

咖啡因和 EDTA 后处理对不同辐射敏感性作物核酸代谢的影响

宋道军

(中国科学院等离子体物理研究所生物工程中心 合肥 230031)

徐登益 万兆良 何首林

(西南农业大学中心实验室 重庆 630716)

摘要 研究了辐射损伤修复抑制剂咖啡因和 EDTA (乙二胺四乙酸二钠盐) 后处理对不同辐射敏感性作物大豆和油菜的核酸代谢的影响。结果表明, 随着辐射剂量的增大, 辐射敏感的大豆和耐辐射的油菜 7d 龄幼苗下胚轴内 DNA 和 RNA 的含量有所增加, 咖啡因和 EDTA 后处理又进一步提高了两种作物核酸的含量; 大豆幼苗内 DNA、RNA 的含量均高于油菜。放射性³H-TdR (³H-胸腺嘧啶核苷) 掺入试验证明, 种子辐照后的浸种 24h 内有非按期的 DNA 合成, 且油菜的非按期 DNA 合成能力强于大豆, 咖啡因和 EDTA 及复合后处理不同程度的抑制了 DNA 的非按期合成, 其抑制程度为 C+E (咖啡因+乙二胺四乙酸二钠盐) > Caf (咖啡因) > EDTA, 试验还证实了辐射与咖啡因和 EDTA 后处理抑制了正常的 DNA 合成, 延迟细胞分裂周期, 且辐照剂量越大, 抑制和延迟作用越强。

关键词 辐射损伤修复抑制剂, 作物, 辐射敏感性, DNA 合成, 咖啡因, EDTA

自前人发现咖啡因、EDTA 能有效抑制损伤 DNA 的修复、提高突变频率和扩大突变谱以来, 修复抑制剂在诱变育种中的应用研究得到迅速发展。Yamaguchi^[1]报道, 辐照后用 EDTA 处理能提高大麦叶绿素和矮秆的突变率; 赵孔南^[2]报道用 EDTA 处理辐照后的水稻, M₁ 代损伤加重, M₂ 代叶绿素缺失突变、抽穗期及株高的突变率都提高了; 高明尉^[3]用液氮、辐照咖啡因复合处理水稻种子, 加剧了二叶期秧苗的生理损伤; 李国全^[4]用辐照与咖啡因复合处理风干的大豆种子, 增大了 M₁ 代幼苗叶绿素的缺失率和根尖细胞染色体的畸变率, 等等。上述诸研究从形态上、遗传上对咖啡因、EDTA 的影响作了探讨, 本工作对咖啡因、EDTA 及其复合处理在生化与分子水平上对遗传物质核酸代谢的作用进行研究, 并对不同科属不同辐射敏感性作物的影响作比较。

1 材料与 方法

1.1 材料

风干饱满的大豆种子 (西豆 3 号, 含水量 13%), 十字花科作物油菜种子 (西油 B-2, 6-I, 含水量 11%)。

1.2 辐照处理

西南农业大学⁶⁰Co γ 装置辐照, 剂量为 0~1400 Gy, 辐照温度 27℃, 相对湿度 83%,

收稿日期: 初稿 1996-09-24, 修回 1996-12-02

种子距辐照源 60 cm。

1.3 咖啡因和 EDTA 浸种处理

辐照后的种子立即用下列溶液浸种 5h: H₂O (对照); 5m mol/L 咖啡因 (Caf); 1m mol/L EDTA; 及 Caf 和 EDTA 的等比例混合液 (简略记为 C+E, 下同)。

1.4 发芽试验与幼苗培养

浸种后立即用自来水将种子冲洗干净, 播于垫有湿润草纸的培养皿上, 每皿大豆 60 粒、油菜种子 200 粒, 置于 28℃ 恒温培养箱 (美国贝克曼公司生产人工气候全自动模拟培养箱) 中培养 7d, 各组均 3 次重复。

1.5 测试方法

1.5.1 放射性³H-TdR 示踪标记 取各 50mg 辐射后两作物种子, 按 1.3 方法于 25℃ 培养箱中分别用 H₂O、Caf、EDTA 和 (C+E) 浸种培养 2~24h, 取出后再浸于³H-TdR 液 (浓度为 1.85×10⁵Bq) 中继续培养 2h, 取出后用蒸馏水冲洗 3 次, 100℃ 下烘干并转入 10ml 试管中。

1.5.2 材料的消化与液闪测定 分别向上述试管中加入各 6 滴高氯酸和过氧化氢, 于 100℃ 烘箱中消化, 待材料全部消化完, 将消化液转入闪烁杯中, 用无水乙醇洗 2 次, 再加入闪烁液振荡, 使溶液呈无色透明状, 用 Backman LS-9800 闪烁计数器测放射性活度, 以 cpm 数表示 DNA 中³H-TdR 的掺入量, 绘图表示³H-TdR 的掺入量和 DNA 合成的变化规律。

1.5.3 水解 DNA、RNA 测定 取 7d 龄两种作物幼苗下胚轴作试材, 按周顺伍^[5]等方法进行。

2 结果与分析

2.1 Caf 和 EDTA 后处理对两作物幼苗 DNA 含量的影响

测试表明 DNA 含量变化有如下规律 (见图 1、2): (1) 7d 龄大豆和油菜幼苗下胚轴中 DNA 含量均是随辐照剂量增大而增大, 且大豆的增幅高于油菜; (2) Caf、EDTA 后处理, 与水处理对照相比, 进一步提高了各剂量下 DNA 含量; (3) 7d 龄大豆下胚轴中 DNA 含量比相应各处理中油菜的高。作物的辐射敏感性与遗传物质 DNA 含量成正相关, DNA 含量越高辐射的敏感性就越高^[6], 但本试验发现辐射及修复抑制后处理使不同敏感性作物 DNA 含量增大, 其原因尚待研究。

2.2 Caf 和 EDTA 后处理对大豆和油菜幼苗 RNA 含量的影响

由图 3、4 可知, Caf 和 EDTA 后处理对 7d 龄两作物幼苗下胚轴中 RNA 含量有如下影响: (1) 各处理 RNA 的含量亦随辐照剂量增大而增大; (2) 各处理 RNA 含量均高于对应测量的 DNA 含量, 大豆的亦高于油菜, 这与韩贻仁^[7]和龙运森^[8]等的报道相一致; (3) Caf 和 EDTA 后处理对两种作物 RNA 含量影响不一, 但均未有对 DNA 影响显著。

已证明 Caf 能与断裂 DNA 的 3'-OH 结合, 是暗修复抑制剂, 它能优先堵塞无误的切补修复; EDTA 则可抑制 DNA 的修复合成^[1,9], 因而两者直接影响着 DNA 的损伤修复与含量的变化, 而对 RNA 的影响可能是间接的, 因而影响较小。辐射与 Caf 和 EDTA 后处理对 RNA 的影响是否在转录水平上, 以及对三种 RNA (即 mRNA、rRNA、tRNA) 何者影响更大, 有待今后进一步探讨。

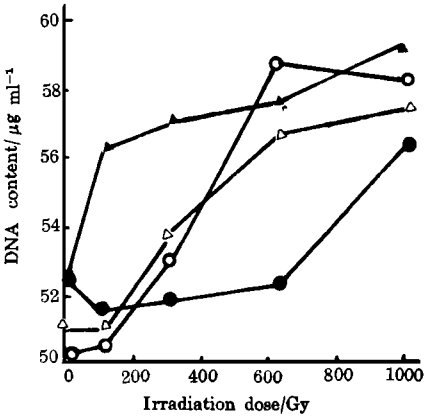


Fig. 1 The effect of Caf and EDTA post-treatment on the content of DNA in the hypocotyl of 7days soybean seedling (•) H₂O (°) Caf (△) EDTA (▲) C+E

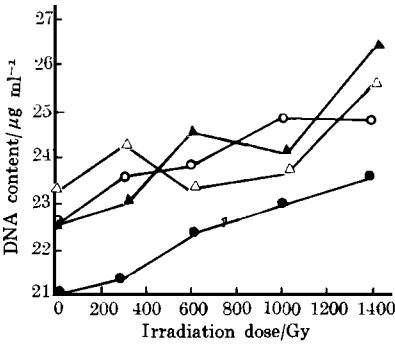


Fig. 2 The effect of Caf and EDTA post-treatment on the content of DNA in the hypocotyl of rape (•) H₂O (°) Caf (△) EDTA (▲) C+E

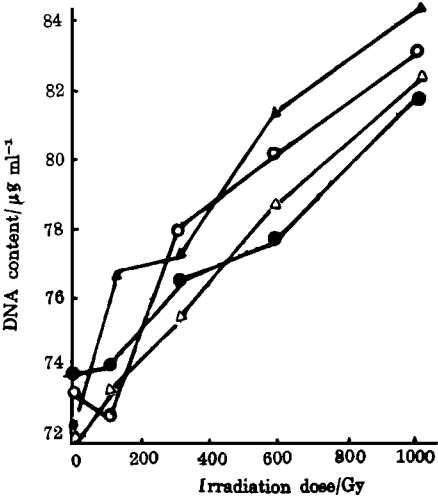


Fig. 3 The effect of Caf and EDTA post-treatment on the content of RNA in the hypocotyl of soybean (•) H₂O (°) Caf (△) EDTA (▲) C+E

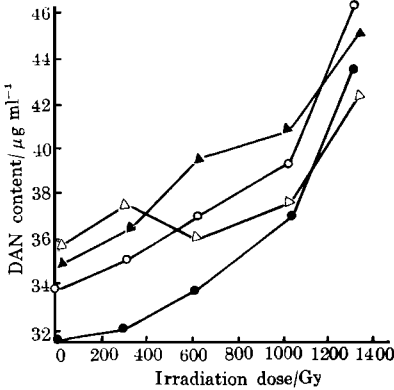


Fig. 4 The effect of Caf and EDTA post-treatment on the content of RNA in the hypocotyl of rape (•) H₂O (°) Caf (△) EDTA (▲) C+E

2.3 Caf 和 EDTA 后处理对大豆和油菜种子 DNA 合成的影响

由图 5~8 可知, (1) 浸种培养的初期, ³H-TdR 的掺入量较少, 随着时间的延长³H-TdR 的掺入量迅速增大, 并达到峰值, ³H-TdR 掺入量的剧增, 意味着 DNA 进入合成期。而与对照 (未辐照) 水处理相比, 在合成期前, 各处理³H-TdR 的掺入量均高于对照, 这说明 DNA 在未进入合成期之前, 存在着有 DNA 聚合酶、修复酶等参与的非按期 DNA 修复合成。(2) 大豆与油菜相比, 在后者剂量 (600Gy) 大于前者 (100Gy) 的情形下, 后者的最大非按期 DNA 修复合成率 (145.7%) 仍大于前者 (130.2%), 这说明油菜 DNA 的损伤修复能力比大豆强, 这可能是十字花科作物油菜比豆科作物大豆抗辐射的重要原因。(3) 辐射不仅造成了 DNA 损伤, 而且还抑制了 DNA 的正常合成, 且剂量越大抑制作用越强; 而 Caf 和 EDTA 后处理不仅抑制了非按期的 DNA 合成, 也影响了 DNA 的正常复制合成, 其对两者的抑制程度为 C+E>Caf>EDTA。(4) 辐照延迟了两种作物 DNA 的合成周期 (即细胞分裂周

期), 辐照剂量越大, 延迟的时间越长, 而 Caf 和 EDTA 后处理又加大了这种延迟作用。

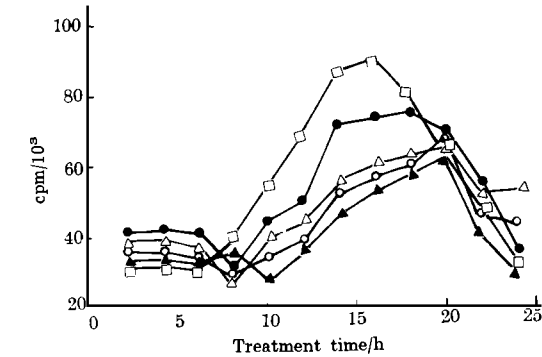


Fig. 5 The effect of 100·Gy lower-dose irradiation and treatments on the DNA synthesis of soybean seeds
(□) H₂O (●) H₂O + γ (○) Caf + γ (△) EDTA + γ (▲) C+E+γ 50 mg seed

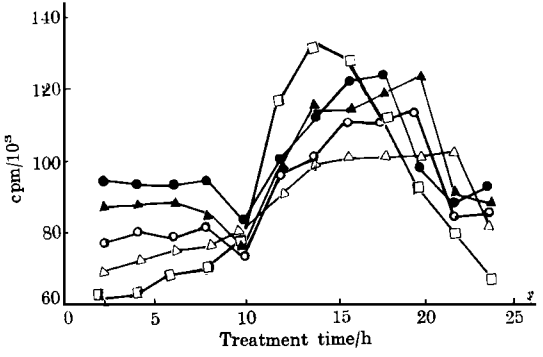


Fig. 6 The effect of 600·Gy lower-dose irradiation and treatments on the DNA synthesis of rape seeds
(□) H₂O (●) H₂O + γ (○) Caf + γ (△) EDTA + γ (▲) C+E+γ 50 mg seed

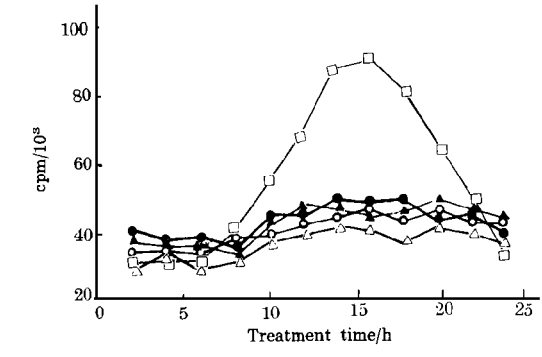


Fig. 7 The effect of 1000 Gy higher-dose irradiation and treatments on the DNA synthesis of soybean seeds
(□) H₂O (●) H₂O + γ (○) Caf + γ (△) EDTA + γ (▲) C+E+γ 50 mg seed

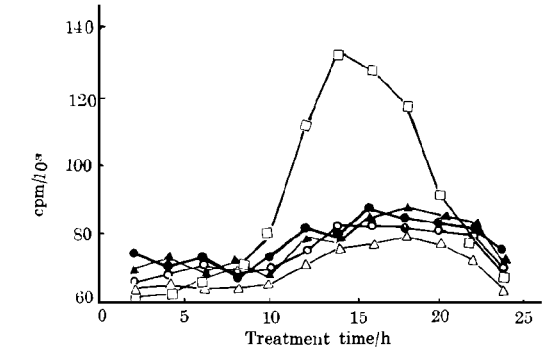


Fig. 8 The effect of 1400·Gy higher-dose irradiation and treatments on the DNA synthesis of rape seeds
(□) H₂O (●) H₂O + γ (○) Caf + γ (△) EDTA + γ (▲) C+E+γ 50 mg seed

3 讨论

3.1 Caf 和 EDTA 后处理与作物 DNA 损伤修复的关系

用两种辐射敏感性差异较大的作物作试材, 用 Caf 和 EDTA 进行辐射后处理, 发现辐照后的种子内存在着非按期的 DNA 修复合成, 且辐射敏感的大豆 DNA 的修复能力弱于抗辐射的油菜, 证实了作物辐射敏感性与其损伤修复能力密切相关^[10]。

3.2 Caf 和 EDTA 后处理与不同作物辐照敏感性的关系

辐射及 Caf 和 EDTA 后处理除导致两种作物核酸含量增大外, 还测得大豆的 DNA、RNA 含量高于油菜。DNA 这一重要的遗传物质被视为射线作用的“靶子”^[9], DNA 含量越多被射线“击中”的几率就越大, 损伤也就越严重。这一理论也说明了豆科作物大豆较十字

花科作物的油菜对辐射更敏感的原因。

3.3 Caf 和 EDTA 后处理对作物 RNA 的影响

辐射及 Caf 和 EDTA 后处理对 RNA 的影响, Inoue 等^[11]认为辐射破坏了组蛋白的结构, 使 DNA 脱离成为有活力的 DNA, 从而能进行转录, 使 RNA 含量增大。另外, 断链 DNA 变性成单股或断裂成单股区, 使二股 DNA 都能转录形成 RNA, 亦会使 RNA 含量增大^[8]。

参 考 文 献

- 1 Yamamot K, Yamaguchi H. Proceedings of The Sixth International Congress of Radiation Research, IAEA, Vienna, 1979; 575~581
- 2 赵孔南等. 浙江农业大学学报, 1985, 11 (3): 271
- 3 高明尉等. 浙江农业大学学报, 1982, 8 (2): 143
- 4 李国金等. 吉林农业大学学报, 1986, 8 (1): 31
- 5 周顺伍. 生化实验技术, 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 165~177
- 6 朱壬葆等. 辐射生物学, 北京: 原子能出版社, 1987: 689
- 7 韩贻仁著. 分子细胞生物学, 北京: 高等教育出版社, 1992: 67
- 8 龙运森等. 西南农业大学学报, 1993, 15 (2): 170
- 9 查德威克著, 张卿西译. 放射分子生物学理论, 北京: 原子能出版社, 1987: 35
- 10 Alexander P. Radiation Damage and Sphidryl Compounds, IAEA, Vienna, 1968, 10: 63
- 11 Inoue M *et al.* Rad Bot, 1975, 15: 387

INFLUENCE OF IRRADIATION AND Caf EDTA ON THE METABOLISM OF NUCLEUS ACID OF THE DIFFERENT RADIOSENSITIVE CROPS

Song Daojun

(Bioengineering Centre, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Heifei 230031)

Xu Dengyi Wan Zhaoliang He Shoulin

(Central Lab. Southwest Agri. Uni., Chongqing 630716)

ABSTRACT Irradiation and damage repair inhibitor (Caf and EDTA) post-treatment had a substantial effect on DNA and RNA content and DNA self-repairing synthesis. The experiment results showed the content of DNA and RNA increased with increase doses in the seedling hypocotyl of soybean and rape, Caf and EDTA post-treatment made them further higher than that of H₂O-treatment. Meanwhile, the content of DNA and RNA in hypocotyl of soybean seedling was more than that of rape. Radioactive ³H-TdR incorporation experiment showed γ -ray irradiated seeds induced unscheduled DNA synthesis in the primary cultivated seeds of two crops, which was inhibited by Caf, EDTA and C+E post-treatment in the order of C+E>Caf>EDTA. Experiment also revealed irradiation and repair repressor post-treatment affected normal scheduled DNA synthesis, postponed the cycle of cell division.

KEYWORDS Radiation damage repair inhibitor, Crop, Radiosensitivity, DNA synthesis, Caffeine, EDTA