^{60}Co γ 辐照对冬小麦幼苗* 保护酶同工酶表达的影响

戚微娜[a],吕金印[b],赵 军[b],高俊凤[b]
(西北农林科技大学 a. 理学院;b. 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了探讨^{60}Co γ 射线的诱变机理,用 0,100,300,500 Gy 剂量^{60}Co γ 射线对陕合 6 号和长武 131 2 个小麦品种的种子进行辐照处理,并采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳对二叶一心期小麦叶片和根中的过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶进行了分析。结果表明,2 个品种的小麦种子经 100 Gy ^{60}Co γ 辐照处理后,其酶谱带数与对照相比变化不大;经 300 和 500 Gy ^{60}Co γ 辐照处理后,小麦叶片中 CAT 和 SOD 同工酶谱带消失,POD 同工酶谱带仍然存在,且增加了 4 条谱带;小麦根中 3 种保护酶同工酶谱带数均有不同程度增加,POD 同工酶增加了 1 条 Rf 值为 0.411 的谱带,CAT 同工酶增加了 2 条 Rf 值分别为 0.488 和 0.524 的谱带。以上结果说明,小麦根较叶片对辐射更加敏感。

[关键词] ^{60}Co;小麦;过氧化物酶同工酶;过氧化氢酶同工酶;超氧化物歧化酶同工酶
[中图分类号] S512.1^{+}10.352 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)07-0123-04

Effects of ^{60}Co γ ray irradiation on protective enzymes isozymes expression in winter wheat

QI Wei-na[a],LÜ Jin-yin[b],ZHAO Jun[b],GAO Jun-feng[b]
(a. College of Sciences, b. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to define the mutated mechanism,two different genotypes seed of Shaanhe 6 and Changwu 131 were adopted,and the seeds were radiated by ^{60}Co γ ray under different doses of 0,100,300, and 500 Gy,respectively. When the wheat grows to the period of three leaves cultured with water,and then peroxidase (POD),catalase (CAT) and superoxide dismutade (SOD) isozymes of wheat were analyzed. The results showed that the isozymes changed little when radiated by 100 Gy doses compared with control. But CAT and SOD isozymes disappeared in the leaves,POD still existed,and increased 4 bands when radiated by 300 and 500 Gy doses. But bands of three kinds of isozymes in the roots had to different degree increased:isozymes of POD increased a band of Rf 0.411,and CAT increased two bands of Rf 0.488 and Rf 0.524,which means the roots are more sensitive to radiation than the leaves.

Key words: ^{60}Co;wheat;peroxidase isozymes;catalase isozymes;superoxide dismutade isozymes

我国农业生态区域复杂多样,因而对农作物品种的需求也是多样的。辐射诱变育种技术不仅可以创造出种子库中所没有的新材料,而且周期短、见效快,是现阶段人们常用的一种育种技术,目前在水稻、小麦等农作物及蔬菜园艺作物中均有广泛应用[1-5]。同工酶分析是选择突变体的重要指标之一,也可作为作物辐射效应变化的一种生化分析手段,不仅具有可靠性和可重复性,而且还可以与形态证

* [收稿日期] 2006-12-13
[基金项目] 西北农林科技大学校重点科研项目
[作者简介] 戚微娜(1981 -),女,辽宁本溪人,在读硕士,主要从事放射生物学和植物辐射诱变育种研究。
E-mail:qina1981@sina.com。
[通讯作者] 吕金印(1960 -),男,陕西岐山人,教授,博士,主要从事植物生理及核农学研究。E-mail:Jinyinlu@163.com。

据互相补充,为鉴别、预测、筛选辐照变异提供了便捷的手段[6]。过氧化物酶(POD)同工酶、过氧化氢酶(CAT)同工酶和超氧化物歧化酶(SOD)同工酶是常用的指示酶,已广泛应用于植物生长发育各阶段的分析中[7]。本研究采用^{60}Co γ射线辐照处理小麦种子,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,分析小麦叶片和根中3种保护酶同工酶的变化,旨在为不同品种辐射剂量的筛选及辐射诱变效应的观察提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

选用陕合6号和长武131 2个冬小麦品种,分别采用0(对照),100,300和500 Gy ^{60}Co γ射线辐照处理干种子。小麦种子均由西北农林科技大学农学院提供。

1.2 方 法

1.2.1 材料的培养 挑选对照和经^{60}Co γ射线辐照处理且籽粒饱满的小麦种子,置于铺有2层滤纸的培养皿中,上面铺两层纱布,在25 ℃恒温培养箱中恒温培养,待露白后,将种子转移至光照培养箱中,每天光照12 h,并用Hoagland营养液培养,每2 d更换1次营养液,待幼苗长至二叶一心期时采样。

1.2.2 粗酶液的提取[8] 分别取二叶一心期小麦的叶片和根部,加入0.05 mmol/L、pH为7.8的磷酸缓冲液(含体积分数1%PVPP),冰浴研磨成匀浆,12 000 r/min离心20 min,取上清液,作为粗酶液。

1.2.3 同工酶电泳及染色 (1)同工酶电泳。采用非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法。POD、CAT和SOD电泳时所用分离胶(pH 8.8)质量分数分别为7.5%,7.0%和8.0%,浓缩胶(pH 6.8)质量分数均为3.0%,电极缓冲液为Tris-Gly缓冲系统(pH 8.8),点样量30 μL,15 mA恒流电泳,时间约8 h。

(2)染色。POD采用醋酸联苯胺法染色[9]。将凝胶浸入染色液(联苯胺贮液20 mL+蒸馏水50 mL+体积分数0.6 % H_2O_2 20 mL(用前再加H_2O_2))中,20 min左右即出现清晰可见的蓝色条带,放入蒸馏水中保存即可。

CAT凝胶先置于染色液A(体积分数3.0% H_2O_2 5 mL+0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)10 mL+0.06 mol/L $Na_2S_2O_3$ 7 mL+蒸馏水78 mL)中15 min,水洗2~3次放入染色液B(0.09 mol/L KI 5 mL+冰醋酸1 mL+蒸馏水95 mL)中染色2 h,凝胶上有CAT活性的部位无色,其余部位为深蓝色[10]。

SOD凝胶首先置于质量分数0.2%NBT(氮蓝四唑)中,黑暗条件下浸泡20 min,水洗2~3次后,再放入染色液C(TEMED(四甲基乙二胺)1.4 mL+质量分数0.004%核黄素350 μL +0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH7.8) 36 mL+蒸馏水12 mL)中,黑暗条件下浸泡15 min,蒸馏水洗2次,放入染色液D(0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH7.8)100 mL+质量分数10.0%EDTA(乙二胺四乙酸)32 μL)中,32 W光照,直至凝胶上有SOD活性的部位无色、而其余部位为蓝色时照相[11]。

2 结果与分析

2.1 不同剂量^{60}Co γ辐照对小麦过氧化物酶(POD)同工酶的影响

由图1可以看出,陕合6号与长武131 2个品种之间POD同工酶谱带差异不大,只是染色深浅不同。两个小麦品种的叶片经不同剂量^{60}Co γ辐照后,与对照相比,100 Gy辐照处理的POD同工酶谱带数无变化;300和500 Gy辐照处理的POD同工酶谱带数发生了明显变化,增加了4条谱带,分别是Rf 0.552,Rf 0.614,Rf 0.688和Rf 0.755。辐照后,POD同工酶谱带颜色变化明显,其中Rf 0.839和Rf 0.899颜色变深,可能是因为蛋白含量增加,而原有的其余谱带颜色均表现为随着辐照强度的增加而逐渐变浅,这可能是因为蛋白含量减少的缘故。

经300和500 Gy ^{60}Co γ辐照处理后,与对照相比,陕合6号和长武131 2个小麦品种的根中POD同工酶均增加了1条Rf值为0.411的谱带,且各谱带颜色均随辐射强度增加逐渐变深,表明蛋白含量增加。

2.2 不同剂量^{60}Co γ辐照对小麦过氧化氢酶(CAT)同工酶的影响

由图2可知,不同剂量^{60}Co γ处理对小麦CAT同工酶谱带影响较大。陕合6号种子经100 Gy ^{60}Co γ处理后,小麦叶片和根中CAT同工酶谱带数没有发生变化;300和500 Gy ^{60}Co γ处理后,叶片中CAT同工酶谱带基本消失,而根中CAT同工酶谱带也发生了明显变化,原有的2条带完全消失,出现了2条新的谱带(Rf 0.488,Rf 0.524)。经^{60}Co γ辐照后,陕合6号叶片和根CAT同工酶谱带颜色均随辐照剂量的增大而逐渐变浅,可能是酶蛋白含量或表达量减少所致。

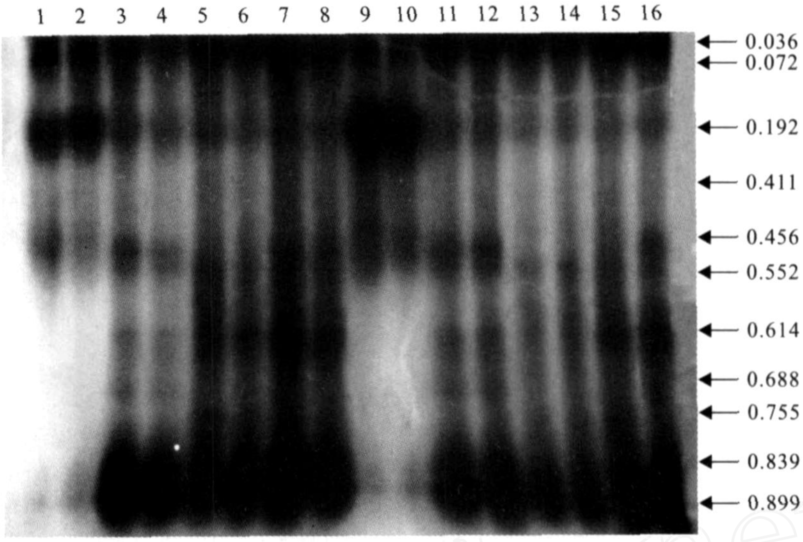

图 1　^{60}Co γ 辐照对小麦叶片和根 POD 同工酶的影响

1～4. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号叶片;5～8. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号根;9～12. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的长武 131 叶片;13～16. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号根

Fig. 1　Effects of peroxidase isozymes spectrum of leaves and root of wheat radiated by ^{60}Co γ

1 - 4. Leaves of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;5 - 8. Roots of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ. 9 - 12. Leaves of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;13 - 16. Roots of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ

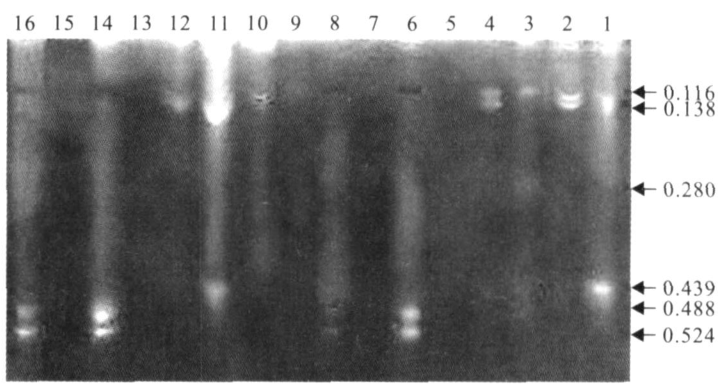

图 2　^{60}Co γ 辐照对小麦叶片和根 CAT 同工酶的影响

1,3,5,7. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号叶片;2,4,6,8. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号根;9,11,13,15. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的长武 131 叶片;10,12,14,16. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的长武 131 根

Fig. 2　Effects of catalase isozymes spectrum of leaves and root of wheat radiated by ^{60}Co γ

1,3,5,7. Leaves of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;2,4,6,8. Roots of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;9,11,13,15. Leaves of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;10,12,14,16. Roots of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ

长武 131 种子经 100 Gy ^{60}Co γ 射线处理后,与对照相比,叶片中的 CAT 同工酶增加了 1 条 Rf 为 0.439 的谱带,且谱带颜色明显变亮,表明蛋白含量增加;根中缺失 1 条 Rf 为 0.280 的谱带。经 300 和 500 Gy ^{60}Co γ 处理后,长武 131 叶片和根中的 CAT 同工酶谱带变化与陕合 6 号一致,但酶谱带颜色要深于陕合 6 号。

2.3　不同剂量^{60}Co γ 辐照对小麦超氧化物歧化酶(SOD)同工酶的影响

由图 3 可看出,2 个小麦品种经^{60}Co γ 辐照后,SOD 同工酶谱带数的变化基本一致,且谱带颜色随辐射剂量的升高而逐渐变浅,其中 500 Gy ^{60}Co γ 辐

照后 2 个小麦品种叶片中的 SOD 同工酶谱带几乎消失。2 个小麦品种叶片中原有 5 条 SOD 同工酶谱带(Rf 0.079,Rf 0.410,Rf 0.517,Rf 0.598,Rf 0.755),在 300 Gy 辐照下,Rf 0.755 谱带均消失;根中原有 6 条谱带(Rf 0.079,Rf 0.410,Rf 0.517,Rf 0.598,Rf 0.661,Rf 0.755),经 300 Gy ^{60}Co γ 幅照后,Rf 0.661 谱带消失。

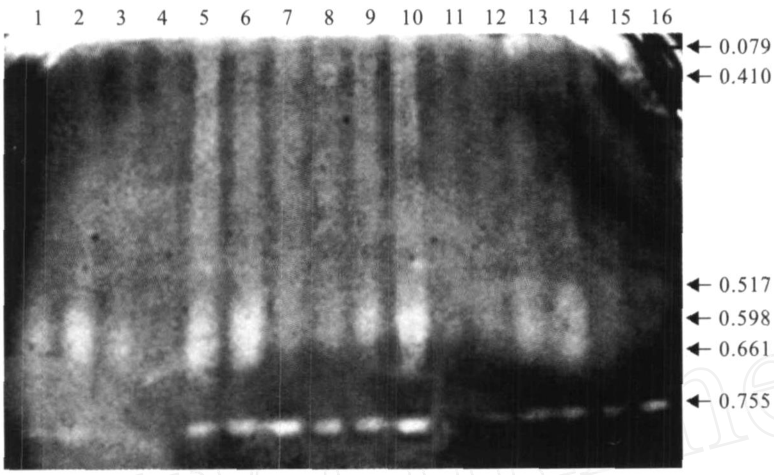

图 3 ^{60}Co γ 辐照对小麦叶片和根 SOD 同工酶的影响

1～4. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号叶片;5～8. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号根;9～12. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的长武 131 叶片;13～16. 辐射剂量分别为 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ 射线辐照的陕合 6 号根

Fig. 3 Effects of peroxidase isozymes spectrum of leaves and root of wheat radiated by ^{60}Co γ

1 - 4. Leaves of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;5 - 8. Roots of wheat of Shaanhe 6 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;9 - 12. Leaves of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ;13 - 16. Roots of wheat of Changwu 131 radiated by the doses of 0,100,300,500 Gy ^{60}Co γ

3 讨 论

γ 射线的高能量和强穿透能力,能有效诱发生物体染色体畸变,产生一些新的突变体,同时也可以诱发生物本身的自我修复功能,提高抗逆境功能[4]。

酶是基因表达的产物,同工酶谱的差别反映了不同材料之间基因型的差异[12]。POD、CAT 和 SOD 均为植物体内的保护酶。SOD 可以催化植物体内过多的氧自由基发生歧化反应,生成过氧化氢,而过氧化氢又可以被 POD 和 CAT 清除,从而阻止对细胞破坏性的氧化作用[13]。本研究中,小麦经 100 Gy ^{60}Co γ 射线辐照后,3 种保护酶及其同工酶含量均降低,可能是植物体内的过氧化氢含量增多所致。经 300 和 500 Gy ^{60}Co γ 照射后,叶片中 3 种同工酶谱带中只有 POD 同工酶表现有很强的活性,CAT 和 SOD 同工酶均已失活,这可能与植株出现早衰现象有关,同时也表明 POD 是辐照处理后植物活性氧清除系统中作用最持久的一种同工酶。

小麦根中 POD 同工酶含量随着辐射剂量的增加而逐渐增高;CAT 同工酶变化较大,原有条带消失,另出现 2 条新谱带;SOD 同工酶含量降低,且 1 条谱带消失。

本研究通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明,小麦经过^{60}Co γ 射线辐照后,叶片中 3 种保护酶同工酶条带染色颜色均随着剂量的增加而逐渐变浅或消失,而根中 3 种保护酶同工酶谱带随着辐照剂量的增加变化较大,原有的谱带颜色逐渐变浅或消失,并且出现了新的同工酶谱带,表明^{60}Co γ 射线辐照对小麦根的损伤程度较大,这与余泽高[14]的研究结果相一致。

核辐射诱变所造成的伤害及诱变效应具有随机性和潜在性,辐射诱变的机理较为复杂。本研究仅对两个冬小麦品种的 3 种保护酶同工酶进行了分析,有关辐射对这 3 种同工酶的基因表达调控的影响机制,还需进一步探讨。

[参考文献]

[1] 沈圣泉. γ 射线诱发水稻长粒型突变体的研究[J]. 核农学报,2004,18(5):340-343.

[2] 尹淑霞. ^{60}Co-γ 射线辐射对黑麦草种子发芽及 POD 同工酶的影响[J]. 中国草地,2005,27(1):75-79.

(下转第 130 页)

加[11-12];但如果是导致了 Cl^- 进入膜内、膜处于超极化状态不能兴奋,突触后膜的静息电位不能消失,试虫则发生瘫软麻痹,肌肉难以收缩,马氏管的皱褶数也不会增多[13]。因此,CLB 虽然影响了其作用位点氯离子通道的变化,但这种影响是导致 Cl^- 进入膜内还是流向膜外,还有待进一步的试验研究。

CLB 作用于虫体后引起试虫马氏管肌肉层的收缩,肌肉收缩的结果应该使马氏管直径缩小。但本研究表明,CLB 可导致试虫马氏管及其基部的球体扩张,中性红在马氏管内为颗粒状,且长时间不能从马氏管中排出。其原因可能是 CLB 在使试虫产生其他中毒症状的同时,破坏了马氏管的吸收 - 排泄循环方式,其吸收过程不断进行而排出过程中断,使进入马氏管内的物质积累,导致其直径增大。马氏管是昆虫重要的排泄器官,有毒物质进入虫体后的排毒代谢途径之一,就是经过马氏管将其排出体外,CLB 对试虫马氏管排泄机能的损伤可进一步加强其对试虫其他组织的伤害,但 CLB 是否对马氏管组织的细胞产生伤害尚不清楚。

试虫取食植物源有毒物质后,常影响其中肠的消化酶活性,对围食膜产生伤害等[8,13-14]。同样,试虫取食 CLB 后也使其中肠围食膜遭到破坏,肠壁细胞层的厚度显著变薄;但其是抑制了中肠细胞对围食膜的分泌途径或是破坏了分泌细胞,对中肠组织的细胞是否也产生了破坏,尚需继续进行研究。

[参考文献]

[1] 郭 亮,柴慧霞,谢扬高,等. 马桑内酯点燃大鼠海马脑片 CAI 的双脉冲抑制观察[J]. 华西医科大学学报,1992,23(4):399-402.

[2] 徐小平,郭 平,宋玉如. 马桑内酯对大鼠脑内γ-氨基丁酸和谷氨酸含量的影响[J]. 华西医科大学学报,1991,22(2):213-215.

[3] 李孟楼,庄世宏,宗 娜. 马桑毒素 B 对粘虫几种生理生化指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(6):54-58.

[4] Ozoe Y, Hasegawa H, Mochida K, et al. Picrodendrins, a new group of picotoxane terpenoids: structure-activity profile of action at the $GABA_A$ receptor-coupled picrotoxinin binding site in rat brain[J]. Biosci Biotech Biochem,1994,58:1506-1507.

[5] 李孟楼,郭新荣. 马桑毒素杀虫机理研究进展[J]. 西北农业学报,1998,7(5):30-32.

[6] 马希汉,郭新荣,李孟楼. 马桑毒素初提物对黑肩毛胸榆叶甲取食及生殖影响[J]. 西北林学院学报,1995,10(1):64-67.

[7] 李孟楼,热孜万古丽,郭新荣. 昆虫学研究进展[M]. 北京:中国林业出版社,1997:105-109.

[8] 李孟楼,郭新荣,庄世宏. 马桑毒素致毒后试虫酯酶同工酶变化的时序分析[J]. 西北林学院学报,2000,15(4):57-61.

[9] 李孟楼,郭新荣,唐光辉. 侧柏毒蛾幼虫酯酶对马桑毒素及 4 种杀虫剂的应激性反应[J]. 西北农业学报,2000,9(3):23-27.

[10] 李孟楼,王 倩,唐光辉. 马桑毒素 B 对几种林木害虫呼吸代谢的影响[J]. 西北农业学报,1998,7(5):48-51.

[11] 张克斌,谭六谦. 昆虫生理[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1989:166-167.

[12] 张友军,张文吉,韩熹莱. 杀虫剂分子靶标γ-氨基丁酸 A 型受体(一)[J]. 昆虫知识,1996,33(4):244-247.

[13] 刘惠霞,赵德金,钱 洪. 苦皮藤麻醉成分对粘虫生理生化指标的影响[J]. 西北农业大学学报,1992,20(3):37-41.

[14] 张 兴,王兴林,冯俊涛. 植物性杀虫剂川楝素的开发研究[J]. 西北农业大学学报,1993,21(4):1-5.

(上接第 126 页)

[3] 严海燕. 小麦辐射突变体及原始品种不同发育期酯酶、过氧化物酶同功酶分析[J]. 武汉植物学研究,2005,23(4):342-346.

[4] 黄训端. ^{60}Co γ射线辐照对花魔芋同工酶与品质的影响[J]. 激光生物学报,2005(6):213-217.

[5] Hayashi T, todorki S, Nagao A. Effect of Gamma irradiation on the membrane permeability and lipid composition of patato tuber[J]. Environment Experiment Botany,1992(32):265-271.

[6] 孙 静. 盐胁迫对小麦过氧化物酶同工酶基因表达的影响[J]. 麦类作物学报,2006,26(1):42-44.

[7] Thomas B, Chain F. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. Plant physiol,1997(59):411-416.

[8] 陈文强. 天麻 3 种变型过氧化物酶的同工酶研究[J]. 西北植物学报,2005,25(8):1665-1668.

[9] 蒋全熊. 我区富士苹果不同品系过氧化物酶同工酶研究[J]. 宁夏农学院学报,2003,24(1):14-18.

[10] 袁海娜. 冬瓜贮藏过程中 PPO、POD 和 CAT 活性及同工酶研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(1):61-63.

[11] 罗广华. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯,1983(6):44-45.

[12] 尹淑霞. ^{60}Co-γ辐射对多年生黑麦草植株过氧化物同工酶和酯酶同工酶的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2005(5):596-598.

[13] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版社,2000.

[14] 余泽高. ^{60}Co γ射线辐射小麦种子对生长发育的影响[J]. 湖北农学院学报,2003,2(1):1-4.