文章编号: 1007-4627(2010)03-0335-06

12C⁶⁺离子束辐照紫苏干种子当代效应^{*}

武振华1,2,3,张红1,2,3,#,王新字4,薛林贵5,牛炳韬4,赵旭5

(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;
 - 4 兰州大学生命科学学院细胞生物学研究所,甘肃 兰州 730000;
 - 5 兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:利用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的12 C6+离子束辐照紫苏干种子(辐照剂量为 40, 80 和 120 Gy, 剂量率 4 Gy/min), 探讨了重离子束辐照对紫苏 M1 代的生物学效应。结果发现, 经 不同剂量的¹²C⁶⁺离子束辐照后,紫苏种子的发芽率、发芽势、存活率、株高、分枝数、单株产量和 千粒重等生物学性状均发生了变化,其中发芽势、单株产量和千粒重随辐照剂量的提高而降低,且 有明显的剂量效应关系,但发芽率、大田成活率、株高和分枝数却随辐照剂量的增大,呈现出明显 的"抛物线"趋势;紫苏幼苗根尖细胞的微核率和染色体畸变率随辐照剂量增加呈线性增加关系。这 表明: 12 C6+ 重离子束辐照紫苏种子, 具有明显的当代损伤效应, 在本试验剂量范围内, 低剂量辐照 对发芽率和成活率有促进作用。

关键词: 紫苏; ${}^{12}C^{6+}$ 离子束; 诱变育种; 生物性状; 染色体畸变 中图分类号: Q691.5; Q691.8; R932; S565.8 文献标识码: A

1 引言

紫苏(Perilla frutescens (L.) Britt),别名荏 子、赤苏、红苏等,唇形科一年生草本植物,是一 种具有很高利用价值的食、药两用植物,全草入药。 紫苏在我国有悠久的种植历史,栽培广泛,资源丰 富,成本较低,是卫生部首批公布的60种食药两用 物品之一。它也是目前发现的 α-亚麻酸含量最高的 植物资源之一, 现已成为国内外医疗保健、食品和 化工等领域专家研究的热点。但这些研究主要集中 在紫苏油的成分和药理功效等方面[1-5],有关其诱 变育种进而提高次生代谢物 α-亚麻酸含量方面的研 究未见报导。

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、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[6-10]。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。

本研究利用¹²C⁶⁺辐照紫苏种子,从形态特征、 染色体畸变和一些生物学性状等方面研究了重离子 对紫苏辐照当代的损伤效应,以期为提高紫苏产量 和次生代谢物 α-亚麻酸含量的诱变育种研究奠定基 础。

材料与方法 2

2.1 材料

紫苏干种子由兰州大学生命科学学院细胞生物 学研究所王新宇教授馈赠。

作者简介: 武振华(1974-),男(汉族),甘肃通渭人,硕士研究生,从事辐射生物学效应方面的研究工作; E-mail: wuzhh@impcas. ac. cn

收稿日期: 2009 - 10 - 20; 修改日期: 2010 - 03 - 05

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(0803RJZA074)

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

2.2 辐照方法

辐照实验在中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置(HIRFL)生物辐照终端上进行。初始能量为80 MeV/u的C离子束经过束流管道的镍窗、电离室、空气、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40,80和120 Gy,剂量率为4 Gy/min,其中以没有辐照的种子作为对照。

2.3 大田试验

大田实验在兰州交通大学化学与生物工程学院试验田中进行。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人试验田小区。每小区面积约 4 m×6 m,行距 20 cm,株距 10 cm,试验田周围设约 1 m 的保护行。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,其它各条件基本保持一致。

2.4 检测指标

(1) 微核和染色体畸变观察

随机选取对照(CK)组、40,80和120Gy组的紫苏种子各100粒,培养皿内发芽,待根长约2cm时,切取1cm长的根尖分生区,冰浴低温预处理24h以上,Carnoy固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)固定(4℃)24h,加入1mol/l盐酸,60℃水浴解离8min,洗涤,改良的卡宝品红染液染色20min,洗涤,2.5%的纤维素酶和果胶酶混合酶液(25℃)酶解8min,蒸馏水低渗2min,45%醋酸2min,取根尖约0.5cm,压片,在Motic显微镜下观察微核和染色体畸变。每个处理剂量各观察20个根尖,每个根尖随机选取10个视野,统计出现微核、落后染色体和染色体桥等畸变现象的细胞数,拍照,统计微核率和染色体质等变率[11]。

微核率 = $\frac{2 f \otimes k \otimes k \otimes k}{2 \times k \otimes k} \times 100 \%$,

染色体总畸变率 = $\frac{$ 含有染色体畸变的总细胞数 \times 100% 。 观察细胞总数

(2) 发芽率、发芽势和田间存活率的测定

在室温条件下,把不同剂量重离子辐照的紫苏种子和对照各 100 粒放入铺有湿纸的培养皿内,发芽以子叶展开为标准,第 8 和 12 d 分别对发芽势和发芽率进行统计,其中发芽势按下式计算:

发芽势 = $\frac{8 \text{ d} \text{ 内发芽的种子粒数}}{\text{供测定种子粒数}} \times 100\%$ 。

在 35 和 70 d 按小区分别统计不同辐照剂量紫 苏的存活率。

(3) 株高和分枝数统计

在开花期对大田中每个小区的植株分别统计株 高和分枝数,每个辐照剂量组随机统计 20 株。

(4) 单株产量和千粒重测定

根据不同辐照剂量,在大田每小区随机选取 30 株,收取,晾干,分别脱粒、统计单株产量,求平均值,从每株的纯净种子中随机取出 100 粒为一组称量,称三组,求平均重量,并由此计算出千粒重。

3 结果

3.1 辐照对紫苏根尖细胞染色体畸变的影响

不同剂量的¹² C⁶⁺ 离子束辐照紫苏种子后,由于对其 DNA 的损伤,产生了一些染色体畸变类型,如细胞质中圆形或椭圆形的丢失的染色体片段——微核,细胞分裂后期两细胞之间的桥状类似物——染色体桥,细胞分裂时从细胞核中分离出来的染色体——游离染色体以及细胞分裂后期染色体分配不均,向一极移动时落后的染色体——滞后染色体等

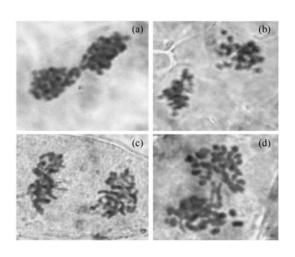


图 1 ¹² C⁶⁺ 束辐照对紫苏幼苗根尖细胞产生的畸变染色体 (a) 微核,(b) 游离染色体,(c) 滞后染色体,(d) 染色体桥。

(图 1),且随辐照剂量的增大,微核率和染色体畸变率都呈上升趋势(如表 1)。与 40 Gy 处理组相比,80 和 120 Gy 处理组根尖细胞的微核率分别提高了 1.0% 和 2.6%,染色体畸变率分别提高了1.8%和 4.0%。这表明,重离子束辐照对紫苏种子

造成了一定程度的损伤,表现为染色体畸变率和微核率随辐照剂量的增加而显著提高(a P<0.05,b P<0.01)。

表 1 12 C6+ 束辐照对紫苏根尖细胞染色体畸变的影响

监测指标	辐照剂量/Gy				
血火剂相外	СК	40	80	120	
观察细胞数	500	500	500	500	
微核细胞数	0	8	13	21	
染色体畸变细胞数	0	2	6	9	
微核率(%)	0	1.6 \pm 0.31	2.6 \pm 0.74 ^a	4.2 ± 1.01^{b}	
染色体总畸变率(%)	0	2.0 ± 0.43	3.8±0.11ª	6.0 ± 1.64^{b}	

^{*} 与 CK 组相比, a P<0.05, b P<0.01。

3.2 辐照对紫苏发芽率、发芽势和存活率的影响

实验结果表明,不同剂量的¹² C⁶⁺ 离子束辐照对紫苏的发芽率、发芽势和大田存活率有较大的影响。与 CK 组相比,紫苏种子经不同剂量的¹² C⁶⁺ 离子束均匀辐照之后,发芽时间都推迟大约 1—2 d。随辐照剂量的增加,紫苏的发芽率曲线表现为"抛物线"形,而发芽势曲线表现为逐渐递减的"双曲线"趋势(图 2)。

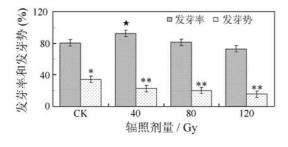


图 2 不同剂量 12 C $^{6+}$ 束辐照对紫苏发芽率和发芽势的影响与 CK 组相比, $\bigstar P$ <0.05,* P<0.05,* * P<0.01。

紫苏种子在培养皿内 2 d 后开始"露白", 8 d 时统计发芽势,发现随辐照剂量的增加,与 CK 组相比,发芽势呈明显的下降趋势(**P<0.01),且有剂量效应关系。12 d 时统计发芽率,发现 40和 80 Gy 辐照组的发芽率和 CK 组相比分别提高了14.8%和 8.7%,而 120 Gy 辐照组的反而降低了9.6%,其中 40 Gy 组提高显著(P<0.05),有统计学意义。这说明较低剂量的C0.05,有统利于紫苏的发芽。

紫苏种子在大田的存活率统计结果如图 3 所示。在播种后第 35 d 统计发现,与 0 Gy 的 CK 组相比,存活率变化不大;但在 70 d 时统计发现,40

Gy 辐照组的存活率比 CK 组提高了 6.9% (* P < 0.05),而 80 和 120 Gy 辐照组的反而分别降低了 20.2%和 33.6% (* * P < 0.01)。

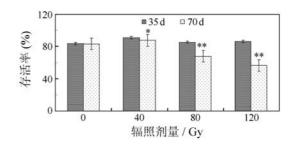


图 3 不同剂量¹²C⁶⁺离子束辐照对紫苏存活率的影响 与CK组相比,*P<0.05,**P<0.01。

3.3 辐照对紫苏株高和分枝数的影响

研究发现,不同剂量的 12 C°+ 离子束辐照紫苏种子,对植株的后期发育有重要影响,如辐照后植株矮化、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等。对开花期统计发现,就平均株高而言,与对照组相比,40 Gy 辐照组明显提高(c P<0.05),80 和 120 Gy 组却略有降低,但降低不明显,没有统计学意义(表 2);就平均分支数而言,各辐照剂量组的分支数都有所提高,其中低剂量组效果较为明显(d P<0.05),有统计学意义。这表明重离子辐照能增加紫苏的分枝数,且较低剂量的重离子辐照对紫苏的株高有一定促进作用。

表 2 不同剂量12℃6+ 束辐照对紫苏株高和分枝数的影响

检测指标 -	辐照剂量/Gy				
	CK	40	80	120	
株高/m	1.22±0.2	1.29±0.42°	1.18±0.19	1.16±1.9	
分枝数	19.1 \pm 1.7	24.4 ± 2.4^{d}	22.8 \pm 1.3	22.2±1.4	

^{*} 与 CK 组相比, c P<0.05, d P<0.05。

3.4 辐照对紫苏单株产量和千粒重的影响

经¹² C⁶⁺ 离子束均匀辐照之后,不同辐照剂量的紫苏,其单株产量和千粒重变化如图 4 所示。与 0 Gy 的 CK 组相比,40,80 和 120 Gy 辐照组的单株产量随辐照剂量的增大而降低,分别降低了0.57,0.73 和 1.02 g; 千粒重的变化趋势与单株产量的基本一致,与辐照剂量关系也呈负相关,40,80 和 120 Gy 辐照组的千粒重和 CK 组相比分别降

低了 5.5%, 11.64%和 17.92%。

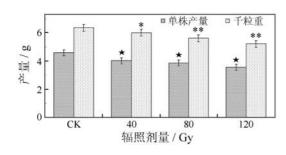


图 4 不同剂量的¹² C⁶⁺ 离子束辐照对紫苏单株产量和千粒 重的影响

与 CK 组相比, ★P<0.05, *P<0.05, **P<0.01。

4 讨论

近年来,越来越多的学者把重离子束诱变技术 应用到了植物领域,其中,有关染色体畸变的研究 是离子诱变、染色体工程和生物学效应研究的重要 方面之一。染色体畸变通常表现为微核、双核、多 核、染色体桥、滞后染色体和游离染色体等现象, 这些畸变在损伤修复时,有可能引起基因结构改 变,产生一些正向突变,培育出优良品种,所以, 重离子辐照引起的有关染色体畸变的研究在育种应 用上具有重要意义[11]。本研究中,紫苏种子经不同 剂量的¹²C⁶⁺离子束均匀辐照后,产生了一些染色 体畸变, 且随辐照剂量的增大, 染色体畸变率逐渐 提高。这可能是由于随辐照剂量的增大,辐照对细 胞的损伤增强, DNA 断裂片段增多, 错配几率增大 而引起,这也为筛选优良的变异品种提供了更多可 能。同时,说明重离子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。

在本研究中,经不同剂量的¹² C⁶⁺ 离子束均匀辐照紫苏种子之后,其发芽率和存活率变化呈现"抛物线"趋势,而发芽势变化表现为逐渐递减的"双曲线"。其中发芽率和存活率变化趋势与某些同行的研究结果相似^[12,13],却与有些学者的有所不同^[14-17],罗红兵和颉红梅等^[14,15]的研究结果表明:辐照剂量越大,发芽率越低。因为随辐照剂量增大,辐照抑制也增强。但本研究发现,低剂量 C 离子束对紫苏发芽有促进作用,只有在较高剂量时才有抑制作用,这可能与辐照源和实验材料的种属差异有关,也可能与辐照剂量的选择范围不同有关。董喜存等^[8]和 Yu 等^[16]研究发现,低能重离子注入

能使植物出现"反常辐照损伤"(即在低注入剂量段,生物存活率与注入离子量的关系呈现先降后升再降的"马鞍型"曲线),但在本研究中却表现为"抛物线"趋势,这可能是本次研究使用的 C 离子束贯穿剂量过大,辐照剂量梯度间隔也比较大而引起的;发芽势变化表现为逐渐递减的"双曲线",是因为辐照剂量越大,对种子的损伤越严重而应起。

重离子辐照能改变植物的一些生物学性状,且对植物生命活动的影响具有双重效应,低剂量常表现为刺激效应,而高剂量则带来抑制效应[18]。在本研究中,发现辐照紫苏的某些性状具有类似的现象,如分支数和株高的变化,较低剂量时能明显提高紫苏的分支数和株高,但较高的剂量却表现为抑制作用;千粒重和单株产量的变化却有所不同,随辐照剂量的提高而降低,且有剂量效应关系。这可能与不同植株及不同性状的差异有关,也可能与辐照剂量的选定和性状的变异剂量范围有关。

在本研究的 M1 代发现了一些表型和性状有变异的植株,如有叶缘皱缩、分枝多、花期较短、单株产量和千粒重都高的的正突变株,也有叶片畸形、分枝很少、矮而弱小和产量极低的负突变株。不过这些变异类型是由于辐射损伤还是基因变异引起,且能否稳定遗传,还有待于在其后代的后续研究中继续观察,并在分子水平上进行检测鉴定。

参考文献(References)。

- [1] Liu Yuexiu, Zhang Weiming, Qian Xueshe. Chinese Wild Plant Resources, 1996, (3): 24(in Chinese). (刘月秀,张卫明,钱学射.中国野生植物资源, 1996, (3): 24.)
- [2] Zhang Hong, Huang Jianshao, Zhao Donghai. Food & Machinery, 2006, **22**(2); 41(in Chinese).
 (张洪,黄建韶,赵东海.食品与机械,2006,**22**(2); 41.)
- [3] Yin Chaozhou, Li Baocun, He Linchong, et al. Plants, 1990, **17**(4): 18(in Chinese). (殷朝洲,李保存,何林冲,等. 植物杂志,1990, **17**(4):
- [4] Zhang Yanping, Zhang Hong, Wang Weihua. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 1999, 14(3): 4(in Chinese).

(张燕平,张红,王维华. 中国油脂学报,1999,14(3):4.)

[5] Hui Guojun, Ge Fahuan, Wang Haibo, *et al*. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 1996, **27**(2): 51(in Chinese).

- (辉国钩,葛发欢,王海波,等.中国医药工业杂志,1996,**27** (2):51.)
- [6] 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.)
- [7] Wang Zhidong. Isotopes, 2005, **18**(3): 183(in Chinese). (王志东. 同位素, 2005, **18**(3): 183.)
- [8] Dong Xicun, Li Wenjian, He Jinyu, et al. J Radiat Res Radiat, 2007, **25**(6): 359(in Chinese). (董喜存,李文建,何金玉,等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(6): 359.)
- [9] Hou Suiwen, Sun Landi, Zhang Yingcong, et al. Nuclear Techniques, 2008, **31**(6): 449(in Chinese). (侯岁稳,孙兰弟,张颖聪,等. 核技术, 2008, **31**(6): 449.)
- [10] Guan Mei, Li Xun. Acta Agronomica Sinica, 2006, **32**(6): 878(in Chinese). (官梅,李栒. 作物学报, 2006, **32**(6): 878.)
- [11] 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.)
- [12] Liang Qianjin, Hu Yulian, Zhang Genfa. Acta Bio-phys Sin,

- 2002, **18**(2): 251(in Chinese). (梁前进, 胡玉连, 张根发. 生物物理学报, 2002, **18**(2):
- 251.)

 [13] 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.)
- [14] Xie Hongmei, Hao Jifang, Wei Zengquan, el al. J Radiat Res Radiat Process, 2004, 22(1): 61(in Chinese). (颜红梅, 郝冀方, 卫增泉, 等. 辐照研究与辐照工艺学报, 2004, 22(1): 61.)
- [15] 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.)
- [16] Yu Z L, Yang J B, Wu Y J, et al. Radiat Phys Chern, 1994, 43(4): 349.
- [17] Huang W D, Yu Z L, Zhang Y H. Nucl Instr and Meth, 1998, **B134**: 202.
- [18] Hou Suiwen, Wu Dali, Zhang Yingcong, et al. J Radiat Res Radiat Process, 2008, **26**(2): 78(in Chinese). (侯岁稳,吴大利,张颖聪,等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, **26**(2): 78.)

Effects of Irradiation with ¹²C⁶⁺ Ions on M1 Characters of Perilla frutescens (L.) Britt^{*}

 $WU\ Zhen-hua^{1,\ 2,\ 3}\ ,\ ZHANG\ Hong^{1,\ 2,\ 3,\ \sharp}\ ,\ WANG\ Xin-yu^4\ ,\ XUE\ Lin-gui^5\ ,\ NIU\ Bing-tao^4\ ,\ ZHAO\ Xu^5\ ,\ NIU\ Bing-tao^4\ ,\ ZHAO\ Xu^5\ ,\ NIU\ Bing-tao^5\ ,\ NIU\ Bing-tao^6\ ,\ NIU\ Bing-tao^6$

- (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 Prevince, Lanzhou 730000, China;
- 4 Institute of Cell Biology, School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;
- 5 School of Chemistry and Bioengineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To investigate the M1 biological effects of heavy ions on *Perilla frutescens* (L.), its dry seeds of it were irradiated by ¹²C⁶⁺ with the dose of 0, 40, 80 or 120 Gy respectively at the rate of 4 Gy/min delivered by the Heavy Ion Research Facility in Lanzhou(HIRFL). The results showed that biological characters such as germinating rate, germinating potentiality, survival rate, plant height, numbers of branch, yield per plant and 1000-grain weight were changed after irradiation. Moreover, the germinating potentiality, yield per plant and 1000-grain weight decreased in a dose-dependent manner. The germinating rate, survival rate, plant height and numbers of branch exhibited obviously "parabola" trends with irradiation

^{*} Received date: 20 Oct. 2009; Revised date: 5 Mar. 2010

Foundation item: Natural Science Foundation of Gansu Province(0803RJZA074)

[#] Corresponding author: Zhang Hong, E-mail: zhangh@impeas.ac.cn

doses. The frequency of micronucleus and chromosomal aberration in root-tip cells of *Perilla frutescens* (L.) was observed "linear rise" trend with the increase of radiation dosage. Data suggest that exposure with low-dose ¹²C⁶⁺ to seeds of *Perilla frutescens* (L.) has obvious injury effects at the first generation, and the low-dose irradiation has apparent promotive function to the germinating rates and survival rates in the range of irradiation dosage at this experiment.

Key words: *Perilla frutescens* (L.) Britt; ¹²C⁶⁺ ion beam; mutation breeding; biological character; chromosomal aberration