

微核监测技术在蚕豆种质资源耐盐性评价中的应用研究

郑开斌¹, 李爱萍¹, 臧春荣², 纪荣昌¹

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院科研处, 福建 福州 350003)

摘要: 研究了 100 份蚕豆种质的根尖细胞微核率及盐敏指数差异情况, 以盐胁迫发芽试验的相对盐害率为参考指标, 分析微核率、盐敏指数和相对盐害率间的相关关系。结果表明: 微核监测技术适用于蚕豆种质的耐盐性鉴定, 供试的 100 份蚕豆种质在 3.0% NaCl 盐溶液胁迫下的微核率变异幅度为 8.3%~15.3%, 盐敏指数变异幅度为 0.33~2.56; 以盐敏指数为耐盐指标, 对上述 100 份蚕豆种质资源进行耐盐力分级, 其中 I 级占 3%、II 级占 9%、III 级占 18%、IV 级占 32%、V 级占 38%。

关键词: 微核监测; 微核率; 耐盐性; 盐胁迫; 盐敏指数; 种质资源; 蚕豆

中图分类号: S 643.6

文献标识码: A

Application of micronucleus test technology to salt-tolerance evaluation in broadbean germplasm resources

ZHENG Kai-bin¹, LI Ai-ping¹, ZANG Chun-rong², JI Rong-chang¹

(1 Crop Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2 Department of Agricultural Sciences Management, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: The difference of root tip cell micronucleus frequency and salt-sensitive index among 100 *Vicia faba* varieties were studied. Correlativity among micronucleus frequency, salt-sensitive index and relatively salt damage rate were analyzed by the relatively damage rate of seedlings under salt-stress. Micronucleus test technology was adapted to appraise salt-tolerance of *Vicia faba*, the *Vicia faba* micronucleus frequency were 8.3% to 15.3%, the salt-sensitive index were 0.33 to 2.56 under 3.0% NaCl. Salt-tolerance of 100 *Vicia faba* varieties was divided into 5 grades by salt-sensitive index, among which, I in 3%, II in 9%, III in 18%, IV in 32% and V in 38%.

Key words: micronucleus test; micronucleus frequency; salt-tolerance; salt-stress; salt-sensitive index; germplasm resources; broad bean

微核测定技术是一种遗传毒理方面致突变的检测方法, 其原理是生物细胞受到辐射或化学药物等污染物攻击时, 细胞染色体有丝分裂后期着丝粒散失, 正常交换受到干扰, 甚至发生染色体断裂, 产生各种染色体片断, 这些染色体片断可能发生畸变, 并分布在主核的周围形成微核 (micronucleus), 微核的多少 (常以微核千分率 MCN % 表示) 反映污染物对生物体的危害和损伤程度。微核监测技术是联合国环境规划署 (UNEP)、世界卫生组织 (WHO) 以及中国、美国等国家和地区指定的环境生物监测手段之一, 以蚕豆根尖细胞为检测材料的蚕豆微核率 (*Vicia* MCN %, 常以 VM-CN % 表示) 指标已被许多国际性机构和国家 (如

国际经济合作与发展组织、国际环境诱变剂和致癌剂防护委员会、美国环保局、日本国立卫生实验所以及我国卫生部、国家环保总局) 列为环境生物监测的常规指标。

盐溶液的胁迫可以导致蚕豆根尖细胞微核率的增加, 不同蚕豆品种的敏感程度不同^[1]。本研究通过测定 100 份蚕豆种质在一定盐浓度胁迫下的微核率变化, 并以常规盐胁迫发芽试验的盐害率指标为对照, 试图揭示蚕豆微核率变化与品种耐盐性之间的关系, 确立微核监测试验的耐盐性指标, 以期为蚕豆种质资源耐盐力的评价提供一条定量、高效、快速、准确、简便的室内鉴定途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

国内外征集引进的蚕豆种质资源中随机选取100份作为试验材料, 种质资源根据其在1.0% NaCl溶液胁迫下的相对盐害率从低到高以代号B₁、B₂、B₃、…、B₁₀₀表示。

1.2 发芽试验与相对盐害率计算

供试材料用5%次氯酸钠浸种消毒20 min后, 清水冲洗3次。用1.0% NaCl溶液浸种48 h, 然后在培养皿中铺上以1.0% NaCl溶液浸润的滤纸, 每皿放10粒种子, 再覆盖以1.0% NaCl溶液浸润过的滤纸, 每天定时用1.0% NaCl溶液保持湿润, 置于25℃恒温条件发芽, 每品种重复3次, 以蒸馏水处理的为对照。当胚芽达到种长一半时视为发芽。调查各品种发芽率, 按以下公式计算相对盐害率(%), 各品种的相对盐害率为3次重复的算术平均数, 经生物学统计分析品种间差异:

$$\text{相对盐害率}(\%) = [(\text{对照发芽率} - \text{处理发芽率}) / \text{处理发芽率}] \times 100$$

1.3 微核监测试验

配置3.0% NaCl盐溶液, 观察上述100份蚕豆种质资源在3.0% NaCl盐溶液胁迫下的微核发生情况, 以蒸馏水处理为对照, 统计各品种在盐胁迫和对照中的蚕豆微核千分率(VMCN‰)。盐胁迫处理及微核观测的试验程序参照国家环保总局《环境监测技术规范(第4册): 生物监测部分》的操作规范^[5]并进行如下优化: 蚕豆种子在25℃下浸种30 h, 并在25℃恒温催芽, 当种根长出2~3 mm时选取发芽良好的种子继续培养36~48 h, 当种根长2~3 cm时浸入3.0% NaCl溶液中6 h, 取出, 清水浸洗3次(每次2~3 min), 25℃恒温培养恢复24 h。切取根尖1 cm, 进行卡诺氏液固定24 h, 置70%乙醇中4℃冰箱保存备用。在12 h内完成根尖的染色、制片、镜检和微核统计。

细胞中微核标准为: 小于主核1/3、与主核分离的、染色与主核相同或相近的圆形、椭圆形、不规则的小核。每根尖观察1 000个细胞中的微核数。

$$\text{蚕豆微核率} \text{VMCN} (\%) = (\text{观察到的微核数} / \text{观察的总细胞数}) \times 1000$$

1.4 盐敏指数的计算

由于不同蚕豆品种的微核率本底值(即蚕豆品种在蒸馏水处理下的微核率)不同^[3~4], 为了消除本底值的影响, 本文提出盐敏指数(s)的概念,

其计算公式如下:

$$\text{盐敏指数} (s) = (\text{处理微核率} - \text{对照微核率}) / \text{对照微核率}$$

s越小说明蚕豆品种对盐胁迫越不敏感, 即耐盐力越强, 反之, 则耐盐力越弱。

2 结果与分析

2.1 不同蚕豆品种的相对盐害率比较

从蚕豆发芽试验结果显示, 在参试的100份蚕豆种质资源中, 相对盐害率最小的为15%, 最大的达93%, 差异极大(图1)。方差分析表明(表1): 品种间相对盐害率存在极显著差异($F = 2420.7 > F_{0.01}$), 说明蚕豆品种耐盐性具有显著的品种间差异。

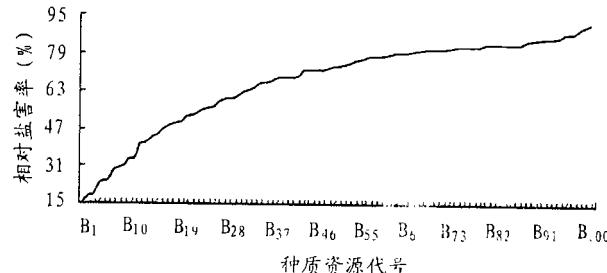


图1 100份蚕豆种质资源相对盐害率曲线

Fig 1 The relatively salt damage rate of 100 *Vicia faba* varieties

表1 不同蚕豆品种相对盐害率方差分析

Table 1 Variance analysis on the relatively salt damage rate of 100 *Vicia faba* varieties

变异来源	SS	df	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
品种间	112610.1	99	1137.475	2420.7 ^{**}	1.32	1.48
误差	93.98	200	0.4699			
总计	112704	299				

2.2 不同蚕豆品种微核率比较

从图2看出, 在对照组中不同蚕豆品种的微核率也存在一定的差异, 最低的B₇₁和B₇₅为3.42‰, 最高的B₈为6.63‰, 从B₁、B₂、B₃、…、B₁₀₀没有一定的规律, 即蚕豆微核率本底值的大小与蚕豆自身的耐盐力(相对盐害率)不存在明显的相关性。而在盐胁迫处理下的蚕豆微核率随着相对盐害率的提高总体上呈现出了上升的趋势, 最低的是B₁, 微核率为8.3‰, 最高的是B₁₀₀, 微核率为15.3‰, 但整条曲线波动较大, 说明这种趋升的规律并不明显, 如种质资源B₂₄、B₂₅、B₂₆、B₂₇的微核率分别为12.8‰、12.3‰、11.9‰、10.7‰。

与总体上升趋势相反反而呈局部下降趋势。可见,仅以微核率作为蚕豆品种耐盐力的评价指标似乎难以真实反映蚕豆品种的耐盐能力。

2.3 不同蚕豆品种盐敏指数的变化趋势

图 3 显示,蚕豆不同品种的盐敏指数随着相对盐害率的提高而呈现明显的上升趋势,最低的 B_1 为 0.33,最高的 B_{100} 为 2.56,整条曲线的走势与图 1 相近,尤其是当盐敏指数 s 介于 0~2.0 时,这种趋升的规律性十分明显。

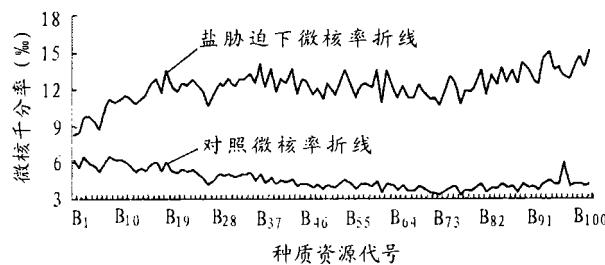


图 2 100 份蚕豆种质资源在盐胁迫和对照下的微核率变化曲线

Fig 2 The micronucleus frequency of 100 *Vicia faba* varieties in salt solution and water

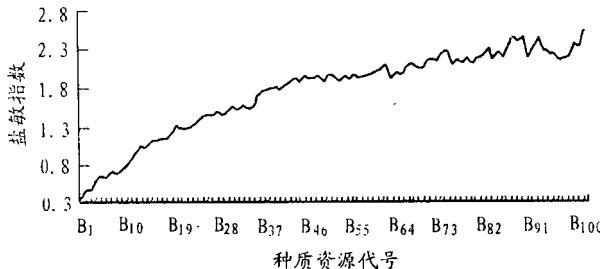


图 3 100 份蚕豆种质资源盐敏指数趋势

Fig 3 The salt-sensitive index of 100 *Vicia faba* varieties

2.4 相对盐害率、微核率、盐敏指数的相关分析

相对盐害率、微核率、盐敏指数三项指标均在一定程度上体现蚕豆的耐盐力,相对盐害率是传统

的耐盐指标,受到许多学者的认可和引用^[2],微核率和盐敏指数是本文提出来的 2 项新指标,为了探讨这 3 项指标间的关系,对 3 项指标进行相关性分析,结果如表 2 所示,可以看出 3 项指标两两之间均存在极显著正相关,其中以盐敏指数与相对盐害率间的相关系数最大,达到 0.9766。这说明在以微核监测技术评价蚕豆品种的耐盐力时,以盐敏指数为指标比微核率指标更能准确反映蚕豆品种的真实耐盐力。

2.5 蚕豆耐盐力分级标准

在采用相对盐害率来衡量蚕豆的耐盐力时,通常将蚕豆耐盐力分为 5 级^[2](表 3),Ⅰ 级、Ⅱ 级、Ⅲ 级、Ⅳ 级、Ⅴ 级耐盐性依次减弱,Ⅴ 级对盐胁迫最敏感。根据相对盐害率的分级标准,供试的 100 份蚕豆种质资源中Ⅰ 级占 3%、Ⅱ 级占 8%、Ⅲ 级占 19%、Ⅳ 级占 34%、Ⅴ 级占 36%,说明高耐盐的资源比例很低。在以盐敏指数作为蚕豆耐盐力指标时,同样将蚕豆耐盐力分为 5 级,各等级标准如表 3,根据该标准对供试的 100 份蚕豆种质资源的耐盐力进行分级,结果Ⅰ 级占 3%、Ⅱ 级占 9%、Ⅲ 级占 18%、Ⅳ 级占 32%、Ⅴ 级占 38%,与采用相对盐害率分级标准的结果基本相同,说明盐敏指数的上述分级标准是比较可行的。

表 2 相对盐害率、微核率、盐敏指数的相关系数

Table 2 Correlation factors of the relatively salt damage rate, micronucleus frequency and salt-sensitive index

	相对盐害率	微核率
相对盐害率		
微核率	0.3114**	
盐敏指数	0.9766**	0.3497**

注: $R_{0.05} = 0.195$, $R_{0.01} = 0.254$ 。

表 3 100 份蚕豆种质资源的耐盐力分级情况

Table 3 Salt-tolerance grade of 100 *Vicia faba* varieties

耐盐等级					
相对盐害率	标准	$0 < h \leq 20.0$	$20 < h \leq 40.0$	$40 < h \leq 60.0$	$60 < h \leq 80.0$
	各等级比例(%)	3	8	19	34
盐敏指数	标准	$s \leq 0.5$	$0.5 < s \leq 1.0$	$1.0 < s \leq 1.5$	$1.5 < s \leq 2.0$
	各等级比例(%)	3	9	18	32

3 小结与讨论

3.1 蚕豆品种间耐盐力差异显著

朱志华等(1990年)对663份蚕豆种质资源的耐盐性进行芽期和苗期鉴定,结果表明蚕豆不同品种的相对盐害率有很大差异^[2]。本试验无论从相对盐害率还是盐敏指数指标来看,不同蚕豆品种对盐胁迫的敏感程度显著不同,说明蚕豆品种耐盐力存在显著的品种间差异,从蚕豆种质资源中筛选高耐盐种质进而用于耐盐育种是有效和可行的。同时,试验结果也显示,蚕豆高耐盐种质的比例很少,仅在3%左右,所以探讨和建立准确、灵敏的耐盐性鉴定方法显得尤为重要。

3.2 微核监测技术是蚕豆品种耐盐力评价的有效手段

蚕豆染色体 $2n=12$,在微核监测中具有染色体数目少、染色体大、微核易于观察等优点,这也是环境生物监测中首选蚕豆作为检测材料的主要原因。蚕豆根尖细胞在盐胁迫下产生的微核清晰,易于计数,微核率重复性高,用于蚕豆耐盐力鉴定具有定量、准确等诸多优势,很适合用于蚕豆耐盐力的鉴定和评价。由于以往蚕豆品种耐盐力鉴定方法的研究很少,现有文献报道的均是采用盐胁迫发芽试验、盐土田间出苗试验或田间盐害症状调查的方法进行鉴定,鉴定时间长,易受季节和外界自然条件的限制和影响,使得鉴定结论准确性低、重复性差。微核监测技术用于鉴定蚕豆耐盐力作为一种全

新的方法,在盐胁迫浓度、时间等方面有必要通过试验进一步加以完善,以建立更加科学、合理的微核监测室内操作规范,以期为蚕豆种质耐盐性评价提供更加理想的鉴定手段。

3.3 盐敏指数是微核监测中蚕豆耐盐力的评价指标

由于蚕豆品种微核率的本底值存在较大差异^[3-4],以微核率作为蚕豆品种的耐盐评价指标难以真实反映蚕豆品种的耐盐能力。本文提出的盐敏指数能较好地剔除本底值的影响,是微核监测中评价蚕豆品种资源耐盐力的良好指标。采用盐敏指数为指标,对100份供试的蚕豆种质资源耐盐力进行分级,其结果与采用相对盐害率为指标的分级结果基本相符。

参考文献:

- [1] 郑开斌,李爱萍,臧春荣,等.微核监测技术应用于蚕豆耐盐力鉴定试验[J].福建农业科技,2006,(5): 45-46.
- [2] 朱志华,王明珍,宋景芝,等.蚕豆和豇豆品种耐盐性鉴定初报[J].作物品种资源,1990,(4): 29-30.
- [3] 段昌群,杨俊波,卢秀萍,等.蚕豆微核监测在云南地区的品种优选及应用[J].云南大学学报,1994,16(3): 250-255.
- [4] 金波,陈光荣.蚕豆根尖微核试验敏感品种的筛选[J].华中师范学院学报,1984,(2): 48-51.
- [5] 国家环保总局.环境监测技术规范:第4册[M].北京:中国环境科学出版社,1991: 64-126.

(责任编辑:翁志辉)