

^{60}Co - γ 射线对簇毛麦愈伤组织细胞的分裂及染色体的影响

周爱芬¹ 夏光敏² 陈惠民 何世贤³ 陈建爱³

(山东大学生物系 济南 250100)

摘要 为了探明 ^{60}Co - γ 射线对簇毛麦愈伤组织的细胞分裂及染色体变异的影响,采用 10-300Gy 剂量辐照,结果表明 70~300Gy 引起细胞间期致死,30-60Gy 引起分裂致死。10-60Gy 均能引起染色体的结构及数量变异,其中有利于融合双方染色体整合或重组的片段化在 60Gy 辐射后第 3 天频率最高。愈伤组织在继代后的天数明显影响辐照效应。

关键词 簇毛麦,愈伤组织, ^{60}Co - γ 射线,染色体变异

植物体细胞杂交近年来取得了较大进展,其中重要原因之一是建立了不对称融合方法。此方法对融合一方一供体予以射线(多数用 γ -射线)处理,使供体的部分染色体基因与受体的 DNA 整合或重组,从而较易得到比较稳定的融合体,提高远缘不亲和的种间或属间体细胞杂交获得成功的可能性^[1]。已往的工作对供体的最适辐照剂量、辐照后染色体的变异情况及其动态变化,以及辐射效应与供体本身的生理状态之间的关系等研究甚少。然而上述因素无疑对融合体的发育存在着重要的影响。为此,我们报道本实验结果以供体细胞杂交工作者参考,同时也为 γ -射线对植物细胞及染色体的影响累积部分资料。

1 材料与方法

簇毛麦(来源于山东省农科院)幼胚愈伤组织的诱导与培养同小麦^[2]。经过一年的继代和筛选形成了生长较快、黄白色,大小约 1.5mm 的颗粒结构,每 12~13d 继代一次。此种愈伤组织可分离出大量的原生质体。

取继代后第 2、4、5、7 和 10d 的愈伤组织进行 ^{60}Co - γ 射线辐照,剂量分别为 10、20、30、50、60、70、100 和 300Gy,剂量率为 1.30Gy/min。去壁低渗火焰干燥法进行染色体制片观察辐照后染色体的变异情况^[3]。

2 结果与分析

簇毛麦愈伤组织在继代后 4~5d 处于分裂高峰期。取此时愈伤组织用 8 种剂量的

1. 现在工作单位:中国人民解放军济南医学高等专科学校生化教研室。
2. 通讯联系人。
3. 山东省农科院原子能农业应用研究所。

本文于 1995 年 1 月 16 日收到。

^{60}Co - γ 辐照。制片观察其染色体状况及细胞分裂状况。结果如下。

2.1 不同剂量的 ^{60}Co - γ 射线对簇毛麦愈伤组织细胞分裂的影响

簇毛麦愈伤组织经 10~20Gy- γ 射线辐照后,细胞持续分裂,至今已继代 1 年,愈伤组织仍正常生长;经 50、60Gy 辐照的愈伤组织很快全部变褐死亡。经 30Gy 辐照的在继代两次(约 1 个月)后也变褐死亡。细胞学观察表明,30~60Gy 的 γ -辐照能引起细胞的分裂致死,即细胞受照射后经历一次或多次分裂后丧失了继续分裂的能力和代谢活动的功能^[4]。经 70Gy 以上剂量的 γ -辐照后的愈伤组织很快变褐,引起细胞的间期致死,即细胞受照射后未经分裂就死亡^[4]。10~60Gy ^{60}Co - γ 射线辐照对细胞分裂的影响还表现在使分裂延缓和分裂节律的改变(表 1)。

表 1 不同剂量辐照的细胞分裂效应

Table 1 Effect of γ -ray on cell division

Dose/Gy	10	20	30	50	60
The time required for the occurrence of cell division after radiation/d	0	1	2	3	3
The time required for the occurrence of cell division peak after radiation/d	3	3	5	5	3

2.2 不同剂量的 ^{60}Co - γ 射线对簇毛麦染色体的影响

10~60Gy 的 ^{60}Co - γ 射线辐照均能引起染色体变异(见图版 I-2-6)。在 10~60Gy 剂量范围内,随着照射剂量的升高,变异率(染色体发生变异的细胞占总分裂细胞的百分数)上升。辐照后染色体变异的动态变化情况如图 1 所示:经 30~60Gy γ -辐照后的分裂细胞,在

辐照后第 3 天染色体变异率最高,达 80% 以上;10~20Gy 辐照后的分裂细胞染色体变异率在辐照的当天及辐照后第 5 天较高,但均在 50% 以下。对当代及继代后的经 10~60

表 2 愈伤组织经 10~60Gy ^{60}Co - γ 射线处理后达到分裂高峰期时的染色体分析

Table 2 Chromosome analysis of the radiated calli at the peak of cell division after subculture

Dose/Gy	No. of cells observed	Diploidy cell		Tetra-ploidy cell		Supercoiled chromosome		Chromosome fragments		Chromosome ring	Chromosome and frag-	Chromosome fragments and chromosome ring		
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%			No.	%	
10	704	687	96.7	3	0.43	5	0.71	13	1.85	1	0.14	-	-	
20	386	327	84.7	1	0.26	-	-	38	7.25	-	-	3	0.78	
30	164	145	88.4	1	0.61	2	1.22	9	5.49	4	2.44	-	-	
50	48	3	6.25	-	-	1	2.83	33	68.75	-	-	-	-	
60	306	1	2.28	-	-	1	0.33	243	79.43	3	0.98	21	6.86	
Dose/Gy	Dicertric chromosome		Chromosome coherence		Micronuclear		Micronuclear chromosome fragments		Micronuclear and frag-		Aneuploidy cell			
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	< 14		> 14	
10	-	-	-	-	1	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	16	4.14	1	0.96	-	-	7	1.81	3	0.78	-	-
30	-	-	3	1.83	2	1.22	-	-	1	0.61	-	-	-	-
50	5	10.42	1	2.83	-	-	1	2.89	3	8.49	1	2.83	-	-
60	1	0.33	13	4.25	2	0.65	11	3.59	-	-	1	0.33	-	-

表3 经辐照的愈伤组织继代后分裂高峰时的染色分析

Table 3 Chromosome analysis of subcultured calli at the peak of cell division after radiation

The term of subculture	Chromosome Dose/Gy	No of cells observed	Diploidy cell		Tetra-ploidy cell		Superdiploidy cell(>14)		Aneuploid		Other aberrations	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
			First term	10	46	18	39.1	-	-	-	-	25
20	65	7		10.8	-	-	-	-	50	76.9	8	12.3
30	44	3		6.82	1	2.28	8	18.2	15	34.1	17	38.6
50	30	7		23.3	-	-	4	13.3	17	56.7	2	6.7
60	7	1		14.3	-	-	-	-	4	57.1	2	28.6
Second term	10	169	64	37.3	-	-	-	-	97	57.3	8	5.4
	20	76	27	35.5	1	1.4	-	-	39	51.3	9	11.8
	30	7	3	42.9	-	-	-	-	1	14.2	3	42.9
	50	no cell in division										
	60	no cell in division										

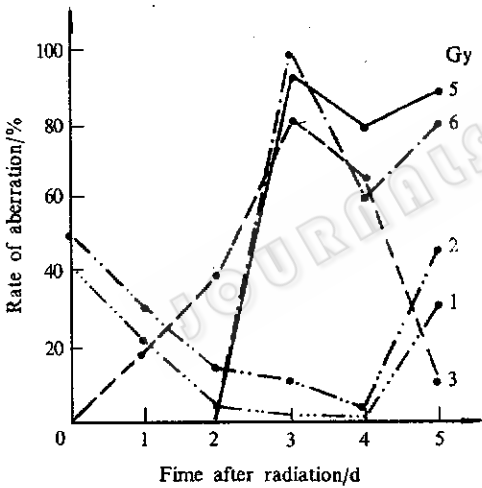


图1 辐照后1~5d的染色体变异率

Fig.1 A borration frequency after 1-5 days of radiation

Gy γ-辐照的愈伤组织达到分裂高峰时的分裂细胞的染色体变异情况的分析如表2和表3所示。由表可看出,10~30Gy γ-射线辐照后分裂细胞中仍以正常的二倍体为主(84.7%~96.7%),继代后二倍体明显减少(6.82%~39.1%),说明低剂量的γ-射线造成的伤害延至继代分裂才表现出来;50-60Gy γ-射线处理后的愈伤组织分裂细胞正常2倍体仅占2.88%~6.25%,变异率在90%以上,变异中以染色体断裂为主,占70%左右,可见较大剂量的γ-射线可直接作用于染色体DNA引起断裂。继代后,细胞发生染色体丢失,以4-13条的缺体占多数(表3)。未经辐照的簇毛麦愈伤组织在分裂高峰时的染色体情况为:二倍体(图版1-1)92.4%;四倍体2.6%,超二倍体3.1%,缺体1.9%,未见到明显的结构变异。

在染色体分析过程中,我们着重分析了辐射后染色体的片段化率(染色体发生断裂的分裂细胞占总的分裂细胞的百分数)及片段化高峰期(表4)。因为染色体断片的存在可增加供体部分基因与受体染色体重组的机会。此外,若片段化高峰期有与丝分裂高峰期重合或临近,则供体此时能提供最多量的含断片细胞,有利于不对称核融合的发生。

经60Gy γ-辐照后的愈伤组织片段化率最高,并在辐照后第3天同时达到片段化高峰和有丝分裂高峰。

表 4 10~60Gy γ -辐照后染色体片段化的情况Table 4 State of chromosome fragmentation after 10~60 Gy γ -radiation

Dose/Gy	10	20	30	50	60
Fragmentation frequency at the fragmentation peak after radiation/%	26.36	17.3	43.09	71.64	89.88
The time required for the occurrence of fragmentation peak after radiation/d	0	5	3	5	3
The time required for the occurrence of cell division peak after radiation/d	3	3	5	5	3

2.3 照射时愈伤组织的生理状态对辐射效应的影响

以上实验所用材料是继代后 4~5 天处于分裂高峰期的簇毛麦愈伤组织,由实验结果我们认为 60Gy 的辐照剂量比较适宜。那么,同一继代周期中的其它时期的辐射效应如何?分别对继代后第 2、7 和 10d 的愈伤组织进行了 60Gy(1.30Gy/min)的⁶⁰Co- γ 射线辐照。辐照后的染色体分析表明,处于继代周期前期的愈伤组织对辐射较敏感,染色体变异率较高。继代 2d 的材料辐照后其染色体片段化率可高达 97%,继代 7 和 10 天的材料辐照后染色体片段化率仅为 50%,而且在这三种情况下分裂相均很少。因此选择继代 4~5d(此时愈伤组织已明显增殖)的材料进行照射较适宜。通过以上对各种辐射效应的分析,我们选择了继代 4~5d 的簇毛麦愈伤组织、60Gy(1.30Gy/min)为最适融合供体的辐射条件。将经上述辐射条件辐射的簇毛麦愈伤组织分离的原生质体(供体)与小麦品种济南 177 悬浮细胞分离的原生质体(受体),用 PEG 法诱导融合,获得了不对称体细胞杂种植株^[5]。通过此工作我们认为,在不对称融合工作中对供体的辐射效应作详细的分析研究是十分必要的。

参 考 文 献

- [1]孙勇如. 生物工程学报,1989,5(3):191~194.
- [2]Li Z Y, Xia G M, Chen H M. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1982, 28:79~85.
- [3]张自立,俞新大. 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理,北京:高等教育出版社,1990,p14~15.
- [4]赵孔南,陈秋方,王彩莲等. 植物辐射遗传育种研究发展,北京:原子能出版社,1990,pp.221~223.
- [5]周爱芬,夏光敏,陈惠民. 中国科学(C辑),1996,26(1):32~37.

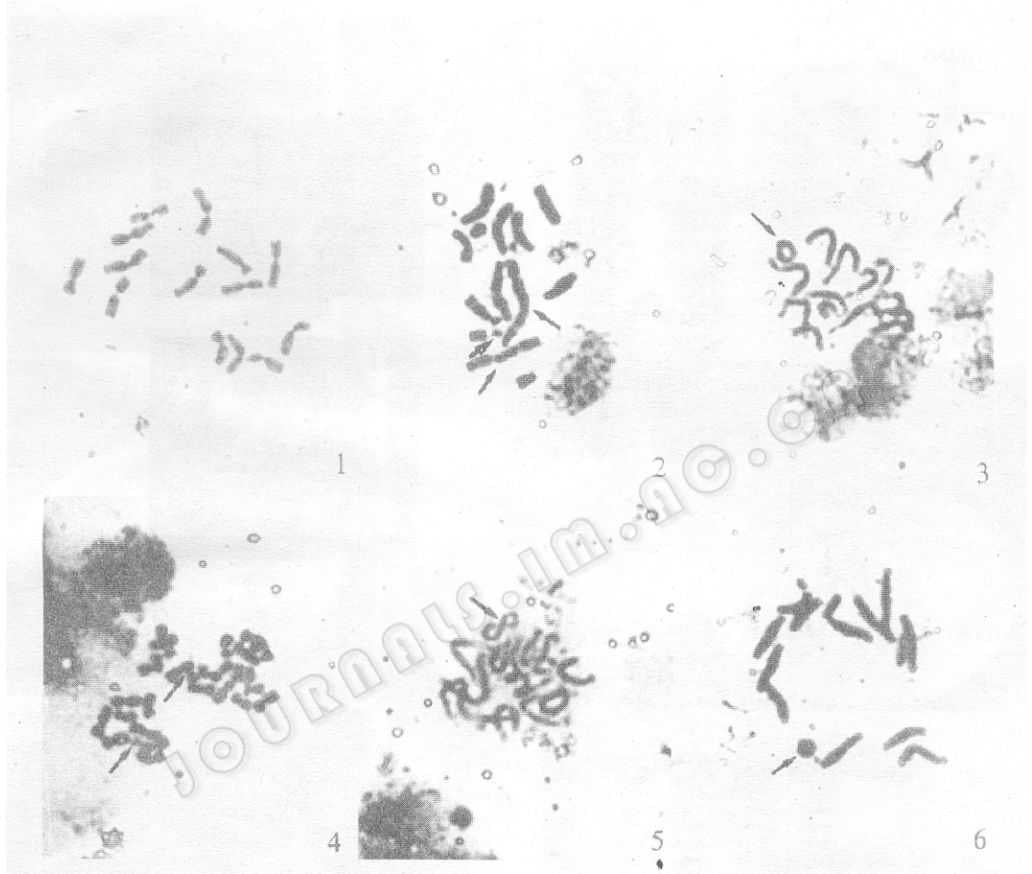
Effect of ⁶⁰Co- γ Radiation on Calli of *Haynaldia villosa*

Zhou Aifen Xia Guangmin Chen Huimin He Shixian Chen Jianai

(Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract In order to find out the influence of ⁶⁰Co- γ ray on the cell division and chromosome aberration of *Haynaldia villosa* calli, doses from 10~300Gy were used for irradiation. The results showed that 70~300Gy induced interval lethality of cells and 30~60Gy division lethality. All the doses from 10-60 Gy could lead to the aberration of chromosome both in number and structure. The chromosome fragmentation which was beneficial to the recombination between the partner chromosomes occurred with the highest frequency at the third day after irradiation of 60 Gy. The radiation effect was also influenced by the duration time following subculture to irradiate.

Key words *Haynaldia villosa*, callus, ⁶⁰Co- γ ray, chromosomal aberration



- | | |
|--|-------|
| 1. Euploid of <i>Haynaldia villosa</i> ($2n = 14$) | ×2150 |
| 2. Chromosome fragment ↑ and dicentric chromosome ↑ | ×2750 |
| 3. Chromosome ring ↑ (60Gy) | ×2150 |
| 4. Chromosome coherence ↑ (30Gy) | ×2600 |
| 5. Chromosome ring, "g" type chromosome ↑ and chromosome fragment (20Gy) | ×2500 |
| 6. Chromosome condensation ↑ (60 Gy) | ×2750 |