^{60}Coγ 射线辐照野牛草干种子的细胞学效应

李 健[1], 王 健[2], 赵智同[3], 张蕴薇[1*]
(1. 中国农业大学草地研究所, 北京 100193; 2. 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 3. 内蒙古民族大学农学院, 通辽 028043)

摘要: 通过 5 种不同剂量的^{60}Coγ 射线对野牛草(*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm.)种子的辐射诱变效应研究表明,γ 射线辐照能抑制野牛草根尖细胞的有丝分裂。随 γ 射线辐射剂量的增加,根尖细胞有丝分裂指数呈下降趋势。γ 射线辐照能诱发根尖细胞的染色体畸变和核畸变,产生桥、染色体断片、粘连染色体、游离染色体、落后染色体、单微核、双微核、多微核、小核等多种畸变类型。在 0~ 2000 Gy 范围内,随剂量的增加各种畸变率不断提高,至 2000 Gy 辐照剂量时,各畸变率达到最大。

关键词: 野牛草; γ 射线; 细胞有丝分裂指数; 核畸变; 染色体畸变
中图分类号: S335. 21; S812 文献标识码: A 文章编号: 1007-0435(2009)05-0795-04

Cytological Effect of ^{60}Coγ Ray Irradiation on *Buchloe dactyloides* Dry Seeds

LI Jian[1], WANG Jian[2], ZHAO Zhi-tong[3], ZHANG Yun-wei[1*]
(1. Institute of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China 2. Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China; 3. College of Agronomy, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao, Inner Mongolia Autonomous Region 028043, China)

Abstract: The irradiation of ^{60}Coγ ray can induce different types of variation and irradiation breeding has been applied to turfgrass variety improvement as one effective method. The cytological effects of 5 kinds of dosages of ^{60}Coγ ray on *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. seeds were evaluated and the results show that the γ ray irradiation inhibited the mitoses of root tip cells. And the mitotic index of root tip cells decreased along with the increased dosage. Furthermore, the γ ray irradiation induced the chromosomal and nuclear aberration, such as bridge, chromosome fragment, chromosome conglutination, chromosome dissociation, draggling chromosome, single micronucleus, double micronucleus, multi-micronucleus, and small micronucleus in root tip cells of *B. dactyloides*. The higher the γ-rays irradiation dosage, the higher the rate of aberration from the irradiation dosage of 0 to 2000 Gy; all the aberration rates reached to the maximum at 2000 Gy.

Key words: *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm.; ^{60}Coγ ray; Mitotic index; Nuclear aberration; Chromosomal aberration

野牛草(*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm.),是禾本科画眉草亚科野牛草属植物。该草原产于北美中部半干旱温带和亚热带地区,是北美干草原的特有草种[1]。自 20 世纪 40 年代引入我国,多年的评价结果表明,野牛草具有抗旱性强、耐热、耐盐碱、抗病和再生能力强、适应性广等明显优点,但其种子不易萌发、绿期短、不耐荫等均有待于改良。

辐射诱变能够产生不同的变异类型,包括抗盐细胞变异体、抗干旱、高低温细胞变异体抗病细胞变异体等[2]。因此,辐射诱变育种是一种有效的品种改良方法[3~5],已经在粮经作物育种方面取得了良好成效。至 2002 年在国际原子能机构联合处(IAEA)登记的诱变品种达 2252 个,其中我国利用辐射诱变育成的新品种有 605 个(40 多种植物),占世界总和的 26.7%。但在草坪草辐射育种方面报

收稿日期: 2009-05-14; 修回日期: 2009-07-08
基金项目: 十一五科技支撑项目: (2006BAD01A19-3), (2008BADB3B04), (2008BAD97B07); 863 项目(2007AA100105)
作者简介: 李健(1985-), 男, 湖南永兴县人, 硕士研究生, 研究方向为牧草与草坪草育种, E-mail: lijian4531@163.com; * 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: zywei@126.com

道不多。郭爱桂等曾用γ射线对狗牙根进行辐射处理,结果表明高剂量处理对狗牙根数量性状能产生较稳定的理想的变异[6]。张彦芹用γ射线照射高羊茅干种子和分化苗获得叶片变小、变细且具有耐旱(寒)特性的高羊茅突变体,RAPD分析显示了这些突变体在DNA水平上发生的变异[7]。范贞使用γ射线处理假俭草后,出现越冬性较强的黄茎株系和不易感染病害的紫茎株系[8]。

本试验利用不同剂量γ射线处理野牛草干种子,研究野牛草根尖细胞有丝分裂指数、根尖细胞核畸变率、根尖细胞染色体畸变率等指标的变化规律,旨在为野牛草的辐射诱变育种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以来自美国的普通野牛草品种为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 辐照方法 2008年7月利用中国农业辐照中心^{60}Coγ射线源,对野牛草干种子进行辐照处理,每处理30 g种子,剂量分别为0、1200、1400、1600、1800和2000 Gy。

1.2.2 试验方法 2008年11—12月间,将辐照处理和未经处理(对照)的野牛草干种子分别放入培养皿,在光照培养箱中25℃恒温避光培养,待根长至1~2 cm时剪下,取根时间为8:00–9:00,用卡诺固定液(无水乙醇∶冰醋酸=3∶1)固定22 h,在75%乙醇中保存备用。用前经蒸馏水漂洗,1 mol/L盐酸60℃水浴处理10 min,蒸馏水冲洗后,以铁矾-苏木精法染色,进行染色体制片(每处理10个制片),Olympus光学显微镜下镜检(每张染色体制片统计大约300个细胞)、拍照。

1.2.3 观测内容 统计观察细胞总数、分裂细胞数、核畸变细胞数(单微核、双微核、多微核和小核)和各种染色体畸变(单桥、双桥、多桥、落后染色体、游离染色体、粘连染色体、染色体断片、复合染色体畸变等)。计算细胞有丝分裂指数、染色体畸变率、核畸变率。其中:

细胞分裂指数(%)=(分裂细胞数/观察细胞总数)×100

染色体畸变率(0.1%)=(染色体总畸变数/观察细胞总数)×100

核畸变率(0.1%)=(核总畸变数/观察细胞总数)×100

1.3 数据处理

试验数据结果采用Excel和SAS 8.0统计软件分析。

2 结果与分析

2.1 γ射线对野牛草根尖细胞有丝分裂指数的影响

γ射线辐照处理后,野牛草根尖细胞有丝分裂指数减小(表1)。在0~2000 Gy范围内,随着辐照剂量的升高,野牛草细胞分裂指数减小,各个辐照处理与对照均差异显著。在2000 Gy剂量下细胞有丝分裂指数是7.45%,比未处理的降低60.5%。表明此范围内γ射线辐照剂量越大对细胞有丝分裂的抑制作用越强。

表1 辐照对野牛草根尖细胞有丝分裂指数的影响

Table 1 Mitotic index of *B. dactyloides* treated by γ rays irradiation

剂量 Dose (Gy)	0	1200	1400	1600	1800	2000
细胞总数 Total cell number	3067	2980	3080	3010	3340	3301
有丝分裂细胞数 Total mitotic cell number	579	457	426	384	306	246
细胞有丝分裂指数 Mitotic index (%)	18.87^{a}	15.33^{b}	13.83^{c}	12.75^{c}	9.16^{d}	7.45^{e}

注:同行中不同字母间差异显著($P<0.05$)

Note: Means with different letters in the same row are significantly different at the 0.05 level

2.2 γ射线对野牛草细胞核畸变的影响

γ射线辐照处理后,野牛草的根尖细胞在有丝分裂时期均出现了单微核、双微核、多微核和小核等细胞畸变类型(图1),其中单微核的畸变数量最多。在1200~2000 Gy剂量范围内,随着剂量的增加,微核和小核数目逐渐增多,5个辐照处理下的核总畸变率间差异显著(表2)。2000 Gy剂量时达到最大,野牛草根尖细胞的核总畸变率为49.99‰,比1200 Gy增加了136%。

2.3 γ射线对野牛草根尖细胞染色体畸变的影响

辐照处理后,野牛草的根尖细胞染色体出现各

表 2　辐照对野牛草根尖细胞核畸变率的影响

Table 2　Nucleolar aberration rate of *B. dactyloides* root tip cells irradiated by γ rays

剂量 Dose (Gy)	0	1200	1400	1600	1800	2000
细胞总数 Total cell number	3067	2980	3080	3010	3340	3301
单微核率 Single micronucleus rate (0.1%)	0	14.76	18.5	23.59	27.54	33.02
双微核率 Double micronucleus rate (0.1%)	0	4.03	6.17	7.64	9.28	10.91
多微核率 Multi-micronucleus rate (0.1%)	0	1.68	2.59	5.32	5.69	6.06
小核率 Small nuclear rate (0.1%)	0	0.67	1.3	1.99	2.39	3.03
核总畸变率 Total aberration rate (0.1%)	0	21.14[e]	28.56[d]	38.54[c]	44.9[b]	49.99[a]

注: 同行中不同字母间差异显著($P<0.05$)

Note: Means with different letters in the same row are significantly different at the 0.05 level

种染色体变异, 其中以染色体桥、染色体断片、游离染色体为主要畸变类型(图 1)。随着剂量的加大, 野牛草根尖细胞染色体畸变率呈逐渐增加趋势(表 3), 五个辐照处理下的染色体总畸变率之间差异显著。染色体桥、落后染色体和染色体断片的畸变率均在 2000Gy 时达到最高, 只有粘连和游离染色体在 1600Gy 时最高。且各染色体畸变类型畸变率最低时的辐射剂量不同, 染色体落后率、粘连率、断片率和游离率在 1200Gy 时最低, 染色体单桥和双桥率在 1400Gy 时最低, 染色体多桥率最低为 1600Gy。在 1200~2000Gy 范围内, 野牛草染色体总畸变率为 27.52‰~45.13‰。随着剂量的增大, 复合染色体畸变率变大。

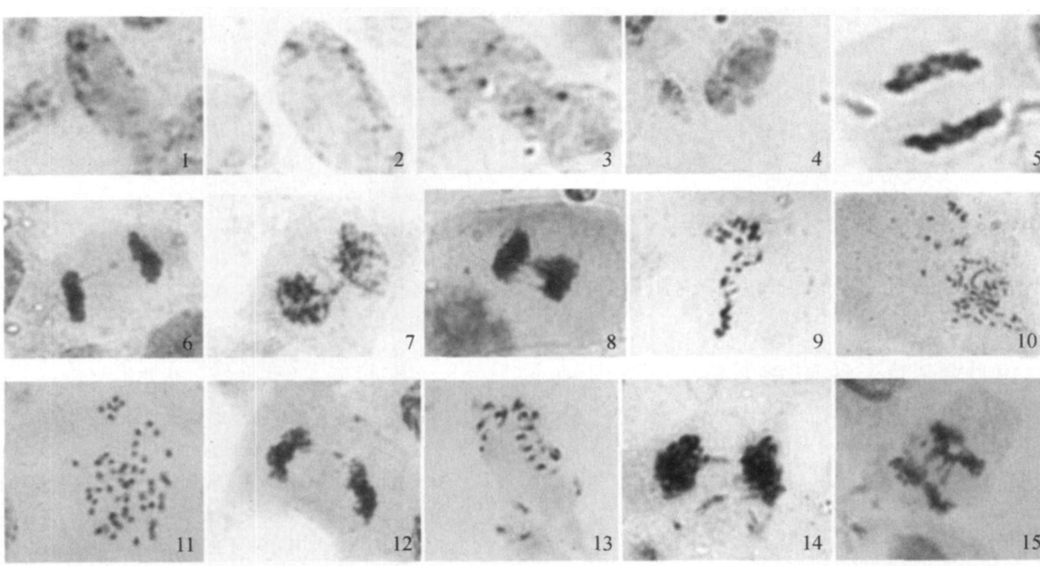

图 1　γ 射线辐照诱发的野牛草细胞染色体畸变

Fig.1　Pictures of different chromosome aberrations types of *B. dactyloides* irradiated by γ rays

1. 单微核 Single micronucleus; 2. 双微核 Double micronucleus; 3. 多微核 Multi-micronucleus; 4. 小核 Small nucleus; 5. 正常有丝分裂后期 Normal anaphase; 6. 单桥 Single bridge; 7. 双桥 Double bridge; 8. 多桥 Multi-bridge; 9. 粘连染色体 Chromosome conglutination; 10. 游离染色体 Dissociative chromosomes; 11. 正常染色体 Normal chromosomes; 12. 染色体断片 Chromosome fragments; 13. 落后染色体 Dragging chromosome; 14. 单桥和染色体断片 Single bridge and chromosome fragments; 15. 多桥和染色体断片 Multi-bridge and chromosome fragments

3　讨论

3.1　γ 射线辐照能够影响植物细胞的生活周期。经 γ 射线辐照后, 植物细胞正常条件下的有丝分裂频率发生改变。随着辐射剂量的增加, 细胞有丝分裂期落后或者分裂期延长, 即高能辐射下, 植物细胞有丝分裂表现出抑制效应[9]。不同剂量处理后, 野牛草根尖细胞有丝分裂指数的变化也反映了 γ 射线辐照的抑制效应。陆璃[10]对不同品种的小麦根尖细胞有丝分裂指数分析表明, γ 射线辐照具有双重效应: 低剂量辐射表现出促进效应, 高剂量表现出抑制效应。这与试验结论中的抑制效应不完全一致,

表 3 辐照对野牛草根尖细胞染色体畸变率及复合畸变率的影响

Table 3 Chromosome aberrant rate and multi-aberration rate of *B. dactyloides* root tip cells irradiated by γ rays

剂量 Dose (Gy)	0	1200	1400	1600	1800	2000
细胞总数 Total number of cells	3067	2980	3080	3010	3340	3301
染色体单桥率 Chromosome single bridge rate (0.1%)	0	3.69	2.60	2.99	3.59	6.36
染色体双桥率 Chromosome double bridge rate (0.1%)	0	2.35	1.95	1.66	3.29	4.54
染色体多桥率 Chromosome multi-bridge rate (0.1%)	0	2.35	2.60	1.99	2.99	4.85
染色体落后率 Chromosome dragging rate (0.1%)	0	4.03	3.57	5.98	6.59	5.45
染色体断片率 Chromosome fragment rate (0.1%)	0	5.03	7.79	7.79	7.48	8.78
染色体粘连率 Chromosome conglutination rate (0.1%)	0	4.70	6.49	7.97	6.59	6.97
染色体游离率 Chromosomes dissociation rate (0.1%)	0	5.03	7.79	8.64	6.89	6.36
其它畸变率 Other aberrations rate (0.1%)	0	0.34	0.65	0.66	1.20	1.82
染色体总畸变率 Total aberrant rate (0.1%)	0	27.52^{e}	33.44^{d}	37.86^{c}	38.62^{b}	45.13^{a}
复合畸变率 Multi-aberration rate (0.1%)	0	1.68	1.95	2.66	3.29	4.54

注: 同行中不同字母间差异显著($P<0.05$)

Note: Means with different letters in the same row are significantly different at the 0.05 level

有待于在低剂量对野牛草根尖细胞诱变效应上进一步研究。王文恩[11]使用γ射线辐照狗牙根干种子, 发现幼苗鲜重、幼苗高度和主根生长的临界辐射剂量分别为200、250和300 Gy。王文恩[12]还曾用25~300Gy γ射线辐照野牛草干种子, 发现剂量高于200Gy 的辐射处理明显的抑制幼苗的生长; 当辐照剂量高于250Gy 时, 部分植株出现株高负增长, 叶片扭曲, 叶色明显变浅等生物学变异现象。而本试验使用的剂量为1200~2000Gy, 两者辐射差异大, 原因可能在于王文恩进行了剥去颖苞的前处理, 而本试验用的完整的种子, 颖苞可能影响野牛草干种子的辐射敏感性。

3.2 γ射线辐照野牛草干种子, 将影响到细胞内部核和染色体结构, 在细胞分裂时期出现核畸变和染色体畸变, 而且核畸变率和染色体畸变率都随着剂量的升高而增加, 这与前人的研究结果一致[13~15]。郭桂云等[16]的试验结果支持"微核是衡量辐射对染色体损伤的可靠指标"这一观点。由本试验可知, γ射线辐照诱导会使野牛草的种子根尖细胞产生微核, 而且微核率随剂量的升高而增加, 这与前人研究结果一致。

4 结论

4.1 1200~2000 Gy 的^{60}Co γ射线处理野牛草干种子, 抑制根尖细胞有丝分裂, 并诱发产生单微核、双微核、多微核、小核、染色体断片、染色体粘连、单桥、双桥、多桥、游离染色体、落后染色体等多种畸变。

4.2 在1200~2000 Gy 范围内, 随剂量的增加各种畸变率不断提高, 各辐照处理畸变率显著高于对照。

参考文献

[1] Quinn J A, Engel J L. Life-history strategies and sex ratios for a cultivar and wild population of (*Buchloe dacyloides* (Nutt.) Engelm) [J]. Amer. J. Bot., 1986, 73(6): 874-881

[2] 周小梅, 易自力, 蒋健雄, 等. 辐照育种研究概况及其在草坪草中的应用前景[J]. 湖南城市学院学报, 2004, 13(4): 73-76

[3] 王连铮, 裴颜龙, 赵荣娟, 等. 大豆辐射育种的某些研究[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(2): 1-5

[4] 段智英, 吴殿, 沈圣泉, 等. 辐照改良水稻淀粉特性的研究[J]. 核农学报, 2003, 17(4): 249-254

[5] 张盛林, 李川, 刘佩瑛, 等. ^{60}Co γ射线辐射对花魔芋性状影响初探[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 183-185

[6] 郭爱桂, 刘建秀, 郭海林, 等. 辐射技术在国产狗牙根育种中的初步应用[J]. 草业科学, 2000, 17(1): 45-47

[7] 张彦芹, 贾炜珑, 杨丽莉, 等. ^{60}Co γ辐射高羊茅性状变异研究[J]. 草业学报, 2005, 14(4): 65-71

[8] 范贞. 暖季型草坪草辐照突变体及种质资源评价[D]: [学位论文]. 广州: 华南农业大学, 2007

[9] 周立人, 吴雪琴, 魏晓飞, 等. ^{60}Co γ射线辐射不同麻种种子的细胞学效应[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(1): 10-14

[10] 陆璃, 吕金印, 刘军, 等. ^{60}Co γ射线辐照对小麦种子根尖细胞有丝分裂的影响[J]. 西北农林科技学报(自然科学版), 2005, 33(9): 57-62

[11] 王文恩, 包满珠, 张俊卫. ^{60}Co-γ射线对狗牙根干种子的辐射效应(简报)[J]. 草地学报, 2007, 15(2): 187-189

[12] 王文恩, 张俊卫, 包满珠. ^{60}Co γ辐射对野牛草干种子的刺激生长效应[J]. 核农学报, 2005, 19(3): 191-194

[13] 杨茹冰, 张月学, 徐香玲, 等. ^{60}Co γ射线辐照紫花苜蓿种子的细胞生物学效应[J]. 核农学报, 2007, 21(2): 136-140

[14] 黄训端, 何家庆, 周立人, 等. ^{60}Co γ射线辐照花魔芋诱变效应的主成分分析[J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 198-203

[15] 刘丽, 唐凤兰, 张月学, 等. 空间飞行和^{60}Co-γ射线辐照对苦荬菜种子的细胞学效应研究[J]. 草地学报, 2007, 15(5): 469-472

[16] 郭桂云, 张晓菊, 邢情, 等. ^{60}Co γ射线辐射番茄种子对其生理生化影响的研究[J]. 植物研究, 1996, 16(2): 108-113

(责任编辑 刘敏轩 才 杰)