

文章编号: 1007-4627(2012)03-0290-04

低能 N 离子注入对蚕豆根尖细胞的诱变效应

黄雅琴¹, 李尽哲¹, 黄群策²

(1. 信阳农业高等专科学校, 河南 信阳 464000;

2. 郑州大学离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 为了研究低能 N 离子束的细胞遗传学效应, 以不同剂量的 N 离子束对蚕豆种子的种胚进行辐照, 观察分析根尖细胞的微核率、有丝分裂指数和染色体畸变效应。研究发现, 离子束的注入抑制了根尖细胞的有丝分裂, 干扰了正常的有丝分裂过程, 引发了染色体的结构、行为和数目畸变; 随着离子注入剂量的增加, 微核率增加、有丝分裂指数降低、染色体畸变率增加。

关键词: N 离子束; 蚕豆; 根尖细胞; 染色体畸变; 微核

中图分类号: Q691 **文献标志码:** A

1 引言

20 世纪 80 年代中期我国发现和开发了离子束生物技术, 离子束与生物体相互作用的过程中存在着原初阶段的能量沉积效应、质量沉积效应和电荷交换效应。这些效应使得离子束生物技术在应用于作物育种时, 出现了突变谱广、突变频率高、生理损伤小, 并有一定的方向性和重复性的新特点^[1]。20 多年来, 低能离子束在水稻、小麦和棉花等植物遗传育种改良中取得了显著的成效^[2]。然而, 关于离子注入后遗传变异基础的研究却局限于小麦、黑麦和棉花^[3], 它们的根尖细胞有丝分裂和花粉母细胞的减数分裂过程中出现的异常不具有代表性, 不能充分解释其他植物的离子束生物效应。

细胞微核检测技术由于其具有简便、经济、快速、重复性好和灵敏度高的优点而广泛用于食品、医药和化学物质等的检测, 它能较准确地反映致突变因子对细胞产生遗传毒害的大小和细胞染色体的稳定性。染色体检测技术是对分裂期染色体的结构、行为和数目发生的变化进行检测, 它能较准确地反映致突变因子对有丝分裂指数(MI)的影响, 以及染色体畸变的发生水平。本试验利用低能 N 离子束辐照蚕豆种子, 研究了不同剂量的 N 离子束对蚕豆根尖细胞微核、MI 和染色体畸变的影响, 为离子束生物效应提供细胞遗传学资料, 也为其他植物

的遗传改良奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

蚕豆干种子购于郑州普通农贸市场, 挑选大小匀称, 色泽一致, 无病虫害的用于实验。

2.2 辐照方法

挑选 500 粒蚕豆干种子, 切去胚部的一半种皮, 随机分成 5 组, 每组 100 粒, 用透明胶带固定在培养皿上, 使种胚朝上, 用 N 离子进行注入, 注入能量 $E = 30 \text{ keV}$, 剂量分别为 0×10^{17} (CK), 1×10^{17} , 3×10^{17} , 5×10^{17} , $7 \times 10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 。

2.3 根尖细胞的培养与处理

将 5 组处理后的蚕豆种子分别在不同的器皿里浸泡 1 d, 待吸水膨胀后移到铺有 2 层湿润滤纸的培养皿中, 置于 25 °C 黑暗培养 50 h, 待根长至 1~2 cm 时, 于上午 10 时左右剪取根尖。把根尖浸入盛蒸馏水的小管内, 置于冰水共存的容器中, 再把该容器放到 4 °C 的冰箱中冷冻处理 24 h, 勿使材料结冰。取出根尖, 用吸水纸吸去表面水分, 在卡诺固定液中固定 24 h, 再用 95% 酒精漂洗 30 min, 80% 酒精漂洗 30 min, 70% 酒精中 4 °C 保存。将待

收稿日期: 2012-02-19; 修改日期: 2012-02-28

基金项目: 河南省科技前沿基础研究项目(82300433202)

作者简介: 黄雅琴(1986—), 女, 河南信阳人, 助教, 硕士, 从事生物物理学研究; E-mail: hyaqin@yahoo.com.cn;

通信作者: 黄群策, E-mail: quncehuang@zzu.edu.cn.

观察的根尖在 60 °C 的水浴环境中用 1 mol/L HCl 解离 6~7 min, 蒸馏水清洗 10 min, 并且在 0.075 mol/L KCl 中放置 20 min, 再清洗。转移至 EP 管中, 加入 2 滴改良品红染液, 用镊子夹碎根尖细胞组织, 染色 10 min 后, 吸取细胞悬液铺展在载玻片上, 盖上盖玻片, 进行镜检。每个处理随机观察 20 个根尖, 每个根尖观察 1 000 个细胞。

2.4 数据分析

计算蚕豆根尖细胞微核率(MNR)、MI 和染色体畸变率(CAR), 观察各种染色体畸变类型, 如染色体断片、落后染色体、染色体环、染色体桥和微核, 统计 CAR。

$MNR(\%) = \text{微核细胞数} / \text{观察细胞总数} \times 1\,000\%$,

$MI(\%) = \text{分裂期细胞数} / \text{观察细胞总数} \times 100\%$,

$CAR(\%) = \text{染色体畸变细胞数} / \text{分裂期细胞数} \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 N 离子注入对蚕豆根尖细胞 MNR 和 MI 的影响

对不同剂量 N 离子束注入处理后的蚕豆根尖细胞进行了镜检观察。MNR 随离子注入剂量增加而升高(见图 1)。与对照 $0 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 剂量下的 MNR 相比, 当剂量为 $1 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时, MNR 升高最少, 仅 2.46%; 当剂量为 $7 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时, MNR 升高最多, 达 19.7%。同时, 微核在细胞周

期的不同时期都有出现, 随着剂量的增加, 分裂期微核与间期微核都增多, 双微核和三微核几乎都出现在细胞间期。由此可见, MNR 与离子注入剂量之间呈正相关。

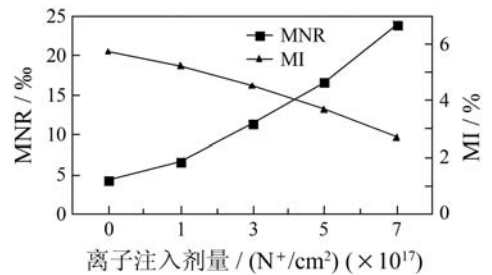


图 1 N 离子注入对蚕豆根尖细胞的 MNR 和 MI 的影响

MI 随离子注入剂量增加而降低(见图 1)。与对照 $0 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 剂量下的 MI 相比, 当剂量为 $1 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时, MI 降低最少(0.52%); 当剂量为 $7 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 时, MI 降低最多(3.06%)。由此可见, N 离子的注入明显抑制了根尖细胞的有丝分裂, 随着剂量的增加抑制越显著, 即 MI 与离子注入剂量之间呈负相关。

综上所述, 随着离子注入剂量的增加, MNR 增加, MI 降低。可见, N 离子束的注入干扰了正常的生理生化过程, 严重影响了有丝分裂的正常发生, 细胞核与染色体在外界刺激下发生无规则不均等分裂, 形成游离于细胞质中的微核。

3.2 N 离子注入对蚕豆根尖细胞 CAR 的影响

对不同剂量 N 离子注入处理后的蚕豆根尖细胞的有丝分裂进行观察, 其间出现的染色体畸变有

表 1 N 离子注入对蚕豆根尖细胞 CAR 的影响

剂量/(N ⁺ /cm ²)	染色体畸变类型及概率/%					CAR/%
	微核	染色体断片	染色体桥	染色体环	落后染色体	
0×10^{17}	0.49	0.35	0	0	0	0.84
1×10^{17}	1.76	1.13	0.24	0	0.39	3.52
3×10^{17}	2.19	1.67	0.31	0.22	0.78	5.17
5×10^{17}	2.72	2.25	0.74	0.69	1.43	7.83
7×10^{17}	3.41	2.66	1.02	0.95	2.18	10.22

5 种类型, 分别是微核、染色体断片、染色体桥、染色体环和落后染色体, 如图 2 所示。对各种类型的分 CAR 进行统计后, 得到总的 CAR(表 1)。由表 1 可见, 对照组的 CAR 最低(0.84%), 仅出现了微

核和染色体断片两种畸变类型。在最小的辐照剂量 $1 \times 10^{17} \text{ N}^+ / \text{cm}^2$ 处理下, 又出现了染色体桥和落后染色体这两种畸变类型。随着剂量的增加出现了第 5 种畸变类型—染色体环, 在最大的辐照剂量 $7 \times$

$10^{17} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 处理下, CAR 达到最大值 10.22%, 畸变主要为微核畸变, 概率达 3.41%。综上所述,

随着离子辐照剂量的增加, 染色体畸变类型更加丰富, CAR 升高, 两者呈正相关。

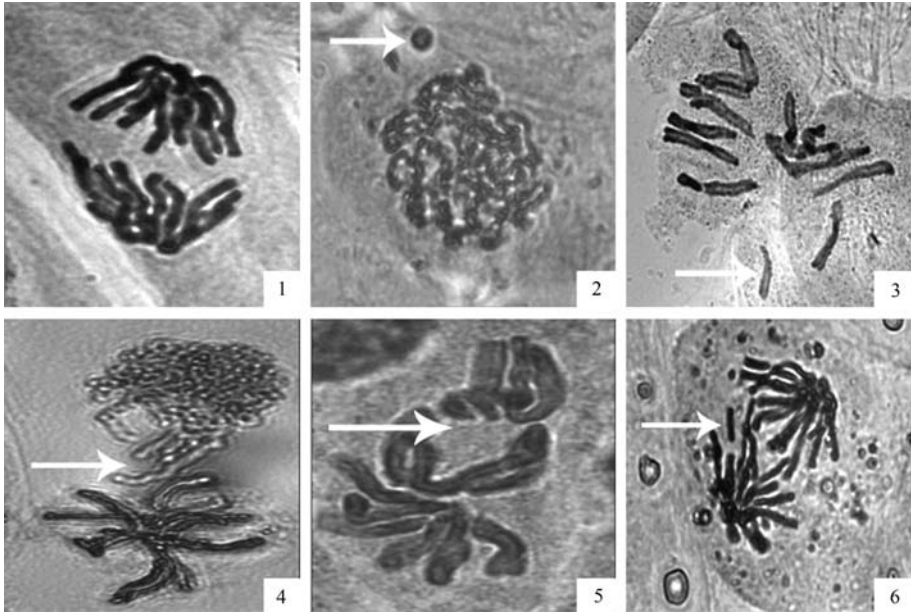


图 2 蚕豆根尖细胞染色体畸变类型

1. 正常对照, 2. 分裂前期微核, 3. 染色体断片, 4. 染色体桥, 5. 染色体环, 6. 落后染色体。

4 讨论

目前, 离子束生物技术的应用研究主要集中在植物领域, 其中, 细胞遗传学效应是离子束生物效应的研究重点之一, 也是农作物遗传育种的细胞遗传学基础。前人已经对小麦^[4-5]和棉花^[6]做了初步的研究, 充分肯定了离子束这一新型诱变源的诱变效应。本研究配合 1 个对照, 以 4 个不同剂量梯度的 N 离子束对蚕豆干种子的胚进行了辐照, 通过对蚕豆根尖细胞的观察和分析, 认为随着离子辐照剂量的增加, 根尖细胞的 MNR 显著增加, 并且有丝分裂过程中出现的染色体畸变类型增多, CAR 也显著增加, 但是 MI 却明显降低。这与前人得出的离子束剂量效应相一致。可见, 随着辐照剂量的增大, 辐照对细胞的损伤增强, 这也为筛选优良的变异品种提供了更多可能。同时, 说明离子束在辐照诱变新的突变类型, 培育新的优良品种方面存在较大的潜力。

本试验中的离子辐照剂量均为 10^{17} 数量级, 而前人的实验多采用的是 10^{16} 数量级, 这是因为考虑到前人的研究对象是种胚很小的小麦, 而本工作的

研究对象是种胚较大的蚕豆, 离子注入剂量的增加, 能诱发出更多染色体畸变, 更能说明离子束的生物学效应。染色体畸变通常指染色体结构、行为和数目的变化, 其中染色体结构的变异主要有缺失、重复、倒位和易位 4 种, 典型表现是染色体断片、染色体桥和染色体环; 染色体行为变异的典型表现是落后染色体; 微核的诱发必然导致染色体数目的减少, 产生非整倍体。武振华等^[7]用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照紫苏种子, 官梅等^[8]用 ^{12}C 离子束辐照油菜种子, 颜红梅等^[9]用 $^{20}\text{Ne}^{10+}$ 离子束辐照牧草种子, 这些实验对根尖细胞的 MNR 和 CAR 均做了研究和观察, 也都认为随着剂量的增加 CAR 升高。可见, 低能 N 离子束具有和重离子束一样的剂量效应, 这给彼此的研究提供了参考和对照。

根尖细胞的有丝分裂异常和花粉母细胞的减数分裂异常是离子束细胞遗传学效应的两个研究重点。张怀渝等^[5]对离子注入处理后的小麦 M1 代植株花粉母细胞减数分裂行为进行了观察, 发现染色体配对出现了异常, 产生了大量的染色体畸变。本试验仅对根尖细胞的有丝分裂异常做了研究, 花粉母细胞的减数分裂异常还有待于今后进一步的研究

和补充。

参考文献 (References):

- [1] YU Zengliang. *Physics*, 1997, **26**(6): 333(in Chinese).
(余增亮. *物理*, 1997, **26**(6): 333.)
- [2] WEI Zengquan, XIE Hongmei, LIANG Jianping, *et al.* *Nuclear Physics Reviews*, 2003, **20**(1): 38(in Chinese).
(卫增泉, 颀红梅, 梁剑平, 等. *原子核物理评论*, 2003, **20**(1): 38.)
- [3] YU Zengliang. *On Ion Beam Applied to Bio-tech*. Hefei: Anhui Sci Tech Press, 1998, 195–222(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, 1998, 195–222.)
- [4] LU Shuxia, JI Shengdong, YUE Chunhui, *et al.* *Journal of Henan Normal University*, 2011, **39**(1): 165(in Chinese).
(路淑霞, 姬生栋, 岳春辉, 等. *河南师范大学学报*, 2011, **39**(1): 165.)
- [5] ZHANG Huaiyu, SONG Yun, REN Zhenglong. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2005, **23**(2): 147 (in Chinese).
(张怀渝, 宋云, 任正隆. *四川农业大学学报*, 2005, **23**(2): 147.)
- [6] CHENG Beiju, TIAN Qiuyuan, LIN Yi, *et al.* *Journal of Anhui Agricultural University*, 1991, **18**(2): 148(in Chinese).
(程备久, 田秋元, 林毅, 等. *安徽农学院学报*, 1991, **18**(2): 148.)
- [7] 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.)
- [8] GUAN Mei, LI Xun. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, **32**(6): 878(in Chinese).
(官梅, 李恂. *作物学报*, 2006, **32**(6): 878.)
- [9] XIE Hongmei, HAO Jifang, WEI Zengquan, *et al.* *Acta Laser Biology Sinica*, 2003, **12**(5): 346(in Chinese).
(颀红梅, 郝冀方, 卫增泉, 等. *激光生物学报*, 2003, **12**(5): 346.)

Effects of Irradiation with Low-energy Nitrogen Ion Injection on Root Tip Cells of Broad Bean

HUANG Ya-qin¹, LI Jin-zhe¹, HUANG Qun-ce²

(1. *Department of Biotechnology, Xinyang Agricultural College, Xinyang 464000, Henan, China;*

2. *Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China*)

Abstract: In order to study the cytogenetic effects of low-energy nitrogen ion irradiation, broad bean seed embryo was irradiated by different doses of nitrogen ions. Micronucleus rate, mitotic index and chromosome aberration in root-tip cells were analyzed. The results showed that the injection of ions inhibited mitosis of root tip cells, interfered the normal process of mitosis, caused aberrations of chromosome structure, behavior and number. The frequency of micronucleus and chromosomal aberrations increased with the increasing radiation dosage, while mitotic index decreased.

Key words: nitrogen ion beam; broad bean; root tip cell; chromosomal aberration; micronucleus