

# 东方百合 X 射线急性辐照后代的生长及 POD 同工酶特性研究

黄海涛<sup>1</sup>, 王 丹, 周丽娟<sup>3</sup>

(1. 四川省绵阳市农业科学研究所, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010;

3. 西安外事学院, 陕西 西安 710004)

**摘要:** 运用 X 射线对东方百合“索邦”离体不定芽进行急性辐照, 并对辐照后的百合不定芽继代材料的生长及过氧化物(POD)同工酶酶谱进行分析。结果表明: 1.76 Gy 剂量处理东方百合芽高增量较对照显著增大, 不定芽增殖无显著性变化, 其它剂量处理相关生长指标与对照无显著性差异。POD 同工酶酶谱分析发现, 1.76 Gy 剂量处理与对照相似系数较小, POD 同工酶与对照的差异最大。

**关键词:** X 射线; 急性辐照; 东方百合; POD

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)20-0138-03

百合以其极高的观赏价值及食品药用价值近年来越来越受到人们的广泛关注。我国野生百合资源丰富

占世界的一半, 而我国观赏用百合栽培生产中使用的种球, 多数来源于国外进口, 因此百合育种有非常好的市场前景及社会效益。百合育种手段较多, 有杂交育种、分子育种、原生质体融合育种、诱变育种等<sup>[1-3]</sup>。辐射诱变育种作为较新的育种方法, 具有简单、方便、易行、突变率高特点, 一般可达千分之几, 有时可达 1/30, 比自然突变率高出几百倍甚至上千倍, 容易引起花卉形态结构和相关酶特性多方面的变异<sup>[4]</sup>。目前国内外关于百合

**第一作者简介:** 黄海涛(1983), 男, 湖南新宁人, 硕士, 研究方向为植物遗传育种。E-mail: cet\_ch@163.com.

**基金项目:** 中国工程物理研究院军民两用开发技术资助项目(200305)。

**收稿日期:** 2010-07-19

- [4] 阮萃才, 梁远, 刘锦玲, 等. 蚕豆根尖微核技术监测环境污染物的诱变活性[J]. 环境科学, 1992, 13(4): 56-58.
- [5] 杨茹冰, 张月学, 徐香玲, 等. <sup>60</sup>CO<sub>2</sub>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.
- [6] 任卫波, 徐柱, 陈立波, 等. 紫花苜蓿种子卫星搭载后其根尖细胞的生物学效应[J]. 核农学报, 2008, 22(5): 566-568.
- [7] Degrassi F, Rizzoni M. Micronucleus test in Vicia faba root tips to detect mutagen damage in fresh water pollution[J]. Mutat Res, 1982, 97: 19.

- [8] 胡振东. 蚕豆微核测定技术及其应用[J]. 自然科学, 2000, 16(4): 1-6.
- [9] Grant W F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals[J]. Mutat Res, 1999, 426: 107-112.
- [10] 门晓云. 辣椒种子发芽率低的原因及措施[J]. 辣椒杂志, 2005(1): 40-41.

## A Method for Micronucleus Preparation Using Pepper Root Tips

WANG De-hui<sup>1</sup>, GUO Chang-hong<sup>1</sup>, GUO Ya-hua<sup>2</sup>, GENG Yue-wei<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Horticultural Sub-academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

**Abstract:** In order to establish micronucleus technology of pepper root tips, the germination conditions of pepper seeds and the dissociation time of pepper roots were investigated. The results showed that 52 °C treatment and soaked at room temperature were beneficial for germination of pepper seeds, the root tip material in good condition may be acquired; Cell dispersion and dyeing was better when dissociating pepper root tips 7 min at 60 °C with 1N HCl; Using pepper root tips can get ideal micronucleus preparation.

**Key words:** pepper; micronucleus; seed germination; dissociation

辐射育种的研究较少,且辐射的材料主要是鳞茎,辐射多采用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线作为诱变源,以X射线急性辐照进行百合的诱变育种的研究尚未见报道<sup>[5-6]</sup>。

同工酶是DNA编码的遗传信息表达的产物,是分析和选择突变体的重要指标之一,也可作为植物辐照效应变化的一种生化分析手段,具有可靠性和可重复性。该试验利用X射线对东方百合离体不定芽进行急性辐照处理,并对辐照后的百合不定芽继代材料的生长及POD同工酶特性进行统计分析,初步探索X射线急性辐照对东方百合组培不定芽的影响,旨在为进一步利用X射线急性辐照结合组织培养诱变育种研究提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为将东方百合“索邦”(Sorbonne)组织培养形成的不定芽,其诱导培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,培养基中蔗糖为3.0%,琼脂0.75%,pH 5.8。

### 1.2 试验方法

1.2.1 辐照处理 辐照在中国工程物理研究院流体物理研究所进行。以脉冲X光机对东方百合“索邦”组织培养形成的不定芽进行X射线急性辐照,X光机共脉冲84次,分别在4 d内完成,3次重复。各处理离发射点的距离、辐照量、处理材料的瓶数和芽数见表1。

1.2.2 辐照后生长指标测定 辐射前统计不定芽的初始芽高,接种的不定芽芽数。辐射后立即转接,30 d后统计不同处理百合不定芽的芽数、芽高。记录芽长势,然后计算出芽率,芽高增量。出芽率=(接种30 d后不定芽数-接种不定芽芽数)/接种不定芽芽数 $\times 100\%$ ;芽高增量=接种30 d的芽高-接种不定芽芽高初值。

表1 X急性辐照剂量和不定芽数

处理	离发射点的 距离/cm	单次辐照 剂量/mR	辐照剂 量/Gy	瓶数 /瓶	不定芽 芽数/个
CK	未辐照	0	0	25	855
1	60	66.67	0.05	25	834
2	40	150	0.11	25	871
3	30	266.67	0.20	25	856
4	20	600	0.44	15	462
5	10	2 400	1.76	8	320

1.2.3 POD同工酶酶谱测定 取待测植物鲜样1.0 g置于冰浴上的研钵内,加入1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  研磨成匀浆,转入离心管,再用2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  前述溶液将附着在研钵壁上的研磨样品洗下并全部转入离心管,3 500 r/min 离心15 min,上清液即为酶粗液,4℃低温保存。电泳采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶浓度为3.0%,分离胶浓度为7.5%,电极缓冲溶液为Tris-Gly (pH 8.3),点样量为10  $\mu\text{L}$ ,以0.1%的溴酚蓝为前沿指示剂,样品电泳电压为200 V,稳压电泳2.5 h。POD同工酶染

色采用醋酸联苯胺染色法,染色后用BIO-RAD Gel Doc凝胶成像系统拍照。测定POD酶带迁移率(Rf), $\text{Rf} = \text{酶带迁移距离} / \text{前沿指示剂距离}$ <sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 X射线急性辐照对百合不定芽增殖和生长的影响

辐射前统计百合不定芽的初始芽高和芽数,辐射转接后1个月再次统计不定芽芽高和芽数,计算X射线急性辐照东方百合不定芽的芽高变化量和芽增殖率,统计结果见表2。由表2可知,不同剂量的X急性辐照的东方百合不定芽芽增殖率与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ ),不定芽长势也无明显差别,都较好,分析原因,可能是辐照剂量偏低,急性辐照对不定芽的生长和繁殖未造成显著的影响。从株高变化情况看,1.76 Gy剂量处理与对照组比较具有统计学差异( $P < 0.05$ ),其它处理与对照组相比差异不明显( $P > 0.05$ ),即1.76 Gy低剂量的射线处理对百合进行辐照,可以产生刺激效应,促进了不定芽的生长,但未能对不定芽的繁殖造成影响。

表2 X射线急性辐照东方百合不定芽生长情况

辐射剂 量/Gy	芽高初 始值/cm	辐照后芽 高值/cm	芽高增 量/cm	不定芽 增殖率/%	不定芽 生长势
0	1.10 $\pm$ 0.06	2.08 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.13	58.70 $\pm$ 16.23	+++
0.05	1.09 $\pm$ 0.04	1.97 $\pm$ 0.21	0.98 $\pm$ 0.33	57.13 $\pm$ 28.87	+++
0.11	1.07 $\pm$ 0.08	2.15 $\pm$ 0.33	1.08 $\pm$ 0.40	56.12 $\pm$ 28.16	+++
0.20	1.07 $\pm$ 0.09	2.05 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.17	58.95 $\pm$ 32.35	+++
0.44	1.10 $\pm$ 0.32	2.24 $\pm$ 0.25	1.16 $\pm$ 0.32	55.16 $\pm$ 19.40	+++
1.76	1.08 $\pm$ 0.02	2.35 $\pm$ 0.25	1.27 $\pm$ 0.26(1)	58.50 $\pm$ 22.20	+++

注:n=25,采用邓肯氏新复极差法进行差异显著性测验;(1) $P < 0.05$  (2) $P < 0.01$  vs 对照;+++最好;++好;+一般。

### 2.2 X射线急性辐照对百合不定芽POD同工酶影响

由图1可看出,X急性辐照对东方百合同工酶产生了显著的影响。对照株不定芽存有7条明显的POD同工酶酶带,相对迁移率Rf分别为0.110、0.200、0.262、0.400、0.472、0.536、0.665、0.734。与对照组比较,低剂量辐照处理(0.05、0.11 Gy)新增了1条Rf值为0.328特异性同工酶酶带;0.20 Gy剂量处理在Rf值为0.400和0.536的酶带消失;0.44 Gy剂量处理在Rf值为0.400处的酶带减弱,Rf为0.536处的酶带消失;1.76 Gy急性辐照处理材料的低分子量的酶带酶活明显减弱,与对照比较有1条酶带缺失(Rf为0.110)。

### 2.3 基于同工酶的聚类分析

使用统计分析软件SPSS11.5 (Statistics Package for Social Science)进行层次聚类分析中的Q型聚类,对同工酶图谱上各泳道每一相同迁移位置,清晰且重复性好的酶记为“1”,无酶带的记为“0”,聚类方法使用类内平均连锁法(Within-groups Linkage)连结,建立样品间的聚类树形图(图2)。同时得到了SPSS层次聚类分析各样本(0、0.05、0.11、0.20、0.44、1.76 Gy)的相似系数矩阵(表3),

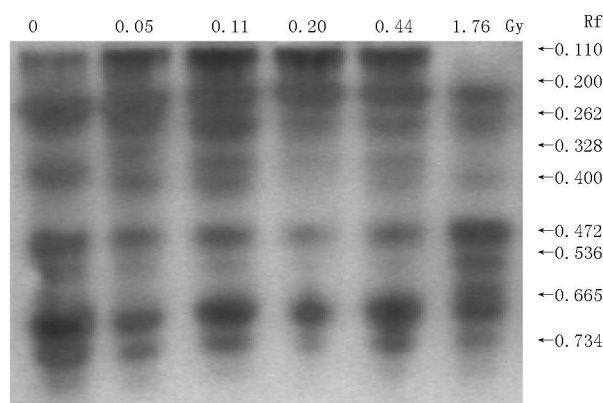


图1 X射线急性辐照不同处理东方百合 POD同工酶图谱  
从中可看出各个样本之间亲缘关系远近。

表3 基于同工酶酶谱的单匹配相似系数矩阵

辐照剂量/Gy	0	0.05	0.11	0.20	0.44	1.76
0	1.000					
0.05	0.889	1.000				
0.11	0.889	1.000	1.000			
0.20	0.667	0.778	0.778	1.000		
0.44	0.778	0.889	0.889	0.889	1.000	
1.76	0.667	0.778	0.778	0.778	0.667	1.000

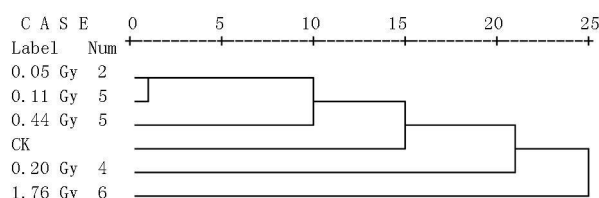


图2 基于 POD 同工酶酶谱的聚类树形图

由图2可看出, X射线急性辐照材料和对照被明显的分成二大类, 一类为1.76 Gy处理, 另一类为低剂量的处理( $\leq 0.44$  Gy)和对照, 这与生长指标统计的结果基本为一致; 0.05和0.11 Gy剂量处理与对照亲缘关系最近, 相似系数为0.889。1.76 Gy剂量处理与对照相似系

数为0.667, 与对照的差异最大, 由此推测为提高突变率, 在进行进一步试验时设计剂量应高于1.76 Gy。

### 3 结论与讨论

试验所测的X射线急性辐照后东方百合不定芽的生长变化情况来看, 1.76 Gy剂量处理东方百合株高较对照有所增大, 不定芽增殖无显著性变化, 其它剂量处理生长指标与对照无显著性差异, 说明剂量偏低, 低剂量的辐射刺激了东方百合的生长。早在1898年就有人发现低剂量的X射线对植物有刺激作用, 以后不断有人报道这方面的研究结果。Luckey<sup>[8]</sup>提出生物的发生、发展都是各种电离辐射存在下进行的, 它认为把低剂量辐射的刺激作用理解为低剂量射线是生物生存必要条件之一。从试验测定结果来看, 这个刺激作用“低剂量”也有一定的临界点值, X射线急性辐照起刺激作用的“低剂量”的临界点在0.44~1.76 Gy之间。同工酶是基因表达的产物, 在诱变育种中同工酶常常作为辐射效应的指标。试验发现不定芽辐射后的生长势与对照无显著性变化, 同工酶的表达差异并不显著, 说明X射线对东方百合不定芽尚未产生诱变作用, 由此推测为诱发百合离体不定芽突变, 在进行东方百合离体材料X射线急性辐照诱变育种时, 设计剂量应高于1.76 Gy。

### 参考文献

- [1] 洪波. 百合花卉的研究综述[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(2): 68-70.
- [2] 屈云慧, 熊丽, 陈卫民等. 百合育种研究进展[J]. 西南农业学报, 2004, 17(增刊): 471-477.
- [3] 吴祝华, 施季森, 池坚等. 观赏百合资源与育种研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2006, 30(2): 113-118.
- [4] 程金水. 园林植物遗传育种学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000, 153-155.
- [5] 张冬雪, 王丹, 张志伟. 离体培养条件对百合鳞片辐射敏感性的影响[J]. 核农学报, 2007, 21(3): 224-228.
- [6] 张克中, 赵祥云, 张启翔. 辐射百合鳞片扦插诱生的不定芽植株变异研究[J]. 核农学报, 2003, 17(3): 215-220.
- [7] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 168-169.
- [8] Luckey T D. Homesis with ionizing radiation. CRC Press, 1980.

## Study on Growth and POD Isozymes Activities of Offspring of Oriental Lily Irradiated by X-ray Acute Irradiation

HUANG Hai-tao<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>2</sup>, ZHOU Li-juan<sup>3</sup>

(1. Mianyang Research Institute of Agricultural Science, Mianyang, Sichuan 621000; 2. Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010; 3. Xi'an International University, Xi'an, Shaanxi 710004)

**Abstract:** The adventitious buds of oriental lily were treated with X-ray acute radiation, and then the growth and zymogram of POD isozyme of adventitious buds were analyzed. The results showed that the plant height of 1.76 Gy dose treatment had increased compared with the control, and the rates of germination of adventitious buds haven't been significant changed and other dose-related growth index had no significant difference with the control. Using cluster analysis on the isozyme, found there was an obviously difference between the 1.76 Gy and the control.

**Key words:** X-ray; acute irradiation; oriental lily; POD isozyme