

· 基础研究 ·

$^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射中国水仙的细胞学诱变效应

高 健¹, 彭镇华^{2*}

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学技术重点开放实验室, 北京 100102;

2. 中国林业科学研究院林业科学研究所, 北京 100091)

摘 要: 用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射中国水仙三年生鳞茎, 首次研究了辐射后中国水仙鳞茎 M_1 代形态损伤、剂量效应曲线、细胞学变化及其与形态变化的关系。结果表明, $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线抑制细胞分裂, 降低细胞分裂指数, 引起中国水仙的形态损伤, 并诱发中国水仙染色体畸变和核畸变, 畸变类型丰富。在染色体畸变中染色体桥的发生频率较高, 随着辐射剂量的增加染色体断片率提高。细胞核畸变中, 微核发生率最高。核畸变率、染色体畸变率与剂量间存在显著的线性正相关, 相关系数分别为 0.9874、0.9829, 线性方程表达式分别为 $Y = -0.085 + 1.0385X$, $Y = -9.6727 + 2.3697X$ 。间期细胞微核率与分裂期染色体畸变率间呈正相关。

关键词: $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线; 中国水仙; 辐射诱变; 染色体畸变; 核畸变

中图分类号: Q345+.2; Q691

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2006)02-0179-05

The Mutagenic Effects of $^{60}\text{Co}\gamma$ Ray Radiation to Chinese Narcissus Bulb

GAO Jian¹, PENG Zhen-hua^{2*}

(1. International Centre for Bamboo and Rattan, The Key Laboratory for Bamboo and

Rattan of Chinese State Forestry Administration, Beijing 100102, China;

2. Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Chinese narcissus bulbs were radiated by $^{60}\text{Co}\gamma$ ray with different dosages. The injury effects of morphology and cytology in M_1 generation, the dose effects and the relationship among them were studied. The results indicated that $^{60}\text{Co}\gamma$ ray was an effective mutagenesis for ornamental plant breeding. It induced the chromosomal aberration and nuclear aberration. There were abundant aberrant types. In chromosomal aberration the frequency of chromosomal bridge was the most aberrant. In nuclear aberration the frequency of micronucleus was the most aberrant. The relationship between different dosages and frequencies of chromosomal aberration and nuclear aberration of root tip cells in M_1 generation was fitted in with the model $Y = -0.085 + 1.0385X$, $Y = -9.6727 + 2.3697X$ respectively. The correlation coefficient was 0.9829 and 0.9874 respectively.

Key words: $^{60}\text{Co}\gamma$ ray; chinese narcissus; mutagenic effect; chromosomal aberration; nuclear aberration

收稿日期: 2006-02-10

基金项目: 国家林业局项目(95-12-01)和“948”项目

作者简介: 高健(1966—), 女, 博士, 主要从事林木分子生理生态和花卉诱变育种研究。(电子信箱) gaojian@icbr.ac.cn

* 通讯作者

0 引言

水仙是石蒜科水仙属植物的统称,中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem)属多花水仙(*N. tazetta* L.)即法国水仙的主要变种之一。它是我国传统十大名花之一,叶片和花器有着同样重要的观赏价值。为世界上少有的草本花卉中能够造型的艺术珍品,将花卉与盆景结合得臻善尽美。中国的花卉出口中,水仙花及水仙雕刻品属佼佼者,在国内观赏植物出口创汇中占举足轻重的地位^[1]。中国水仙不仅具极高的观赏价值,其药用价值亦不可低估,有排脓消肿,解热祛风的功效,可治痛疽疮毒,百虫咬伤等症,而近年日本人发现其中之一石蒜碱具一定的抗癌作用,更使之倍受关注。水仙花也广泛地被用于高级名贵香精、香料的提取。其潜在的工业价值正被逐步开发利用。虽然世界上水仙花有60多种,但具浓香味的仅中国水仙等几种,而中国水仙的种质资源并不丰富。同时由于中国水仙遗传上的高度保守性,虽传至我国1200多年,且在气候差异较大的地区分布、栽培,但从目前掌握的资料看,仍无变异^[2]。据中国水仙的染色体分带研究,漳州水仙、舟山水仙、崇明水仙为同种^[3]。又由于中国水仙为同源3倍体,具高度不孕性,虽子房膨大,但种子空瘪,用传统常规的杂交育种方法无法繁殖,更无法获得新的品种。为丰富中国水仙种质资源,彭镇华等^[4]尝试利用⁶⁰Coγ射线辐射育种技术创造变异。

辐射育种技术为观赏植物尤其是不能进行有性繁殖的植物育种提供了重要的手段^[5]。至20世纪90年代,国际上利用这一技术已选育出各种无性繁殖植物品种428个,其中观赏植物达379个^[6-7]。本文就是利用该技术分析⁶⁰Coγ射线辐射中国水仙鳞茎的细胞诱变效应,丰富⁶⁰Coγ射线辐射诱变育种的理论研究。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料选用福建漳州水仙的单瓣品系,取其经三年培育的商品母球(开花大球)即三年生鳞茎,主鳞茎围茎长24 cm左右,在商业分级中属30桩的主鳞茎。

1.2 辐射处理

在中国科学技术大学化学系辐射加工厂用⁶⁰Coγ射线辐射,分8个剂量(A-5 Gy、B-10 Gy、C-15 Gy、D-20 Gy、E-25 Gy、F-30 Gy、G-35 Gy、H-40

Gy),根据以往经验选择剂量率4.4 Gy/min,每剂量下处理中国水仙鳞茎5头。

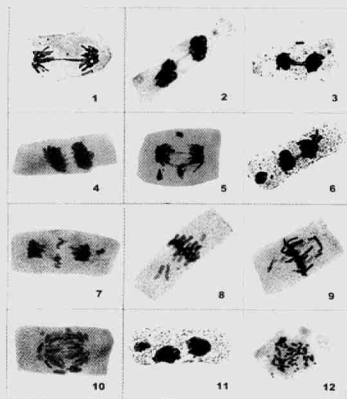
1.3 染色体制片及细胞学观察统计

待各处理鳞茎的根系长至2.0 cm左右时,一天中分不同时间(8:00,10:00,12:00,14:00,16:00,16:30,18:00)取材。取材后即进行对二氯苯饱和水溶液处理2小时,然后用1 mol HCl 60℃水解10分钟,再置入Cannoy's固定液(3:1)固定,进而切取根尖生长点部位1 mm处组织,作染色体制片,用改良苯酚品红染色液染色,架刀片敲碎法制片,电热板烤片。在高倍显微镜下观察和统计细胞分裂、核畸变和染色体畸变的类型及频率,并用Olympus Vanox AH-2型显微摄影机拍照。每种剂量包括对照观察统计10个根尖,每根尖观察统计1 000个左右细胞,合计观察10 000个左右细胞。根据统计结果分别计算出根尖细胞的分裂指数、核畸变率、染色体畸变率及有丝分裂总畸变率等。

2 结果

2.1 根尖细胞染色体畸变类型

副冠原基分化期⁶⁰Coγ射线辐射后,细胞分裂的中、后期根尖细胞中出现染色体单桥、多桥、落后、断片、游离、散碎、团状染色体及染色体粘连等畸变类型(图1)。低剂量辐射时未出现中、后期落后染色体



1. 染色体单桥; 2. 染色体单桥+染色体片断; 3. 染色体双桥+落后染色体; 4. 染色体多桥; 5. 染色体多种类型畸变(侧桥+落后+游离); 6. 染色体桥+落后染色体团; 7. 游离染色体+落后; 8、9、10. 游离染色体+染色体片断; 11. 染色体落后团; 12. 染色体散碎。(×200)

1. Single chromosome bridge; 2. Single chromosome bridge + chromosome fragment; 3. Double chromosome bridges + laggard; 4. Chromosome multi-bridges; 5. Chromosome multi-aberration(side bridge + laggard + free chromosome); 6. Chromosome bridge + laggard; 7. Free chromosome + laggard; 8. 9. 10. Free chromosome + chromosome fragment; 11. Chromosome laggard clump; 12. Nuclear pulverization

图 1 ⁶⁰Coγ 射线辐射诱发根尖细胞染色体畸变类型
Fig. 1 Types of chromosomal aberration induced by ⁶⁰Coγ ray on Chinese narcissus root tip

团或游离染色体团,也无染色体散碎现象,但当剂量高于 G 组时在中、后期细胞中染色体开始出现散碎现象,而当辐射剂量处于 F~G 时,在中、后期细胞中染色体畸变类型中开始出现落后染色体团或游离染色体团,但无散碎现象。值得注意的是高剂量处理下中、后及末期细胞中往往出现复合畸变类型即一个细胞中同时有二种甚至三种以上畸变类型出现,

复合结构、团状染色体的出现说明损伤程度加重,而染色体散碎的发生则预示着损伤达到相当严重的程度。

2.2 染色体畸变的剂量效应

表 1 列出了⁶⁰Coγ 射线辐射中国水仙鳞茎后 M₁ 代根尖细胞各类型的染色体畸变率。可以看出所有辐射处理的染色体畸变率均高于对照,在 50 Gy 剂量下,畸变率为对照的 128.7 倍。随辐射剂量的增加,染色体总畸变率呈正相关,与各畸变类型间也有在类似的线性关系,在染色体畸变率中高剂量下(≥35 Gy)以桥和断片的贡献最大,二者几乎各占总畸变率的 1/3 多,低剂量下(≤15 Gy),以染色体桥频率最高,约占总畸变率的 45%,⁶⁰Coγ 辐射引发的变异以结构变异为主,与程备久结论一致^[9-10]。拟合各畸变类型与剂量间的关系(表 2)。

表 1 ⁶⁰Coγ 射线辐射对中国水仙鳞茎根尖细胞染色体的影响

Tab. 1 Effects of chromosome of root tip cell of Chinese narcissus by ⁶⁰Coγ ray

染色体畸变类型 Chromosome aberrant types	剂量 Dose (Gy)						
	0	A	B	C	E	G	H
观察细胞总数 Total number of cells	1059	1144	1125	1218	1237	924	938
落后率 Rate of laggard (%)	0.06	1.42	2.81	2.93	5.58	8.31	14.69
单桥率 Rate of single bridge (%)	0.20	1.68	3.94	5.24	10.63	12.84	15.17
多桥率 Rate of multi-bridge (%)	0.02	0.52	2.58	2.77	11.25	15.32	18.57
断片率 Rate of fragment (%)	0	0.28	3.76	4.38	16.90	20.65	26.90
游离率 Rate of free chromosome (%)	0	0.61	1.31	1.60	9.38	18.34	21.50
复合畸变率 Rate of multi-aberration (%)	0	1.52	7.56	14.60	46.30	54.12	67.26
微核率 Rate of micronucleus (%)	0.28	4.52	14.18	17.43	54.56	75.60	96.83
染色体有无散碎 Chromosome pulverization	-	-	-	-	-	+	+
团状染色体 Dumpling chromosome	-	-	-	-	-	+	+
染色体总畸变率 Rate of total aberrant types (%)	0.28	4.48	7.78	23.96	53.74	75.46	96.83

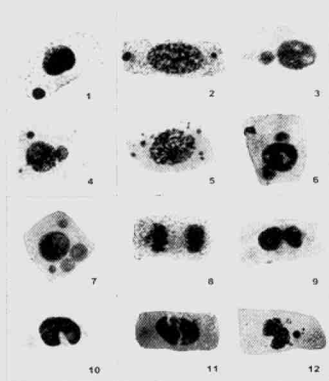
表 2 各畸变类型畸变率与剂量间相关方程

Tab. 2 Relative equation between aberration type and dosage

畸变类型 Type of aberration	方程 Equation	相关系数 Correlation coefficient	F 值 F value
染色体总畸变率 Rate of total aberrant types	$Y = -9.6727 + 2.36969X$	$R = 0.98292$	$F = 288.4274$
染色体桥率 Rate of chromosome bridge	$Y = -0.6786 + 0.74701X$	$R = 0.943206$	$F = 84.0380$
染色体断片率 Rate of fragment	$Y = -5.0935 + 0.81022X$	$R = 0.972016$	$F = 174.6735$
染色体落后率 Rate of laggard	$Y = -0.7188 + 0.28609X$	$R = 0.956027$	$F = 109.7058$
游离染色体率 Rate of free chromosome	$Y = -3.5976 + 0.5309X$	$R = 0.930818$	$F = 68.2730$
染色体畸变复合结构率 Rate of multi-aberration	$Y = 9.9417 + 1.93121X$	$R = 0.93997$	$F = 63.6334$

2.3 对根尖细胞间期细胞核的影响

2.3.1 ^{60}Co 射线辐照后根尖细胞间期细胞核畸变类型 ^{60}Co 射线辐照处理后,中国水仙根尖细胞核畸变类型有:微核、小核、核出芽、核耳、核凹陷、核裂、双核、多核(见图2),而微核、小核、核出芽最为普



1,3. 单微核; 2. 双微核; 4,6. 微核+核出芽; 5. 多微核; 7. 微核+小核; 8. 双核; 9. 核耳; 10. 核溢缩; 11. 核裂; 12. 核溢缩+核出芽+微核

1. 3. Single micronucleus; 2. Double micronucleus; 4. 6. Micronucleus + nuclear budding; 5. Multi-micronucleus; 7. Micronucleus + small nucleus; 8. Double micronucleus; 9. Nuclear bleb; 10. Nuclear constriction; 11. Nuclear fragmentation; 12. Nuclear constriction + nuclear bleb + micronucleus ($\times 200$)

图2 ^{60}Co 射线辐照诱导根尖细胞核畸变类型
Fig.2 Types of nuclear aberration induced by ^{60}Co ray on Chinese narcissus root tip

表3 辐射中国水仙鳞茎 M_1 代对根尖细胞核的影响

Tab.3 Effects of chromosome of root tip cell of Chinese narcissus by ^{60}Co ray radiation

核畸变类型 Nuclear aberrant type	剂量 Dose (Gy)						
	0	A	B	C	E	H	
总细胞数 Total number of cells	10353	10677	10472	10810	10014	12877	12980
分裂指数 Index of cleavage	11.39	10.71	10.21	7.43	6.09	3.95	3.42
核畸变率 Rate of aberration (%)	0.20	5.32	7.18	11.57	12.6	16.28	19.31
微核率 Rate of micronucleus (%)	0.032	4.02	6.82	10.35	12.42	24.87	31.05
小核率 Rate of small nuclear (%)	0	0.09	1.26	2.91	3.23	7.21	10.28
核出芽率 Rate of nuclear bleb (%)	0.17	1.13	10.96	2.52	4.33	5.78	8.46
核裂出现否 Nuclear fragmentation	-	-	-	-	-	+	+
核总畸变率 Rate of total aberration (%)	0.21	5.38	10.12	16.27	23.04	38.84	51.23

遍,微核又有小微核和大微核之分,其出现频率在各剂量下均显著高于其他类型。在实验中观察到微核数目不等,从一个到六个,微核大小不等,剂量增加到 25 Gy 以上时,60% 的具微核细胞含有两个以上的微核(微核中又有单微核、双微核、三微核、四微核、多微核等多种类型)。这显然是由于辐射作用的强弱不同所致。核裂仅在高剂量下出现,说明了此种核畸变类型是细胞核严重损伤的标志,高剂量下核畸变也出现了复合类型即在同期细胞中也同时存在二种以上的核畸变类型。

2.3.2 对根尖细胞核分裂和核畸变效应的影响

^{60}Co 射线辐照后,中国水仙根尖细胞分裂表现为强烈的抑制效应,且随着剂量增大抑制效应增强。剂量效应曲线可用方程: $Y = 10.9887 - 0.1723 X$, $R = 0.901658$, $F = 36.6745 > F_{0.05}$ 或 $Y = 12.8373 - 0.3777 X + 0.00376 X^2$, $R = 0.933438$, $F = 54.9718 > F_{0.05}$ 来描述,在各剂量处理下微核率极显著高于其他类型核畸变率,均占总畸变率的 50% 以上,详见表 3。

H 组辐照后分裂指数仅为对照的 30%,而 C 组以下的辐照,其分裂指数与对照相差无几,降低不明显,但 C 组辐照与对照相比分裂指数显著降低。这从细胞学水平上揭示了叶片高度及花葶高度等形态学指标在 C 组辐照时显著降低的原因。考察分裂指数与叶片高度之间关系,得出如下方程: $Y = 5.959 + 1.92263 X$, $R = 0.974683$, $F = 231.9963 > F_{0.05}$, 分裂指数与花葶高度间相关方程为: $Y = 0.66735 + 2.7073 X$, $R = 0.985783$, $F = 417.0207$, 极显著相关。因此根尖细胞分裂指数指标很可能成为早期预测中国水仙叶片高度、花葶高度等重要观赏指标和农艺性状的准确、快速的方法。

3 结论与讨论

在本实验的剂量范围和处理时期内⁶⁰Co γ 射线辐射处理均能诱发M₁根尖细胞核畸变和染色体行为、结构及数量变异,变异类型丰富,染色体畸变的类型有染色体桥(单桥、双桥、多桥)、染色体断片、染色体落后、染色体游离、染色体团、染色体散碎、染色体粘连等,核畸变类型有核出芽、小核、大核、微核(单微核、双微核、多微核、小微核、大微核)、核裂、核耳、核凹陷等。在实验的剂量范围内染色体畸变率随剂量加大而增加,呈线性正相关。染色体总畸变率在A、B、C、E、G、H组剂量辐射下,分别为4.52%、14.18%、17.43%、54.56%、75.60%、96.83%,方差分析结果表明,与对照的染色体总畸变率(0.28%)有极显著差异。在实验剂量范围内细胞核畸变率与剂量间关系和染色体畸变率与剂量间关系趋势一致,都随着辐照剂量的加大而增加,分别为5.38%、10.12%、16.27%、23.04%、38.84%、51.23%,方差分析表明与对照差异极显著。核畸变率、染色体畸变率与剂量间存在显著的线性正相关,相关系数分别为0.9874、0.9829,线性方程表达式分别为 $Y = -0.085 + 1.0385X$, $Y = -9.6727 + 2.3697X$ 。沈光平等^[11]研究认为微核与染色体畸变具有一定的相关性。本文对细胞分裂间期核畸变的深入分析,发现间期细胞微核率与分裂期染色体畸变率间亦存在高度相关关系,线性表达式为 $Y = -16.598 + 18.0591X$,相关系数 $R = 0.8322$, $F = 30.75227 > F_{0.05}$ 。

致谢 本论文的细胞学实验部分得到了安徽农业大学生物工程系遗传教研室的大力支持,谨此致谢!

References

- [1] 许荣义,李益民. 中国水仙[M]. 福州:福建美术出版社,1992:57-62.
XU Rong-yi, LI Yi-min. Chinese Narcissus[M]. Fuzhou: Fujian Art Publish House,1992:57-62.
- [2] 朱心武. 中国水仙的核型研究[J]. 武汉植物学研究,1986,14(2):36-40.
ZHU Xin-wu. Research on Nuclear Type of Chinese Narcissus[J]. Wuhan Botany Research,1986,14(2):36-40.
- [3] 李懋学,陈定慧,王莲英. 中国水仙的染色体组型和 Geimsa C

- 带之研究[J]. 园艺学报,1980,7(2):30-37.
LI Mao-xue, CHEN Ding-hui, WANG Lian-ying. Research on Chromosome Set Pattern and Geimsa C of Chinese Narcissus[J]. Acta Horticulturae Sinica,1980,7(2):30-37.
- [4] 彭镇华,江守和. 花卉辐射育种研究[J]. 中国科技大学学报,1995,25(93):89-91.
PENG Zhen-hua, JIANG Shou-he. Research on Radiation Breeding to Flower[J]. Journal of Chinese Science and Technology University,1995,25(93):89-91.
- [5] 高健,卢惠萍. 花卉辐射育种研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2000,27(2):57-62.
GAO Jian, LU Hui-ping. Research Progress of Radiation Breeding on Flowers[J]. Journal of Anhui Agricultural University[J],2000,27(2):57-62.
- [6] 李雅志. 花卉辐射育种成就与前景[J]. 原子能农业应用,1986,(3):57-60.
LI Ya-zhi. Achievements and Perspective of Radiation Breeding to Flower[J]. Applied Agriculture of Atomic Energy,1986,(3):57-60.
- [7] 李震华. ⁶⁰Co γ 射线对中国水仙球茎的影响[J]. 西南农业大学学报,1996,18(5):425-428.
LI Zhen-hua. Impact of ⁶⁰Co γ Ray to Chinese Narcissus Bulb[J]. Journal of Southwest Agricultural University,1996,18(5):425-428.
- [8] 丘冠英,冯胜彦. 辐射生物物理学[M]. 武汉:武汉大学出版社,1990:23-26.
QIU Guan-ying, FEN Sheng-yan. Biological Physics of Radiation[M]. Wuhan:Wuhan University Publish House,1990:23-26.
- [9] 程备久,李展,王公明,等. 三种离子注入棉花种子的诱变效应[J]. 核农学报,1993,7(2):73-80.
CHENG Bei-jiu, LI Zhan, WANG Gong-ming, et al. Mutagenic Effects of Nitrogen Ion Injection to Seeds of Cotton[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica,1993,7(2):73-80.
- [10] 程备久,李展,周立人,等. 三种离子注入棉花种子的细胞学效应[J]. 安徽农业大学学报,1995,22(3):189-195.
CHENG Bei-jiu, LI Zhan, ZHOU Li-ren, et al. Cytobiological Effects of Three Ions Injection to Seeds of Cotton[J]. Journal of Anhui Agricultural University,1995,22(3):189-195.
- [11] 沈光平,王钦南,周祉祯. 微核与染色体畸变的相关性[J]. 遗传,1985,7(1):15-17.
SHEN Guang-ping, WANG Qian-nan, ZHOU Zhi-zhen. Correlation between Micro-nuclear and Chromosome Abbreption[J]. Heritage,1985,7(1):15-17.
- [12] RAO G M. Mutagenic Efficiency, Effectiveness and Factor of Physical and Chemical Mutagen in Rice[J]. Cytologia,1983,48(3):427-436.