

ARTP 辐照对两色金鸡菊种子诱变的生物学效应

赵喜亭^{1a,b,c}, 许言^{1a}, 吕萌^{1a}, 蒲腾飞^{1a}, 王立言², 李明军^{1a,b,c}

(1 河南师范大学 a.生命科学学院;b.河南省道地药材保育及利用工程技术研究中心;c.绿色药材生物技术河南省工程实验室, 河南 新乡 453007;2.清华大学 无锡应用技术研究院生物育种中心,江苏 无锡 214072)

摘要:ARTP(常压室温等离子体)作为一种新型安全高效的生物诱变育种手段,已成功应用于微生物的育种研究,在植物上的应用刚刚起步.本研究首次采用 ARTP 处理两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)种子,研究其对种子萌发、幼苗生长、花形和品质的影响,以期获得观赏价值大、品质好的诱变品系.结果表明:(1)与对照相比,不同时间(7.50~37.50 min)的 ARTP 辐照提高了两色金鸡菊种子的发芽势和发芽率,辐照 22.50 min 时其发芽势(80.00%)和发芽率(86.70%)达最大;不同时间的 ARTP 辐照也不同程度地增加了其幼苗的最大冠幅、叶片数量、叶柄长度、叶面积,以 22.50 min 的辐照效果最好.(2)ARTP 辐照种子 22.50 min 后,其大部分植株最大花径明显增加、舌状花红褐色区域明显增大,13.33%的植株舌状花瓣数增多(T_m)、6.67%的植株雄蕊瓣化(T_s)、6.67%的植株舌状花管状化(似喇叭状)(T_l);部分植株花朵总黄酮、绿原酸和木犀草苷成分增加,其中 T_l 植株不仅花形发生变化且活性成分也有所提高.ARTP 诱变有望成为两色金鸡菊育种的新途径.

关键词:两色金鸡菊;ARTP;辐照;种子;生物学效应

中图分类号:Q947.8

文献标志码:A

两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)为菊科(Compositae)金鸡菊属(*Coreopsis* L.)^[1]一年生草本植物,具有清热解毒、活血化瘀、和胃健脾的功效,兼具观赏、药用和茶饮的功能,市场前景广阔.

天然生长在喀喇昆仑山北处、海拔 3 200 m 以上的高寒山区的两色金鸡菊,又名‘昆仑雪菊’,它作为具有养生和保健功能的天然植物,具有很大的研究价值^[2].

常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma, ARTP)是在常压下产生的具有高活性粒子的等离子体射流,离子体射流的温度可以控制在 25~40 °C 之间^[3];ARTP 可以对生物胞内 DNA 物质造成显著损伤,并诱发细胞发生突变^[4];与传统的诱变技术相比较,ARTP 诱变育种技术具有突变率高、突变位点丰富和操作简便安全等优点,已经广泛用于细菌、放线菌、藻类、酵母、霉菌和大型真菌等领域^[5];该诱变技术也开始逐步在植物育种领域进行应用探索,初步结果显示 ARTP 可以有效促进玉米(*Zea mays*)种子萌发^[6].本研究首次以‘昆仑雪菊’种子为实验材料,采用 ARTP 诱变技术,探究其不同辐照时间对‘昆仑雪菊’种子萌发、幼苗生长、花形花色及品质的影响,以期得到观赏价值大、品质好的新品系,为进一步开发利用‘昆仑雪菊’提供新的育种方法.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为‘昆仑雪菊’种子.所用试剂有甲醇、氯化铝、醋酸-醋酸钠缓冲液、芦丁标准品、绿原酸标准品、

收稿日期:2018-04-10;修回日期:2018-09-20.

基金项目:国家自然科学基金(31372105;U1704120);国家中医药管理局中医药行业科研专项子课题(201407005-08);河南省创新型科技人才队伍建设工程(C20130037);河南省高校科技创新团队支持计划基金(15IRTSTHN020).

作者简介:赵喜亭(1971-),女,河南孟津人,河南师范大学副教授,博士,研究方向为药用植物生物技术研究,E-mail:zhaoxt0411@126.com.

通信作者:李明军,教授,博士,长期从事药用植物生物技术研究,E-mail:limingjun2002@263.net.

木犀草苷标准品、乙腈、磷酸、丙酮和乙醇.使用仪器有 ARTP 育种仪(ARTP-II S, 洛阳华清天木生物科技有限公司提供)、超声波清洗机、725 型分光光度计、直尺、游标卡尺、培养皿、营养钵、刀镊、恒温箱、试管和高效液相色谱仪.

1.2 方法

ARTP 诱变前,先将‘昆仑雪菊’种子在蒸馏水中进行吸胀处理 6 h.

1.2.1 ARTP 诱变

使用 ARTP-II S 型诱变育种仪,以工作气体为 99.99% 高纯氦气,工作气流量为 $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,额定功率为 120 W,等离子体辐照距离 3 mm;辐照‘昆仑雪菊’种子,辐照时间分别为 0.00、7.50、15.00、22.50、30.00 和 37.50 min.每个辐照 3 次重复,每个重复 30 粒种子.

1.2.2 发芽势和发芽率的测定

把经过辐照的‘昆仑雪菊’种子放在铺有双层滤纸(保持滤纸湿润)的培养皿上萌发,分别统计第 2 d 和第 4 d 萌发种子数,算出发芽势和发芽率.

发芽势 = (培养 2 d 出芽良好的种子数 / 每组实验种子数)

发芽率 = (培养 4 d 出芽良好的种子数 / 每组实验种子数)

1.2.3 幼苗生长相关指标测定

‘昆仑雪菊’种子在湿润的滤纸上萌发 7 d 后,将已发芽的苗移入蛭石体积:营养土体积 = 1:1 的营养钵内,在温度为 $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$,光照度为 $36.00 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,照光时间 14 h 的环境下进行培养 40 d^[7].

随机选取 15 株植株,每个处理设置 3 个重复,用游标卡尺和直尺测量每株幼苗上最大叶片的叶片长度、叶片宽度^[8],测量每株幼苗的叶柄长度、最大冠幅,计算出平均值^[9].叶面积 = $(2 \times \text{叶宽} \times \text{叶长}) / 3$ ^[10].

1.2.4 花朵特征的分析

每个处理选取 15 株,每个处理设置 3 个重复,以每个单株为样本^[11],将花朵全部采收,进行生殖生长期性状特征的分析.每个株系选 10 朵花用游标卡尺对花的直径大小、基部红褐色部分直径大小进行测量,分析其花形变化情况.

1.2.5 花朵活性成分的测定

每个处理选取 15 株,每个处理设置 3 个重复,采收每一株上的花, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重.对花朵中的总黄酮含量、绿原酸含量和木犀草苷含量分别进行测量.

总黄酮的提取采用超声波提取法^[12],其含量的测量采用 AlCl_3 法^[13],使用分光光度法测定^[14],以芦丁为标准品计算总黄酮含量^[15].绿原酸含量和木犀草苷含量的测定参考中华人民共和国药典 2015 年版的方法^[16].

1.2.6 数据处理

数据分析使用 Excel 和 SPSS 统计软件,采用 LSD 法进行检验,不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 上达到显著差异.

2 结果与分析

2.1 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’种子萌发的影响

由表 1 可知,不同时间的 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’种子的萌发有不同的促进作用.与对照相比,在 ARTP 处理 7.50、22.50 和 37.50 min 时,‘昆仑雪菊’种子的发芽势和发芽率均提高了,以处理 7.50 和 22.50 min 时其发芽势(80.00%)和发芽率(86.70%)达到最大.

2.2 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’幼苗生长的影响

ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’幼苗生长的影响见图 1、图 2 和表 2.由图 1 和图 2 可以看出,随着辐照时间的增加最大冠幅有所增加,22.50 min 达到最大,并且与对照相比达到显著性差异,22.50 min 之后随着辐照时间的增加最大冠幅呈现下降趋势,但仍高于对照株系;ARTP 辐照后其叶片数较对照呈现先增加后降低的趋势,22.50 min 辐照幼苗叶片数最多,且与对照差异显著;叶柄长度呈现先增加再降低的趋势,在 22.50 和

30.00 min 时的叶柄长度与对照相比差异性显著.由表 2 可知,随着辐照时间的增加,叶长、叶宽和叶面积呈现先升高后降低的趋势;15.00 min 之后随着 ARTP 辐照时间的增加‘昆仑雪菊’的叶片长度、叶片宽度和叶面积增加,在辐照 22.50 min 时达到最大,且与对照相比差异显著.

表 1 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’种子的发芽势和发芽率的影响

Tab.1 Effect of ARTP irradiation on seed germination potential and germination rate of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

辐照后天数/d	项目	ARTP 辐照时间					
		0.00 min	7.50 min	15.00 min	22.50 min	30.00 min	37.50 min
2	萌发的种子数	18	24	22	24	18	21
	发芽势/%	60.00	80.00	73.30	80.00	60.00	70.00
4	发芽的种子数	23	26	22	26	21	25
	萌发率/%	76.60	86.70	73.30	86.70	70.00	83.30

注:每个处理为 30 粒种子,数据来自 3 次独立的实验.



(a) 对照;(b) 辐照 7.50 min;(c) 辐照 15.00 min;(d) 辐照 22.50 min;(e) 辐照 30.00 min;(f) 辐照 37.50 min.

图 1 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’幼苗生长的影响(40 d)

Fig.1 Effect of ARTP irradiation on seedling growth of *Coreopsis tinctoria* Nutt. (40 d)

表 2 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’幼苗叶片长度、叶片宽度和叶面积的影响(40 d)

Tab.2 Effect of ARTP irradiation on the length, width and area of leaf at seedling stage of *Coreopsis tinctoria* Nutt. (40 d)

辐照时间/min	叶长/mm	叶宽/mm	叶面积/mm ²
0.00	16.07±2.35bc	9.94±2.14b	106.47±37.36b
7.50	14.07±2.03c	9.48±1.93b	88.95±31.31b
15.00	18.91±4.99ab	11.42±2.50b	143.90±81.12ab
22.50	20.65±7.99a	14.21±6.26a	195.58±227.15a
30.00	17.75±3.33ab	10.96±1.94b	129.73±48.06b
37.50	16.54±2.47bc	10.37±1.79b	114.33±36.05b

注:同一列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平达到显著差异,下同.

2.3 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花形的影响

ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花形的影响见表 3、表 4 和图 3。由表 3 和图 4 可以看出:ARTP 处理 22.50 min 后,在处理的植株中出现了花径变大、舌状花红褐色部分普遍增大(T_r)的情况,并发现了 3 种花形变异,分别是多瓣化(T_m)、雄蕊瓣化(T_s)、管状化(T_t)。其中 T_m 出现比率占 13.33%, T_s 出现比率为 6.67%、 T_t 出现比率 6.67%(表 3)。统计分析表明(表 4): T_0 、 T_m 、 T_s 与对照相比最大花径和舌状花红褐色区域均明显增加,其中 T_s 株系花径大小显著增加, T_m 和 T_s 舌状花红褐色部分直径比对照增加,差异显著。在野生状态下‘昆仑雪菊’也存在多瓣化、雄蕊瓣化等一系列观赏性状的变异,但是没有出现过整株性状变异的情况。

表 3 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花形的影响

Tab.3 Effect of ARTP irradiation on the flower shape of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

辐照时间/min	总植株数	T_m 比例/%	T_s 比例/%	T_t 比例/%
0.00	45	0.00	0.00	0.00
22.50	45	13.33	6.67	6.67

注: T_m :多瓣化的变异植株; T_s :雄蕊瓣化的变异植株;
 T_t :管状化的变异植株。下同。

表 4 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花径大小的影响

Tab.4 Effect of ARTP irradiation on the maximum flower diameter of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

辐照时间/min	花径/mm	红褐色部分直径/mm
0.00	38.65±2.12b	21.19±2.031c
22.50	T_0	40.99±2.28b
	T_m	39.58±0.52b
	T_s	45.06±1.16a
	T_t	35.15±0.43c
		22.34±1.22bc
		25.30±1.81a
		23.70±0.48ab
		20.36±0.23c

注: T_0 :处理后未发生变异的植株,下同。

2.4 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花中活性成分的影响

ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花中活性成分的影响见表 5。ARTP 处理后,‘昆仑雪菊’花中活性成分均发生了变化, T_t 变异株系的变化最为显著。 T_t 变异株系的绿原酸、木犀草苷含量分别高于对照 38.80% 和 10.68%, 达到显著水平,总黄酮高于对照 11.86%。

3 讨 论

目前已有大量的诱变育种手段在植物育种上广泛应用,如化学诱变(秋水仙素诱变)、物理诱变(温度处理、紫外线处理和辐射处理等)。ARTP 作为一种新的诱变育种方式,产生的等离子体中富含各种化学活性粒子,可以对菌株/植物细胞产生多重作用,造成 DNA 结构的多样损伤,引起细胞膜通透性和蛋白结构的改变等^[3],因此 ARTP 具有突变率高、突变位点丰富、操作简便、安全性高(辐射水平低于手机辐射强度)等优点,

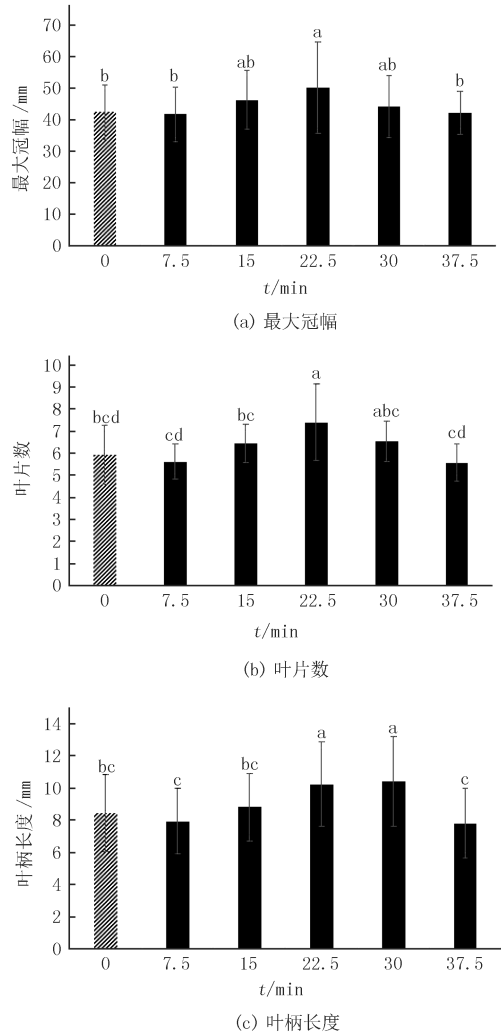


图 2 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’幼苗最大冠幅 (a)、叶片数 (b) 和叶柄长度 (c) 的影响 (40 d)

Fig.2 Effect of ARTP irradiation on the maximum crown length(a), the number of leaves(b), the length of petiole(c) of *Coreopsis tinctoria* Nutt. (40 d)

并已被广泛运用于微生物的诱变育种中,比如酵母菌、番茄红素产生菌等,产生了大量的高产突变菌株^[5]。但在植物方面 ARTP 诱变技术的应用刚刚开始,处于探索阶段。研究表明,大气压等离子体处理黄瓜和番茄^[18]等植物的种子,能促进其萌发、使其植株干重增加,同时增加抗病性、提高产量等^[17];短时间的 ARTP 辐照对玉米种子的发芽势和发芽率没有显著性的影响,但是随着处理时间的增加,苗干质量增加,根长与苗高比降低,处理玉米花粉后影响了花粉的萌发^[6]。

本研究首次使用 ARTP 对‘昆仑雪菊’的种子进行不同时间的辐照,并对辐照过的种子的发芽势、发芽率、幼苗的长势,以及花形花色、花中活性成分的含量进行了全面的研究,不同时间的 ARTP 辐照使‘昆仑雪菊’的发芽势、发芽率有所提高,最大冠幅、叶片数量、叶柄长度和叶面积有不同程度的增加,其中 22.50 min 的辐照时间效果最佳。ARTP 辐照 22.50 min 后,出现最大花径普遍增加、花基部红褐色部分增大等提高观赏性的花形的变异及活性成分增加的变异。这些变异株系的形成为进一步选育优质的、观赏价值高的‘昆仑雪菊’新品种奠定了基础。ARTP 诱变有望成为植物诱变育种的新途径。

由上可知, T_t 株系是花形变异和活性成分含量提高兼具的突变株系。

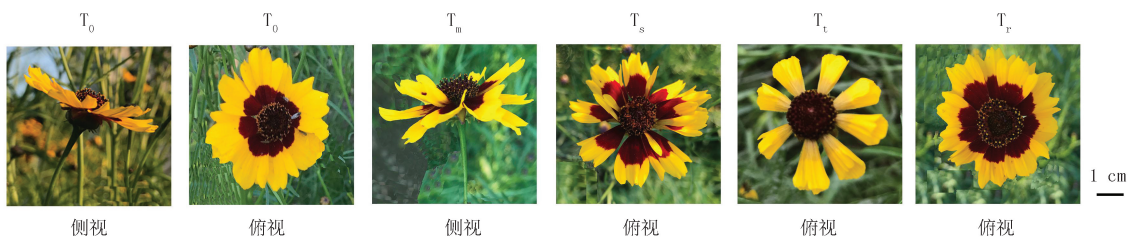


图 3 ARTP 辐照 22.50 min 对‘昆仑雪菊’花形影响的形态图

Fig.3 Effect of ARTP irradiation on flower shape of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

表 5 ARTP 辐照对‘昆仑雪菊’花中活性成分含量的影响

Tab.5 Effect of ARTP irradiation on active component content in flower of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

辐照时间/min		总黄酮/(mg · mL ⁻¹)	绿原酸/(mg · g ⁻¹ DW)	木犀草苷/(mg · g ⁻¹ DW)
0.00		18.80 ± 1.36a	2.09 ± 0.19b	159.61 ± 13.43b
	T_0	18.89 ± 1.65a	1.78 ± 0.02c	149.31 ± 5.22b
	T_m	19.43 ± 3.03a	1.68 ± 0.04c	145.05 ± 7.77b
22.50		15.37 ± 0.19b	1.06 ± 0.13d	144.50 ± 3.24b
	T_s	15.37 ± 0.19b	1.06 ± 0.13d	144.50 ± 3.24b
	T_t	21.03 ± 0.91a	2.90 ± 0.16a	176.68 ± 6.34a

注:DW:干质量。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院植物研究所.《中国植物志》第 75 卷[M].北京:科学出版社,1979:364.
- [2] 杜鹃,吴忠红.新疆昆仑雪菊总黄酮含量测定方法研究[J].食品研究与开发,2015(1):93-96.
- [3] Zhang X,Zhang X F,Li H P,et al.Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool.[J].Appl Microbiol Biotechnol,2014,98(12):5387-5396.
- [4] Zhang X,Zhang C,Zhou Q Q,et al.Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J].Appl Microbiol Biotechnol,2015,99(13):5639-5646.
- [5] 吴亦楠,邢新会,张翀,等.ARTP 生物育种技术与装备研发及其产业化发展[J].生物产业技术,2017(1):37-45.
- [6] 骆美洁,赵衍鑫,宋伟,等.常压室温等离子体对玉米种子及花粉萌发的影响[J].分子植物育种,2016,14(5):1262-1267.
- [7] 顾承星,翟德武,阿不来提·马合木提.和田县平原昆仑雪菊栽培技术[J].新疆农业科技,2011(6):39-40.
- [8] 杨长琴,张国伟,刘瑞显,等.种植密度和缩节胺调控对麦后直播棉产量和冠层特征的影响[J].棉花学报,2016,28(4):331-338.
- [9] 叶尔根·夏依木拉提.盐胁迫对雪菊种子萌发及幼苗生理和生长特性的影响[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2015.
- [10] 黄庆文.果树叶片近似叶面积计算公式[J].沈阳农业大学学报,1990(90):59-61.
- [11] 刘素华,彭延,彭小峰,等.调亏灌溉与合理密植对旱区棉花生长发育及产量与品质的影响[J].棉花学报,2016,28(2):184-188.
- [12] 宋琳琳,罗乐,武鹏飞.超声波法对菊花中总黄酮提取工艺的优化[J].贵州农业科学,2010,38(10):188-189.
- [13] 买买提·艾买提,木合布力·阿布力孜,孟磊.新疆昆仑雪菊水溶性总黄酮的含量测定[J].海峡药学,2010,22(10):56-58.

- [14] 王艳,张彦丽,阿依吐伦·斯马义.分光光度法测定新疆昆仑雪菊中总黄酮的含量[J].新疆医科大学学报,2011,34(8):817-819.
- [15] 木合布力·阿布力孜,张燕,景兆均,等.新疆昆仑雪菊化学成分的初步定性研究[J].新疆医科大学学报,2010,33(6):628-630.
- [16] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015
- [17] 周筑文,黄燕芬,杨思泽,等.大气压等离子体处理对番茄生长发育及产量与品质的影响[J].安徽农业科学,2010,38(2):1085-1088.

Biological effect of ARTP irradiation on mutagenesis of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

Zhao Xiting^{1a,b,c}, Xu Yan^{1a}, Lyu Meng^{1a}, Pu Tengfei^{1a}, Wang Liyan², Li Mingjun^{1a,b,c}

(1.a.College of Life Sciences;b.Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs in Henan Province;c.Henan Province Engineering Laboratory of Green Medicinal Plant Biotechnology, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
2.Biological breeding center of Wuxi Institute of Applied Technologies, Tsinghua University, Wuxi 214072, China)

Abstract: ARTP (Atmospheric and room temperature plasma) irradiation has been widely used in the breeding of micro-organisms as a new, safe and efficient biological mutation breeding method. Its application in plants has just been started. In this study, the seeds of *Coreopsis tinctoria* Nutt. were irradiated by ARTP for the first time. After irradiation, the change of seed germination, seedling growth, flower shape and quality were studied. The study's purpose to generate mutant strains with improved ornamental value and flower quality. The results showed that: (1) Compared with the control, the different ARTP irradiation time (7.50—37.50 min) improved the germination potential and germination rate of *Coreopsis tinctoria* Nutt. seeds, the maximal value of 80.00% and 86.70% at 22.50 min, respectively; the maximum crown length, the number of leaves, the length of petiole and the area of leaf increased with the extension of ARTP irradiation time, and the effect was the best at 22.50 min. (2) After 22.50 min of ARTP irradiation, the maximum flower diameter and the red brown area of ligulate flowers (Tr) of most plants increased significantly; the number of ligulate flowers petals of 13.33% plants was increased (Tm), stamens of 6.67% plants were petaloid (Ts) and ligulate flower of 6.67% plants became trumpet-shaped (Tt); contents of flavonoids, chlorogenic acid and galuteolin in some plants' flowers were increased, especially in the Tt plants, not only the flower shape was changed but also the active components were increased. ARTP irradiation is expected to become a new way of breeding for *Coreopsis tinctoria* Nutt.

Keywords: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; Atmospheric and room temperature plasma; irradiation; seed; biological effect

[责任编辑 王凤产]