

⁶⁰Co γ 辐射对美丽胡枝子生理生化效应的影响

王 玮, 王奎玲, 刘庆超, 刘庆华, 王 媛, 许红印

(青岛农业大学 环境艺术学院 山东 青岛 266109)

摘 要: 采用不同剂量的⁶⁰Co γ 射线辐射美丽胡枝子种子, 测定其叶片中叶绿素、可溶性蛋白含量以及细胞膜透性和 SOD 活力。结果表明: 对照叶片的叶绿素含量明显低于辐射后的叶片, 并且其随不同剂量的变化较为复杂; 辐射能不同程度的提高可溶性蛋白的含量, 且效果比较显著; 当剂量超过 300 Gy, 细胞渗出液浓度随着辐射剂量的加大而增加; 随辐射剂量的增加, SOD 活性有明显的下降趋势, 但在 100 Gy 时, SOD 活性变化不大, 当剂量达到 200 Gy 以上时, SOD 活性下降较为明显。

关键词: 美丽胡枝子; 叶绿素; 细胞膜透性; 可溶性蛋白

中图分类号: Q 503; S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)10—0109—04

自⁶⁰Co γ 射线在 20 世纪 40 年代被用于引发突变和诱变育种以来, 人们对⁶⁰Co γ 射线在高等植物上的诱变作用进行了广泛研究, 对于观赏植物⁶⁰Co γ 射线的诱变研究自 20 世纪 80 年代以来在我国也有广泛应用, 迄今已证明⁶⁰Co γ 射线对月季、菊花、梅花等具有重要观赏价值的我国传统名花有诱变作用。

第一作者简介: 王玮(1981—), 男, 山东烟台人, 硕士, 主要从事园林植物遗传育种方面研究工作。E-mail: wangwei1012@hotmail.com。
通讯作者: 刘庆华。
基金项目: 山东省农业良种产业化工程资助项目[鲁科农字(2005)99 号]。
收稿日期: 2008—04—18

以往大部分辐射效应研究都是研究其形态效应指标及生物学效应指标, 而从生理生化角度揭示花卉诱变的深层效应则比较少见。试验以美丽胡枝子为材料, 研究⁶⁰Co γ 射线处理材料后的生理生化诱变效应。通过比较辐射和对照组间供试材料的叶绿素、可溶性蛋白含量以及细胞膜透性和 SOD 活性, 为进一步探讨美丽胡枝子辐射育种规律提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试种子 2006 年 11 月取自青岛中山公园, 采后用纸袋封存后置于通风干燥处。种子籽粒饱满, 千粒重为 8.80 g。

1.2 种子辐射

辐射前进行水分平衡。采用真空干燥法将美丽胡

Effects of Different Soaks on Seed Germination Rate of *Rhododendron delavayi* Franch

CHENG Xue-mei¹, HE Cheng-zhong², ZHOU Min¹, SHU Qing-tai², WANG Li-cang³

(1. Faculty of Landscape Architecture Southwest Forestry College, Kunming Yunnan 650224, China; 2. Faculty of Resources Southwest Forestry College Kunming Yunnan 650224 China; 3. Forestry Bureau of Qujing City, Qujing, Yunnan 655000, China)

Abstract: Conducted the different soaks effect on seed germination rate that, collected from four populations of *Rhododendron delavayi*. The result showed that soaking seeds in 0.5% boric acid, distilled water (room temperature) and lukewarm distilled water (30 ℃) for 24 hours could promote its germination rate, and differences were not significant among the three methods. However, 0.5% boric acid soaking was the most efficient method, and the difference was significantly compared with the controlled treatment. Furthermore analysis showed that seed germination rate and seed germination force in same treatment had differences among the four populations of *R. delavayi*, and seeds of Ma-xiong Mountain population had the highest germination rate and germination force.

Key words: *Rhododendron delavayi*; Soaks; Germination rate; Germination force

枝子成熟干种子置于装有水和甘油(1 : 1)的干燥器内,平衡水分至 12%,然后将种子取出放入硫酸纸小袋中。

辐射剂量参照其他豆科植物相关辐射研究结果^[1]及预试验数据确定,采用⁶⁰Co γ 射线 100、200、300、400、500 Gy 5 种剂量对美丽胡枝子种子进行处理,剂量率为 1.61 Gy/min,每剂量处理种子 600 粒,重复 3 次,以未辐射为对照。试验于 2007 年 3 月在青岛农业大学原子能试验站进行。

1.3 材料栽培

种子辐射后当日种植于青岛农业大学种质资源圃,每个处理的每个重复种植一行,随机排列。行距 30 cm,株距 20 cm,正常水肥管理。

1.4 叶绿素提取与测定

分别取不同处理美丽胡枝子新鲜叶样 0.5 g,擦净组织表面污物,剪碎(去掉中脉),混均。采用丙酮和无水乙醇等体积混合液法提取叶绿素。在暗室中提取 24~30 h 直至叶片组织变白无绿色,用混合液作对照液,用上海产的 721 分光光度计测定在波长为 663 和 645 的条件下测定吸光度,利用下面的公式计算叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量及叶绿素总量:

$$C_a = (13.95D_{665} - 6.88D_{649}) \times V / 1000W;$$
$$C_b = (24.96D_{649} - 7.32D_{665}) \times V / 1000W;$$
$$C_{总} = C_a + C_b = (18.08D_{649} + 6.63D_{665}) \times V / 1000W。$$

1.5 细胞膜透性的测定

用 0.5 mm 手持式打孔器分别打取不同辐射处理的植株叶圆片(每处理 12 片),将叶圆片放入 50 mL 锥形瓶中,随即加入 25 mL 去离子水,用真空泵抽气 10 min,放入真空干燥器中,用铝箔纸封口,于 25℃下分别浸泡 24 h 和 48 h。用 DDS-320 型精密电导仪测定电导值 A₁和 A₂。测定后,再将上述锥形瓶沸水浴 30 min,冷却至 25℃后测定电导值 B₁和 B₂。分别计算 24 h 电导率、48 h 电导率(相对电导率(%))=电导率值 A/电导率值 B×100%)。重复 3 次。

1.6 SOD 活性测定

用 NBT 法:3 mL 反应体系中含 13 mmol/L 蛋氨酸、0.1 mmol/L EDTA、0.004 mmol/L 核黄素和 0.075 mmol/L 氮蓝四唑(NBT),于 3 支 40W 的荧光灯下进行光反应 25 min,遮光中止反应后立即在 560 nm 下比色,依 SOD 抑制 NBT 光化学反应还原量计算酶活性。一个酶活性单位(U)相当于引起反应液达到 50%最大光还原反应抑制所需的酶量。

1.7 可溶性蛋白含量测定

可溶性蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法^[2]。

2 结果与分析

2.1 不同剂量辐射对美丽胡枝子叶绿素含量的影响

辐射后美丽胡枝子的叶色比对照深,显得浓绿、翠绿,而且随着剂量的加大,叶色趋深。通过叶绿素含量测定(表 1),表明对照叶绿素含量明显低于辐射后的叶片。表 2 给出了方差分析的结果。

表 1 辐射样和对照样叶片叶绿素含量

材料	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 a+b	叶绿素 a/叶绿素 b
0 Gy	0.2506	0.3115	0.5621	0.8045
100 Gy	0.1956	0.5059	0.7014	0.3866
200 Gy	0.5727	0.2754	0.8481	2.0795
300 Gy	0.6126	0.2604	0.8729	2.3525
400 Gy	0.6794	0.2839	0.9634	2.3931
500 Gy	0.6454	0.3024	0.9478	2.1343

虽然方差分析表明辐射样与对照样间叶绿素含量差异显著,但多重比较结果显示经不同剂量辐射后,美丽胡枝子叶片中叶绿素含量均提高,当剂量达到 400 Gy 时叶绿素 a+b 含量最高,但叶绿素 a+b 含量并不简单的随剂量的增加而增多。100 Gy 辐射处理与对照间差异并不显著。

尽管叶绿素 a+b 含量在辐射处理后含量均增加,但通过表 1 中数据可以看出叶绿素 b 的含量变化规律却不同于总量的变化规律。辐射处理样本中,只有 100 Gy 时的叶绿素 b 含量高于对照,为 0.5059 μg/g,其他各处理中叶绿素 b 含量均低于对照,但并不是单纯的随剂量的增加而下降。叶绿素 b 含量最高值出现在 100 Gy 时,这种现象较难以解释。

表 2 叶绿素含量的方差分析

指标	变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	显著性
叶绿素 a	剂量间	5	0.6775	0.1355	29.587	**
	重复间	12	0.0550	0.0046		
	总计	17	0.7325			
叶绿素 b	剂量间	5	0.1251	0.0250	3.871	*
	重复间	12	0.0776	0.0065		
	总计	17	0.2027			
叶绿素 a+b	剂量间	5	0.3628	0.0726	11.451	**
	重复间	12	0.0760	0.0063		
	总计	17	0.4389			
叶绿素 a/b	剂量间	5	11.9186	2.3837	8.231	**
	重复间	12	3.4752	0.2896		
	总计	17	15.3939			

由图 1 可知,叶绿素 a 含量变化规律类似于总量的变化规律,除 100 Gy 时叶绿素 a 含量低于对照,为 0.1956 μg/g,其他各处理中叶绿素 a 含量均高于对照,且提高较为显著。同样,叶绿素 a 含量也不是单纯的随剂量的增加而增加。叶绿素 a 含量最高值出现在 400 Gy 时。由图 2 可知,叶绿素 a/叶绿素 b 的含量变化与叶绿素 a 变化较为相似,其最大值出现在 400 Gy 时。

2.2 不同剂量辐射对美丽胡枝子细胞膜透性的影响

辐射处理不仅能引起细胞核中 DNA 产生变异 同时在一定剂量处理后会引引起膜损伤,膜透性会明显改

变,表现出种子浸出液电导率增加。

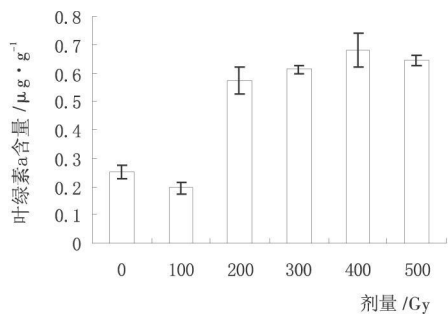


图1 叶绿素 a 含量的变化

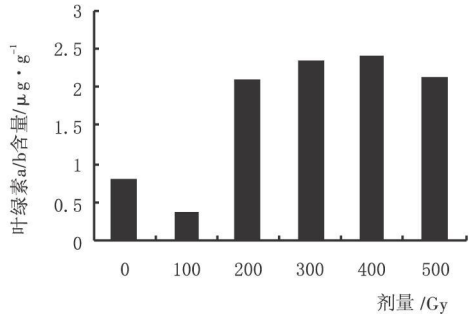


图2 叶绿素 a/ b 含量的变化

表 3 辐射处理对美丽胡枝子种子细胞膜透性的影响

剂量 /Gy	24 h			48 h		
	A1	B1	24 h 相对电导率	A2	B2	48 h 相对电导率
0	101.5	262.7	38.6	167.1	372.3	44.9
100	115.3	275.5	41.9	182.0	383.6	47.4
200	122.8	291.0	42.2	195.6	407.2	48.0
300	159.7	342.1	46.7	251.2	452	55.6
400	173.0	351.8	49.2	273.0	461.5	59.2
500	201.6	362.3	55.6	286.1	468.2	61.1

不同处理的美丽胡枝子叶圆片浸泡液 24 h 和 48 h 电导值及相对电导率测定结果见表 3。表 3 显示: 辐照剂量不超过 200 Gy 时, 3 种电导率变化均小, 说明细胞膜透性变化小, 细胞损伤不严重; 当剂量超过 300 Gy, 细胞渗出液浓度随着辐射剂量的加大而增加。电导率越

大, 膜透性越大, 细胞受损伤程度越大。美丽胡枝子叶片的 24 h 电导率、48 h 电导率变化趋势表现出一致性。

2.3 不同剂量辐射对美丽胡枝子 SOD 活性的影响

由图 3 知, 随辐射剂量的增大, 美丽胡枝子叶片中 SOD 酶活性均显著受到不同程度的抑制。100 Gy 剂量辐射下, SOD 活性比对照降低 1.7%、200~300 Gy 剂量辐射下, 分别比对照下降 10.2%和 16.7%; 400 Gy 时, SOD 活性较之 300 Gy 时略有所提高, 但仍比对照下降 12.6%; 500 Gy 时, SOD 活性比对照降低 17.6%。由上可知, 随辐射剂量的增加, SOD 活性有明显的下降趋势。但在 100 Gy 时, SOD 活性变化不大, 当剂量达到 200 Gy 以上时, SOD 活性下降较为明显。

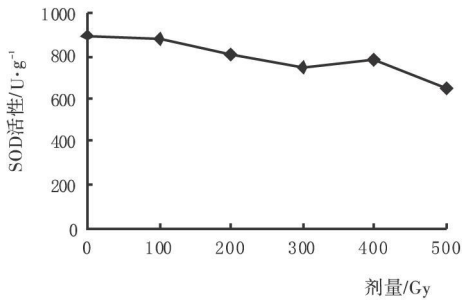


图3 辐射对美丽胡枝子叶片 SOD 的影响

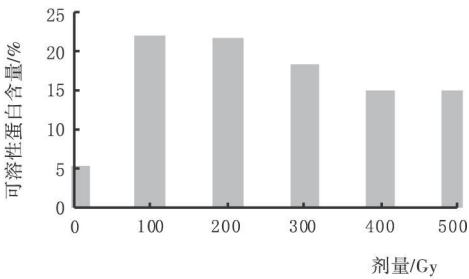


图4 辐射对美丽胡枝子叶片可溶性蛋白含量的影响

2.4 不同剂量辐射对美丽胡枝子可溶性蛋白含量影响

由图 4 可知, 低剂量(100、200 Gy)可以显著迅速提高可溶性蛋白的含量, 且二者可溶性蛋白含量无显著性差异。此后随着剂量的增加, 可溶性蛋白的含量开始降低。但总的来说, 辐射能不同程度的提高可溶性蛋白的

含量, 且效果比较显著。

3 讨论

在辐射诱变及应用中人们更多的注意辐射对遗传物质的影响, 对细胞膜的辐射损伤及生理生化效应虽有所发现, 但研究不多。

该试验结果表明在一定剂量处理后引起膜损伤,膜透性会明显改变,有较明显的变化临界点,结果与苗高等指标有很好的-致性,因此被认为是一个判别辐射剂量效应的有效指标。

辐射处理使对射线敏感的细胞核中的 DNA 产生变异,同时也对美丽胡枝子细胞膜产生损伤。低剂量对膜损伤较小,细胞膜透性变化小。当剂量超过 300 Gy 时,对美丽胡枝子细胞膜开始产生显著伤害,随剂量增大,相对电解质渗出率明显提高。

辐射明显改变了美丽胡枝子叶片的叶绿素含量。辐射后叶片中叶绿素 a 的含量与对照有显著差异,其含量在辐射后显著增加,但并不随剂量的增加而增多。叶绿素 b 含量与对照间也有显著差异,其含量在辐射后显著降低,但并不随剂量的增加而减少。叶绿素 a+b 含量与对照差异显著,有随剂量增加而增多的趋势。辐射引起叶绿素含量的变化是否由于影响叶绿素合成途径所致,还需进一步深入研究。

SOD 是一种清除超氧离子自由基酶,是防御细胞膜脂过氧化的主要酶,能对细胞造成的伤害做出敏感的反应,同时清除自由基产生的伤害而起修复作用,与植物的抗逆性、抗衰老密切相关。酶活力高,说明植物受伤害的程度轻,是对植物的保护反应^[3-5]。Marome^[6]认为辐射毒素和相应酶系的活性可以作为植物辐射敏感性的测定指标,也是损伤的代谢指标。该试验结果表明,经过不同剂量辐射后,美丽胡枝子的 SOD 均比对照降低,但低剂量辐射不引起 SOD 活性的明显变化。随着

剂量的增加,下降幅度愈加明显。这说明不同剂量的辐射会不同程度的降低美丽胡枝子的抗逆性,并且易于促进植物衰老。因此,辐射育种过程中,在保证一定突变率的基础上,应尽量控制辐射剂量,在同等条件下保持美丽胡枝子的抗逆性。

通过辐射,可以不同程度的提高美丽胡枝子体内可溶性蛋白含量。在 100~200 Gy 时,可溶性蛋白含量上升一致,但从 300 Gy 开始,可溶性蛋白含量下降较为明显,其原因可能是辐射增强使美丽胡枝子蛋白质分解代谢加强,可溶性蛋白质含量下降,这可能与辐射增强造成蛋白质结构改变、蛋白酶活性上升有关。总之,蛋白质对植物非常重要,许多酶属于蛋白质类,所以可以通过辐射提高蛋白质含量,从而提高植物体内的生理生化反应。

参考文献

- [1] 马建中,鱼红斌,伊虎英.关于牧草辐射育种几个问题的探讨[J].核农学报,2000,14(3):167-173.
- [2] 郝再彬,苍晶,徐仲.植物生理试验技术 B 册[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002.
- [3] 李宪利,高东升.铵态和硝态氮对苹果 SOD 和 POD 活性的影响[J].应用与生物学报,1997,33(4):254-256.
- [4] 叶挺梅.⁶⁰Co γ 射线辐射对芦荟生理指标的影响[J].安徽农业科学,2005,33(2):234-235.
- [5] 吴双软.x 射线同步辐射对小麦细胞膜脂质过氧化产物及相关酶活性的影响[J].核技术,2003,26(8):578-581.
- [6] 顾光炜,董家伦.农业应用核技术[M].北京:原子能出版社,1992:161-212.

Effects of ⁶⁰Co γ Rays Radiation on Physiological Activity of *Lespedeza formosa*

WANG Wei, WANG Kui-ling, LIU Qing-chao, LIU Qing-hua, WANG Yuan, XU Hong-yin

(Landscape Architecture and Art College, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The seeds of *Lespedeza formosa* were irradiated by different doses of ⁶⁰Co γ rays. The content of chlorophyll, soluble protein, cell membrane permeability and SOD activity were determined. The results showed that the chlorophyll content of control group was lower than radiation group significantly and the variation was comparatively complex along with different doses. Radiation could improve the content of soluble protein in different extent and the effects were relatively remarkable. The concentration of cellular exudates increased with the increasing of radiation dose when the dose was more than 300 Gy. SOD activity had significant downward trend with the increasing of radiation dose. SOD activity had little change when the radiation dose was 100 Gy, and it descended obviously when radiation dose exceeded 200 Gy.

Key words: *Lespedeza Formosa*; Chlorophyll; Cell membrane permeability; Soluble protein