

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对小麦种子萌发、幼苗生长及存活的影响

刘青芳^{1,2} 余丽霞^{1,2} 杜艳^{1,2} 周利斌¹ 曲颖¹ 陆栋¹ 金文杰¹ 李文建¹

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

² (中国科学院大学 北京 100049)

摘要 采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对小麦 (*Triticum aestivum* L) 种子进行不同剂量 (0、10、20、30、60、120、150 和 200 Gy) 辐照处理, 考察种子萌发率、幼苗根长及株高、有丝分裂活动及存活率等生物学特性。结果表明: 试验剂量范围内, 大多数种子能够正常萌发; 低剂量 (10 Gy 和 20 Gy) 辐照对幼苗生长具有促进作用, 而高剂量辐照则表现出明显的抑制作用; 根的生长与分生组织细胞有丝分裂指数密切相关, 低剂量时有丝分裂指数略有增加, 而高剂量则相反, 分裂细胞被选择性阻滞在中期和后期。存活率曲线呈“抛物线”状, 半致死剂量 (LD_{50}) 为 55 Gy。

关键词 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束, 小麦种子, 幼苗生长, 存活率, 半致死剂量

中图分类号 Q691.5

重离子束具有质量、能量沉积效应和典型的 Bragg 峰, 与 γ 射线、X 射线相比, 表现出较高的 LET 和 RBE, 这些特性使其成为一种新的诱变源得到重视。近二十多年来有很多研究活动通过辐射装置使用离子束辐照来进行, 如日本的 RIKEN、W-MAST 和 HIMAC 以及国内的中科院等离子体所和近代物理研究所等。重离子束辐照较宽的诱变谱和较高的诱变频率, 被认为是植物诱变育种领域中重离子典型的诱变效应^[1]。目前, 重离子束已被用于新的突变体或新品种的获得, 尤其是用于高等植物辐射诱变育种^[2-7]。在辐射生物学中, 重离子束辐照可应用于大多数生物体系诸如动物细胞和微生物辐射效应研究。植物体系是一个多细胞和多组织的体系, 其本身的复杂性和较长的生长周期, 使得诱变基础理论研究远远滞后于应用研究。

小麦 (*Triticum aestivum* L, $2n=6X=42$), 是世界上重要的粮食作物。目前我国与其他小麦生产国都出现了单产增长逐渐变缓的情况, 同时受全球气候变化对小麦产量的影响加大, 小麦育种进入了爬坡阶段^[8]。采用重离子辐照诱变技术拓宽小麦育种途径, 培育更多高产、稳产、优质的小麦品种对国家粮食安全和改善民生具有重要意义。同时由于小麦染色体大小及多倍性, 它也成为重离子辐照诱变机理研究较好的植物材料^[9]。本研究采用不同剂量

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照小麦种子, 以萌发率、幼苗生长、存活率为生物研究参数, 研究碳离子束辐照剂量-效应关系, 并分析不同辐照剂量根尖分生组织细胞有丝分裂指数及不同分裂时期分配频率, 从细胞学角度探寻重离子束辐照对幼苗生长的影响。期望为作物重离子束辐照育种技术中剂量参数设置及诱变机理研究提供可靠的基础理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 植物材料

所用的小麦品种为高原 448, 种子由中国科学院西北高原生物研究所提供。选取颗粒饱满, 大小均匀的种子用于碳离子束辐照试验。

1.2 辐照处理

辐照实验在中国科学院近代物理研究所兰州重离子研究装置 (HIRFL) 生物辐射终端进行。所用碳离子束 $^{12}\text{C}^{6+}$ 初始能量为 80 MeV/u, 经由不锈钢窗, Mylar 膜和空气后, 到达样品表面的能量为 76.3 MeV/u。挑选的小麦种子平铺于样品盒中, 种子平均厚度为 5 mm。辐照实验均在大气及常温下进行, 样品更换和数据获取由计算机控制。吸收剂量分别设置为 0、10、20、30、60、120、150 和 200 Gy, 剂量率为 20 Gy/min, 平均 LET 为 35.6 keV/ μm , 每

中国科学院西部行动计划项目 (KZCX2-XB3-05) 资助

第一作者: 刘青芳, 女, 1980 年 2 月出生, 2006 年于西北大学细胞生物学专业获硕士学位, 主要从事植物辐射生物学效应研究, 现为中国科学院近代物理研究所博士研究生

通讯作者: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2012-05-21, 修回 2012-07-04

个剂量设置 3 次重复。

1.3 辐照后种子萌发、幼苗生长及存活分析

不同剂量辐照小麦种子用 70%乙醇表面消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 遍, 播种于培养皿内的湿滤纸上, 放置在 25℃ 培养箱中, 16 h 光照条件下培养。分别在培养后第 3 天和第 7 天测定其幼苗的根长及株高。第 7 天统计其萌发率, 随后将其幼苗转移至土壤中在相同条件下培养 1 个月统计存活率。每个剂量设置 3 组重复, 每个重复 30 粒种子。

1.4 根尖分生组织细胞学分析

另取辐照种子在上述相同条件下培养, 待胚根长至 1.5 cm 左右时, 切取根尖部分并收集在 EP 管中。置于 4℃ 冰箱预处理 20 h, Carnoy's 溶液(无水乙醇: 冰乙酸=3: 1)固定 24 h。将固定好的根尖用蒸馏水冲洗干净, 加入 1 mol/L HCl 60℃水浴解离 13 min, 以品红染色液染色 1 h, 45%冰乙酸脱色 30 min。用刀片切取 0.5 mm 根尖部分加入一滴 45%冰乙酸进行压片, 制备的片子用显微镜观察。每个根尖中至少 1000 个细胞被观察及统计, 分析其有丝分裂指数(Mitotic index)及不同分裂期细胞分布频率(Frequency of mitotic phase cells)。实验设置 3 次重复, 每组重复包含 10 个根尖。

$$\text{有丝分裂总数} = \frac{\text{有丝分裂细胞总数}}{\text{所观察细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{分裂期细胞频率} = \frac{\text{各个有丝分裂时期细胞总数}}{\text{所观察细胞总数}} \times 100\%$$

1.5 数据分析

实验中所有数据均采用“平均值±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。利用 *t* 检验进行统计学意义分析。当 $p < 0.05$ 时, 视作差异显著, 以*表示, 当 $p < 0.01$ 时, 视作差异极显著, 以**表示。

2 结果与分析

2.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对小麦种子萌发影响

图 1 显示的是 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照小麦种子萌发率的剂量-效应曲线。结果表明: 对照萌发率为 96.67%, 10 Gy 和 20 Gy 时分别为 98.9% 和 97.7%, 其萌发率均高于对照。而在 30 Gy 到 200 Gy 范围内, 随着辐照剂量的增加, 萌发率逐渐降低, 尤其在 120 Gy ($p < 0.05$), 150 Gy ($p < 0.05$) 和 200 Gy

($p < 0.01$) 时, 萌发率与对照相比显著降低。但即使在最高辐照剂量为 200 Gy, 大部分种子仍可正常萌发, 其萌发率可达 84.4%。这表明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对种子萌发的影响较小。

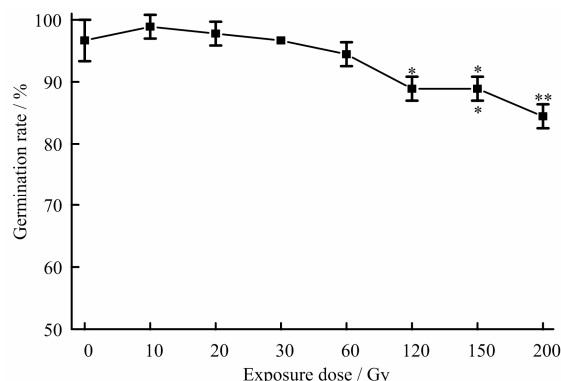


Fig.1 Germination rate of wheat seeds after exposure to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams irradiation. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.2 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对小麦幼苗生长的影响

图 2 和图 3 显示培养后第 3 天和第 7 天根长及幼苗高度。结果表明: $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子束辐照后 3 天和 7 天的根长及幼苗高度曲线变化趋势相似。从图中可看出, 培养 3 天时 10 Gy 和 20 Gy 根长及幼苗高度略高于对照, 但在 30 Gy 到 200 Gy 剂量范围内, 根长及幼苗高度随着辐照剂量的增加而逐渐降低。而在培养 7 天时, 10 Gy 和 20 Gy 根长及幼苗高度则高于对照, 随后逐渐降低, 特别是在 120 Gy、150 Gy 和 200 Gy 时, 第 3 天和第 7 天的根长分别为 16.8 mm、23.39 mm 和 14.74 mm 和 17.59 mm、13.6mm 和 16.25 mm, 这一现象说明第 3 天到第 7 天大部分幼苗根生长缓慢甚至停滞, 从而影响到整个幼苗的正常生长, 并导致幼苗的最终死亡。由此可见, 不同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对其幼苗生长具有明显的影响。低剂量辐照 (10 Gy 和 20 Gy) 对幼

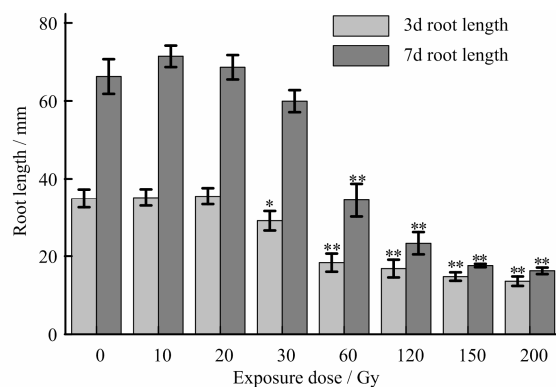


Fig.2 Root growth of seedling after exposure to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams irradiation. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

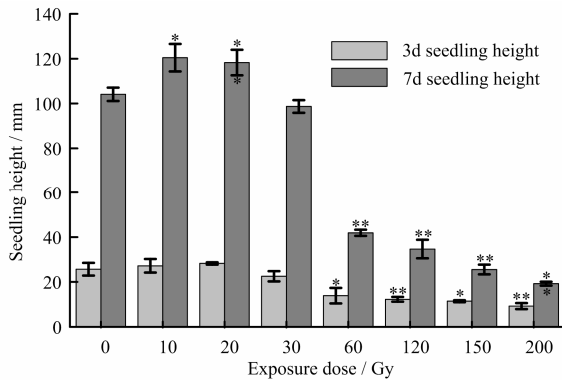


Fig.3 Seedling growth after exposure to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams irradiation. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

苗生长具有促进作用, 而高剂量时则表现出明显抑制作用, 且这种抑制作用随着辐照剂量的增加而增大。

2.3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对根尖分生组织细胞有丝分裂活动的影响

为了进一步阐明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对幼苗生长的影响, 我们对不同剂量辐照的小麦根尖分生组织进行了细胞学观察, 测定其不同辐照剂量有丝分裂指数 (图 4) 及各个分裂时期细胞分布频率 (图 5)。如图 4 所示, 10 Gy 和 20 Gy 时有丝分裂指数增加, 随后随着剂量的增加逐渐降低, 并在 120 Gy ($p < 0.05$), 150 Gy ($p < 0.01$) 和 200 Gy ($p < 0.01$) 时呈显著降低。对照有丝分裂指数为 10.7%, 而 200 Gy 时其有丝分裂指数达到最低, 仅为 1.26%。同时, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对各个有丝分裂期细胞分布也具有一定的影响。在低辐照剂量下 (10 Gy 和 20 Gy), 有丝分裂前期细胞所占比例最高, 中期和后期次之, 末期细胞数最少。并且分裂前期和末期细胞分布频率比对照低, 而中期和后期与之相反。在高辐照剂量时 (30–200 Gy), 各个时期细胞频率均较对照低,

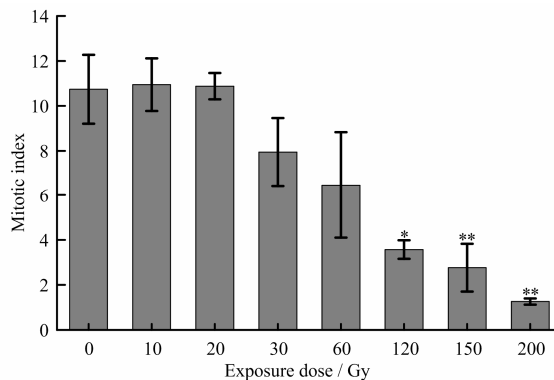


Fig.4 Mitotic index of root tip meristematic cells of wheat irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

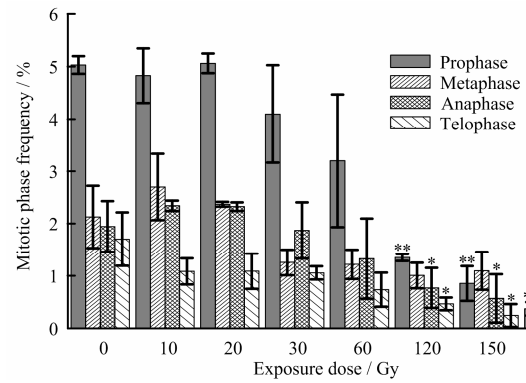


Fig.5 Mitotic phase Frequency of root tip meristematic cells of wheat irradiated by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

并与辐照剂量呈负相关。特别是在 150 Gy 和 200 Gy 时, 前期和末期细胞数量明显减少, 所观察到的分裂期细胞多处于中期和后期。这表明低剂量辐照能够促进分生组织细胞分裂, 而高剂量则明显抑制细胞分裂, 并使分裂细胞选择性停滞在分裂中期和后期。

2.4 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对小麦幼苗存活率的影响

图 6 显示的是 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照小麦幼苗存活率剂量-效应曲线。总体而言, 存活曲线呈“抛物线”状趋势。10 Gy 时较对照组略微上升, 随后随着辐照剂量增加而呈下降趋势。从图中可以看出, 30 Gy 时幼苗存活率为 86.7%, 而 60 Gy 时降低为 28.9%, 在设置的最高剂量 200 Gy 时, 其存活率仅达 2.2%。半致死(LD₅₀)剂量为 55 Gy。这一结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对其幼苗具有一定的致死效应, 并且这种致死效应与辐照剂量紧密相关。

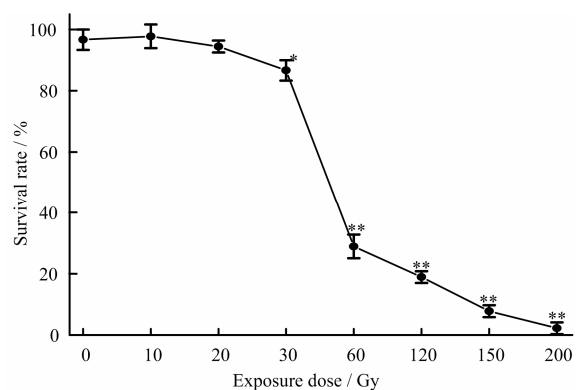


Fig.6 Survival rate of seedlings after exposure to $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams irradiation. Bars represent S.E. The asterisks represent statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3 讨论

为了更有效地将重离子辐射技术应用于植物诱

变育种,以不同植物为材料的辐射生物学效应研究日益受到重视。一些生物学参数,诸如萌发、存活、生长及有丝分裂活动等都被用于植物重离子束辐照效应研究。本研究采用中能 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对小麦种子进行辐照处理进行生物学效应分析。研究结果表明,在所设置的辐照剂量范围内,大多数辐照种子都能够正常萌发,低剂量辐照甚至能够促进种子的萌发,高剂量仅仅表现出较小的抑制作用。幼苗存活曲线则呈“抛物线”趋势,并在高剂量急剧下降。这表明小麦种子萌发与幼苗存活对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照表现出不同的敏感性,且辐照对幼苗存活率降低效应明显大于萌发抑制。Kikuchi等^[9]在采用中能 $^{14}\text{N}^{7+}$ (0–200 Gy)、 $^{20}\text{Ne}^{10+}$ (0–100 Gy)离子束辐照小麦种子的研究中也类似的报道,并与X射线相比,重离子束辐照对植株存活影响更为明显。Hase等^[10]在烟草中也报道两种重离子束辐照后存活率的降低幅度明显高于萌发率。这种辐照敏感性差异在模式植物拟南芥中有更为详细的报道^[11],Tanaka等^[11]认为重离子束辐照引起拟南芥存活反应可能由DNA修复所致,而萌发抑制则是由其他因素造成,仍需更深入地探索规律。同时,钱平平^[12]与武振华等^[13]等采用相同能量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束分别辐照大葱和紫苏种子的研究报告中也有相似的结果,即低剂量辐照均能促进种子萌发及植株存活,存活曲线也呈“抛物线”状。所不同的是,种子萌发率与存活率之间并无明显的辐照敏感差异,这可能与辐照剂量范围设置相关。

同时, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对根长及株高表现出更为显著的“低剂量刺激和高剂量抑制”效应,这被称之为“辐射毒性兴奋效应”(Radiation hormesis),该现象在植物及其他有机体包括哺乳动物,细菌和真菌的辐射效应中被广泛研究^[14]。武振华等^[13]报道离子束辐照后紫苏株高也呈现类似结果。孙兰第等^[15]研究表明30 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照明显地促进了油菜和胡麻的植株生长,随着剂量的升高,两者的株高逐渐降低。为了阐明辐照对植株生长及致死效应,本研究对根尖分生组织有丝分裂活动进行了初步研究。众所周知,根的伸长是受顶端分生组织细胞分化及新生细胞控制,这一现象被认为是植物生物物理及化学因子毒性与根生长抑制性研究中敏感的生物参数之一^[16]。研究结果表明 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照对小麦根生长的影响与根尖分生组织有丝分裂活动密切相关。低剂量辐照(10 Gy和20 Gy)对根的生长和分生组织有丝分裂均具有一定的促进作用,高剂量则表现出明显的抑制作用。尤其是120–200 Gy时,根尖分生组织分裂期细胞数量骤降,细胞周期

受到阻滞,致使根的生长停滞,导致存活率降低。Shi等^[17]研究也报道了重离子束辐照对水稻根尖分生组织细胞有丝分裂活动具有相同效应。

综上所述,本研究采用中能 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对小麦种子进行较宽剂量范围辐照处理,初步探寻辐照种子萌发,幼苗生长及存活的剂量–效应规律,根据其存活率曲线确定LET为35.6 keV/ μm 时半致死剂量为55 Gy,为碳离子束辐照小麦种子提供可靠的剂量确定依据。

参考文献

- 1 Hase Y, Yoshihara R, Nozawa S, *et al.* Mutagenic effects of carbon ions near the range end in plants. *Mutat Rec*, 2012, **731**: 41-47
- 2 Yamaguchi H, Nagatomi S, Morishita T, *et al.* Mutation induced with ion beam irradiation in rose. *Nucl. Instr Meth Phys Res Sect B*, 2003, **206**: 561-564
- 3 Okamura M, Yasuno N, Ohtsuka M, *et al.* Wide variety of flower-color and-shape mutants regenerated from leaf cultures irradiated with ion beams. *Methods Phys Res Sect B*, 2003, **206**: 574-578
- 4 Abe T, Kazama Y, Ichida H, *et al.* Plant breeding using the ion beam irradiation in RIKEN. *Cyclotrons and Their Applications*, 2007: 222-224
- 5 Yamaguchi H, Yoshihiro H, Tanaka A, *et al.* Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice. *Breeding Science*, 2009, **59**: 169-177
- 6 Matsumura A, Nomizu T, Furutani N, *et al.* Ray florets color and shape mutants induced by $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam irradiation in chrysanthemum. *Sci Hortic*, 2010, **123**: 558-561
- 7 Arase S, Hase Y, Abe J, *et al.* Optimization of ion-beam irradiation for mutagenesis in soybean: effects on plant growth and production of visibly altered mutants. *Plant Biotech*, 2011, **28**: 323-329
- 8 李振声. 我国小麦育种的回顾与展望. *中国农业科技导报*, 2010, **12**(2): 1-4
- 9 LI Zhensheng. Retrospect and Prospect of Wheat Breeding in China. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, **12**(2): 1-4
- 9 Kikuchi S, Saito Y, Ryuto H, *et al.* Effects of heavy-ion beams on chromosome of common wheat, *Triticum aestivum*. *Mutat Rec*, 2009, **669**: 63-66
- 10 Hase Y, Shimono K, Inoue M, *et al.* Biological effects of ion beams in *Nicotiana tabacum* L. *Radiat Environ Biophys*, 1999, **38**: 111-115
- 11 Tanaka A, Shikazoko N, Yokota Y, *et al.* Effects of heavy

- ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. Int J Radiat Biol, 1997, **72**(1): 121-127
- 12 钱平平, 侯岁稳, 吴大利, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐照大葱的生物学效应. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, **25**(4): 211-215
- QIAN Pingping, HOU Suiwen, WU Dali, *et al.* Biological effects of $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ions irradiation on *Allium fistulosum* L. J Radiat Res Radiat Process, 2007, **25**(4): 211-215
- 13 武振华, 张红, 王新宇, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照紫苏干种子当代效应. 原子核物理评论, 2010, **27**(3): 335-340
- WU Zhenhua, ZHANG Hong, WANG Xinyu, *et al.* Effects of Irradiation with $^{12}\text{C}^{6+}$ Ions on M1 characters of *Perilla frutescens* (L.) Britt. Nuclear Physics Review, 2010, **27**(3): 335-340
- 14 Calabrese E J, Baldwin L A. Radiation hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. Hum Exp Toxicol, 2000, **19**: 41-75
- 15 孙兰弟, 张颖聪, 吴大利, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对4种农作物种子出苗率及幼苗生长的研究. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 182-186
- SUN Landi, ZHANG Yingcong, WU Dali, *et al.* Studies of $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ions irradiation on seed germination and young seedling growth of four crops. Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 182-186
- 16 Dho S, Camusso W, Mucciarelli M, *et al.* Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. Environ Exp Bot. 2010, **69**: 17-23
- 17 Shi Jinming, Guo Jianguo, Li Wenjian, *et al.* Cytogenetic effects of low doses of energetic carbon ions on rice after exposures of dry seeds, wet seeds and seedlings. J Radiat Res, 2010, **51**: 235-242

Effects of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams irradiation on germination, plant growth and survival of wheat seeds

LIU Qingfang^{1,2} YU Lixia^{1,2} DU Yan^{1,2} ZHOU Libin¹ QU Ying¹
LU Dong¹ JIN Wenjie¹ LI Wenjian¹

¹ (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

² (University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT Wheat (*Triticum aestivum* L) seeds were irradiated with different doses of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams. Several biological endpoints including seeds germination rate, seedling root length and plant height, mitotic activities and survival rate were investigated. The results showed that in all dose range, most irradiated seeds were able to germinate normally. Low doses radiation (10–20 Gy) had a stimulation effect on seedling growth, while high doses radiation played an inhibition role. Especially root growth was strongly related to mitotic index. MI increased in low doses and decreased in high doses, and the mitotic cells were arrested in metaphase and anaphase. The survival curve showed that the “parabola” trend and the median lethal dose (LD_{50}) was 55 Gy.

KEYWORDS $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams, Wheat seeds, Seedling growth, Survival rate, LD_{50}

CLC Q691.5