

α 粒子注入拟南芥胚胎/胚对其生长的影响及其可能机制

任杰^{1,2} 吴李君¹ 王荣富² 杨根¹ 王家保¹ 吴跃进¹ 卞坡¹ 余增亮¹

¹ (中国科学院离子束生物工程重点实验室 合肥 230031)

² (安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

摘要 该研究表明, 1Gy、10Gy 和 100Gy 的 α 粒子注入拟南芥胚后, 胚的发芽率均达 96% 以上, α 粒子注入对胚生活力的影响体现在发芽势, 照射 1Gy 发芽势呈升高趋势, 剂量大于 10Gy 发芽势低于正常水平。主根长度的变化趋势与发芽势一致, 100Gy α 粒子注入使主根的重力敏感性降低, 而在竖直的培养基上呈“S”型生长。Vc 清除过氧化氢实验表明, 100Gy 的 α 粒子注入的拟南芥胚, 在含 0.2mmol/L Vc 的 MS 培养基上, 根的重力敏感性恢复正常。 α 粒子注入引起的重力敏感性 & 根长等生理指标的变化与过氧化氢的产生有关。过氧化氢酶、丙二醛的含量随剂量的增加而增加, 而 SOD 活性在 100Gy 时降低。该研究表明, α 粒子注入可能通过诱导信号分子过氧化氢的增加, 引起生理水平的变化。

关键词 α 粒子注入, 拟南芥胚, 辐射生理效应, 重力敏感性

中图分类号 Q691

生物体所受的环境辐射 55% 来自于氦气及其子体衰变产生的 α 粒子^[1], α 粒子引起的生物学效应一直是辐射生物学家感兴趣的研究领域。 α 粒子属于直接电离粒子, 具有较高的传能线密度 (Linear energy transfer, LET), 与物质有较强的相互作用。Nelson^[2] 等发现微核的诱导与照射的 α 粒子数成正比, 并可以引起减数分裂的延缓。1cGy 的 α 粒子照射人纤维原细胞就能引起 DNA 双链断裂 (Double strand break, DSB), 并能引发细胞之间的辐射信号传导及其细胞间旁效应 (Bystand effect) 的产生^[3]。细胞学研究已证明 α 粒子是一种致癌和致突因子, 能引起微核的产生^[2]、姐妹染色体交换^[4]、基因突变^[5] 及活性氧的产生^[6]。然而, 由于 α 粒子的穿透力较弱, 有关 α 粒子的辐射生物学的研究多集中在哺乳动物方面^[2-5], 在个体和组织水平上研究 α 粒子生物效应在国内外尚未见报道。

双子叶植物拟南芥植株小、生育期短、结籽多而小、遗传背景清晰、变异丰富, 是发育和遗传学研究的模式物种, 它的基因组全序列已测定^[7], 拟南芥胚具有细胞、根、叶等器官形成分化的基本模式^[8], 是研究个体水平辐射的理想材料。由于 α 粒子的穿透深度 (在拟南芥胚中约 33 μ m) 有限, 本研究建立了能够满足实验要求的拟南芥胚 (由胚

轴、胚柄及两片子叶组成, 形状与拟南芥种子相似, 长约 250 μ m, 厚约 80—120 μ m) 分离与照射技术, 把 α 粒子直接注入拟南芥胚, 探讨了 α 粒子与拟南芥胚相作用的辐射生理学效应及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) columbia 生态型种子。

1.1.1 拟南芥胚的剥取与 α 粒子照射 把拟南芥种子置于 Φ 1.5mL 离心管中, 加无菌水, 4 $^{\circ}$ C 浸泡 3d, 使发芽同步化^[9]。用微型镊子无菌环境下剥取胚。然后将无损的拟南芥胚置于辐照皿里的 Mylar 膜 (厚度 3.5 μ m) 上, 在膜上加若干滴水, 使空气湿度接近 100%, 免使胚的活力受影响。 α 粒子由 ²⁴¹Am 放射源产生, 平均能量为 3.5 MeV, 剂量率为 1.28cGy/min^[3]。辐照剂量分别为 1Gy、10Gy 和 100Gy, 处理后的胚与对照一起种植于含 MS (8 克琼脂/升) 培养基的培养皿上, 各四个重复, 每个处理约 24 粒胚。然后置于 23 $^{\circ}$ C 的恒温温室中生长, 每天光照 16h。光照强度为 6.02 \times 10¹⁹ photons m⁻² s⁻¹。至 4 叶时转移至营养土中。

国家杰出青年基金 (10225526)、国家自然科学基金面上项目 (30570435)、中国科学院知识创新项目 (KSCX2-SW-324) 资助
第一作者: 任杰, 男, 1981 年 2 月出生, 2003 年毕业于安徽农业大学, 现为安徽农业大学与中国科学院联合培养硕士研究生, 生物物理专业

通讯联系人: 吴李君

收稿日期: 初稿 2006-03-03, 修回 2006-04-20

1.1.2 α 粒子在拟南芥胚中的穿透深度 用 SRIM (2003) 软件模拟 α 粒子在拟南芥胚中的穿透深度, 模拟显示, α 粒子在拟南芥胚中的穿透深度约为 33 μ m。

1.2 拟南芥胚活力测定

胚的活力 (Germination ability) 用发芽势 (Germination speed) 与发芽率 (Percentage germination) 来衡量。发芽势反映了胚的萌发速度; 发芽率从胚最终发芽数量方面反映胚的活力。参考 Jamalah 等^[10]测定种子活力的方法并作改进。以种子萌动为标准, 第四天测定发芽势, 发芽势(%)=(第四天萌发的胚/供试验胚总数) \times 100%; 第7天统计发芽率, 发芽率(%)=(第7天萌发的胚/供试验胚总数) \times 100%。

1.3 α 粒子注入拟南芥胚对主根生长的影响

用数码相机 (DSC-F505V, SONY) 取像, 用微标尺结合 image J 软件, 第10天测定根长 (从根尖到下胚轴的长度), 参考 Fu 等^[9]的方法。

1.4 根的重力敏感性变化及抗坏血酸实验

照射后抗坏血酸 (Vc, 过氧化氢猝灭剂, SIGMA) 处理: 拟南芥胚接种到含 0.2mmol/L 的 Vc 的 MS 培养基平板上, 培养 10d, 用数码相机取像, 用微标量角器结合 image J 软件测量根弯曲的角度, 计算 100Gy 和对照的根平均弯曲角度。若弯曲度小于 30°记作正常, 以“N”表示。以“S”表示根呈“S”型生长或根的平均弯曲度大于 30°。参考 Joo 等^[11]的方法并作改进。

1.5 酶活性测定

在拟南芥抽苔期, 称取 0.2g 鲜重的第六片叶片, 加入 2 mL 含 PVP 的磷酸缓冲液 (pH7.8, 浓度 50mmol/L), 于冰浴中充分研磨至匀浆, 然后在 11590r/m 下 4℃离心 20min, 取上清液供测定酶活及测定丙二醛含量使用。过氧化氢酶 (Catalase, CAT, EC 1.11.1.6) 使用南京建成公司试剂盒 (Becana^[12]方法的改进) 进行测定, 1 个酶活单位为: 每克鲜重组织中过氧化氢酶每秒钟分解吸光度为 0.50—0.55 的底物中的过氧化氢相对量。超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1) 采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定 (Spychalla^[13]等方法的改进), SOD 酶活性以抑制氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 光还原 50% 时所需的酶量为一个活力单位。分光光度计采用 TU-1901 型分

光光度计 (Beijing Puxi)。

1.6 丙二醛含量测定

丙二醛 (Malodialdehyde, MDA) 含量的多少是膜脂过氧化高低的反映^[14]。MDA 测定采用南京建成生物工程研究所的 MDA 试剂盒。分光光度计采用 TU-1901 型分光光度计 (Beijing Puxi)。

1.7 统计方法

本实验数据的统计方法采用 Student's *t* test 检验。

2 结果

2.1 α 粒子注入对拟南芥胚发芽率、发芽势和根长的影响

图 1 的实验结果表明, α 粒子注入拟南芥胚对胚的发芽率无显著影响, 各处理均达 96% 以上, 并无显著差异 ($p>0.05$)。 α 粒子注入对胚的生活力的影响主要体现在对胚的发芽势的影响上, 1Gy 的 α 粒子注入能较显著地刺激胚的萌发, 使发芽势比对照 (71%) 提高了 11.4%; 100Gy 处理则显著抑制胚的萌发, 其发芽势仅为 29%, 比对照降低 42%; 10Gy 的 α 粒子注入胚的发芽势为 51.4%, 也抑制了拟南芥胚的萌发速度。

α 粒子注入对主根长的影响同样存在刺激效应与抑制效应, 且主根长短同其发芽势的变化趋势一致 (见图 2), 结果表明 1Gy 的 α 粒子注入刺激了拟南芥胚根的生长, 100Gy 的 α 粒子注入则抑制了胚根的伸长。其中在第 10 天 1Gy 处理的主根长比对照增加 26.6%, 而 10Gy 和 100Gy 处理的主根长比对照分别减少 15.9% 和 39.3%。

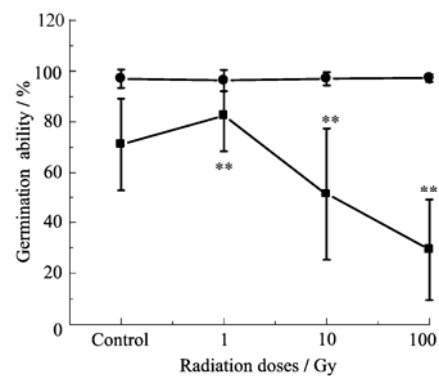


Fig.1 Germination percentage (●) and germination speed (■) of *Arabidopsis thaliana* embryos irradiated to different doses by ²⁴¹Am α particles. Data were pooled from 15 individual experiments

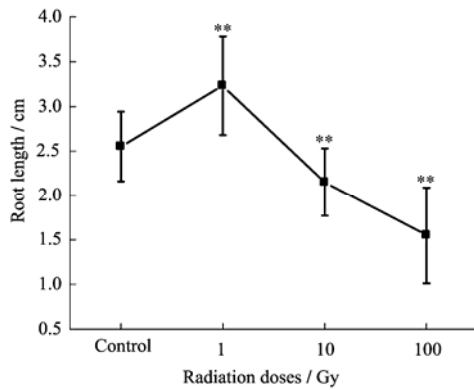


Fig.2 Root length of *Arabidopsis thaliana* seedlings on the 10th day after irradiation of different doses by ^{241}Am α particles. Data were pooled from more than six individual experiments. Value (means \pm standard errors of the mean, SEM) with * or ** is significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) different from the non-irradiated control

2.2 α 粒子注入对拟南芥根的重力敏感性的影响

α 粒子对根的重力敏感性 (Root gravitropism) 影响与照射剂量呈正相关, 100Gy 的影响最为显著。通过观察竖直方向的 MS 培养基里生长的拟南芥幼苗, 100Gy 的粒子注入的拟南芥的主根形状呈明显的“S”形, 即弯曲的形式生长 (见图 3), 弯曲度平均为 69.1° , 非照射对照为 13° (见图 4)。



Fig.3 Shape of the *Arabidopsis* root growth on the 8th day in a vertical MS medium. The left half, which is the group irradiated to 100Gy by the α particles, shows obviously “S” type growth, whereas the right is the non-irradiated control

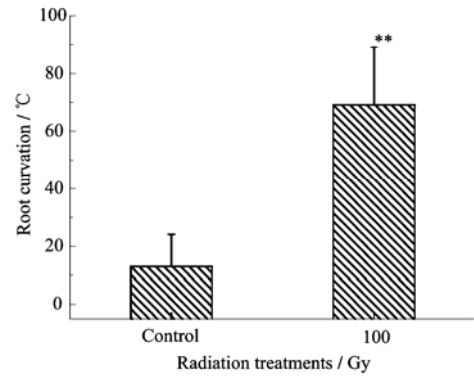


Fig.4 Curvation angles of the *Arabidopsis* roots of the 100Gy irradiated and the control. Data were pooled from three independent experiments and value (means \pm standard errors of the mean, SEM) with ** is significantly ($p < 0.01$) different from the control

一些研究显示根的重力敏感性与诱导的信号分子有关。Hu 等^[15]认为 NO 参与了根重力信号的传导。A-H-Mackerness 等^[6]认为 UV-B 辐射导致活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 和 NO 的产生。Joo 等^[11]认为 H_2O_2 参与了重力信号的传导。为进一步研究 α 粒子注入引起的根的重力敏感性发生变化的原因, 我们在 MS 培养基里添加一定浓度 Vc, 研究作为辐射信号传导的自由基在早期根生长中的作用。

结果 (见表 1) 显示, 100Gy 处理的拟南芥胚在含 0.2mmol/L Vc 的 MS 培养基上, 其根的重力敏感性恢复正常, 说明高浓度的 Vc 猝灭了大量的过氧化氢, 同时也表明 100Gy 辐照的胚在萌发早期产生了大量的自由基, 过氧化氢可能介导了根的重力敏感性反应。

Table 1 Root gravitropism of seedlings in MS medium plates

Radiation doses / Gy	MS +0.2mmol/L Vc	MS
	Root gravitropism	Root gravitropism
100	N	S
0	N	N

Notes: N indicates that the root gravitropism of seedlings was normal and S indicates that the root gravitropism of seedlings was inhibited and root shape showed an S type curve

2.3 α 粒子注入引起的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶及膜脂过氧化的变化

植物体内的 CAT 和 SOD 是保护型酶, 当受到逆境环境因子 (如 UV^[16]、离子辐射等^[17,18]) 的作用, 植物体的 CAT 和 SOD 可能被激活, 对植物起

到自我保护作用。如图 5(a), α 粒子直接注入拟南芥胚引起了 CAT 被激活, CAT 酶的激活随剂量的增加而增加。1Gy、10Gy 和 100 Gy 的 α 粒子注入的 CAT 含量分别比对照提高 18%、39%和 66%。与 CAT 酶活随照射剂量增加而增加相比, 1Gy 和 10Gy 的 α 粒子注入拟南芥胚 SOD 酶活变化不显著 (图

5(a))。随着粒子注入剂量的增大, SOD 酶活降低, 100Gy 的 α 粒子注入其酶活性比对照低 12.6% (图 5(b))。陈宏等^[19]研究也认为不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射水稻种子, 其幼苗 SOD 酶活性下降。Costa^[16]的研究表明向日葵子叶中 SOD 活性随 UV 辐射的增加而降低。

通常用 MDA 含量的多少衡量脂质过氧化的高

低^[16]。本研究表明 α 粒子注入引起的 MDA 含量的变化随辐照的剂量增加而增加, 如图 5(c), 抽苔期, 对照的 MDA 的含量平均为 1.32nmol/g.FW, 而 100Gy 的粒子注入处理达到 3.68nmol/g.FW, 是对照的 2.8 倍。叶片中 MDA 含量随剂量增加而增加说明了这种高 LET α 粒子注入使植物发生了严重的膜脂过氧化。

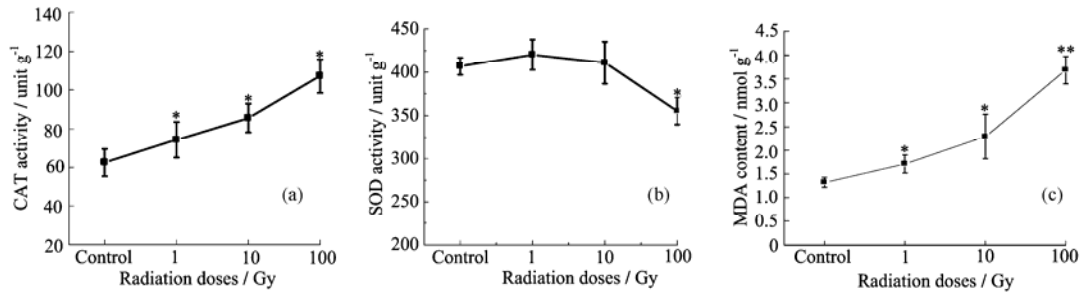


Fig.5 Effect of the α -particle irradiation on activity of CAT (a), SOD (b) and on content of MDA (c). Data were pooled from at least three independent experiments. Value (means \pm SEM) with * or ** is significantly ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) different from the non-irradiated control

3 讨论

尽管 α 粒子的穿透力有限, 但这种具有较高 LET 的粒子直接与具有较厚细胞壁的植物生物体相互作用, 仍然具有较强的生物学效应。我们研究显示 α 粒子注入植物生物体不仅具有刺激效应, 而且具有抑制效应。1Gy 的 α 粒子注入拟南芥胚, 使发芽势、主根长、丙二醛和超氧化物歧化酶等不同程度的增加。当粒子注入量加大时, 特别是 100Gy 的 α 粒子注入, 使发芽势、主根长、超氧化物歧化酶等生理指标降低, 膜脂过氧化产物 MDA、过氧化氢清除酶 CAT 增加。但这种刺激或抑制效应所需的剂量远小于 γ 射线产生相应效应所需的剂量。强继业等^[20]认为 20Gy 的 γ 射线辐照鸡冠花种子刺激其根长的增加, 80Gy 的剂量抑制根的生长。其所需剂量均高于本实验, 原因可能是 α 粒子是具有较高 LET 的粒子, 其电离能力强, 产生相应效应所需剂量较小。

正常情况下, 植物体内活性氧 (包括 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\text{OH}\cdot$ 等) 的产生和清除处于动态平衡, 有研究认为, CAT 含量能间接反映植物体内 H_2O_2 含量的高低, 本实验表明 CAT 含量随辐射剂量的增加而增加, 说明随辐射剂量的加大, 植物体内的 H_2O_2 大量增加。同时, Vc 实验也表明 α 粒子注入引起了的根生长及其重力敏感性变化与自由基的产生有关。SOD 的活性在高剂量注入时显著下降, 说明仅靠 CAT 的激活不足以清除植株体内产生的 H_2O_2 , 相对

过量的活性氧促进了膜质的过氧化作用, 细胞膜受到损伤, 造成了 MDA 的大量积累, 使植物体内的活性氧代谢失调, 进而引起相应的生理生化反应。

最近有研究认为 H_2O_2 作为信号分子调节植物胁迫时相应基因的表达^[5]。Joo^[11]研究认为 ROS 参与了根的重力敏感性的发生。Demidchik 等^[18]研究认为自由基猝灭剂能够抑制根的伸长, 并且 H_2O_2 参与激活细胞内的钙信号放大。本研究认为 H_2O_2 可能参与了辐射诱导的生理生化水平的变化。自由基清除实验表明, 100Gy 辐照的胚, 种于含 0.2mmol/L Vc 的 MS 培养基上, 其重力敏感性恢复正常。Vc 实验表明过氧化氢清除剂 Vc 猝灭了 α 粒子辐射早期产生的过氧化氢。低剂量时, 辐射产生了较低浓度的过氧化氢; 高剂量粒子辐射产生较多的 H_2O_2 。在低剂量辐照时产生的少量 H_2O_2 刺激了发芽势、根长的增加, SOD 和 CAT 酶的激活, 并引起膜脂过氧化作用。高剂量辐射时, 产生大量的 H_2O_2 抑制了胚的萌发、根的生长和根的重力敏感性, 并抑制了 SOD 的活性, H_2O_2 的增加引起的 CAT 酶的活性的提高不足以清除产生的 H_2O_2 , 进而引起膜脂过氧化产物 MDA 的大量积累。

参考文献

- Garnier L J, Gilek M, Sundell B S, *et al.* J Radiol Prot, 2004, 24(4): 139-155
- Nelson J M, Brooks A L, Metting N F, *et al.* Radiat Res, 1996, 145(5): 568-574

- 3 Hu B, Han W, Wu L, *et al.* Radiat Res, 2005, **164**: 286-291
- 4 Nagasawa H, Little J B. Cancer Res. 1992, **52**(22): 6394-6396
- 5 Zhou H, Randers P G, Charles A W, *et al.* PNAS, 2000, **97**(5): 2099-2104
- 6 A-H-Mackerness S, John C F, Jordan B, *et al.* FEBS Lett, 2001, **489**(2-3): 237-242
- 7 The Arabidopsis Genome Initiative. Nature, 2000, **408**(6814): 796-815
- 8 Thomas B. Plant Physiol Biochem, 1998, **36**(1-2): 69-82
- 9 Fu X, Nicholas P H. Nature, 2003, **421**(6924): 740-743
- 10 Jamal M, Lisa A D, Kathleen D, *et al.* American J Bot, 2001, **88**(7): 1240-1249
- 11 Joo J H, Bae Y S, Jee J S. Plant Physiol, 2001, **126**(3): 1055-1060
- 12 Becana M, Aparicio-Tejo P, Irigoyen J J, *et al.* Plant Physiol, 1986, **82**(4): 1169-1171
- 13 Spychalla J P, Desborough S L. Plant Physiol, 1990, **94**(3): 1214-1218
- 14 André Dias de Azevedo Neto, José Tarquinio Prisco, Joaquim EnéasFilho, *et al.* J Plant Physiol, 2005, **162**(10): 1114-1122
- 15 Hu X, Neil S J, Tang Z, *et al.* Plant Physiol, 2005, **137**(2): 663-670
- 16 Costa H, Gallego S M, Tomaro M L. Plant Sci, 2002, **162**(6): 939-945
- 17 Zaka R, Vandecasteele C M, Misset M T. J Exp Bot, 2002, **53**(376): 1979-1987
- 18 Demidchik V, Shabala S N, Coultts K B, *et al.* J Cell Sci, 2002, **116**(1): 81-88
- 19 陈宏, 靳阳, 张喜红, 等. 南开大学学报(自然科学版), 1999, **32**(2): 118-120
- CHEN Hong, JIN Yang, ZHANG Xihong, *et al.* Acta Sci Naturalium Universitatis Nankaiensis (Nature Science Edition), 1999, **32**(2): 118-120
- 20 强继业, 钟仙龙, 李锡珍, 等. 安徽农业科学, 2005, **33**(4): 620, 720
- QIANG Jiye, ZHONG Xianlong, LI Xizhen, *et al.* J Anhui Agri Sci, 2005, **33**(4): 620, 720

Morphological and physiological effects of α -particle irradiation on *Arabidopsis* embryos

REN Jie^{1,2} WU Lijun¹ WANG Rongfu² YANG Gen¹ WANG Jiabao¹
WU Yuejin¹ BIAN Po¹ YU Zengliang¹

¹ (Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, CAS, Hefei 230031)

² (Life School, Anhui Agriculture University, Hefei 230036)

ABSTRACT *Arabidopsis* embryos were irradiated by ²⁴¹Am α -particles to 1, 10 or 100Gy to study the irradiation effects. The results indicated that germination percentages of embryos were not affected by the irradiation in the dose range. Germination speed of the 1Gy group was 11.4% higher than that of control, whereas germination speed of the higher dose groups decreased, with germination speed of the 100Gy group being about 29.3%. The irradiation effect on root length was similar to the germination speed. Moreover, root gravitropism of the 100Gy group became S-shaped curves. In a mechanism study, the root gravitropism recovered while cultured in an MS medium containing 0.2mmol/L Vc, which indicated that H₂O₂ might joined the process of gravitropism. Furthermore, during shooting period of the *Arabidopsis*, the content of MDA was detected and the activities of SOD and CAT were observed. and the CAT activity and MDA content increased with the dose, while SOD activity of the 100Gy group decreased by 12.6% compared with the control. The results indicate that the induced increase of H₂O₂ signal molecules after the α -particle irradiation may be the mechanism of radiation physiological effects.

KEYWORDS α particle irradiation, *Arabidopsis* embryo, Physiological effects, Root gravitropism

CLC Q691