

电子束辐照唐菖蒲球茎对 M1 代花粉的影响初探

张志伟¹ 王丹¹ 张冬雪¹ 袁向辉²

¹ (西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621000)

² (西北大学生命科学学院 西安 710069)

摘要 为了探讨电子束对唐菖蒲诱变育种的可行性和不同剂量的电子束对花粉性状的影响,用能量为 3MeV 的不同剂量电子束辐照唐菖蒲“超级”球茎,对其 M1 代的花粉进行了研究。花粉活力的检测表明电子束辐照处理后的 M1 代花粉活力比对照略有下降,但小剂量辐照对花粉活力的影响并不明显,随着剂量的增加,辐照对花粉活力的抑制作用逐渐达到显著水平;扫描电镜观察发现,随着辐照剂量的增大,M1 代花粉的孢粉学特征与对照差异逐渐明显,并且出现了多种变异形式;通过对 M1 代花粉酯酶同工酶的分析。结果表明,酯酶同工酶与对照相比发生了明显的变化,其中剂量在 120Gy 以下的酶带与对照相同,但酶活性较对照变弱,剂量为 160Gy 和 200Gy 时出现了一条新的酶带并且有两条酶带消失,剂量为 240Gy 时酶谱出现了一条特异酶带同时有一条酶带消失,并且剂量大于 160Gy 的酶活性与对照以及其他剂量相比也略有不同。由此表明,电子束辐照对植株能产生明显的影响,通过对花粉的一系列分析,能够较好地反映辐照对植株的诱变情况。

关键词 电子束,唐菖蒲,花粉活力,扫描电镜,花粉形态,酯酶同工酶

中图分类号 S603.6, S63.01, Q319, Q691.6

诱变育种技术已在观赏植物上得到了很好应用,取得了显著成效。据 FAO/IAEA^[1]2000 年不完全统计,世界各国已在 22 种观赏植物上育成 511 个品种。中国起步较晚,诱变源仍以 ⁶⁰Co γ 射线为主^[2],国内近年来有关离子束的报道也较多^[3,4],而电子束对植物进行辐射育种的研究较少,特别是在观赏植物中鲜见报道^[5-7];至于诱变后代花粉与对照的比较与分析也少见报道^[8]。本试验拟用电子束辐照唐菖蒲球茎,对不同剂量辐照球茎后 M1 代花粉活力进行测定,利用扫描电镜观察 M1 代花粉畸变情况,并对花粉进行酯酶同工酶的分析,为电子束诱变源的有效利用及诱变机理的进一步研究提供依据。

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 辐照处理在中国工程物理研究院

久远辐射中心完成。以机器电压为 3MeV 的 EPS 电子加速器对材料进行电子束辐照处理,剂量率为 40Gy/10s,辐照剂量分别为 40、80、120、160、200 和 240Gy。每剂量设 3 次重复,每次重复照射 20 个唐菖蒲球茎;对照样品为未照射(0Gy)。

1.2.2 栽培 唐菖蒲球茎种植于西南科技大学农业设施实验室,种植用土为菜园土,另加 5%珍珠岩、1%过磷酸钙和 5%复合肥混合而成,水肥管理一致,至盛花期采摘花粉取样。

1.2.3 唐菖蒲花粉活力测定 采用 I-KI 染色法、TTC(2,3,5 氯代三苯基四氮唑)染色法和发芽法(琼脂 1%或无,蔗糖 15%或 10%,硼酸 0.05%,PH5.8)分别测定各处理的花粉活力^[9],显微镜观察,每次 3 个视野,每个视野统计不少于 70 个花粉粒,3 次重复。统计花粉总数及具有活力花粉数,计算各平均值,用邓肯氏新复极差法分析不同处理花粉活力与对照差异的显著水平,并确定测定花粉活力的最佳方法。

1.2.4 电镜观察 电镜观察在西南科技大学电镜室完成,电镜型号为 stereoscan S440 立体扫描电子显

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 2007-03-12,修回 2007-05-22

显微镜,规格为 30kV,分辨率为 10nm±,由 Leica Cambridge LTD 生产。

将新鲜的花粉收集在培养皿内,置于干燥器中过夜。在解剖镜下将花药均匀涂抹在铜台上的双面胶表面,送入真空镀膜机中喷金,然后直接在电镜下观察、拍照并记录。

1.2.5 酯酶同工酶电泳 取种植于田间各辐照处理及对照未开放花朵中的花药,取样前,先观察花粉母细胞减数分裂,确定花粉发育时期与花蕾长度的关系,以保证取样花粉发育时期的一致性。聚丙烯酰胺垂直板电泳,浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 6.6%。电泳采用稳压方式,电泳后胶板采用常规酯酶染色法染色^[10],后经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照分析。

2 试验结果与分析

2.1 辐照对花粉活力的影响

采用 I-KI 染色法、TTC 染色法和发芽法测定花粉活力见表 1。3 种方法均测得花粉活力随辐照剂量的增加而降低。但 I-KI 和 TTC 染色法的结果偏高,且随剂量增加下降的幅度较小;而发芽法的测定结果随剂量的增加下降明显,所得花粉活力数值更接近实际值,表明用发芽法较好,而发芽法中,不同蔗糖浓度的 4 种固体或液体培养基中,以 10%蔗糖浓度的固体琼脂培养基的发芽率较高,是 4 种培养基中较佳的培养基。对各方法所得数值分别进行方差分析,结果显示除 I-KI 方法外,其他方法在高剂量(200Gy 或 240Gy)时花粉活力均达到显著水平,说明高剂量电子束辐照对花粉活力具有明显的抑制作用(见表 1)。

Table 1 The effect of electron beam on vitality of pollen in gladiolus

Dose /Gy	Percentage of pollen germination /%		Percentage of pollen dyeing /%			
	I-KI Dyeing	TTC Dyeing	Germination in liquid medium		Germination in agar medium	
			10% sucrose	15% sucrose	10% sucrose	15% sucrose
0(CK)	81.7a	79.0a	32.2a	33.8a	44.7a	37.2a
40Gy	80.5a	77.8ab	31.5a	32.7ab	44.2a	37.2a
80Gy	78.5a	76.3abc	32.0a	31.2abc	42.3ab	37.2a
120Gy	74.3a	77.2ab	28.5ab	31.3abc	38.3bc	34.3ab
160Gy	77.0a	69.3bc	30.7a	30.2abc	34.2c	36.7a
200Gy	73.7a	68.0c	28.2ab	28.0bc	33.5c	30.3b
240Gy	74.5a	68.2c	25.7b	27.2c	34.7c	31.0b

Note: Significance of difference via Duncan Analyse, same small letter in the column means no significant ($P=0.05$)

2.2 电镜观察

从图 1-a, 1-c, 1-e 可以看出,对照组花粉多为近椭圆形,大小相差不大,外壁纹饰均为刺状及圆球状突起,圆球突起基部膨大,端部纯圆,偶见两突起相连,外壁表面光滑,未见孔穴,内壁纹饰也为刺状及圆球状突起,但较外壁少且突起较小。

辐照组在花粉形态上既保留了对照组的多数特征,但也出现了一定的异常,辐照后近椭圆形花粉所占比例减小,花粉形状较为复杂多样,且大小悬殊(图 1-b);外壁圆球突起较对照稀疏,较大不规则,偶见两突起相连。80 与 240Gy 剂量的花粉也存在较大差异,80Gy 剂量的花粉外壁表面光滑,与对照相近(图 1-f),而 240Gy 剂量的花粉外壁表面粗糙,多孔(图 1-g);花粉内壁纹饰变为圆球状突起,较对照大而密,突起间距缩短(图 1-d)。高剂量(200Gy 或 240Gy)辐照后部分植株的花粉发生了较大的异

常变化,如有些花粉内外壁纹饰近乎消失,沟宽明显减小,近椭圆形,极轴赤道比增大(图 1-h);另有近圆形盾状花粉出现(图 1-i)。由此可见,受辐照影响致使植株花粉出现多种畸变现象,特别是高剂量辐照的植株,与对照组花粉的外壁纹饰相比存在较大差异。

2.3 酯酶同工酶分析

从图 2 可以看出,对照花粉有 7 条明显的酯酶同工酶酶带,相对迁移率(R_f 值)分别为 0.01、0.04、0.08、0.22、0.32、0.37 和 0.46。不同辐照剂量下唐菖蒲花粉酯酶电泳图谱有明显变化,剂量较小时(40~120Gy),分子量相对较小(R_f 值大于 0.22)的酯酶同工酶酶带颜色较对照明显变浅,说明较小辐照剂量植株的酶活性较对照的酶活性减弱,但同工酶酶带条带数并无变化,而 R_f 值为 0.01、0.04 和

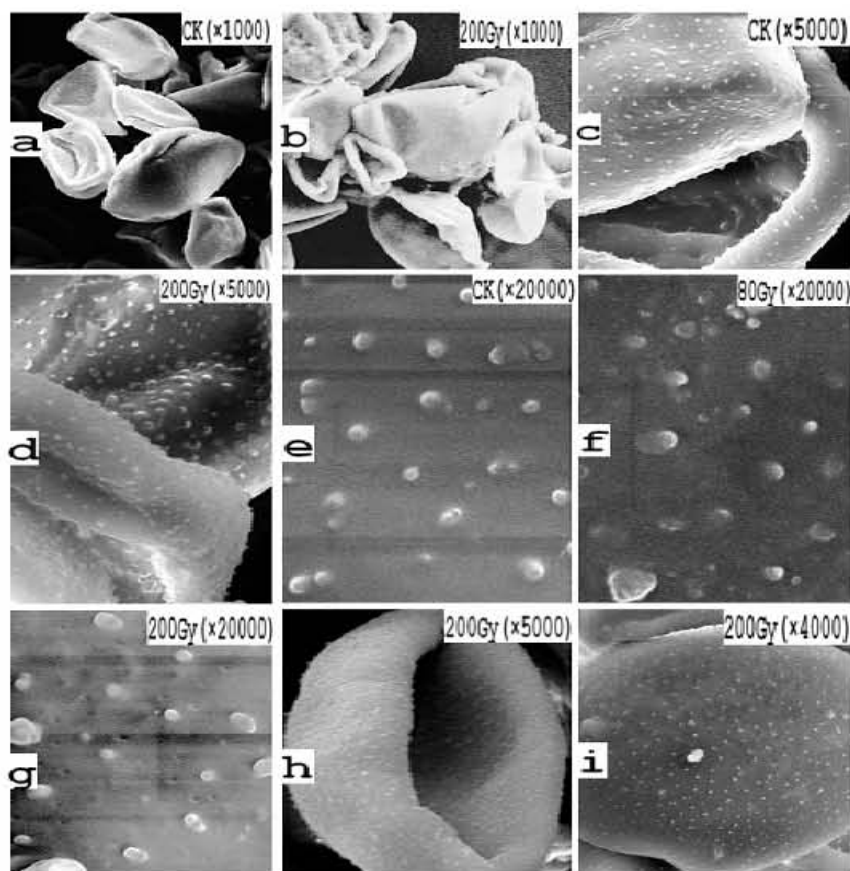


Fig.1 SEM photograph of exine of M1 generation

a. SEM observation on the pollen shapes of control ($\times 1000$); b. SEM observation on the pollen shapes of incidence at the treatment of 200Gy ($\times 1000$); c. SEM observation on the pollen shapes of control ($\times 5000$); d. SEM observation on the pollen shapes of incidence at the treatment of 200Gy ($\times 5000$); e. SEM observation on the pollen surface of control ($\times 20000$); f. SEM observation on the pollen surface of incidence at the treatment of 80Gy ($\times 20000$); g. SEM observation on the pollen surface of incidence at the treatment of 200Gy ($\times 20000$); h. SEM observation on an aberrant pollen ($\times 5000$); i. SEM observation on another aberrant pollen ($\times 4000$)

0.08 的同工酶酶带无显著变化; 随着辐照强度的增大, 在 160 和 200Gy 时, R_f 值为 0.01、0.04 和 0.08 的同工酶酶带强度变弱, R_f 值为 0.22 和 0.46 的同工酶酶带消失, 而 R_f 值为 0.32 和 0.37 的同工酶酶带强度明显增强, 并且在 R_f 值为 0.40 处出现了一条新的同工酶酶带; 当剂量达到 240Gy 时, R_f 值为 0.01、0.04 和 0.08 的同工酶酶带强度变得更弱, 说明此 3 处酶活性明显变弱, R_f 值为 0.22 和 0.46 的酶带重新出现, R_f 值为 0.37 的同工酶酶带消失, 在 R_f 值为 0.30 处又出现了一条新的同工酶酶带。从同工酶电泳结果可以看出, 较低剂量 (40–120Gy) 处理只改变唐菖蒲酯酶同工酶含量及活性, 并不改变同工酶谱带, 而当剂量大于 160Gy 时, 随着剂量的增大, 对唐菖蒲酯酶酶谱能产生明显改变。

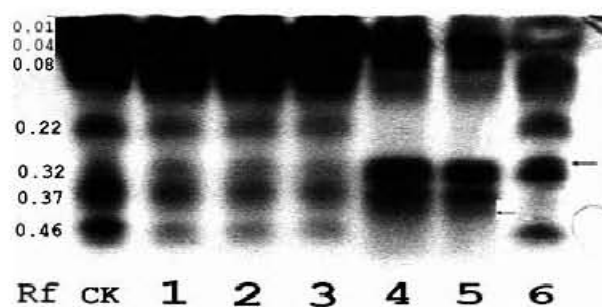


Fig.2 Esterase isozyme patterns in the pollen of gladiolus irradiated by electron beams
1: 40Gy; 2: 80Gy; 3: 120Gy; 4: 160Gy; 5: 200Gy; 6: 240Gy; CK: Control

3 讨论

核技术辐射诱变育种的目标是既有较高的变异率和较宽的变异谱, 又能保证较高存活率。为了得到适宜辐照的剂量, 人们常常采用 LD_{50} (使 50%植

株死亡的剂量)、 VID_{50} (使活力指数下降 50%的剂量)、 SHD_{50} (使幼苗高度降低 50%的剂量)和 PHD_{50} (使株高降低 50%的剂量)等方法,其中以 LD_{50} 最为常用。但诱变育种的选育工作是一个相对漫长的过程,而花粉的遗传物质将完全传给下一代植株,花粉活力的统计结果,可以反映辐照对植株直至花期的损伤与变异情况。花粉活力的测定方法,本试验结果表明,应用发芽法较 I-KI 和 TTC 染色法更可靠,结果更接近实际,在发芽法中,采用 10%蔗糖浓度的固体琼脂培养基较其他处理更适宜。

花粉形态与花色、花期、花型等遗传性状具有相关性^[8,11]。花粉的形态特征主要由基因型控制,具有一定的保守性^[12],不易受环境的影响。正是由于花粉形态固有的保守性特点,通过对花粉的观察,可以较准确地了解植株变化情况。从本试验中花粉形态的电镜观察结果表明,电子束辐照随剂量的增加致使植物损伤变异程度增大,进而影响植物性状的改变。综合考虑酯酶同工酶电泳图谱及花粉的电镜观察结果,可以看出在辐照剂量为 160Gy 开始出现明显变化,这与形态学变异相吻合,考虑在获得变异的情况下尽量减小对植株的损伤,初步推断唐菖蒲“超级”电子束诱变处理的适宜辐照剂量为 160Gy。

由于辐射对植株染色体序列的诱变同样具有随机性,使得植株的损伤及变异成为一个随基因的程序性表达而逐渐表现的过程,而 M1 代花粉是承接 M1 和 M2 的桥梁,通过对 M1 代花粉研究,可以提早了解后代的变异趋势,特别是对于 M1 代未表现变异的植株的后代变异情况进行提早把握。

参考文献

- 1 Maluszynski M, Nichterlein K, VanZanter L, *et al.* Officially released mutant varieties-the FAO/IAEA database. Mutation Breeding Review, 2000, (12)
- 2 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 Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(6): 443-447
- 3 陈恒雷,吕杰,曾宪贤.生物技术通报,2005,2: 10-13
CHEN Henglei, LÜ Jie, ZENG Xianxian. Biotechnology Bulletin, 2005, 2:10-13
- 4 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. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(2): 301-305
- 5 Tanabe K, Dohino T. Research Bulletin of the Plant Protection Service, 1993, 29: 1-9
- 6 林祖军,孙纪霞,连惠惠.核农学报,2002,16(6): 351-354
LIN Zujun, SUN Jixia, ZE Fuhui. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2002, 16(6): 351-354
- 7 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
- 8 傅玉兰.北京林业大学学报,1998,20(2): 110-113
FU Yulan. Journal of Beijing Forestry University, 1998, 20(2): 110-113
- 9 王玖瑞.枣树雄性不育和胚败育研究.保定:河北农业大学,2004.5-8
WANG Jiurui. Studies on Male Sterility and Embryo Abortion of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill.). Agricultural University of Hebei, Baodin, 2004. 5-8
- 10 中国科学院上海植物生理所,上海市植物生理学会.现代植物生理学实验指南.北京:科学出版社,1999. 263-266
Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy Science, Shanghai Society for Plant Physiology. Guide to advanced experiment in plant physiology. Beijing: Chinese Science Press, 1999. 263-266
- 11 陈智忠.林业科技通讯,1999,3: 33-34
CHEN Zhizhong. Forest Science and Technology, 1999, 3: 33-34
- 12 张志伟,王丹,张冬雪.亚热带农业研究,2006,2(4): 251-257
ZHANG Zhiwei, WANG Dan, ZHANG Dongxue. Subtropical Agriculture Research, 2006, 2(4): 251-257

The change of pollen traits in gladiolus irradiated by electron beam

ZHANG Zhiwei¹ WANG Dan¹ ZHANG Dongxue¹ YUAN Xianghui²

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

² (School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069)

ABSTRACT In order to investigate the feasibility of electron beam induced mutation on Gladiolus and the effects of electron beam with different doses on pollen traits, M1 generation pollen traits were studied by use of 3MeV electron beams with seven doses of 0Gy, 40Gy, 80Gy, 120Gy, 160Gy, 200Gy, 240Gy. It has been shown that the sterile pollen rate of M1 generation is higher than that of control. At low dose there had no obvious effects on the viability and germination rate of M1 generation pollen. With the increase of irradiation dose, the viability and germination rate of pollen was decreased and the difference had statistical significance ($P<0.05$). Comparing (SEM) photograph of the pollen shapes of M1 generation with control, within a certain doses level, mutagenic effects on pollen increased with the dose increasing in the angle of polynology. Variations of mutagenic effect extent were found at the different irradiation dosage. The EST isozymes expression of M1 generation pollen was obviously changed by electron beam irradiation confirmed by use of PAGE electrophoresis. EST patterns of pollen of Gladiolus irradiated at the dose no more than 120Gy were similar to CK, but there were some differences in the vigor of isozymes. The EST bands added or absent had been observed at the dose more than 160Gy compared to CK. There were a special EST band more and 2 EST bands less in plants treated by both 160Gy and 200Gy electron beam irradiation, and a special EST band more and 1 EST bands less in plants treated by 240Gy electron beam irradiation. The vigor of isozymes of plants treated at the dose more than 160Gy showed some respective differences compared to the other treated and CK's. These results revealed that electron beam irradiation is an effective way for Gladiolus breeding.

KEYWORDS Electron beam, Gladiolus, Pollen vigor, SEM, Pollen shape, EST isozyme

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