

文章编号: 1007-4627(2014)03-0411-05

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿 M1 代低温胁迫存活率、 过氧化氢酶及过氧化物酶活性的影响

王曙阳^{1, 2}, 李景华³, 姜伯玲¹, 哈荣华⁴, 李腾腾⁴, 余成群⁵,
刘青芳¹, 李文建¹, 陈积红¹, 刘敬¹, 胡伟¹

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

2. 兰州大学, 兰州 730000;

3. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050;

4. 西北师范大学, 兰州 730070;

5. 中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100039)

摘要: 研究了不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对中兰 1 号、BC-04-477、塔城 3 种苜蓿 M1 代个体在低温胁迫下存活率、过氧化氢酶 (CAT) 及过氧化物酶 (POD) 活性的影响。在辐照剂量为 400 Gy 时, 中兰 1 号低温胁迫组存活率、CAT 活性比未辐照的对照分别提高了 33.3%, 56.3%, POD 活性与未辐照的对照无差异; 在辐照剂量为 400 Gy 时, BC-04-477 低温胁迫组存活率、CAT 及 POD 活性比未辐照的对照组分别提高了 33.3%, 69.2%, 5.1%; 塔城在辐照剂量为 800 Gy 时, 低温胁迫组的存活率、CAT 及 POD 活性比未辐照的对照组分别提高了 25%, 26%, 22.8%。以上结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照可以提高中兰 1 号、BC-04-477、塔城的低温环境的存活能力, 提高苜蓿抗寒性能。

关键词: $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照; 低温胁迫; 存活率; 过氧化氢酶活性; 过氧化物酶活性

中图分类号: R146 **文献标志码:** A **DOI:** 10.11804/NuclPhysRev.31.03.411

1 引言

重离子束作为植物新的诱变源也越来越受到重视, 由于它具有能量沉积效应和典型的 Bragg 峰, 同时还具有传能线密度大, 相对生物效率高, 损伤后修复效应小及较小的氧增比等优势, 重离子辐射诱变育种已成为获得植物新遗传资源选育新品种的重要途径之一。刘振声等^[1]用重离子辐照水稻获得良好的诱变效果; 卫增泉等^[2]用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照春小麦种子, 在第 5 代获得了几个增产 36% 的优良新品系。

苜蓿是世界上栽培面积最广泛、最重要的豆科牧草之一, 素有“牧草之王”之称。当前我国苜蓿的育种目标, 主要是以提高产草量与抗逆性为主, 兼顾饲草品质与种子产量。苜蓿选育多年来, 很多学者进行

了诱变苜蓿抗寒、抗旱等优良特性的新品种的选育工作, 包括 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 诱变(刘杰淋等^[3], 黑龙江省农业科学院草业研究所)、离子束诱变(王梦姣等^[4], 西北农林科技大学)、紫外线诱变(李波等^[5], 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院)以及硫酸二乙酯诱变苜蓿愈伤组织(李波等^[6], 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院)。刘青芳等^[7]采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子对紫花苜蓿下胚轴及子叶外植体进行辐照处理, 研究重离子辐照对愈伤组织诱导率、相对生长率、体细胞胚诱导率及植株再生的影响。苜蓿种子辐照处理后低温下存活率、过氧化氢酶 (CAT) 及过氧化物酶 (POD) 活性与辐照剂量关系的研究未见报道。本实验研究中兰 1 号、BC-04-477、塔城 3 种苜蓿种子经不同剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照, 在低温胁迫下其存活率、抗寒性的变化。

收稿日期: 2013-12-05; 修改日期: 2014-02-14

基金项目: 西藏科技厅西藏饲草产业专项(Y106460XZO); 中国科学院西部行动项目(KZCXZ-XB3-05); 甘肃省辐照育种工程实验室资助项目

作者简介: 王曙阳(1974-), 女, 甘肃正宁人, 副研究员, 从事辐射生物学相关研究; E-mail: wangsy@impcas.ac.cn。

<http://www.npr.ac.cn>

2 材料与方法

2.1 辐照实验^[8]

从中兰 1 号、BC-04-477、塔城 3 个品种的种子中挑选饱满的、没有受过损伤种子分为 4 个辐照剂量组，装入辐射皿。利用能量为 75 keV 的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束进行穿透辐照，每一剂量设 3 个平行对照。根据 2011 年辐照剂量与抗寒性大田实验，2012 年对 3 种苜蓿种子采用如下 4 个辐照剂量，中兰 1 号为 400, 800, 1000, 1200 Gy, BC-04-477 为 400, 600, 800, 1000 Gy, 塔城为 200, 400, 800, 1000 Gy。

2.2 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿低温胁迫下存活率实验^[9-10]

取不同辐照剂量苜蓿种子各 50 粒，3 个品种共 600 粒种于 150 个小盆中，其中 75 盆在 25 °C 温室培养，培养 5 d 后统计其出苗率。另外 75 盆在 25 °C 温室培养 18 d 后，进行 0 °C 低温胁迫培养 24 h，25 °C 温室培养 24 h 后统计其死亡率。研究辐照剂量与苜蓿低温出苗率、存活率关系。

2.3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿 CAT 及 POD 活性影响研究^[11-12]

取 3 个品种 (不同辐照剂量) 的苜蓿种子种于小盆中，分两部分，一部分在 25 °C 温室培养 19 d；另外一部分在 25 °C 温室培养 18 d，0 °C 低温胁迫培养 24 h，将苜蓿苗剪取根颈部，装入自封袋，存放于 4 °C 冰箱待检。

酶液的制备：称取苜蓿叶片 0.25 g，加入 1.25 mL 的 pH7.0 PBS，水浴研磨，15000 r/min 离心 15 min，去部分上清液经适当稀释后用于酶活性测定。

CAT 活性测定：在 3 mL 的反应体系中，包括 0.3% H_2O_2 1 mL， H_2O 1.95 mL，最后加入 0.05 mL 酶液，启动反应，测定 240 nm 波长处的 OD 降低速度。将每分钟 OD 减少 0.01 定义为一个酶活力单位。

POD 活性测定：在 3 mL 的反应体系中，加入 0.3% H_2O_2 1 mL，0.2% 愈创木酚 0.95 mL，pH7.0 PBS 1 mL，最后加入 0.05 mL 酶液，启动反应，测定 470 nm 波长处的 OD 增加速度。将每分钟 OD 增加 0.01 定义为一个酶活力单位。

3 结果

3.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿出苗率影响

将 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照苜蓿种子盆栽 25 °C 培养 5 d，进行出苗率统计，不同辐照剂量下苜蓿的出苗率见图 1。由图 1 可知，3 种苜蓿出苗率存在很大差异，中兰 1 号空白对照组出苗率最低 (92.5%)， $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照有利于提高中兰 1 号出苗率，在辐照剂量 400 Gy 时，出苗率最高达 100%；BC-04-477 在 1000 Gy 辐照剂量下其出苗率提高到 100%；塔城空白对照组出苗率最高 (100%)， $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照减低了塔城出苗率，各辐照组出苗率均低于对照组。

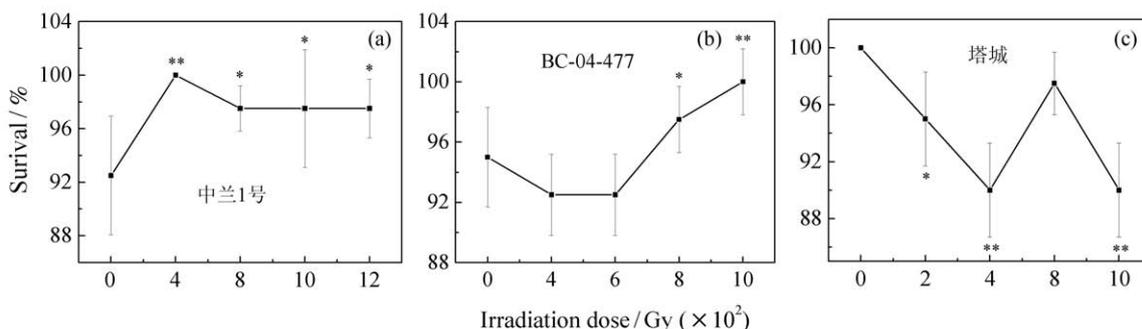


图 1 不同剂量辐照对苜蓿出苗率的影响

(a) 中兰 1 号；(b) BC-04-477；(c) 塔城；与对照相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

3.2 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿低温胁迫存活率影响

将 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照苜蓿种子 25 °C 培养 5 d，0 °C 低温胁迫培养 24 h，25 °C 复苏 24 h，辐照剂量

与低温胁迫存活率统计结果见图 2。经过 0 °C 24 h 的低温胁迫，不同剂量辐照组、空白对照组的存活率存在很大差异，辐照组存活率均高于对照组。在辐照剂量 400 Gy 时，中兰 1 号、BC-04-477 存活率比对照提

高了 33.3%; 在辐照剂量为 1000 Gy 时, 塔城存活率 比对照提高了近 5 倍。

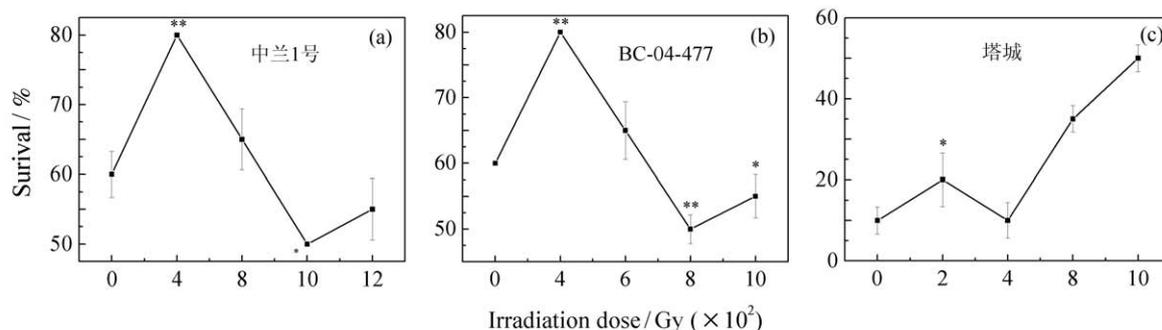


图 2 不同剂量辐照对苜蓿低温处理存活率的影响

(a) 中兰 1 号; (b) BC-04-477; (c) 塔城; 与对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿 CAT 活性的影响

取 3 个品种不同辐照剂量苜蓿种子, 在 25 °C 温室培养 18 d, 3 种苜蓿幼苗分两部分, 分别在 25 °C 和 0 °C 处理 24 h, 剪去叶片进行 CAT 及 POD 活性的测定。叶片中 CAT 活性的检测结果见图 3。由图 3 可知, 4 种不同 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照剂量均能提高中兰 1 号 CAT 活性, 常温组和低温胁迫组中 CAT 活性随辐照剂量增大而提高, 在辐照剂量为 800 Gy 时 CAT 活性达最大值, 常温组和低温胁迫组分别比未辐照的空白对照组提高了 4.4 倍、6.2 倍, 当辐照剂量

大于 800 Gy 时, CAT 活性随辐照剂量增大而降低; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照提高了 BC-04-477 常温组和低温胁迫组中 CAT 活性, 有显著性差异。在辐照剂量为 800 Gy 时, 常温组和低温胁迫组中 CAT 活性最高, 低温胁迫组中 CAT 活性比未辐照空白对照组的提高了 1.8 倍, 常温组中 CAT 活性比未辐照空白对照组提高了 87%, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照显著提高了 BC-04-477 低温胁迫组中 CAT 活性; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照提高了塔城苜蓿中 CAT 活性, 常温组和低温胁迫组与未辐照空白对照相比, CAT 活性最大分别提高了 83% 和 48%。

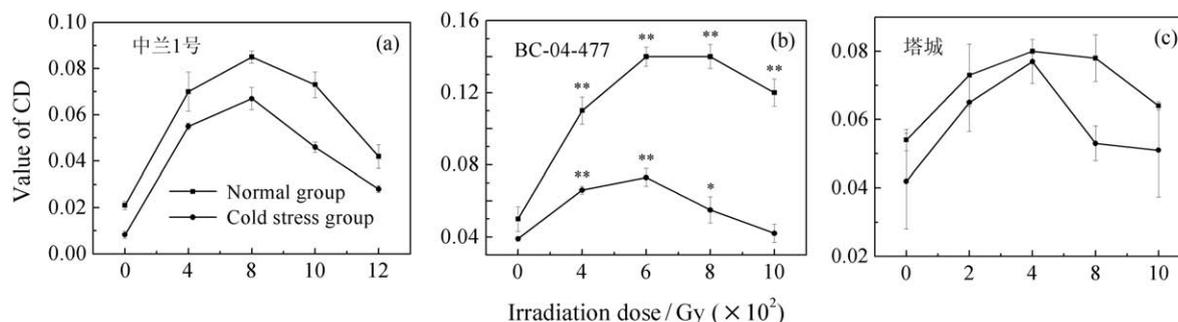


图 3 苜蓿在不同辐照剂量下的 CAT 活性测定结果

(a) 中兰 1 号; (b) BC-04-477; (c) 塔城; 与对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.4 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对苜蓿 POD 活性的影响

在不同辐照剂量下, 3 种苜蓿在 25 °C 和 0 °C 处理 24 h 的常温组和低温胁迫组叶片中过氧化物酶活性检测结果见图 4。中兰 1 号在辐照剂量为 1000 Gy 时, 常温组和低温胁迫组苜蓿叶片中的 POD 活性高于未辐照对照组, 分别提高了 11.8%, 5%。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对中兰 1 号常温组苜蓿叶片中的 POD 活性比低温

胁迫组提高显著 (5% vs 11.8%, $P < 0.001$)。在辐照剂量小于 800 Gy 时, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照均提高了 BC-04-477、塔城 2 个品种常温组和低温胁迫组苜蓿叶片中的 POD 活性。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照下, BC-04-477 常温组和低温胁迫组苜蓿叶片中的 POD 活性有显著差异 (22.6% vs 13.4%, $P < 0.001$); 在辐照剂量为 800 Gy 时, 塔城常温组和低温胁迫组与未辐照对照组相比分别提高 22.8% 和 21.6% ($P < 0.001$)。

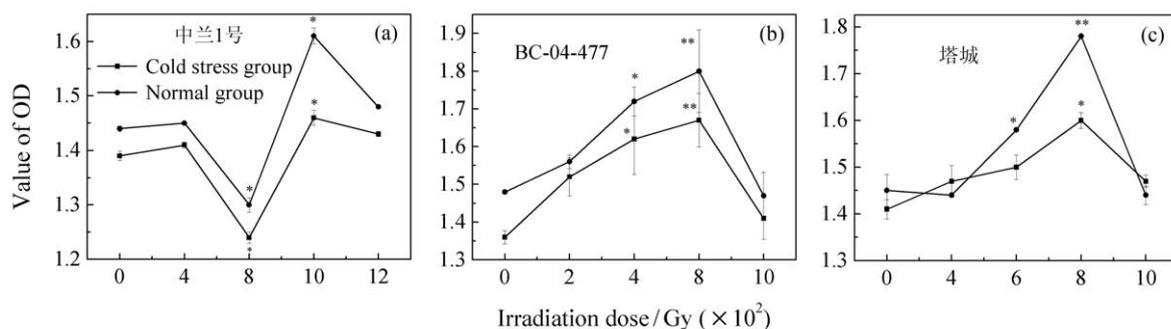


图 4 苜蓿在不同辐照剂量下的 POD 活性测定结果

(a) 中兰1号; (b) BC-04-477; (c) 塔城; 与对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 结论

本实验结果表明,在常温培养下, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照有利于提高中兰1号、BC-04-477的出苗率,对塔城出苗率有抑制影响;在辐照剂量为400 Gy时,中兰1号、BL-04-477低温胁迫组存活率比未辐照的对照提高了33.3%;在辐照剂量为1000 Gy时,塔城低温胁迫组存活率比未辐照的对照提高了接近5倍。一定剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照有利于提高中兰1号、BC-04-477、塔城苜蓿低温胁迫组的存活率,有利于提高苜蓿植株的低温下生存性能。

研究表明,在逆境条件下,植物细胞中生物氧自由基的产生和积累是造成细胞伤害及致死的主要原因。细胞中保护酶系统的存在和活力增加能够清除自由基,从而避免活性氧自由基对植物的伤害。因此,低温处理后,植物中的CAT及POD活性强,则可增强其在低温胁迫时抗逆性能,提高了低温存活率^[13-15]。

一定剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照均不同程度的提高了中兰1号(400~1000 Gy)、BC-04-477(600~800 Gy)、塔城(200~800 Gy)常温组和低温胁迫组苜蓿叶片中CAT及POD活性,尤其对低温胁迫组中CAT及POD的活性提高明显。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照可以提高中兰1号、BC-04-477、塔城的低温环境的存活能力,提高苜蓿抗寒性的机理需要进一步研究。

参考文献:

[1] LIU Zhengsheng, QIU Quanfa, HUANG Wenzhong. Journal of Radiation Research and Radiation Processing. 1991, 9(3): 139. (in Chinese)
(刘振声, 丘泉发, 黄文忠. 辐射研究与辐射工艺学报. 1991,

9(3): 139.)

- [2] WEI Zengquan, XIE Hongmei, ZHANG Jinlian, *et al.* Acta Laser Biology Sinica. 2003, 12(1): 33. (in Chinese)
(卫增泉, 颀红梅, 张金莲, 等. 激光生物学报. 2003, 12(1): 33.)
- [3] LIU Jieli, LI Daoming, TANG Fenglan, *et al.* Heilongjiang Agricultural Sciences. 2008(5): 3. (in Chinese)
(刘杰淋, 李道明, 凤兰, 等. 黑龙江农业科学. 2008(5): 3.)
- [4] WANG Mengjiao. Shaanxi Agricultural Science. 2009(2): 79. (in Chinese)
(王梦姣. 陕西农业科学. 2009(2): 79.)
- [5] LI Bo. Seed. 2008, 27(5): 38. (in Chinese)
(李波. 种子. 2008, 27(5): 38.)
- [6] LI Bo, Yuan Chengzhi, Chen Hui, *et al.* Pratacultural Science. 2004, 21(5): 20. (in Chinese)
(李波, 袁成志, 陈辉, 等. 草业科学, 2004, 21(5): 20.)
- [7] LIU Qingfang, BU Huaiyu, ZHAO Yuwei, *et al.* Acta Pratacultural Sinica. 2006, 15(5): 115. (in Chinese)
(刘青芳, 步怀宇, 赵宇玮, 等. 草业学报. 2006, 15(5): 115.)
- [8] WANG Shuyang, LI Yan, ZHANG Xiangyang, *et al.* Advanced Materials Research, 2012, 524-527: 2156;
- [9] ZHANG Landi, ZHANG Yingcong, WU Dali, *et al.* Nuclear Physics Review, 2008, 25(2): 181. (in Chinese)
(孙兰弟, 张颖聪, 吴大利, 等. 原子核物理评论. 2008, 25(2): 181.)
- [10] CHEN Liyu, ZHANG Shuqing, LI Jianfeng, *et al.* Atomic Energy Science and Technology, 2012, 46(Suppl): 729. (in Chinese)
(陈力玉, 张淑卿, 李剑峰, 等. 原子能科学技术. 2012, 46(增刊): 729.)
- [11] LI Hesheng. Principle and Technology of Plant Physiological and Biochemical Experiments[M]. Beijing: Higher Education Press. 2000: 166. (in Chinese)
(李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 166.)

- [12] Qiang Jiye, Chen zongyu, Li Folin, *et al.* Seed, 2004, **23**(4): 8. (in Chinese)
(强继业, 陈宗瑜, 李佛琳, 等. 种子, 2004, **23**(4): 8.)
- [13] WANG Shugang, WANG Zhenlin, WANG Ping, *et al.* Acta Ecologica Sinica. 2011, **31**(4): 1064. (in Chinese)
(王树刚, 王振林, 王平, 等. 生态学报. 2011, **31**(4): 1064.)
- [14] HE Xueli. Modern Agricultural Science and Tchnology. 2010(10): 37. (in Chinese)
(何学利. 现代农业科技. 2010 (10): 37.)
- [15] GUO Yuanyuan, LUO Haibing, CAO Huiqing, *et al.* Journal of Southern Agriculture. 2012, **43**(9): 1281. (in Chinese)
(郭元元, 罗海斌, 曹辉庆, 等. 南方农业学报. 2012, **43**(9): 1281.)

Effects of Carbon Ion Irradiation on Survival Rate, Catalase and Peroxidase Activity of Alfalfa M1 under Low Temperature Stress

WANG Shuyang^{1, 2, 1)}, LI Jinhua³, JIANG Boling¹, HA Ronghua⁴, LI Tengting⁴, YU Chengqun⁵,
LIU Qingfang¹, LI Wenjian¹, CHE Jihong¹, LIU Jing¹, HU Wei¹

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

2. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

3. Lanzhou Institute of Animal & Veterinary Pharmaceutics Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China;

4. Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

5. Institute of Geographic Science and Natural Resources Research, Beijing 100039, China)

Abstract: In this study, three kinds of alfalfa including Zhonglan 1, BC-04-477 and Ta Cheng were treated with different doses of $^{12}\text{C}^{6+}$ (75 keV) heavy ion radiation, and then the influence of survival rate, catalase(CAT) and peroxidase(POD) activity of M1 with low temperature stress were tested. The results showed that under the condition of 400 Gy radiation dose, the survival rate and CAT activity of Zhonglan 1 under low temperature stress have increased by 33.3%, 56.3% respectively compared with those of the control group, while there was no difference in POD activity between those two groups. The survival rate, CAT and POD activity of BC-04-477 treated with low temperature have been improved by 33.3%, 69.2%, 5.1% respectively compared with those of the control group when the radiation dose was 400 Gy. Compared with those of the control group, the survival rate, CAT and POD activity of Ta Cheng under low temperature stress have been improved by 25%, 26%, 22.8% respectively when the radiation dose was 800 Gy. These results indicate that the viability and the cold resistance ability of Zhong Lan 1, BC-04-477 and Ta Cheng can be improved by $^{12}\text{C}^{6+}$ radiation.

Key words: $^{12}\text{C}^{6+}$ ion irradiation; low temperature stress; survival rate; catalase activity; peroxidase activity

Received date: 5 Dec. 2013; **Revised date:** 14 Feb. 2014

Foundation item: Special Foundation of Forage Industry of Tibet, Science and Technology Office of Tibet(Y106460XZO); Action Plan in the West Area of Chinese Academy Sciences(KZCXZ-XB3-05); Program of Engineering Laboratory of Radiation and Mutation Breeding

1) E-mail: wangsy@impcas.ac.cn.