

快中子照射唐菖蒲球茎的损伤作用初探

张志伟¹ 王丹¹ 张冬雪¹ 郑春²

¹ (西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621000)

² (中国工程物理研究院核物理与化学研究所 绵阳 621000)

摘要 用快中子脉冲堆 (China fast burst reactor II, CFBR-II) 对唐菖蒲“超级”球茎进行不同剂量的照射处理, 研究快中子对唐菖蒲球茎表面的刻蚀情况及对蛋白质表达的阻遏作用。扫描电镜观察发现球茎受损伤情况随照射剂量和照射角度的不同而变化, 受垂直方向照射的球茎表面刻蚀程度最严重, 且刻蚀程度随着剂量增大而增大。通过田间栽培试验和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析发现, 随照射剂量的增大, 植株生长发育受到明显的抑制, 蛋白表达数量显著减少。由此表明, 快中子照射对植株能产生明显的影响。

关键词 中子照射, 唐菖蒲, 扫描电镜, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号 S603.6, S63.01, Q319, Q691.6

诱变育种能突破原有基因库的限制, 诱发新基因或新的基因组合, 形成有现实或潜在利用价值的新种质资源。目前, 照射诱变育种的诱变源仍以⁶⁰Co γ 射线为主^[1], 近年来, 我国有关离子束的报道也较多^[2,3], 而中子对植物进行照射育种的研究较少^[4-7], 特别是在观赏植物中鲜见报道。中子属于高传能线密度 (Linear energy transfer, LET) 照射, 易产生难以修复的 DNA 双链断裂, 其诱导的染色体畸变的有效性较低 LET 照射高数倍, 相对生物效应 (Relative biological effectiveness, RBE) 较高。中子在生物体内不仅有能量的传递, 而且有质量的沉积; 中子不带电荷, 又不同于离子注入方式, 其生物学效应不能完全参照其他射线。本实验用快中子照射唐菖蒲球茎, 用扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 观察照射后球茎表面的变化并对球茎蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 旨在初步确定快中子不同剂量及不同入射角度对唐菖蒲球茎的损伤效应对蛋白表达的阻遏现象, 为快中子诱变源的有效利用及诱变机理的进一步研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

唐菖蒲品种“超级”休眠球茎为供试材料, 周

径为 10—12cm。

1.2 方法

1.2.1 照射处理 本试验在中国工程物理研究院核物理与化学研究所中子辐照中心完成。以 CFBR-II 对样品进行中子照射处理, 照射时间为 270min, 中子注量率分别是 $0.02 \times 10^{10}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (100Gy)、 $0.07 \times 10^{10}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (300Gy) 和 $0.12 \times 10^{10}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (500Gy)^[8]。每剂量设 3 次重复, 每次重复照射 10 个唐菖蒲球茎。对照样品为未照射 (0Gy)。

1.2.2 电镜观察 在西南科技大学电镜室完成, Steroscan S440 立体扫描电子显微镜 (Leica Cambridge LTD), 30kV, 分辨率为 10nm。

将照射后球茎顶芽及侧表面立即进行 FAA 固定, 酒精梯度脱水, 乙醚脱水后于真空干燥箱中干燥, 然后置于真空镀膜仪内喷镀金膜, 进行 SEM 观察。

1.2.3 田间种植 将唐菖蒲球茎种植于西南科技大学农业设施实验室内, 种植用土为: 菜园土:珍珠岩:泥碳=6:1:1, 另加 1%过磷酸钙和 5%复合肥混合而成。水肥管理一致, 一个月后观察生长情况。

1.2.4 SDS-PAGE 取种植于田间的各处理球茎, 球茎蛋白的分离采用不连续缓冲系统, SDS-PAGE 垂直板电泳, 浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 10%。电泳采用稳压方式, 电泳后胶板采用银染法染色^[9],

中国工程物理研究院军民两用开发技术项目 (200305) 资助

第一作者: 张志伟, 男, 1981 年 1 月出生, 2004 年毕业于西北大学生命科学学院, 现为西南科技大学生命科学与工程学院硕士研究生, 研究方向为园艺植物遗传育种学

收稿日期: 初稿 2006-10-08, 修回 2006-12-04

后经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照分析, 用蛋白质 Marker (天泽基因工程公司) 计算蛋白亚基分子量。

2 试验结果与分析

2.1 电镜观察

未照射球茎外壁有较厚角质层, 细胞排列有致, 组织形状规则, 表面光滑圆润略有突起 (见图 1a, 1b)。球茎受中子照射后, 表面细胞和组织形状发生很大变化, 细胞排列略显紊乱, 有明显的刻蚀痕迹, 留下沟槽和孔洞 (见图 1c—h)。照射剂量增大, 表面的破坏程度加大, 受破坏部位更加密集, 刻蚀程

度更加严重, 受照射区域有一定程度的皱褶现象, 且皱褶痕随剂量增加而加深。

球茎表面受照射角度不同, 细胞损伤程度差异明显, 正对照射入射方向的球茎芽尖, 剂量较高时芽尖表面细胞和组织发生严重的刻蚀现象, 有很深的沟槽和孔洞, 且尖部组织有断裂现象 (见图 1c, 1d)。正对入射方向的球茎表面, 细胞和组织也发生严重的刻蚀现象, 刻蚀程度较侧向入射的更严重, 并可观察到很大的裂沟和深深的孔洞和沟槽 (见图 1h)。而受侧向照射的球茎表面, 细胞壁遭到的刻蚀现象较轻, 沟槽和孔洞也较浅 (见图 1f)。不论垂直照射或侧向照射, 高剂量照射损伤均较低剂量照射严重 (见图 1e—h)。

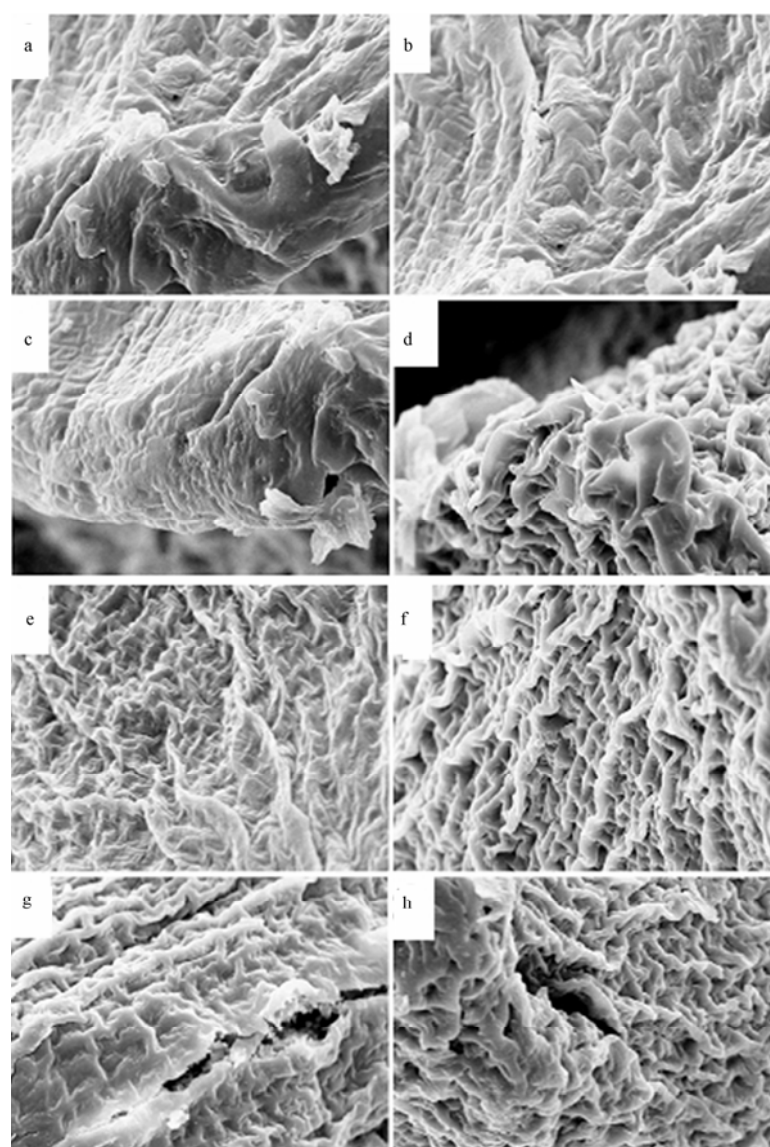


Fig.1 SEM images of gladiolus of irradiation by neutrons ($\times 2000$)

a. the corm-bud epidermis of the control, b. the corm epidermis of the control, c. the corm-bud epidermis by vertical incidence neutrons to 100Gy, d. the corm-bud epidermis by vertical incidence neutrons to 500Gy, e. the corm epidermis by side incidence neutrons to 100Gy, f. the corm epidermis by side incidence neutrons to 500Gy, g. the corm epidermis by vertical incidence neutrons to 100Gy, h. the corm epidermis by vertical incidence neutrons to 500Gy

100Gy 正面照射样品的电镜照片中,可观察到孔洞和沟槽分布极不均匀,表面刻蚀程度也明显不一致,并出现了很大的裂沟(见图 1g),可以推测中子对生物材料表面的刻蚀过程并不均匀,在较小剂量的情况下就已可能在局部造成较大损伤。

由此可见,中子入射角度的不同会造成球茎的损伤程度不同,受正面照射的损伤最严重,而侧向照射的损伤相对较小。为更有效地进行生物体诱变,在选择合适照射剂量的同时,应尽量使照射方向正对生长点等生长发育的核心部位,同时可对其他部位进行保护,尽量减少其他部位的生理损伤,进而保证较高存活率下变异株数的增加。

2.2 中子照射对生长的影响

田间种植一个月后,对照平均株高为 28.6cm,出根数为 42; 100Gy 平均株高为 2.5cm,出根数仅为 1; 300Gy 株高均值小于 0.5cm,且纤细黄褐色不正常,无生根现象; 500Gy 无出芽与出根现象。从生长情况可以发现,中子照射剂量对唐菖蒲球茎生长有明显的抑制作用,且随着剂量的增加,抑制作用愈加强烈。

2.3 中子照射对蛋白表达情况的影响

随着剂量的增加,原有谱带染色强度逐渐减弱,且不同蛋白亚基对射线的敏感程度不同,相对低剂量照射压迫时,40.4kDa 和 26.2kDa 等较低分子量的蛋白亚基谱带消失(见图 2 箭头所示),随着剂

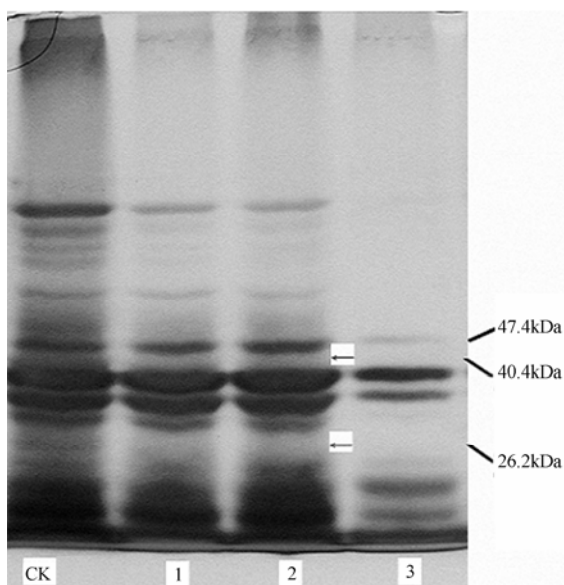


Fig.2 SDS-PAGE patterns of protein subunit in the corm of gladiolus irradiated by neutrons to 1. 100Gy, 2. 300Gy and 3. 500Gy, respectively, and the control (CK)

量的增加,47.4kDa 以上的较高分子量的蛋白表达也都受到抑制而不再表达(见图 2)。可见,低分子量亚基对中子照射较高分子量亚基更为敏感,发生变异的可能性较大。从蛋白的表达情况可知,中子对唐菖蒲的蛋白谱带的改变是有作用的,特别是对小分子量亚基的诱变效果较好。

3 讨论

从本实验可以推断,中子对生物体表面照射时,中子的能量和质量共同作用于被照射部位,由于生物体是热的不良导体,可能导致生物体表面的溅射和刻蚀作用,造成细胞的破裂。照射剂量大,则细胞损伤程度不断加深,继而形成裂缝。受照射球茎表面的 SEM 观察中,能发现大量不规则碎片的情况不多。可能原因是,对以脂类和蛋白质等生物大分子为主要组成的角质层进行中子照射时,由于中子的体积和质量较小,不足以造成大量碎片的飞溅,只是弥散分布在生物体表面。由此可见,中子对生物体的作用方式不同于离子注入等电离辐射。

快中子是间接电离粒子,又属于 LET 照射,快中子在组织内能量损失,主要通过和氢原子核等的弹性碰撞而产生的反冲质子,使组织中的原子激发和电离,引起生物分子中化学键的断裂。中子同生物体相互作用的过程极为复杂,关于照射损伤,特别是中子对植株的损伤特点和机理并未完全阐明。中子对生物体的诱变作用的可能方式,是持续不断的中子作用于某一局部而形成瞬间通道,而后续中子直接作用而损伤 DNA 的结果。另一可能方式是中子与生物材料作用使原子激发和电离,产生其他射线作用于遗传物质。还可能是中子照射产生的自由基对 DNA 分子损伤的结果。这些损伤特点和诱变机理有待进一步研究,随着分子生物学、细胞生物学的不断发展和渗透,应进一步开展中子照射损伤特点和诱变机理的研究,以及中子照射诱变育种的应用。

诱变引起的 DNA 损伤和修复会使细胞在代谢和遗传等方面发生变化,这种变化可反映于蛋白质表达^[10]。中子对生物体组织的初级生物效应,表现为刺激效应和损伤效应。本实验侧重考察中子的损伤作用,所用剂量较高,故损伤作用大于刺激作用。本实验表明,中子照射是唐菖蒲遗传改良的有效方法。如用 ^{252}Cf 中子 γ 射线混合照射,则可如下考虑中子照射的剂量,该 γ 射线照射的 RBE 值为 84 ± 9 , ^{252}Cf 裂变中子的 RBE 值为 124 ± 13 ^[7],结合本试验结果,我们建议用于唐菖蒲“超级”球茎的

中子适宜剂量应低于 100Gy。

球茎表面损伤情况及蛋白表达情况表明, 球茎表面刻蚀程度加大, 蛋白表达受遏制情况愈加严重。可见对生物材料表面的刻蚀程度的观察, 可在一定程度上推测中子照射对植物的损伤程度, 预测其对遗传物质的损伤水平。

在中子诱变育种实验中, 研究中子对植物细胞产生的损伤现象, 对探讨诱变机理、提高中子照射诱变效率很有益处。观察研究了不同剂量和不同入射角度对唐菖蒲球茎表面的损伤情况, 以及球茎蛋白的表达情况, 也讨论了中子照射对生物材料作用的损伤机理和诱变机理, 为中子照射诱变效率的增强提供了实验基础。

参考文献

- 1 王丹, 任少雄, 苏军, 等. 核农学报, 2004, **18**(6): 443-447
WANG Dan, REN Shaoxiong, SU Jun, *et al.* Acta Agric Nucl Sin, 2004, **18**(6): 443-447
- 2 陈恒雷, 吕杰, 曾宪贤. 生物技术通报, 2005, **21**(2): 10-13
CHEN Henglei, LU Jie, ZENG Xianxian. Biotechnol Bull, 2005, **21**(2): 10-13
- 3 宋云, 张怀渝, 畅志坚. 分子植物育种, 2004, **2**(2): 301-305
SONG Yun, ZHANG Huaiyu, CHANG Zhijian. Mol Plant Breed, 2004, **2**(2): 301-305
- 4 Mehadjiev A, Kosturkova G, Mihov M. Israel J Plant Sci, 2001, **49**(4): 279-284
- 5 Kharkwal M C. Indian J Genet Plant Breed, 1998, **58**(4): 465-474
- 6 张圣君. 上海大学学报(自然科学版), 1999, **5**(5): 388-392
ZHANG Shengjun. Journal of Shanghai University (Natural Science), 1999, **5**(5): 388-392
- 7 张文艺, 焦玲, 星正治. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(1): 15-18
ZHANG Wenyi, JIAO Ling, Hoshi M. J Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(1): 15-18
- 8 郑春, 吴建华, 李建胜. 核动力工程, 2004, **25**(1): 93-96
ZHENG Chen, WU Jianhua, LI Jiansheng. Nucl Power Eng, 2004, **25**(1): 93-96
- 9 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 第二版. 北京: 科学出版社, 2005. 92-110
GUO Yaojun. Electrophoresis experiment technique in protein. Second edition. Beijing: Science Press, 2005. 92-110
- 10 李兴林, 卫增泉, 王晓娟, 等. 激光生物学报, 2000, **9**(4): 276-280
LI Xinglin, WEI Zengquan, WANG Xiaojuan, *et al.* Acta Laser Biol Sinica, 2000, **9**(4): 276-280

Damages to gladiolu corm caused by fast neutron irradiation

ZHANG Zhiwei¹ WANG Dan¹ ZHANG Dongxue¹ ZHENG Chun²

¹ (Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000)

² (Nuclear Physics and Chemicals Institute, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621000)

ABSTRACT Gladiolus corms were irradiated to 100—500kGy by fast neutrons in the CFBR-II pulsed reactor, Scanning electron microscope images of the irradiated samples revealed significant radiation damages to the gladiolus corms, and the mutagenic effects were studied by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Within the dose range, radiation damage to the corm increased with the dose, with corm epidermis of the samples irradiated in vertical incidence being more serious than those irradiated in side-incidence to the same dose. Biological characters were investigated via field experiments, and the bands of protein subunit were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the fast neutrons irradiation inhibited growth of M1 generation seedling significantly. Protein expression was obviously inhibited by the irradiation. The study indicates that fast neutron induction is an effective way for gladiolus breeding. And the results may lay a foundation for studies on fast neutron mutation breeding.

KEYWORDS Neutron irradiation, Gladiolus, Scanning electron microscope, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

CLC S603.6, S63.01, Q319, Q691.6