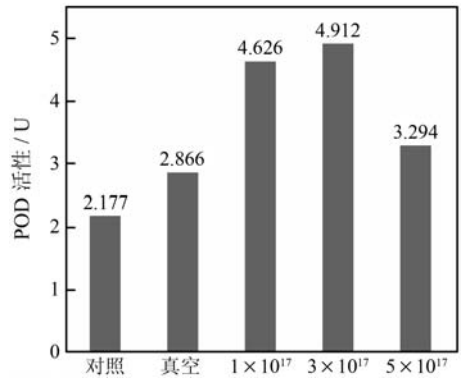


图 2 N⁺注入对 POD 活性的影响

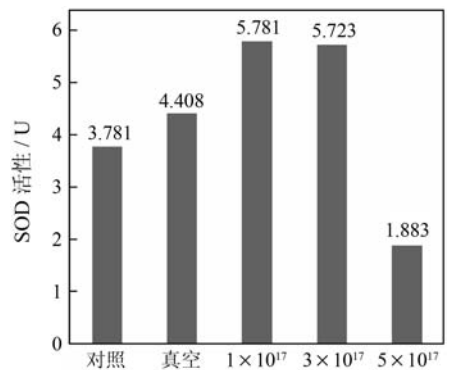


图 3 N⁺注入对 SOD 活性的影响

(4) N⁺注入对 GSH 活性的影响

如图 4 所示, 还原型谷胱甘肽含量随着剂量的增加先下降后上升, 真空时达到最小值, 在 $5 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时达到最大值, 真空与 $1 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 低于对照。说明在低注量下抑制还原型谷胱甘肽的合成, 高注量时可诱发其合成。

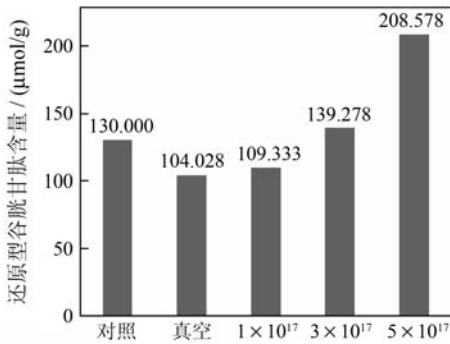


图 4 N⁺注入对 GSH 活性的影响

4 讨论

前人对不同辐照的损伤效应做过研究报道。李国平等^[9]研究了低能 N⁺束、紫外线 UV-C 与 ⁶⁰Co γ 射线辐照对黑松花粉萌发及花粉管生长的影响与 3 种辐照诱发花粉粒细胞损伤效应的差异进行了比较分析。结果表明,低能离子束的损伤效应与其它辐照有两方面的不同,即 N⁺注入剂量与萌发率曲线呈“马鞍型”和 N⁺束注入诱发花粉管顶端肿胀^[9]。吴健等^[10]研究了 3 种辐照对绛红小单孢菌的存活效应和诱变效果,发现离子注入的存活曲线呈下降再上升再下降的趋势,而其它另种辐照为指数曲线。

4.1 物理辐照对小麦种子活力及根苗效应

离子束辐照处理后小麦发芽势低于对照并随剂量增加呈先升后降的趋势,这符合“损伤-修复-损伤”机制,在胁迫下可使植物体受到损伤,但在一定的范围内会产生正效应,当剂量继续增加时就会使生物体受到伤害,使得发芽势有所下降。而在 1 × 10¹⁷ N⁺/cm²发芽率大于对照,在 3 × 10¹⁷ N⁺/cm²,苗长高于对照及其它处理,这些说明植物体本身存在着修复机制,在一定的损伤范围内可以修复并产生正效应。从辐照对种子发芽率的影响趋势可得出,离子注入与紫外线 UV-C 及 ⁶⁰Co γ 射线对种子的作用机理是不同的。这可能是由于能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷交换联合作用导致的,亦可能是离子注入下诱导产生的新辐射损伤修复机制作用的结果^[11]。而 ⁶⁰Co γ 射线和紫外线 UV-C 辐照后发芽势发芽率及出现无根或白苗,说明辐射作用已达到种子胚部,并且所发生的生物学效应存在修复机制^[3]。离子束对小麦的损伤比 ⁶⁰Co γ 射线和紫

外线 UV-C 对小麦的损伤低,说明离子束更适合作为诱变育种的诱变源。

4.2 低能离子束对小麦幼苗酶活影响

低能离子注入种子产生了一系列的物理和化学变化,引起了复杂的生物变化^[2],这些变化将引起遗传物质的改变。由于辐射产生脂质过氧化作用(指细胞膜系统组分脂质分子中不饱和脂肪酸氧化降解的链式反应),活性氧引发不饱和脂肪酸发生自由基反应,这些自由基攻击其他不饱和脂肪酸,又产生更多的自由基^[12]。活性氧自由基攻击生物大分子使得 DNA 断裂,或引起染色体的倒位、异位、缺失和断裂,从而使遗传物质发生改变。CAT, POD 和 SOD 均为保护酶,可以清除自由基。低能离子注入对酶活的影响同样符合“损伤-修复-损伤”机制。离子注入的能量沉积和动量传递产生的自由基对生物体造成损害,离子注入的质量沉积和电荷交换能够清除自由基,对生物体进行修复,但是这种对自由基的清除作用是有限的,因此再次对机体进行损伤^[3]。自由基的产生还会诱导体内酶的变化,以便清除自由基保护植物体。在高剂量下酶活要高于对照,说明离子辐射产生的自由基启动了细胞的修复保护机制^[6]。

综上所述,离子注入与 ⁶⁰Co γ 射线及紫外线 UV-C 作用机制的不同导致对种子的损伤效应有很大不同,进一步研究三者之间的具体差异,可以准确地为诱变育种提供理论指导,为提高小麦的抗氧化作用提供依据,这有利于提高小麦幼苗的抗旱和抗寒性能。

参考文献 (References):

- [1] GUO Jinhua, XIE Chuanxiao, XU Jian, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 2003, 12(5): 368(in Chinese).
(郭金华, 谢传晓, 徐剑, 等. 激光生物学报, 2003, 12(5): 368.)
- [2] YU Zengliang. Introduction of Ion Beam Biotechnology. Hefei: Anhui Sciences and Technology Press, 1998, 67-105, 183-185(in Chinese).
(余增亮. 离子束生物技术. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996, 67-105, 183-185.)
- [3] WEI Shenglin, LIU Jingnan, WANG Tao, *et al.* Acta Prataculturae Sinica, 2004, 13(5): 112(in Chinese).
(魏胜林, 刘竞男, 王陶, 等. 草业学报, 2004, 13(5): 112.)

- [4] LI Xinglin. *Acta Laser Biology Sinica*, 2000, **9**(4): 276 (in Chinese).
(李兴林. 激光生物学报, 2000, **9**(4): 276.)
- [5] GU Yuehua. *Acta Laser Biology Sinica*, 1998, **7**(3): 180 (in Chinese).
(顾月华. 激光生物学报, 1998, **7**(3): 180.)
- [6] PAN Yan, XIAO Xiang, WU Lijun, *et al.* *Acta Laser Biology Sinica*, 2005, **14**(6): 442 (in Chinese).
(潘燕, 肖翔, 吴李君, 等. 激光生物学报, 2005, **14**(6): 442.)
- [7] TAO Jialing, ZHANG Guanghua. *Seed Vigor*. Beijing: Science Press, 1991, 109–111 (in Chinese).
(陶嘉龄, 张光华. 种子活力. 北京: 科学出版社, 1991, 109–111.)
- [8] LI ling. *Plant Physiology*. Beijing: Science Press, 2011, 95–102 (in Chinese).
(李玲. 植物生理学. 北京: 科学出版社, 2011, 95–102.)
- [9] LI Guoping. *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(4): 409 (in Chinese).
(李国平. 原子核物理评论, 2008, **25**(4): 409.)
- [10] WU Jian. *Radiation Research and Radiation Processing*, 2003, **21**(2): 120 (in Chinese).
(吴健. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(2): 120.)
- [11] SONG Daojun. *Nuclear Technology*, 1999, **22**(3): 129 (in Chinese).
(宋道军. 核技术, 1999, **22**(3): 129.)
- [12] GUO Jinhua, WANG Haobo, XIE Chuanxiao, *et al.* *Radiation Research and Radiation Processing*, 2003, **21**(4): 243 (in Chinese).
(郭金华, 王浩波, 谢传晓, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(4): 243.)

Biological Effects of Radiation Mutagenesis in Wheat

ZHANG Jia-jia, DAI Xi-mei, ZHAO Shuai-peng, CHEN Xue-neng

(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China)

Abstract: In this paper, the biological effects, such as germination percentage, germination index and the length of seedlings and roots were investigated by using low-energy N^+ , ^{60}Co γ -rays and ultraviolet UV-C to irradiate the embryos of wheat seeds (Xiaoyan81). The anti oxidative enzyme system (CAT, POD, SOD) and GSH content were studied as well. The results show that the vitality of seed increased and then reduced with increasing the dosage of N^+ ion implantation. The length of roots and seedlings were significantly higher than control. The seed vigor was significant effected after irradiated by ^{60}Co γ -rays and ultraviolet UV-C, but the length of roots and seedlings were significantly lower than control. After N^+ implantation, the changing pattern of CAT was not obviously. The enzymatic activity of POD and SOD were increased at low dosage and reduced at high dosage. The content of GSH was reduced and then raised. The results proved that the damage induced by γ -ray and UV-C to the radicle of wheat was severe that result in a large number of seedling died. However the damage induced by N^+ implantation was lower than that by rays and UV-C irradiation. Certain dosage of ion implantation can promote the growth of wheat.

Key words: wheat; mutagenesis; seed vigor; enzymatic activity