

电子束辐照对唐菖蒲 M1 代花粉母细胞的影响

张志伟^{1,2}, 王丹^{1,2}, 闻方平¹, 张晓雪¹

(1. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621000;

2. 西南科技大学 国防科工委核废物和环境安全国防重点学科实验室, 四川 绵阳 621000)

摘要:为探讨电子束对花粉母细胞的影响,用不同剂量的 3 MeV 电子束辐照唐菖蒲“超级”球茎,对其 M1 代的花粉母细胞进行减数分裂观察及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。结果表明:唐菖蒲减数分裂时出现遗传损伤,产生的染色体畸变类型包括滞后染色体、染色体桥、游离染色体、染色体不均等分离和微核等;在四分孢子期,则有较多三分孢子和多分孢子形成;小孢子的形状和大小有差异,主要表现为小孢子的体积变小。花粉母细胞染色体畸变类型及频率的统计表明,畸变类型以游离染色体和微核为主。SDS-PAGE 分析观测到,电子束辐照能明显改变 M1 代花粉的蛋白表达,低剂量辐照即可产生明显作用,在不同辐照剂量下分别观测到特殊蛋白表达条带,剂量大于 160 Gy 时,蛋白表达条带较低剂量辐照时有所减少。研究结果表明,电子束辐照诱变可作为唐菖蒲育种的一个有效手段。

关键词:电子束;唐菖蒲;小孢子母细胞;减数分裂;SDS-PAGE

中图分类号:S603.6;Q319

文献标志码:A

文章编号:1000-6931(2008)11-1053-04

Effect of Electron Beam Irradiation on Pollen Mother Cells of Gladiolus “chaoji”

ZHANG Zhi-wei^{1,2}, WANG Dan^{1,2}, WEN Fang-ping¹, ZHANG Xiao-xue¹

(1. *Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China;*

2. *National Defense Key Discipline Laboratory of Nuclear Waste and Environmental Safety of Commission of Science Technology and Industry for National Defense, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China*)

Abstract: In order to test the effects of various doses of electron beam on M1 generation pollen mother cells (PMC), the corm of gladiolus “chaoji” was irradiated by electron beam with 3 MeV energy. Some abnormalities of meiosis of pollen mother cells were studied and the bands of protein subunit were analyzed by SDS-PAGE for the irradiated corm. The genetic damage at meiosis of gladiolus is observed, and the types of chromosomal aberrations are laggard chromosomes, chromosomal bridge, chromosome outside nucleus, unequal separation of chromosome, micronuclei and so on. Some trispores and paraspores are viewed at tetraspore period. The shape and size of the microspores vary

in some treated materials, and most of microspores display little volume. The statistic of aberrance types and frequencies in PMCs show that aberrance types are chromosome outside nucleus and micronuclei mostly. The SDS-PAGE result shows that protein expression of M1 generation pollen is obviously changed by electron beam irradiation. Low dose of electron beam has obvious effects, and some special proteins subunit bands are found among varieties of irradiation dosage respectively. The protein bands are absent at the dose more than 160 Gy compared to low dose of electron beam. The results indicate that electron beam irradiation is an effective way for gladiolus breeding.

Key words: electron beam; gladiolus; pollen mother cell; meiosis; SDS-PAGE

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可形成有现实或潜在利用价值的新种质资源。目前,辐照诱变育种的诱变源仍以⁶⁰Co γ 射线为主^[1],国内近年来有关离子束的报道^[2-3]较多,而用电子束对植物进行辐照育种的研究较少,特别是在观赏植物中鲜见报道^[4-6];有关诱变后代花粉内蛋白表达方面的研究也少见报道。本实验用电子束辐照唐菖蒲球茎,观察经不同剂量辐照后 M1 代花粉的减数分裂,及花粉的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的分析,初步确定不同剂量电子束对唐菖蒲 M1 代的花粉诱变状况,为电子束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 10~12 cm。

1.2 方法

1.2.1 辐照处理 辐照在中国工程物理研究院久远辐照中心进行。以 EPS 电子束加速器对材料进行电子束辐照处理,辐照率 40 Gy/10 s,剂量分别为 40、80、120、160、200、240 Gy 及对照剂量(0 Gy),每种剂量处理 20 株,设 3 次重复。

1.2.2 栽培 将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,至花期采摘花粉。

1.2.3 唐菖蒲减数分裂观察 在天气晴朗的早晨,取含苞待放的花蕾及其上部数朵小花蕾,用卡诺氏液固定,2%醋酸洋红复染色,制片。对每种辐照处理类型,每次观察 2 个视野,每个

视野统计不少于 50 个细胞,设 3 次重复。观察和记录花粉母细胞减数分裂各时期的细胞情况及染色体畸变类型,拍照并统计变异细胞数和变异频率。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 取种植于田间的花粉,保证各处理花粉母细胞均处于同一时期(取花蕾长度约 2.5 cm,约处于单核期),花粉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^[7],后经 BIO-RAD GelDoc 凝胶成像系统拍照分析。

2 结果与分析

2.1 唐菖蒲 M1 代花粉母细胞减数分裂行为观察

对唐菖蒲 M1 代花粉母细胞减数分裂行为观察发现,电子束辐照处理导致减数分裂中期单价体数量增多(图 1a 箭头所示),并有多价体产生(图 1b 箭头所示)。在后期 I 能观察到落后染色体(图 1c)和染色体桥(图 1d)等现象,后期 II 出现染色体不均等分离现象(图 1i),此外,还能观察到微核(图 1p)和游离染色体(图 1e)等多种变异类型。在受辐照植株同一花药内,可观察到从未期 I 至后期 II(图 1f)等细胞减数分裂行为,且具有较多同一细胞内两组减数分裂不同期进行的现象(图 1g, h)。在减数分裂完成后,除四分孢子(图 1l)外,还能观察到三分孢子(图 1k)和五分孢子(图 1m);形成小孢子后,未经辐照处理的小孢子近椭圆形且大小基本一致(图 1n),而受辐照后 M1 代小孢子大小和形状明显不一致,出现了大量较小且不规则的小孢子(图 1o)。

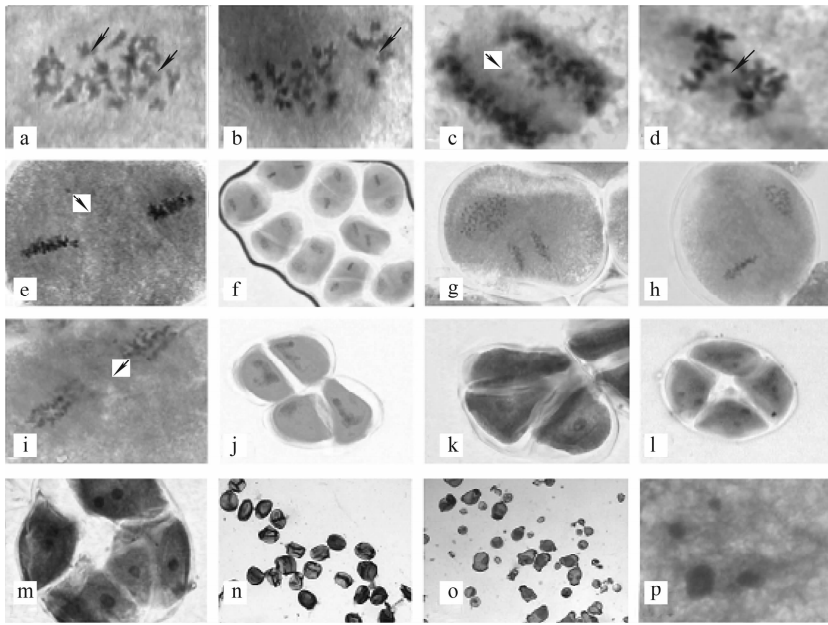


图 1 唐菖蒲 M1 代花粉母细胞减数分裂行为观察

Fig. 1 Observation of meiosis behavior in PMCs of M1 progeny of gladiolus

a——单价体;b——多价体;c——落后染色体;d——染色体桥;e——游离染色体;f——同一花药内小孢子分裂的不一致性;
g——同一细胞内减数分裂不同期 1;h——同一细胞内减数分裂不同期 2;i——染色体不均等分离;j——二分孢子;
k——三分孢子;l——四分孢子;m——五分孢子;n——花粉粒大小一致;o——花粉粒大小悬殊;p——微核

2.2 唐菖蒲 M1 代花粉母细胞减数分裂的畸变类型及频率统计

电子束辐照的唐菖蒲 M1 代花粉母细胞染色体的畸变类型的出现频率有所不同,其中以微核出现的频率最高,其次是游离染色体,而落后染色体和染色体桥出现的频率较低。并且,各种畸变类型均具有明显的剂量效应,染色体的畸变频率随注入剂量的增大而增高,剂量大于 160 Gy 时,能观察到各种染色体畸变类型,包括落后染色体、染色体桥、游离染色体和微核等;剂量小于 160 Gy 时,染色体畸变类型以游离染色体和微核为主(表 1)。

2.3 电泳观察

不同辐照剂量下唐菖蒲花粉中蛋白亚基 SDS-PAGE 谱如图 2 所示。与对照(CK)相比,不同辐照剂量下唐菖蒲花粉中蛋白亚基条带均有所变化,出现了一些特异性表达条带(图 2 中箭头所示),且部分条带颜色变深,说明辐照后花粉中出现一些特异蛋白,且蛋白表达量较对照有所增加,而随着剂量的增加,在剂量大于 160 Gy 时,蛋白表达较小剂量时有所减少。由此可看出,电子束辐照对花粉中蛋白表达产

生较为明显的影响。

表 1 唐菖蒲 M1 代花粉母细胞染色体畸变类型及频率
Table 1 Chromosome aberrance types and frequencies in PMCs of M1 progeny of gladiolus

剂量/ Gy	观察 细胞数	落后 染色体	染色 体桥	游离 染色体	微核	畸变 频率/%
0	300	0	0	0	5	1.67
40	400	0	0	2	11	3.25
80	424	0	0	7	10	4.01
120	551	1	0	8	17	4.72
160	583	6	2	15	22	7.72
200	579	8	3	20	22	9.15
240	635	8	5	22	25	9.45
	(3 472)	(23)	(10)	(74)	(112)	

注:畸变频率=变异细胞数/镜检细胞数×100%;括号内为该列的加合值

3 讨论

研究电子束对植物细胞产生的损伤现象对探讨诱变机理、提高电子束辐照诱变效率很有助益。花粉母细胞的遗传物质将完全传给下一

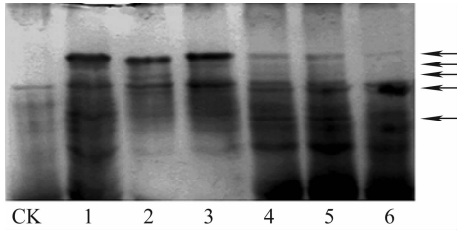


图2 不同辐照剂量下唐菖蒲花粉中蛋白亚基 SDS-PAGE 谱

Fig.2 SDS-PAGE patterns of protein subunit in pollen of gladiolus for irradiated by electron beam
1—40 Gy;2—80 Gy;3—120 Gy;4—160 Gy;
5—200 Gy;6—240 Gy;CK(对照)—0 Gy

代植株, M1 代花粉是承接 M1 和 M2 的桥梁, 通过对 M1 代花粉的 SDS-PAGE 分析及对花粉母细胞损伤情况的观察, 不仅可了解辐照对植株直至花期的损伤与变异情况, 且所得结果又可最大程度地与后代变异情况相一致。在本研究中, 通过对唐菖蒲 M1 代花粉母细胞畸变类型的观察和统计可看出, 电子束辐照唐菖蒲可产生较为广泛的花粉母细胞畸变类型, 且各种畸变类型均具有明显的剂量效应。在剂量为 160 Gy 时, 各种染色体畸变类型产生明显改变。

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, 这种变化可从蛋白质表达上反映出来^[8]。从本实验可看出, 低剂量电子束辐照即可对花粉中蛋白表达产生较为明显的影响, 出现了一些特异表达条带; 在剂量高于 160 Gy 时, 表达条带又发生了改变。

辐照诱变育种的一个原则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。综合考虑对花粉母细胞减数分裂的观察及 SDS-PAGE 分析结果可看出, 辐照剂量为 160 Gy 时, 材料均发生明显变化, 据此初步推断, 唐菖蒲“超级”球茎的电子束诱变处理的适宜辐照剂量为 160 Gy。

参考文献:

[1] 王丹, 任少雄, 苏军, 等. 核技术在观赏植物诱变育种上的应用[J]. 核农学报, 2004, 18(6): 443-447.

WANG Dan, REN Shaoxiong, SU Jun, et al. Application of nuclear technology in radiation breeding of ornamental plants[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(6): 443-447(in Chinese).

- [2] 陈恒雷, 吕杰, 曾宪贤. 离子束诱变育种研究及应用进展[J]. 生物技术通报, 2005, 2: 10-13.
CHEN Henglei, LU Jie, ZENG Xianxian. Advances in research and application of mutation breeding with ion beam implantation [J]. Biotechnology Bulletin, 2005, 2: 10-13 (in Chinese).
- [3] 宋云, 张怀渝, 畅志坚. 离子束用于诱变育种的研究进展[J]. 分子植物育种, 2004, 2(2): 301-305.
SONG Yun, ZHANG Huaiyu, CHANG Zhijian. Progress of mutation breeding with ion beam implantation[J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(2): 301-305(in Chinese).
- [4] TANABE K, DOHINO T. Effects of electron beam irradiation on cut flowers[J]. Research Bulletin of the Plant Protection Service, 1993, 29: 1-9.
- [5] 林祖军, 孙纪霞, 迮福惠. 电子束在花卉诱变育种上的应用[J]. 核农学报, 2002, 16(6): 351-354.
LIN Zujun, SUN Jixia, ZE Fuhui. Studies on irradiation breeding by electron beam in flowers and plants[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2002, 16(6): 351-354(in Chinese).
- [6] 张圣君. 中子和电子束辐照对水稻等农作物育种的影响[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 1999, 5(5): 388-392.
ZHANG Shengjun. Effects of neutron and electron beam irradiation on the breeding of rice and other plants[J]. Journal of Shanghai University: Natural Science, 1999, 5(5): 388-392 (in Chinese).
- [7] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2005: 92-110.
- [8] 李兴林, 卫增泉, 王晓娟, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 注入小麦种子胚乳引起 M1 代的变化[J]. 激光生物学报, 2000, 9(4): 276-280.
LI Xinglin, WEI Zengquan, WANG Xiaojuan, et al. Changes of M1 generation of wheat endosperm implanted by $^{12}\text{C}^{6+}$ [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2000, 9(4): 276-280(in Chinese).