

^{60}Co - γ 射线对益母草种子的诱变效应研究

罗页思^{1,2}, 徐建中², 孙健², 沈晓霞², 王志安^{2*} (1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江省中药研究所, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究 γ 射线对益母草种子的诱变效应, 为采用益母草种子进行诱变育种提供参考依据。方法 以益母草的干燥种子为材料, 研究 γ 射线对其产生的生理效应和诱变效果。以种子发芽率、成苗率、幼苗苗高、根长, 以及叶色突变率作为评价诱变效应的指标。结果 γ 射线对益母草种子发芽、幼苗生长有明显的抑制作用, 具有较强的诱发叶色突变的能力。结论 γ 射线对益母草具有诱变作用, 益母草干燥种子 γ 射线诱变育种的适宜辐射剂量范围为 400~500 Gy。

关键词: ^{60}Co - γ 射线; 益母草; 诱变育种

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)01-0012-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.004

Research on the Mutagenic Effects on Seeds of *Leonurus Japonicas* Houtt. by ^{60}Co - γ Rays

LUO Yesi^{1,2}, XU Jianzhong², SUN Jian², SHEN Xiaoxia², WANG Zhian^{2*} (1. Pharmacy College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the gamma-rays mutagenic effects on seeds of *Leonurus japonicas* Houtt., provide the basis for traditional Chinese medical herb breeding by using gamma-rays radiation. **METHODS** Physiological and mutagenic effects of gamma-rays on *L. japonicas* Houtt. dry seeds were studied. The germination percentage, seedling survival, seedling height, root length of M₁ plants and the frequency of leaf color mutation in M₂ generation were selected as criteria. **RESULTS** The gamma-rays showed obvious inhibitory action to the seedling growth and the ability to induce leaf color mutation. **CONCLUSION** The gamma-rays is one kind of *L. japonicas* Houtt. effective mutagens. The appropriate dose is 400~500 Gy for the dry seeds of *L. japonicas* Houtt.

KEY WORDS: ^{60}Co - γ ray; *Leonurus japonicas* Houtt.; mutation breeding

益母草(*Leonurus japonicas* Houtt.)为唇形科一年生或二年生草本植物, 入药部位为新鲜或干燥地上部分, 其主要药效成分为生物碱、挥发油、二萜、苯丙醇苷、环形多肽等, 具有活血调经、利尿消肿、清热解毒的疗效, 主要用于月经不调、痛经经闭, 恶露不尽等病症, 历来被中医视为妇科良药^[1]。

我国益母草资源丰富, 但生产上缺乏优质益母草新品种, 现有品种普遍存在产量较低, 有效成分含量不稳定等问题, 很大程度上制约了益母草产业的发展^[2]。现试图应用诱变育种技术改良益母草品种。辐射诱变育种是继纯化育种和杂交育种之后的一种现代育种技术手段, 主要包括 ^{60}Co - γ 射线辐照诱变、 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照和离子注入、空间诱变等技术^[3]。辐射诱变育种既能创造多种突变体, 丰富种质资源, 又能打破基因连锁, 提高重组率^[4]。因此诱变育种可以在短时间内获得优良突变

体, 育成新品种, 具有传统育种手段难以替代的特点。本试验以种子发芽率、成苗率、幼苗苗高以及根长为生理效应指标, 以叶色突变率为诱变效应指标, 初步研究了 ^{60}Co - γ 射线诱变剂量对益母草的生理损伤和突变频率等生物学效应的影响, 以明确 ^{60}Co - γ 射线在益母草诱变育种中的利用价值。

1 材料和方法

1.1 供试品种

实验采用 3 份代表性种质为研究对象, 种质来源分别为河南灵宝、江西修水、山东临朐; 3 份种质的生育期、产量和有效成分含量差异显著^[2]。3 种益母草种子均于 2015 年从浙江省中药研究所有限公司的义乌益母草种植基地中收集。

1.2 试验方法

1.2.1 辐照试验 2015 年 8 月在浙江省农业科学院辐照场进行不同剂量的 ^{60}Co - γ 射线辐射, 辐照剂量分别为 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700,

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02058); 公益性行业科研专项经费项目(201507002)

作者简介: 罗页思, 女, 硕士生 Tel: 17826865105 E-mail: 416313582@qq.com *通信作者: 王志安, 男, 教授级高工 Tel: (0571)85241074 E-mail: 13805786846@qq.com

800 Gy, 其中射线辐射剂量率为 $10 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 。以未辐照的种子为对照(CK)。

1.2.2 种子发芽率测定及半数致死量(LD₅₀)的调查 辐照后当天, 将不同剂量处理过的益母草种子整齐排列于垫双层湿润滤纸的培养皿中, 在 14 h 25 °C 光照, 10 h 20 °C 黑暗条件下进行发芽试验, 每剂量选取 100 粒种子, 重复 3 次, 放入光照培养箱中发芽, 并保持发芽期间滤纸的湿润, 每天记录发芽数, 15 d 后计算发芽率。

LD₅₀ 是种子的发芽率为对照 50% 时的辐射剂量, 既是确定辐射敏感性的主要指标, 也是辐射育种适宜诱变剂量的参考^[5]。

1.2.3 成苗率调查及苗高、根长测定 将已发芽的种子从培养皿中取出, 检查发芽粒数, 移栽于花盆内, 统计成苗数, 21 d 后测量苗高和根长。

1.2.4 突变频率调查 将 M₂ 代种子浸种 12 h 条播于苗床, 行距为 30 cm。每个株系种子播种面积为 5 m², 四周设保护行 2.0 m, 出苗后观察植株叶色突变情况^[6]。每处理调查 2 000 株左右, 3 次重复。

1.3 数据处理

试验数据用 SPSS 软件进行统计和方差分析。

2 结果与分析

2.1 辐射剂量对种子发芽率的影响

3 个益母草品种对照组的发芽率无显著差异, 变幅为 75%~85%。3 个益母草品种发芽规律相似, 着床第 4 天, 种子开始萌发, 第 9 天发芽率增长速度趋于稳定, 第 15 天完成发芽。种子的致死率与辐射剂量存在显著正相关关系, 随着辐照剂量增加, 益母草种子发芽率逐渐降低, 当辐照剂量

达到 400 Gy 时, 3 个品种种子发芽率均与对照组差异极显著($P<0.01$); 300 Gy 辐射剂量下, 不同品种的益母草的辐射敏感性存在显著差异($P<0.05$), 山东临朐品种最敏感, 河南宝灵较为迟钝。当辐射量为 100 Gy 时, 发芽率较对照有所降低; 但当辐射剂量为 200 Gy 时, 种子的发芽率却小幅回升, 甚至与对照相当, 该现象可能是辐照诱导种子应激反应引起的。结果见表 1。

2.2 辐射剂量对种子成苗率及苗高、根长的影响

⁶⁰Co- γ 射线辐照对益母草幼苗生长有明显的抑制作用。随着处理辐射剂量的增加, 3 种益母草种子的成苗率、根长以及苗高均逐步下降。当辐射剂量达到 500 Gy 时, 辐照对山东临朐的品种影响最大, 其成苗率只有对照的 20% 左右, 与此同时, 河南灵宝和江西修水减少到对照组的 32% 左右。500 Gy 的辐照条件下, 3 个品种的生长均受到抑制, 其根长、苗长与对照相比减少的幅度在 35%~50% 之间。结果见表 2。

2.3 辐射剂量对叶色突变频率的影响

γ 射线诱发的叶色突变有白化、斑点、黄化、浅绿等多种类型, 本次实验中以前 2 种为主, 占 60% 以上。3 种益母草的突变频率均随剂量的增加而表现为先升后降, 呈现相同的趋势。经 500 Gy 辐照后, 3 种益母草叶色突变频率均最高, 到达 0.63%~0.73%。其中山东临朐突变频率显著高于另外 2 个品种, 该现象与上述山东临朐的品种辐照后成苗率最低相对应, 说明该种质辐照后修复能力或耐辐射能力较弱, 更易发生突变和死亡。结果见表 3。

表 1 辐射对种子发芽率的影响($n=300$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of irradiation on the germination of seeds($n=300$, $\bar{x} \pm s$)

辐射剂量/Gy	发芽率/%								
	河南灵宝			江西修水			山东临朐		
	4 d	9 d	15 d	4 d	9 d	15 d	4 d	9 d	15 d
CK	71.0±3.0	75.0±1.0	76.0±2.0	71.0±3.0	75.5±3.5	82.0±3.0	68.0±1.0	71.5±1.5	77.5±1.5
100	58.0±7.5	63.3±4.1	66.7±3.8	54.7±3.4 ¹⁾	64.0±4.1	73.7±2.1	59.3±1.7 ¹⁾	63.0±3.5	72.0±1.7
200	54.0±4.3 ¹⁾	70.7±1.9	77.3±0.9	50.0±2.2 ²⁾	66.3±4.8	84.3±1.2	51.3±1.2 ²⁾	64.7±2.1	78.3±3.3
300	29.3±4.1 ²⁾	56.7±2.5 ²⁾	60.7±2.5 ¹⁾	39.7±6.8 ²⁾	48.7±3.4 ²⁾	51.7±2.6 ²⁾	28.0±3.3 ²⁾	43.7±2.6 ²⁾	51.0±2.9 ²⁾
400	17.3±5.7 ²⁾	49.3±0.9 ²⁾	49.3±0.9 ²⁾	29.3±1.2 ²⁾	39.7±2.4 ²⁾	46.0±0.8 ²⁾	18.3±1.7 ²⁾	40.3±6.5 ²⁾	43.7±3.3 ²⁾
500	14.0±1.6 ²⁾	36.7±1.7 ²⁾	35.0±2.2 ²⁾	18.0±1.6 ²⁾	34.3±2.1 ²⁾	36.0±1.0 ²⁾	14.0±2.2 ²⁾	28.3±2.1 ²⁾	34.3±0.5 ²⁾
600	6.0±1.6 ²⁾	28.7±4.7 ²⁾	29.3±5.3 ²⁾	9.7±4.1 ²⁾	24.7±2.9 ²⁾	26.3±1.7 ²⁾	7.0±1.6 ²⁾	18.3±3.3 ²⁾	23.7±1.7 ²⁾
700	3.7±0.5 ²⁾	9.3±0.5 ²⁾	9.0±0.8 ²⁾	6.0±2.4 ²⁾	16.0±2.2 ²⁾	16.3±1.7 ²⁾	3.0±0.0 ²⁾	8.7±1.2 ²⁾	16.0±1.6 ²⁾
800	1.3±0.9 ²⁾	8.7±3.4 ²⁾	8.7±3.4 ²⁾	2.3±1.2 ²⁾	2.7±0.9 ²⁾	2.7±0.9 ²⁾	1.0±0.8 ²⁾	2.3±1.2 ²⁾	2.7±0.9 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 2 辐射对种子成苗率及苗高、根长的影响($n=300, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of irradiation on the growth of seedlings($n=300, \bar{x} \pm s$)

辐射剂量/Gy	河南灵宝			江西修水			山东临朐		
	成苗率/%	根长/cm	苗高/cm	成苗率/%	根长/cm	苗高/cm	成苗率/%	根长/cm	苗高/cm
CK	53.97±3.65	8.34±0.88	3.56±0.68	54.11±4.79	8.19±0.81	3.53±0.44	61.93±2.67	8.88±0.97	4.03±0.52
100	50.25±7.55	7.59±0.95	2.97±0.33	45.88±4.15	7.55±0.52	3.08±0.39	51.64±3.51 ¹⁾	7.19±0.56	3.25±0.79
200	42.29±3.11 ¹⁾	6.57±0.50	2.78±0.23	41.83±2.94 ¹⁾	6.53±0.51	2.36±0.06 ¹⁾	41.59±4.59 ²⁾	6.42±0.37 ¹⁾	2.42±0.23 ¹⁾
300	31.84±6.31 ¹⁾	6.03±0.23 ¹⁾	2.20±0.33	33.63±0.82 ²⁾	6.10±0.19 ¹⁾	1.99±0.11 ²⁾	31.70±4.55 ²⁾	5.80±0.49 ¹⁾	1.91±0.16 ²⁾
400	24.62±4.29 ²⁾	4.88±0.38 ²⁾	1.70±0.10 ¹⁾	25.03±4.86 ²⁾	5.55±0.29 ¹⁾	1.69±0.06 ²⁾	22.52±3.78 ²⁾	5.34±0.23 ²⁾	1.43±0.09 ²⁾
500	19.76±2.67 ²⁾	4.25±1.08 ²⁾	1.15±0.24 ²⁾	16.58±4.35 ²⁾	4.41±0.53 ²⁾	1.24±0.16 ²⁾	13.07±1.99 ²⁾	4.47±0.45 ²⁾	1.41±0.53 ²⁾
600	12.19±3.13 ²⁾	3.19±0.40 ²⁾	1.09±0.13 ²⁾	11.61±2.83 ²⁾	3.76±0.48 ²⁾	1.06±0.15 ²⁾	10.69±0.68 ²⁾	3.81±0.43 ²⁾	1.32±0.25 ²⁾
700	5.66±1.13 ²⁾	2.62±0.26 ²⁾	0.98±0.10 ²⁾	5.87±1.01 ²⁾	3.13±0.48 ²⁾	0.91±0.18 ²⁾	7.84±1.40 ²⁾	2.81±0.48 ²⁾	1.06±0.21 ²⁾
800	1.70±0.71 ²⁾	1.21±0.11 ²⁾	0.86±0.08 ²⁾	3.41±1.40 ²⁾	1.85±0.36 ²⁾	0.58±0.30 ²⁾	4.61±1.31 ²⁾	1.67±0.21 ²⁾	0.60±0.05 ²⁾

注：与对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 3 射线诱发叶色突变频率

Tab. 3 Effect of irradiation on frequency of induced leaf color mutation

辐射剂量/Gy	河南灵宝		江西修水		山东临朐	
	调查株数	突变频率/%	调查株数	突变频率/%	调查株数	突变频率/%
CK	2 029	0	1 992	0	2 044	0
100	1 923	0.10±0.04 ¹⁾	1 911	0.14±0.02 ²⁾	1 955	0.15±0.00 ²⁾
200	1 856	0.14±0.05 ¹⁾	1 870	0.16±0.00 ²⁾	1 886	0.25±0.02 ²⁾
300	1 739	0.25±0.03 ²⁾	1 798	0.30±0.05 ²⁾	1 772	0.36±0.03 ²⁾
400	1 662	0.36±0.04 ²⁾	1 700	0.43±0.05 ²⁾	1 669	0.42±0.05 ²⁾
500	1 544	0.63±0.09 ²⁾	1 569	0.64±0.13 ²⁾	1 554	0.73±0.01 ²⁾
600	1 454	0.39±0.06 ²⁾	1 499	0.47±0.06 ²⁾	1 500	0.31±0.11 ¹⁾
700	1 379	0.29±0.03 ²⁾	1 396	0.43±0.06 ²⁾	1 406	0.14±0.05 ¹⁾
800	1 335	0.20±0.04 ²⁾	1 242	0.19±0.04 ²⁾	1 326	0.13±0.03 ²⁾

注：与对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 益母草育种适宜辐照剂量的确定

以发芽试验和室内辅助播种试验数据为基础，以不同辐照剂量 x 为自变量，不同剂量下的相对成苗率 y 为因变量，利用直线回归方程 $y=a+bx$ 和公式 $x=(LD_{50}-a)/b$ 计算益母草辐射育种的 LD_{50} 和临界剂量 LD_{40} ^[7]。通过计算，建立益母草相对成苗率与辐照剂量的回归关系方程： $y=-0.1282x+113.98$ ， $R^2=0.99$ ， LD_{50} 在 500 Gy 左右， LD_{40} 在 400 Gy 左右，由此得出，本实验条件下益母草种子诱变效应的较优辐照剂量范围为 400~500 Gy。

3 讨论

本试验首次将 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线应用于益母草育种，结果显示，在一定范围内，增大辐照剂量可提高突变频率，扩大变异谱，但是过大的剂量会提高致死率和不良畸变率；随着辐射剂量的增加，种

子的发芽率、成苗率以及根长苗高均呈下降趋势，当辐射剂量高于 300 Gy 后，下降趋势尤其显著，黄芩^[8]、桔梗^[9]等其他中药材的辐射育种研究中也出现了类似的现象。 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线有较强的诱发益母草叶色突变的能力，由于辐射诱变具有随机性，即表明 γ 射线同样会导致益母草生物碱、萜类化合物和多肽等有效成分合成相关基因的突变以及生育期、生物量调控基因的突变，产生新的等位基因，为高药效、高生物量、生育期多样的益母草新品种选育奠定了基础。

实验数据显示当辐射剂量为 200 Gy 时，种子的发芽率却有小幅回升，甚至与对照相当。在毛竹^[7]、高羊茅^[10]、胡麻^[11]等诸多物种的诱变育种中均发现类似现象。低辐照剂量会致使种子超氧化物歧化酶、过氧化物酶等抗氧化酶的活性增强，

引起脯氨酸等有助于提高植物体抗逆能力的成分大量累积, 这些物质的适度积累均有助于种子的萌发^[12-13]。

同一物种的不同种质经辐射处理后的生理反应和诱变效率存在差异^[14]。3 份益母草种质在相同剂量的辐照条件下呈现的生理变化有所不同, 相同剂量下, 河南灵宝发芽率与成苗率比另外 2 个品种下降的幅度小, 叶色突变频率也较低, 说明河南灵宝的种质抗辐射能力较强, 与之相对的山东临朐的种质耐辐射能力最弱, 突变频率最高。因此在播种辐照后的益母草时应考虑不同种质的致死率差异, 调整相应的播种密度, 根据突变频率调整不同种质的育种群体的大小。

4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 益母草种子诱变效应的适宜辐照剂量范围为 400~500 Gy, ⁶⁰Co- γ 对叶色性状的诱变效率较高。该研究结果证明 ⁶⁰Co- γ 诱变育种是一种有效的获得益母草突变株系的方法, 本实验为具备优良性状的益母草的选育奠定了基础。今后应深入探讨辐射剂量对益母草生育期及益母草生物产量、有效成分等的影响。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2015: 290.
- [2] XU J Z, YANG H T, SUN Y M, et al. Research on evaluation of different germplasm of *Leonurus japonicus* [J]. Chin J Inf TCM(中国中医药信息杂志), 2016, 05: 78-82.
- [3] JIA C F, LI A L. Advances in studies on radiating mutation breeding of medicinal plants in China [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(4): 633-637.
- [4] SHEN X X, WANG Z A, YU X P. Mutagenic effects of γ -rays on *Coix lacrymajobi* var. ma-yuen [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(11): 1016-1018.
- [5] GENG X M, WANG L G, LI N, et al. Study on the seed germination and seedling growth of *Osmanthus fragrans* under ⁶⁰Co- γ irradiation [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2016, 29(2): 216-223.
- [6] XING C, WANG G X, HUANG J L, et al. Research on chlorophyll mutation of plants and molecular mechanism [J]. Biotechnol Bull(生物技术通报), 2008, 24(5): 10-12, 27.
- [7] CAI C J, GAO J, MU S H. Effects of ⁶⁰Co- γ rays radiation on seed vigor and young seedling growth of *Phyllostachys edulis* [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2007, 21(5): 436-440.
- [8] LIN H B, LU J X, QU Y S, et al. Influence of different habitat and radiation to seed quality of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医学报), 2008, 36(5): 35-36, 83.
- [9] XUE M Y, LIU Q C, WANG K L, et al. Effects of ⁶⁰Co- γ -ray irradiation on the seed germination and seedling growth of *Platycodon grandifloras* [C]. Advances in Ornamental Horticulture of China, 2013.
- [10] WANG Y H, HAN L B, YIN S X, et al. The effect of γ -rays irradiation on seeds germination and enzyme activity of tall fescue [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2006, 20(3): 199-201.
- [11] WU D L. Studies on the biological and mutagenic effects of *Salvia splendens* and *Linum usitatissimum* irradiated by ¹²C⁶⁺ heavy ions [D]. Lanzhou University, 2008.
- [12] JIA Y F, CHEN S, CHAI M L. Effects of ⁶⁰Co- γ -irradiation on manilagrass *in vitro* mutagenesis [J]. J Nucl Agric Sci(核农学报), 2010, 24(3): 466-469.
- [13] ZHANG Y, BIA S Q, LI D X, WANG Z Z. Effects of ⁶⁰Co- γ rays irradiation on chicory seed germination and seedling physiology [J]. Acta Agrestia Sin(草地学报), 2013, 21(1): 147-151.
- [14] MA H L, HAI T, SHEN Q H, et al. Suitable dosages and radiation sensitivities for 89 Forage Legumes [J]. Grassland China(中国草地学报), 1995, 5(2): 6-11.

收稿日期: 2016-08-19