

EMS、NaN₃ 和⁶⁰Co γ-射线处理对芝麻根尖的细胞学效应

刘艳阳, 梅鸿献, 崔承齐, 郑永战*, 张海洋*

(河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450008)

摘要: 为了明确理化诱变剂对芝麻诱变当代(M₁)根尖细胞的细胞学效应, 利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)、叠氮化钠(NaN₃)以及物理诱变剂⁶⁰Co γ-射线对3个芝麻品种进行诱变处理, 研究处理后根尖细胞的有丝分裂指数、染色体畸变率及微核率的变化。结果表明, 5 g/L的EMS和2 mmol/L的NaN₃处理对不同品种芝麻根尖细胞有丝分裂有促进和抑制2种效应。但随着EMS、NaN₃处理浓度和⁶⁰Co γ-射线剂量的增加以及处理时间的延长, 有丝分裂指数呈下降趋势, 而且诱发芝麻根尖细胞的核畸变和染色体畸变, 产生单微核、双微核、染色体断片、落后染色体、染色体桥和染色体团等多种畸变类型。豫芝11号 and ms86-1较三黄芝麻对高质量浓度的EMS(15 g/L)更敏感, ms86-1较豫芝11号和三黄芝麻对低浓度(2 mmol/L)NaN₃更敏感, 3个芝麻品种对⁶⁰Co γ-射线的敏感性依次为ms86-1>三黄芝麻>豫芝11号。

关键词: 芝麻; 诱变; 有丝分裂指数; 染色体畸变; 核畸变

中图分类号: S565.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)12-0047-05

Cytological Effects Induced by EMS, NaN₃ and ⁶⁰Co γ-ray on Sesame Seed

LIU Yan-yang, MEI Hong-xian, CUI Cheng-qi, ZHENG Yong-zhan*, ZHANG Hai-yang*

(Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: In order to illuminate the cytological effects of physical and chemical mutagens on the root-tip cells of the M₁ generation of sesame, mitotic index, rates of chromosome aberration and micronuclei of sesame seeds derived from three varieties, which were mutated by EMS, NaN₃ and ⁶⁰Co γ-rays, were observed by light microscope. The results showed that the low concentration of EMS (5 g/L) and NaN₃ (2 mmol/L), interestingly, both had a pair of opposite effects on the mitosis of tip cells, just depending on the varieties. As concentration (or dosages) and treatment time of the mutagens increasing, the mitotic index of root tip cells decreased. Furthermore, the EMS, NaN₃ and ⁶⁰Co γ-rays induced the chromosomal and nuclear aberration, such as single micronucleus, double micronucleus, chromosome fragment, dragging chromosome, chromosome bridges, chromosome clump, and so on. The experimental result indicated that three sesame varieties had different sensitivity to different mutagens. Yuzhi 11 and ms86-1 were more sensitive to the high-concentration EMS (15 g/L) than Sanhuang sesame; compared with the two other varieties, ms86-1 had better sensitivity to the low-concentration NaN₃ (2 mmol/L); ⁶⁰Co γ-rays exhibited the best effective role in mutating ms86-1, followed by Sanhuang sesame and Yuzhi 11.

Key words: sesame; mutagenesis; mitotic index; nuclear aberration; chromosomal aberration

收稿日期: 2012-07-31

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-15)

作者简介: 刘艳阳(1979-), 女, 河南汝阳人, 副研究员, 博士, 主要从事芝麻种质资源研究。E-mail: liuyanyang001@163.com

* 通讯作者: 郑永战(1963-), 男, 河南宝丰人, 研究员, 博士, 主要从事芝麻种质资源研究。E-mail: zhengyongzhan@yahoo.com.cn

张海洋(1963-), 男, 河南项城人, 研究员, 博士, 主要从事芝麻遗传育种研究。E-mail: haaszhy@yahoo.com

芝麻(*Sesamum indicum* L.)是我国重要的特色油料作物。目前,芝麻生产中存在的主要问题为品种抗病抗逆性差、产量低而不稳。创制变异类型丰富的突变体材料是培育芝麻抗病抗逆新品种的重要方法之一。近年来,很多学者研究了诱变对芝麻生物学特性及农艺性状的影响,确定了诱变的适宜方法和剂量^[1-4],并获得了高产、抗病、抗逆、优质的芝麻突变体^[5-13],这些变异类型丰富的突变体为芝麻遗传育种和功能基因组学研究提供了重要材料。理化诱变不仅引起了细胞外部形态结构的改变,还影响到细胞内部主要是细胞核和染色体结构乃至 DNA 遗传物质的变化,从而导致基因缺失、重复或重组等遗传效应^[14-18]。但目前关于理化诱变对芝麻细胞学效应的研究报道较少^[10]。鉴于此,选用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)、叠氮化钠(NaN_3)以及物理诱变剂 ^{60}Co γ -射线对不同芝麻品种进行处理,探讨其对芝麻根尖细胞有丝分裂、染色体畸变的影响,以期对芝麻理化诱变育种提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为豫芝 11 号、三黄芝麻和核雄性不育系 ms86-1。EMS 溶液用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值为 7)配制,EMS 质量浓度为 5、10、15 g/L; NaN_3 溶液用 0.06 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值为 3)配制,处理浓度为 2、4、6 mmol/L。

1.2 试验方法

1.2.1 种子处理方法 EMS 诱变处理:芝麻种子置于 25℃自来水中浸种 24 h,放入纱布网袋中,利用 5、10、15 g/L EMS 分别处理 4、6、8 h,期间定时摇晃,处理后用自来水冲洗 4 h,晾干备用。同时设空白对照。

NaN_3 诱变处理:芝麻种子置于 25℃自来水中浸种 24 h,分别放入纱布网袋中,利用 2、4、6 mmol/L NaN_3 分别处理 4、6、8 h,期间定时摇晃,处理后用自来水冲洗 4 h,晾干备用。同时设空白对照。

^{60}Co γ -射线辐照处理:由河南省同位素研究所提供辐照源。选择饱满、无损伤的健康种子,辐照剂量

为 200、400、600、800 Gy;剂量率为 1.65 Gy/min。同时设空白对照。

1.2.2 细胞学效应分析 参照刘艳阳等^[19]的方法进行,将处理的种子及对照置于铺有滤纸的培养皿中发芽,25℃恒温培养。待根长至 1.0~1.5 cm 时取材,用 0.002 mol/L 的 8-羟基喹啉预处理 4 h,再将根尖转移到卡诺氏固定液中固定 24 h,解离(浓盐酸:无水乙醇=1:1)10 min,切取根尖 1 mm 分生组织,改良石炭酸品红染色,压片镜检。使用 Leica DM6000 显微镜进行拍照观察,每个处理观察统计 5 个根尖,每个根尖观察统计 100 个细胞。

1.2.3 数据分析与处理 采用 DPS 数据处理软件对所获得的数据进行统计分析。细胞有丝分裂指数、染色体畸变率、微核率的计算公式如下:有丝分裂指数=有丝分裂细胞数/观察细胞数 $\times 100\%$,染色体畸变率=染色体畸变数/观察细胞数 $\times 100\%$,微核率=具有微核的细胞数/观察细胞数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 不同处理对芝麻种子根尖细胞有丝分裂的影响

由图 1—图 3 可知,用 10~15 g/L EMS 和 4~6 mmol/L NaN_3 处理,诱变后种子根尖细胞的有丝分裂指数随着处理时间延长和浓度的增加呈下降趋势。5 g/L EMS 处理 4 h 时,豫芝 11 号和三黄芝麻的有丝分裂指数分别为 10.23%和 10.90%,较 CK 分别增加了 1.22 和 0.90 个百分点,而 ms86-1 的有丝分裂指数为 9.10%,较 CK 降低了 0.90 个百分点。2 mmol/L NaN_3 处理 4 h 时,豫芝 11 号的有丝分裂指数为 10.40%,较 CK 增加了 1.39 个百分点;而 ms86-1 的有丝分裂指数为 9.00%,较 CK 降低了 1.00 个百分点。可见,低(质量)浓度 EMS 和 NaN_3 处理对不同芝麻品种根尖细胞有丝分裂有促进和抑制 2 种效应。 ^{60}Co γ -射线随着辐射剂量的增加,豫芝 11 号和三黄芝麻的根尖细胞有丝分裂指数呈下降趋势,而 ms86-1 的有丝分裂指数在 400 Gy 处理时比 200 Gy 处理增加了 1.10 个百分点,其原因有待进一步深入研究。

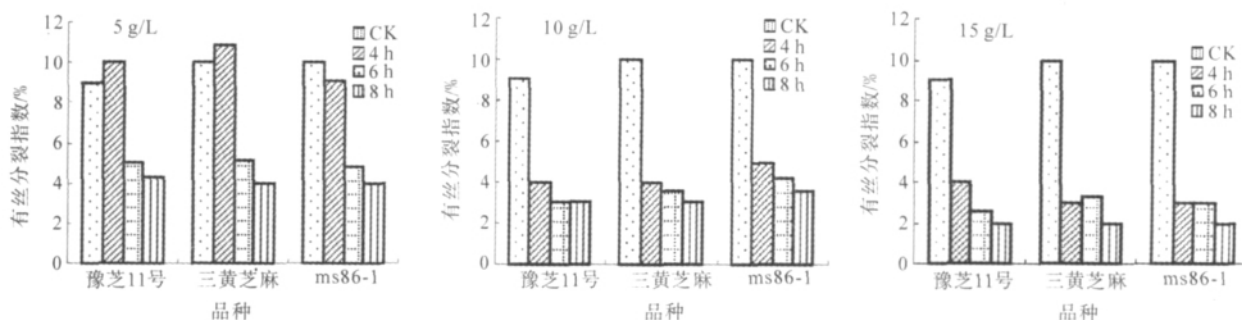
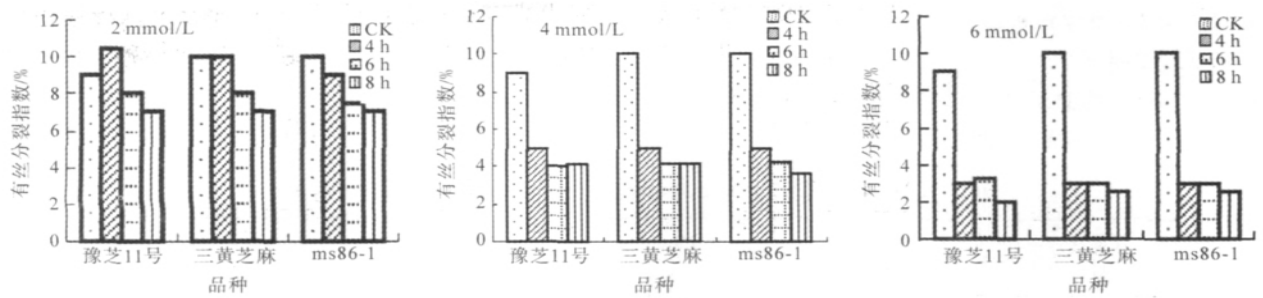
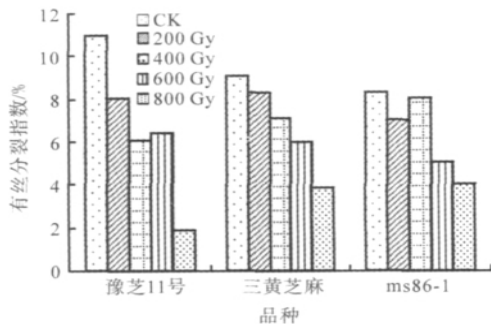
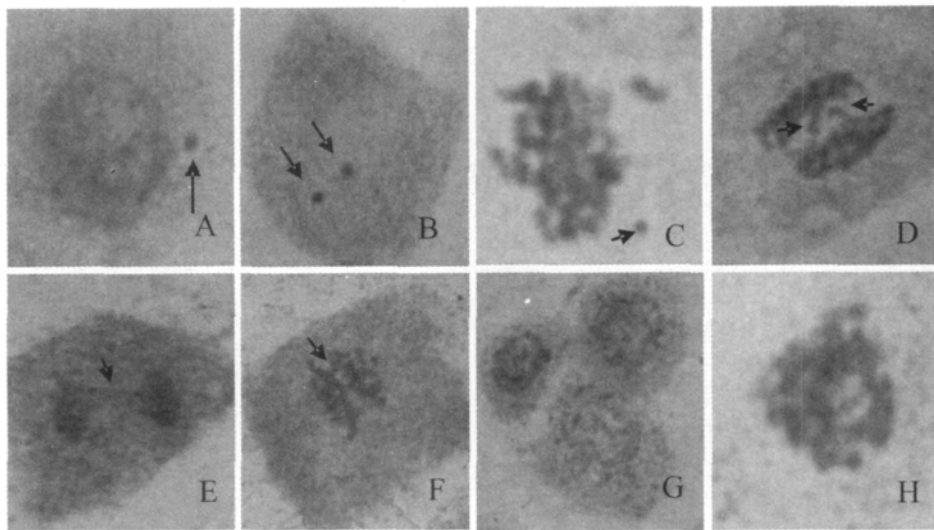


图 1 不同质量浓度 EMS 对芝麻根尖细胞有丝分裂的影响

图 2 不同浓度 NaN₃ 对芝麻根尖细胞有丝分裂的影响图 3 不同剂量⁶⁰Co γ-射线对芝麻根尖细胞有丝分裂的影响

2.2 不同处理对芝麻种子根尖细胞染色体畸变和核畸变的影响

不同诱变剂处理芝麻种子后,诱发根尖细胞的细胞核、染色体产生明显的诱变效应,表现出核畸变和染色体畸变。诱发的核畸变类型主要为单微核(图 4-A),其次为双微核(图 4-B);诱发的染色体畸变类型主要为染色体断片(图 4-C)、落后染色体(图 4-D)、染色体单桥(图 4-E)、染色体多桥(图 4-F)、不均等分裂(图 4-G)和染色体团(图 4-H)。



A. 单微核; B. 双微核; C. 染色体断片; D. 落后染色体; E. 染色体单桥; F. 染色体多桥; G. 不均等分裂; H. 染色体团

图 4 不同处理诱发芝麻种子根尖细胞染色体畸变和核畸变的类型

由表 1 可见,5 g/L EMS 和 2 mmol/L NaN₃ 处理 4 h,3 个芝麻品种均未出现微核,可能是因为处理的诱变剂浓度不够高或处理时间不够长;当处理 6 h,仅发现 ms86-1 的细胞中存在微核现象,2 种化学诱变剂处理诱发的微核率分别为 0.91% 和 0.80%。在 5~15 g/L EMS 和 2~6 mmol/L NaN₃ 范围内,同一诱变剂浓度或同一处理时间下,随处理时间延长或浓度增加,芝麻细胞总畸变率(包括微核率和染色体畸变率,下同)均呈上升趋势。15 g/L

EMS 处理 3 个芝麻品种,豫芝 11 号和 ms86-1 的细胞总畸变率高于三黄芝麻,可见,豫芝 11 号和 ms86-1 对高质量浓度的 EMS 更敏感。2 mmol/L NaN₃ 处理 3 个芝麻品种,ms86-1 的细胞总畸变率高于豫芝 11 号和三黄芝麻,表明 ms86-1 对低浓度的 NaN₃ 更敏感。

由表 2 可见,⁶⁰Co γ-射线辐射使各芝麻材料的细胞微核率和染色体畸变率都明显提高。总畸变率随着辐射剂量的增加而升高;当辐射剂量达到

800 Gy 时,总畸变率最高,并且出现了双微核和多微核现象。表明, ^{60}Co γ -射线辐射剂量越大,对芝麻细胞染色体的结构破坏越大。除了辐射剂量为 600 Gy 时 ms86-1 的总畸变率低于豫芝 11 号和三黄芝麻外,

其他 3 种辐射剂量下,ms86-1 的总畸变率均最高,而三黄芝麻在 4 种辐射剂量下的总畸变率均高于豫芝 11 号。由此可见,3 个芝麻品种对 ^{60}Co γ -射线的敏感性为 ms86-1>三黄芝麻>豫芝 11 号。

表 1 EMS 和 NaN_3 诱发芝麻种子根尖细胞的核畸变率和染色体畸变率

%

诱变剂处理	处理剂量	时间/h	豫芝 11 号		三黄芝麻		ms86-1	
			微核率	染色体畸变率	微核率	染色体畸变率	微核率	染色体畸变率
CK	0	0	0	0	0	0	0	0
EMS	5	4	0	1.00	0	1.90	0	0.94
		6	0	2.08	0	2.00	0.91	2.92
		8	2.10	4.31	2.07	4.04	2.08	3.02
	10	4	2.17	3.09	2.07	3.07	1.02	3.04
		6	3.10	6.11	2.75	5.44	4.21	7.48
		8	6.21	8.21	6.21	8.22	4.54	8.21
	15	4	5.03	8.14	4.08	7.02	4.09	7.17
		6	7.71	10.33	6.67	8.34	6.04	9.20
		8	8.23	14.32	8.19	14.27	8.09	15.20
NaN_3	2	4	0	1.01	0	0.97	0	1.02
		6	0	1.10	0	1.10	0.80	2.50
		8	1.04	3.10	0.99	3.10	2.00	3.95
	4	4	1.02	3.00	1.00	4.00	1.00	4.04
		6	3.95	5.98	3.10	5.10	3.30	4.96
		8	5.20	6.20	4.00	5.99	4.50	7.30
	6	4	4.00	6.00	3.00	6.01	2.96	5.97
		6	6.30	7.40	5.10	7.10	4.96	9.99
		8	7.09	8.10	6.72	11.69	6.72	10.04

注:EMS 的处理剂量分别为 5、10、15 g/L, NaN_3 的处理剂量分别为 2、4、6 mmol/L。

表 2 ^{60}Co γ -射线诱发芝麻种子根尖细胞的核畸变和染色体畸变率

%

处理	处理剂量/Gy	豫芝 11 号		三黄芝麻		ms86-1	
		微核率	染色体畸变率	微核率	染色体畸变率	微核率	染色体畸变率
CK	0	0	0	0	0	0	0
^{60}Co γ -射线	200	0.95	2.00	2.10	3.10	2.02	4.00
	400	3.20	4.00	3.10	5.10	3.99	6.14
	600	4.49	7.17	4.99	8.02	6.14	5.20
	800	5.19	9.47	6.76	9.78	8.04	12.01

3 结论与讨论

3.1 理化诱变对芝麻根尖细胞学效应的影响

本研究结果表明,低浓度的 EMS 和 NaN_3 处理使豫芝 11 号和三黄芝麻有丝分裂指数升高,表现为促进效应,可能是由于低浓度诱变剂处理刺激细胞分裂,使之代谢活跃,从而缩短细胞周期;而使 ms86-1 有丝分裂指数降低,表现出抑制效应,说明诱变剂处理效果存在基因型差异。较高浓度的化学诱变剂(EMS、 NaN_3)和 ^{60}Co γ -射线处理均使芝麻根尖细胞的有丝分裂指数下降,表现出抑制效应,可能

是由于诱变处理使细胞暂时或永久失去分裂能力,从而导致细胞分裂延缓。试验结果还表明,微核和染色体畸变的多少与诱变剂的剂量或辐射积累效应呈正相关。可见,芝麻根尖细胞的微核率和染色体畸变率可作为理化诱变剂对染色体伤害的指标,用于诱变剂的评价筛选,这与前人研究结果基本一致^[20-22]。

3.2 理化诱变产生微核的原因探讨

一般认为,微核的形成与不正常的有丝分裂有关,其形成本身主要是染色体畸变引起的。在本试验过程中还观察到,理化诱变剂处理后,芝麻根尖细

胞染色体的变异在有丝分裂中期的细胞中已经发生,以落后染色体和染色体断片为主,这些染色体断片或染色体在分裂过程中行动滞后,在分裂末期不能进入主核,便形成了主核之外的核块,当子细胞进入下一次分裂间期时,它们便浓缩成主核之外的小核,即形成了微核,引起基因片段的丢失和基因的重组,而染色体桥的出现会使部分细胞有丝分裂停止或致死,这与陆璃等^[21]对小麦以及谢琳等^[22]对甘蓝型油菜的研究结果一致。

3.3 不同芝麻品种对理化诱变剂的敏感性

试验结果表明,豫芝 11 号和 ms86-1 较三黄芝麻对高质量浓度(15 g/L)的 EMS 更敏感,ms86-1 较豫芝 11 号和三黄芝麻对低浓度(2 mmol/L)的 NaN₃ 更敏感,3 个芝麻品种对⁶⁰Co γ-射线的敏感性依次为 ms86-1>三黄芝麻>豫芝 11 号。可见,不同芝麻品种对不同的诱变剂及剂量的敏感性不同,这主要是遗传物质差异所造成的。诱变剂剂量过高,毒害作用较大,对芝麻的生物损伤大,M₁ 代存活率降低;剂量过低,诱变效果较差,从而大大降低有益突变的筛选效率。因此,为了获得更多生物损伤小但对生产有利的突变体,进行芝麻诱变处理时应对不同的基因型品种选择适宜的诱变处理方法。

参考文献:

- [1] 卫双玲,张体德,卫文星,等.种子辐射处理对芝麻产量及农艺性状的影响[J].华北农学报,2000,15(1):32-36.
- [2] 尹美强,张家良,马腾才,等.梯度磁场对芝麻种子生物效应的影响[J].中国生态农业学报,2006,14(1):51-53.
- [3] Zhang L, Jia H C, Fang T, et al. Biological effects of low-energy C ion implantation on sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Front Biol China, 2007, 2(2): 184-186.
- [4] Begum T, Dasgupta T. A comparison of the effects of physical and chemical mutagens in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Genet Mol Biol, 2010, 33(4): 761-766.
- [5] Murty G S S. Induced mutants for the improvement of sesame and hybrid seed production[C]//Sesame improvement by induced mutations. Vienna: IAEA in Austria 2001:99-112.
- [6] 李英德,陈清梅.芝麻雄性不育突变体的诱变及初步遗传研究[J].中国油料作物学报,1998,20(1):24-27.
- [7] Sarwar G, Haq M A. Radiation induced variability for the improvement of yield and yield components in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Sesame and Safflower Newsl, 2005, 20: 42-47.
- [8] Sarwar G, Haq M A, Chaudhry M B, et al. Evaluation of early and high yielding mutants of sesame (*Sesamum indicum* L.) for different genetic parameters [J]. J Agric Res, 2007, 45(4): 125-133.
- [9] Chowdhury S, Datta A K, Saha A, et al. Radiation-induced two oil rich mutants in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Indian J Sci Technol, 2009, 2(7): 51-52.
- [10] Kumar G, Yadav R S. Induced intergenomic chromosomal rearrangements in *Sesamum indicum* L. [J]. Cytologia, 2010, 75(2): 157-162.
- [11] Diouf M, Boureima S, Diop T, et al. Gamma rays-induced mutant spectrum and frequency in sesame [J]. Turkish J Field Crops, 2010, 15(1): 99-105.
- [12] Pawar N, Pai S, Nimbalkar M, et al. Induction of chlorophyll mutants in *Zingiber officinale* Roscoe by gamma rays and EMS [J]. Emir J Food Agric, 2010, 22(5): 406-411.
- [13] Zoumpoulakis P, Sinanoglou V J, Batrinou A, et al. A combined methodology to detect γ-irradiated white sesame seeds and evaluate the effects on fat content, physicochemical properties and protein allergenicity [J]. Food Chem, 2012, 131: 713-721.
- [14] Wang L Q. Radiation breeding of crop in Japan [J]. Atomic Agriculture Translation, 1983, 4(1): 1-4.
- [15] 张旭,杨兆顺.诱变技术在玉米育种中的应用[J].天津农业科学,2004,10(4):25-27.
- [16] 王新新,高健,杨培浩,等.⁶⁰Co γ-射线辐照毛竹种子的细胞学诱变效应[J].核农学报,2008,22(6):770-775.
- [17] 刘勇,王良群,王呈祥,等.高粱体细胞克隆变异辐射诱导研究[J].山西农业科学,2009,37(8):15-16.
- [18] 安伟,樊智翔,马海林,等.EMS诱变技术及其在创造玉米新种质中的应用[J].山西农业科学,2008,36(12):37-39.
- [19] 刘艳阳,郑永战,梅鸿献,等.芝麻染色体常规制片技术关键因子的优化研究[J].河南农业科学,2011,40(8):116-119.
- [20] 周立人,吴雪琴,魏晓飞,等.⁶⁰Co γ-射线辐照不同麻种种子的细胞学效应[J].安徽农业大学学报,2003,30(1):10-14.
- [21] 陆璃,吕金印,刘军,等.⁶⁰Co γ-射线辐照对小麦种子根尖细胞有丝分裂的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(9):57-62.
- [22] 谢琳,牛应泽,郭世星.航天搭载与 NaN₃ 处理对甘蓝型油菜根尖细胞的诱变效应[J].中国农业科学,2008,41(12):4250-4256.