

生物科学

He-Ne 激光诱变对分葱外部形态及生理的影响

高波^{1,2} 张灿邦^{1,3*} 蔡晓俊² 李河² 张举成^{1,3} 田家金^{1,3}

(云南省高校天然药物与化学生物学重点实验室¹, 蒙自 661100;

红河学院生命科学与技术学院², 理学院³, 蒙自 661100)

摘要 对 He-Ne 激光诱变分葱种子幼苗外部形态及生理指标影响的研究有助于进一步研究和指导分葱激光诱变育种工作。实验采用 He-Ne 激光(功率为 0.8 mW, 波长为 632.8 nm)分别照射分葱种子 0、4、16、32、64、96、128 和 152 min。待种子萌发实验后, 移入放有腐质土的育苗盘育苗, 45 d 后对分葱幼苗进行外部形态、叶绿素含量、根系活力、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量的测定。在 He-Ne 激光照射 128 min 处理后, 分葱的根长、株高和鲜重等外部形态指标, 以及叶绿素 a/b 和可溶性蛋白含量均表现出一定的促进作用; 在 96 min 照射处理后分葱根系活力和可溶性总糖含量也高于其余各组。相反, 在 4 min 剂量处理后, 发芽率、发芽势、根长、株高和鲜重等外部形态指标, 根系活力及叶绿素 a/b、可溶性总糖和可溶性蛋白含量等各项指标均低于对照组。总的来看, 与较低剂量相比, 较高剂量的激光诱变对分葱的生长与新陈代谢活动具有积极的作用。

关键词 He-Ne 激光 分葱 外部形态 植物生理

中图分类号 Q63 Q68; **文献标志码** B

分葱(*Allium cepa* var. *aggregatum*) 又称火葱、红葱头、细香葱、香葱、大头葱、绵葱或四季葱, 属葱科, 葱属, 多年生宿根草本, 在中国是一种大量种植且普遍受欢迎的蔬菜, 不仅含有较高的营养价值, 而且可入药。激光诱变育种是行之有效的育种手段, 使用的激光器有多种, 波长涵盖红外 118.8 μm 和 10.6 μm , 可见光 694.3 nm、632.8 nm、530 nm、441.6 nm, 以及紫外 333.7 nm 和 265 nm 等波长。效果较好的激光器有 CO₂、He-Ne、N₂ 分子、红宝石、半导体激光等^[1]。目前, 激光诱变已广泛运用于水稻、小麦、玉米、蚕豆、洋葱、黄瓜、青椒、甜菜、大豆等农作物育种工作中, 取得了积极的诱变效果^[2-5]。

李成佐、潘天春、任永波等人采用 He-Ne 和 CO₂ 两种激光分别辐照洋葱的两个品种, 对其各处理的出苗率、苗高、苗重、叶数、根系活力、须根长、须根数、须根重等外部形态及总糖、净同化率、净光合速率、呼吸速率、蛋白质含量等植物生理指标进行了测定, 分析了激光诱变洋葱的生物学效应, 育成“西葱 1 号”和“西葱 2 号”等洋葱新品种^[6-9]。此外, 赵彤采用 CO₂ 和 He-Ne 两种激光的三种剂量, 分别辐照两个洋葱品种的湿种子, 利用生物统计学的方法从个体水平上考查了激光诱变洋葱 L₂ 代的鳞茎鲜重、横茎等主要性状的回归分析和遗传变异^[10]。然而, 分葱的激光诱变育种工作尚未见报道。

本实验以分葱种子为材料, 首先采用不同剂量 He-Ne 激光(输出功率为 0.8 mW, 波长为 632.8 nm)照射种子, 然后检测分葱幼苗的发芽率、发芽势、根长、株高、鲜重、根系活力、叶绿素含量、可溶性总糖和可溶性蛋白含量, 初步分析激光诱变分葱的生物学效应, 从而为激光诱变在分葱育种工作中的应用提供实验依据, 有助于进一步研究和指导分

2013 年 8 月 12 日收到 国家自然科学基金(61068003, 60748002)、
云南省科技计划基金(2006E0091M)、红河学院校级
科研基金(XSS06021)项目资助

第一作者简介: 高波(1980—), 男, 硕士, 讲师。研究方向: 生物光学与光生物物理学。E-mail: gh_biology2@126.com。

* 通信作者简介: 张灿邦。E-mail: cbzhang@vip.km169.net。

葱激光诱变育种工作。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器和试剂

材料:分葱种子购于蒙自种子站。

仪器:He-Ne 激光器(南京激光仪器厂),722S 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),OHAUS-AR1140 电子天平(梅特勒—托利多仪器上海有限公司制造),HH—4 型数字恒温水浴锅(国华电器有限公司),高速冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5810R,德国)。

试剂:80% 丙酮,无水乙醇,磷酸缓冲液,标准牛血清蛋白溶液,考马斯亮蓝 G-250,葡萄糖,萘酮,氯化三苯基基四氮唑(TTC),98% 硫酸。所用试剂均为国产分析纯。

1.2 He-Ne 激光照射分葱种子

将经过筛选的大小均匀的分葱种子平铺于直径 1 cm 范围内,He-Ne 激光器的光斑完全均匀覆盖照射区域,照射时间分别为 4、16、32、64、96、128 和 152 min(每组 30 粒),以未照射组为对照。

1.3 发芽势和发芽率的测定

将不同剂量 He-Ne 激光照射的分葱种子分别放在湿润的毛巾上,将毛巾置于温室大棚的纸箱里,并保证毛巾有充足的水分,每天记录发芽的种子数。

发芽势 = (前 4 天内正常发芽的种子数/供试种子数) × 100% (1)

发芽率 = (前 7 天内正常发芽的种子数/供试种子数) × 100% (2)

1.4 分葱育苗与栽培

将不同剂量激光照射处理后的种子种在含腐质土育苗盘里,置于温室中培养,定期浇水及管理。

1.5 幼苗株高、根长和鲜重的测定

对经过 He-Ne 激光照射的分葱种子长出的幼苗用直尺分别测量株高、根长。用电子天平称量鲜重。

1.6 叶绿素含量的测定

1.6.1 色素的提取及测定吸光度

用研磨提取法提取叶绿素^[11]。在每组分葱植

株上选取长势一致的叶片,分别洗净,擦干,剪碎混匀。称取样品放入研钵中,加入少量石英砂、碳酸钙及 80% 丙酮,研磨成匀浆,再次加入 80% 丙酮继续研磨,直至残渣不显绿色为止。将残渣沿玻璃棒倒入装有用 80% 丙酮润湿过的滤纸的漏斗中过滤到 25 mL 棕色容量瓶中,用少量 80% 丙酮冲洗研钵、玻璃棒及残渣数次,最后用无水乙醇定容。以 80% 丙酮为对照,用 722S 型分光光度计分别测定以上提取液在波长 645 和 663 nm 下的吸光度。

1.6.2 叶绿素含量计算

据测定,叶绿素 a、b 在红光区的最大吸收峰分别位于 663 nm 和 645 nm,已知叶绿素 a、b 分别在波长 663 nm 和 645 nm 下的比吸收系数,根据 Lambert-Beer 定律,公式(3)和式(4)为叶绿素 a、b 的吸光度与浓度的关系。

$$A_{663} = 82.04C_a + 9.27C_b \quad (3)$$

$$A_{645} = 16.75C_a + 45.6C_b \quad (4)$$

式(3)和式(4)中的 A_{663} 和 A_{645} 分别为叶绿素溶液在波长 663 nm 和 645 nm 下的吸光度, C_a 和 C_b 分别为叶绿素 a 和 b 的浓度,82.04 和 9.27 分别为叶绿素 a、b 在波长 663 nm 下的比吸光系数,16.75 和 45.6 分别为叶绿素 a、b 在波长 645 nm 下的比吸光系数,以 mg/L 为单位。

$$C_a = 12.7D_{663} - 2.69D_{645} \quad (5)$$

$$C_b = 22.9D_{645} - 4.68D_{663} \quad (6)$$

$$C = C_a + C_b = 20.21D_{645} + 8.02D_{663} \quad (7)$$

C 为叶绿素 a、b 的总浓度,由以上方程组可求出叶绿素 a、b 的浓度及叶绿素总浓度,再根据稀释倍数计算每克鲜重叶片中色素的含量,单位 mg/g。

1.7 根系活力的测定

采用 TTC 法测定根系活力^[12]。配制不同浓度 TTC 溶液放入刻度试管中,与乙酸乙酯和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 充分振荡后产生红色的 TTF,转移到乙酸乙酯层,静置分层取上层乙酸乙酯液。分光光度计上于 485 nm 处测定各溶液的 OD,然后以 TTC 浓度作为横坐标,OD 作为纵坐标绘制标准曲线。称取根尖样品 0.5 g 放入小烧杯中,加入 0.4% TTC 溶液和 pH 7.0 磷酸缓冲液在 37℃ 暗保温 1 h,此后立即加入 1 mol/L 硫酸停止反应。把根取出,用滤纸吸干

水分,放入研钵中,加乙酸乙酯,充分研磨后提出 TTF,将红色提取液移入刻度试管,用少量乙酸乙酯把残渣洗涤 2 次,移入试管定容后用分光光度计在波长 485 nm 下比色,查标准曲线求出 TTC 还原量。

$$C = 486.86OD - 23.369 \tag{8}$$

$$\text{根系活力} = C / (Wh \times 1\,000) \text{ [mg TTC / (g} \cdot \text{h)]} \tag{9}$$

公式(9)中: C 为 TTC 还原量(μg); W 为根重(g); h 为时间(h)。

1.8 可溶性总糖含量的测定

用蒽酮比色法测定分葱叶的可溶性总糖含量^[12]。数据处理方法如公式(10),其中,样品中可溶性总糖含量的计算:设 V 为样品稀释后的体积(mL), C 为提取液的含糖量($\mu\text{g/mL}$), W 为植物鲜重(g)。

$$\text{可溶性总糖含量} (\mu\text{g/g}) = (CV) / W \tag{10}$$

1.9 可溶性蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量^[13]。数据处理方法如公式(11),其中, C 为查标准曲线所得样品测定管中蛋白质浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为提取液总体积(mL); W 为取样量(g)。

$$\text{样品可溶性蛋白质的含量} (\mu\text{g/g}) = \frac{CV}{W} \tag{11}$$

2 结果与分析

2.1 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱种子发芽势和发芽率的影响

不同剂量 He-Ne 激光照射组与对照组比较,32 min、96 min 和 128 min 的分葱种子的发芽势、发芽率均高于对照组,较大剂量的激光照射能有效的提高分葱种子的发芽势、发芽率(表 1)。

表 1 He-Ne 激光诱变后分葱种子的发芽势和发芽率

剂量/min	发芽势	发芽率
0	0.766 6	0.966 6
4	0.666 6	0.933 3
16	0.733 3	0.933 3
32	0.833 3	1
64	0.633 3	0.9
96	0.8	1
128	0.8	1
152	0.733 3	0.9

2.2 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱根长、株高和鲜重的影响

2.2.1 根长与株高

不同剂量 He-Ne 激光照射组与对照组比较,128 min 的分葱根长与株高均高于对照组,而 32 min 和 152 min 的分葱的株高高于对照组,96 min 的分葱根长高于对照组(图 1)。

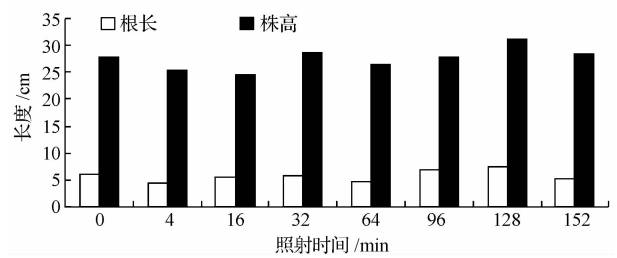


图 1 He-Ne 激光诱变后分葱的根长与株高

2.2.2 鲜重

不同剂量 He-Ne 激光照射组与对照组比较,128 min 的分葱鲜重高于对照组和其它处理组,其它剂量的分葱鲜重均低于对照组(图 2)。

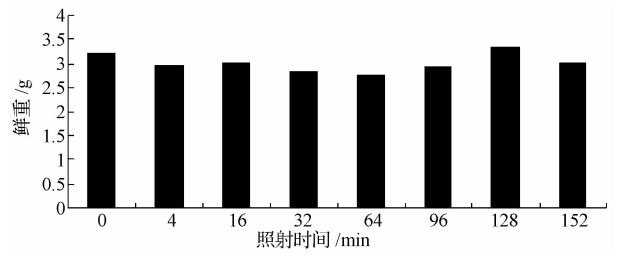


图 2 He-Ne 激光诱变后分葱的鲜重

2.3 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱的叶绿素含量的影响

不同剂量 He-Ne 激光处理组与对照组比较,16、32、64、96、128 和 152 min 的叶绿素 a 含量均高于对照组;而 128 min 的叶绿素 b 含量高于其它各组;96、128 和 152 min 的叶绿素总含量均高于对照组(表 2)。

2.4 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱根系活力的影响

不同剂量的 He-Ne 激光照射处理组与对照组相比较,4 min 的分葱根系活力低于对照,其它剂量的分葱根系活力都有所升高,其中 96 min 的分葱根系活力最高(图 3)。

表 2 He-Ne 激光诱变后分葱的叶绿素 a/b 含量和叶绿素总含量			
剂量 /min	叶绿素 a 含量/(mg · g ⁻¹)	叶绿素 b 含量/(mg · g ⁻¹)	叶绿素总含量/(mg · g ⁻¹)
0	0.786 441	0.097 247	0.883 689
4	0.748 034	0.001 857	0.749 891
16	0.797 462	0.029 286	0.826 748
32	0.817 285	0.032 935 4	0.850 22
64	0.805 605	0.011 679	0.817 284
96	0.857 388	0.096 663	0.954 052
128	0.931 155	0.270 310	1.201 465
152	0.896 409	0.040 292	0.936 701

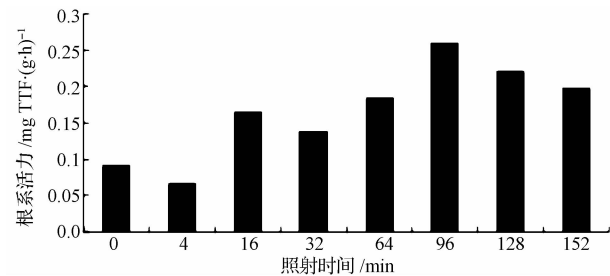


图 3 He-Ne 激光诱变后分葱的根系活力

2.5 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱可溶性总糖含量的影响

不同剂量 He-Ne 激光照射处理组与对照组相比,只有 32 和 96 min 剂量处理后的分葱可溶性总糖含量高于对照组,其余均有所下降(图 4)。

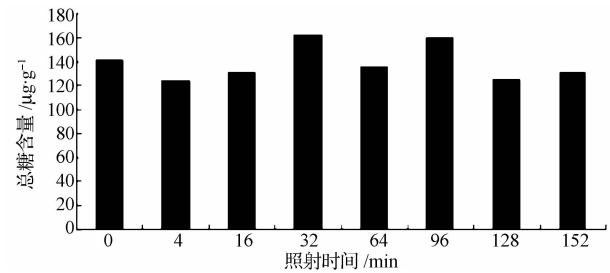


图 4 He-Ne 激光诱变后分葱的可溶性总糖含量

2.6 不同剂量 He-Ne 激光诱变对分葱可溶性蛋白含量的影响

不同剂量 He-Ne 激光照射处理组与对照组相比,32、96、128 和 152 min 的分葱可溶性蛋白含量均有升高,其中 128 min 剂量处理后可溶性蛋白含量最高,其余各处理组均有所降低(图 5)。

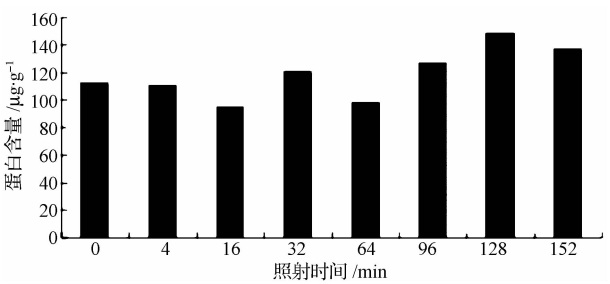


图 5 He-Ne 激光诱变后分葱的可溶性蛋白含量

3 讨论

激光诱变作为物理诱变的一种方式,其生物学效应直接来源于其产生的光、电、热、压力和磁效应的综合作用,使细胞 DNA 分子吸收、聚积能量并进行能量再分配,处于一种易于突变的状态,继而发生一系列的诸如断键、聚合、交联等物理和化学变化,导致 DNA 分子结构的改变即 DNA 分子的损伤和突变,最终引起突变株生物学属性变化^[14]。

从结果看来,在 He-Ne 激光 128 min 处理后,分葱的根长、株高和鲜重等外部形态指标,以及叶绿素 a/b 和可溶性蛋白含量总体上表现出一定的促进作用;在 96 min 照射处理后分葱根系活力和可溶性总糖含量也高于其余各组。相反,在 4 min 剂量处理后,发芽率、发芽势、根长、株高和鲜重等外部形态指标,根系活力及叶绿素 a/b、可溶性总糖和可溶性蛋白含量等各项指标均低于对照组。总的来看,96 或 128 min 等较高剂量 He-Ne 激光处理后的分葱在生长发育及根系活力、叶绿素含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白含量等指标上普遍表现出较强的生长水平和较高的新陈代谢能力。而较低剂量如激光照射 4 min 处理后分葱的生长发育及各项生理指标的影响不是很明显,甚至有所下降。与较低剂量相比,较高剂量的激光诱变对分葱的生长与新陈代谢活动具有积极的作用。

激光诱变技术在农业中的应用仍然存在一些需要解决的问题,比如最佳剂量、最佳波长难以确定,还有一些困难,如周期长、误差大^[15]。但最主要的问题还是激光诱变作用的机理阐述仍然不成熟,活性氧自由基、热效应、细胞信号转导系统的响应、激光与生物大分子的直接作用均有可能参与到激

光诱变的过程中,这些还需不断摸索总结。激光诱变对分葱的影响也许表现为种子萌发前激光处理促进了非平衡稳定状态的打破,导致机体从高度有序向无序的方向发展,因此不同剂量激光照射处理后植物光合作用和新陈代谢水平得以增强,表现出不同于对照组的生长水平^[16,17]。与较低剂量相比,较高剂量的激光诱变对分葱的生长与新陈代谢活动表现出一定的积极作用,这提示了较大剂量激光诱变更有利于分葱种子中非平衡稳定状态的打破,并通过外部形体和生理指标体现出来。不同剂量的激光诱变也可能直接激活酶活性中心,提高生物体内的酶活性,使不同剂量处理后的外部形态、分葱根系活力、叶绿素含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白含量等各项生理指标体现出一定的差异,既有正效应,又有负效应。此外,He-Ne 激光的 632.8 nm 红光可能会影响 DNA 的合成,破坏蛋白质和核酸的弱氢键^[18]。因此,激光诱变对分葱生长和生理的影响也许主要是来源于激光对细胞染色体 DNA 直接或间接的作用,从而通过调节众多蛋白质表达与活性来影响分葱的生长与生理,但产生的变异结果是否能有效稳定的遗传给后代还不能确定,这些都还需要进一步的研究。如果能够建立一套能在较短周期内判断分析激光对植物的诱变作用,将有利于激光诱变机制的研究。分葱生长周期短,种子颗粒小,染色体易观察,将有利于在以后的研究中开展染色体水平的激光诱变机制研究。

参 考 文 献

- 1 陈震古. 现代农业中的激光技术和激光育种. 激光生物学, 1992; 1(3): 99—103
- 2 刘友杰. 水稻激光诱变的遗传育种研究. 应用激光, 1991; 11(2): 88—92
- 3 伍育源, 邹伟民. 激光对蚕豆诱变效应试验研究. 激光生物学报, 1999; 8(2): 134—139
- 4 李成佐, 单成海, 潘天春, 等. 激光辐照洋葱种子的生物学效应初探. 激光生物学报, 1999; 8(1): 48—51
- 5 赵新乐, 金丽虹, 申炳俊. Nd:YAG 倍频激光对大豆幼苗异黄酮的影响. 中国激光, 2009; 36(10): 2728—2833
- 6 熊 红, 李成佐. 激光辐照洋葱的生物学效应. 西南农业大学学报, 2001; 23(5): 438—440
- 7 任永波, 李成佐, 张海宇, 等. 激光诱变洋葱生理效应研究. 西南农业学报, 2002; 15(3): 70—72
- 8 李成佐, 潘天春, 赵丽华, 等. 洋葱新品种“昌激07—90”的激光诱变选育. 安徽农业科学, 2009; 37(25): 11943—11944
- 9 潘天春, 李成佐, 等. 激光诱变对黄皮洋葱须根的生物学效应研究. 安徽农业科学, 2012; 40(25): 12374—12375
- 10 赵 彤. 激光诱变洋葱 L₂ 代主要性状的多重回归分析. 激光生物学报, 2004; 13(5): 372—376
- 11 刘秀丽, 宋 平, 孙成明. 植物叶绿素测定方法的再探讨. 江苏农业研究, 1999; 20(3): 46—47
- 12 陈钧辉. 植物生理学实验. 北京: 科学出版社, 2003
- 13 曲春香, 沈颂东, 王雪峰, 等. 用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究. 苏州大学学报(自然科学版), 2006; 22(2): 82—85
- 14 冯光文, 成 浩, 徐 辉, 等. 激光诱变技术在生物育种中的应用. 激光与光电子学进展, 2007; 44(5): 56—61
- 15 朱新军, 岳 明. 激光对植物的作用及其机理. 科技情报开发与经济, 2006; 16(4): 182—183
- 16 张建东, 陈怡平, 王 勋, 陵. CO₂ 激光处理对大豆种子萌发及生理的影响. 西北植物学报, 2004; 24(2): 221—225
- 17 焦顺吉, 韩亚萍, 赵 莉, 等. 飞秒激光处理对水稻种子发芽和苗期生长的影响. 黑龙江农业科学, 2011; (4): 17—19
- 18 王一波, 王延林, 孔德宁. He-Ne、Nd: YAG 激光对水稻种子萌发的生物效应. 中国农学通报, 2011; 27(9): 72—75

(下转第 25 页)

Model of Drilling String Lateral Vibration Frequency under the Influence of Drilling Fluid Flow Velocity Inside and Outside the Drilling String

YAN Tie¹, CHI Li-bin¹, BI Xue-liang¹, WANG Peng¹, KAI Yue¹, HAN Fu-wei²

(Northeast Petroleum University, Petroleum Engineering College¹, Daqing, 163318, P. R. China;

Bohai Drilling Company, the Third Drilling Company², Tianjin 300280, P. R. China)

[Abstract] Drilling string lateral vibration is a severe damage, the influence of drilling fluid flow velocity is one of the most important factors on drilling string lateral vibration frequency. A theoretical analysis of the drilling string lateral vibration frequency caused by drilling fluid flow velocity inside and outside the drilling string is maken, which supplies some evidence for reducing the times of drill string resonance. By adopting the principle of least action, the influence of drilling fluid flow velocity inside the drilling string on lateral vibration frequency is analyzed by Euler method. Besides, through the use of mechanical analysis method and the introduction of additional mass coefficient, the effect of drilling fluid flow velocity outside the drilling string to the lateral vibration frequency is further studied. A differential equation of drilling string lateral vibration with the consideration of drilling fluid flow velocity inside and outside the drilling string is built up, and a mathematical model of drilling string lateral vibration frequency under the influence of drilling fluid flow velocity inside and outside the drilling string is obtained. Field applications show that average error of the results is 9.15%, By comparison of the frequency data calculated by this model and the field data, it can be seen that this model is in agreement with the field condition.

[Key words] drilling string lateral vibration frequency flow velocity least action Euler method additional mass coefficient

(上接第 20 页)

He-Ne Laser Mutation Effects on External Morphology and Physiology of *Allium cepa* var. *aggregatum*

GAO Bo^{1,2}, ZHANG Can-bang^{1,3*}, CAI Xiao-jun², LI He², ZHANG Ju-cheng^{1,3}, TIAN Jia-jin^{1,3}

(Key Laboratory of Natural Pharmaceutical & Chemical Biology of Yunnan Province, Honghe University¹, Mengzi Yunnan 661100, P. R. China;

Collage of Life Science and technology², Collage of Science, Honghe University³, Mengzi 661100, P. R. China)

[Abstract] The study about He-Ne laser mutation effects on external morphology and physiology of *Allium cepa* var. *aggregatum*, which is named shallot usually, is benefit for the analysis and direction work of laser mutation breeding. Shallot seeds were irradiated by He-Ne laser (0.8 mW, 632.8 nm) for 4, 16, 32, 64, 96, 128 or 152 min respectively. After seeds germination, the shallot seedlings were moved to a seedling tray with humus. And the morphology, chlorophyll content, root activity and soluble sugar content, soluble protein content of shallot seedling were determined 45 days later. The results showed that the root length, plant height, fresh weight, chlorophyll a/b and soluble protein content are promoted by 128 min radiation treating to a certain extent. While the root activity and soluble sugar content of the group treated by 96 min radiation are higher than other groups. Conversely, not only the external morphology such as germination rate, germination energy, root length, plant height and fresh weight, but also root activity, chlorophyll a/b, soluble protein and soluble sugar content of 4 min radiation treated group are all lower than control group. In conclusion, compare to the groups with lower doses, it is suggested that the effect of laser mutation with higher doses is positive on the growth and metabolism of shallot relatively.

[Key words] He-Ne laser *Allium cepa* var. *aggregatum* external morphology plant physiology