

低能碳、氮离子对甜叶菊萌发率、 生长量及过氧化物酶的影响

王鸣刚 罗茂春* 张向红 沈明山 陈睦传

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 以经过碳、氮 (75×10^{14} keV / cm^2) 离子注入处理后的甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertonii) 种子为材料, 研究低能离子注入对甜叶菊萌发率、生长量及过氧化物同工酶的影响。结果表明: (1) 萌发期处理组的萌发率低于对照, 萌发延迟, 幼苗成活率不及对照组; 萌发后期处理组的相对生长量、过氧化物酶活性高于对照组。(2) 幼苗移至实验地种植后, 处理组幼苗长势明显优于未处理组, 处理组 60 d 蓄株比明显高于对照组。(3) 过氧化物酶同工酶谱分析发现, 对照组具有完整 6 条基本带的植株数为 12 具有完整 B1 B2 基本带的植株数为 20 C^+ 处理组分别为 5 和 11, N^+ 处理组分别为 5 和 6 统计发现低能离子的注入影响最大的是同工酶谱 B1 B2 带。 N^+ 处理组生物学负效应大于 C^+ 处理组。

关键词: 甜叶菊; 离子注入; 萌发率; 生长量; 过氧化物酶

中图分类号: Q 691.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X (2001) 02-0143-06

Effects of Low Energy Carbon Ion and Nitrogen Ion Implantation on Germination Rate, Growth Weight and Peroxidase of *Stevia rebaudiana* Bertonii

WANG Ming-Gang LUO Mao-Chun, ZHANG Xiang-Hong,
SHEN Ming-Shan CHEN Mu-Chuan

(Key Laboratory of the Ministry of Education Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The paper reports the effects of low energy Carbon and Nitrogen ion (75×10^{14} keV / cm^2) implantation into *S. rebaudiana* seeds on germination rate, relative growth weight and peroxidase of *S. rebaudiana*. The results showed (1) The seed germination rates were lower and seeding survival rates and development speeds were slower in the treated groups than those in the control in the initial period of seed germinating but in the late period of seed germinating the relative growth weight and peroxidase activity were higher in treated groups than those in the control (2) When seedlings were transplanted into ex-

收稿日期: 2000-06-20 修回日期: 2001-02-17

基金项目: 国家基金委重大项目资助课题 (19890300)

作者简介: 王鸣刚 (1962-) 男, 博士, 主要从事植物细胞分子生物学研究

* 福建省龙岩师专生物学系进修教师, 福建省龙岩市, 364000

perim ental field the grow th and developm ent w ere speeded up in treated groups than that in the control The rate of flow er bud plants w ere higher in treated groups than that in the control (3)The isozym ogram of peroxidase by PAGE show ed that there w ere 12 plants w hich had 1~ 6 basic bands and 20 plants w hich had B1, B2 bands in the control but only there w ere 5 plants and 11 plants respectively in C^+ treated groups and there w ere 5 plants and 6 plants respectively in N^+ treated groups The result also show ed there w ere m ore negative effects by ion im plantation into *S. rebaud iana* in N^+ treated groups than those in C^+ treated groups in the periods of seed gem inating and plant grow th.

Key words Gem inant rate; Grow th w eight; Ion im plantation; Peroxidase; *S tevia rebaud iana*

甜叶菊 (*S tevia rebaud iana* Bertoni)属甜菊科甜菊属, 原产南美洲, 为多年生草本植物。其叶片含有甜度高、低热量、无毒的甜菊糖苷, 可替代蔗糖和糖精应用于饮料、食品、医药和日用化工等多种行业; 是糖尿病、高血压、高血脂患者的理想甜味剂; 因而甜叶菊是一种颇有前景的糖料植物。我国自 1977 年从日本引种成功以来, 在全国广泛种植, 已成为继蔗糖、甜菜糖后的第三大天然糖原^[1]。由于甜叶菊是自交不亲和的异花授粉植物, 极易杂交而导致品质退化, 因此选育甜叶菊优质新品种尤为重要。

自 1986 年中科院等离子体物理研究所余增亮和安徽农科院合作, 率先用 50 keV N^+ 离子注入水稻干种子进行诱变效应研究, 获得可喜结果以来, 离子束作为一种新的诱变源已被广泛应用在小麦、玉米、大豆、棉花、甘薯、烟草、果树、蔬菜等多种作物^[2-4]。舒世珍等^[5]应用 N^+ 离子注入技术选育出品质较好的 R-A 糖苷组分含量高的甜叶菊新品种。罗茂春等^[6]发现 C^+ (100×10^{15} keV / cm^2) 离子注入甜叶菊种子后出现萌发迟缓、生长速度变慢、叶绿体发育减慢和叶绿体膜被破坏等现象。丁亮等^[7]应用 RAPD 技术分析 N^+ 离子注入后甜叶菊幼苗基因组变化, 从 DNA 水平确定低能离子注入对甜叶菊的生物学效应。有关离子注入甜叶菊后其效应的原初反应机理特别是分子生物学机理的研究报道很少。笔者就碳、氮离子注入甜叶菊后, 对其种子萌发、幼苗生长, 特别是对萌发期间及幼苗生长期间的过氧化物酶 (POD) 活性及同工酶酶谱的变化进行了分析, 为进一步探明离子注入甜叶菊的生物学效应, 培育甜叶菊新品种奠定理论基础。有关的研究内容还未见报道

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料为甜叶菊 (*S tevia rebaud iana* Bertoni)“云宾”品种干种子, 由中国农科院品种资源研究所舒世珍研究员提供; 于北京师范大学低能核物理研究所进行碳、氮 (75×10^{14} keV / cm^2) 离子注入处理。

1.2 种子的萌发

取经碳、氮离子注入处理的“云宾”甜叶菊种子 80 粒, 经消毒灭菌后, 置于铺有吸水纸的培养皿中, 人工光照培养箱 ($25^\circ C \pm 1^\circ C$) 中萌发、生长, 定期取样。统计萌发率、生长量, 测定过氧化物酶活性。待幼苗为 10 d 龄时移至实验地种植。设 3 次重复, 取平均值进行统计。统计学处理采用 t 检验及 X^2 检验。

1.3 过氧化物酶活性及同工酶的分析

在培养皿中及实验田内随机取经碳、氮 ($75 \times 10^4 \text{ keV} / \text{cm}^2$) 离子注入处理后的甜叶菊幼苗及成苗 36 株, 取其茎尖处叶 2 片, 进行 POD 活性测定及同工酶的分析。以未经离子注入处理后的甜叶菊为对照。酶液提取、活性测定、制胶、电泳及染色, 依据吴少伯^[8]和胡能书^[9]的方法改进完成。

1.4 过氧化物酶同工酶酶谱的统计与分析

由于甜叶菊为一高度异交的杂合群体, 每一单株具有自己的特异 POD 同工酶酶谱, 但统计后发现其品种内存在基本酶谱, 即未处理的“云宾”甜叶菊品种群体中具有 6 个基本的 POD 同工酶酶带。从试验的 108 株植株 POD 酶谱看出, 各个单株的酶谱均在 6 个基本带范围内。通过比较处理组和对照组试验的 36 株植株的同工酶基本带缺失频率的变化, 能够较为准确地反映处理组间同工酶谱带多态性变化的特征。

2 结果与分析

2.1 碳、氮离子注入后对甜叶菊种子萌发期间生物量的影响

碳、氮离子处理后, 甜叶菊种子萌发率、萌发速率、幼苗成活率及后期生长等都受到一定影响(图 1, 表 1)。种子萌发 1~4 d 处理组相对生长量低于对照组, 但萌发至第 5 d 后其生长速率逐渐加快, 相对生长量高于对照组, 其中碳处理组高于氮处理组。

表 1 碳、氮离子注入对甜叶菊生长发育的影响

Table 1 Effect of Carbon and Nitrogen ion implantations into *S. rebaudiana* on growth and development of *S. rebaudiana*

处理 Treatments	萌发率 (%) Germinating rates	萌发速率 Germinating speeds	10 d 龄 4 叶 株数比 (%) Num. of 10-d plant with 4 leaves per 100 plants	30 d 株高 (cm) 30-d plant height	60 d 株高 (cm) 60-d plant height	60 d 株干重 (g) 60-d plant dry weight	60 d 蕾株比 (%) Buds/Plants (per 100 plants)
C ⁺	79 ± 2.7	+	44 ± 1.5	9.7 ± 2.8	26.9 ± 2.1	14.5 ± 0.2 [*]	70.8 ± 2.8 ^{**}
N ⁺	84 ± 2.1	+	43 ± 1.8	8.4 ± 1.8	24.2 ± 2.3	14.4 ± 0.5 [*]	62.0 ± 2.3 [*]
对照组 (CK)	90 ± 1.6	+++	78.9 ± 1.8	7.2 ± 0.6	22.8 ± 0.9	12.5 ± 0.3	48.2 ± 2.5

* 与未处理比较显著差异水平 $P < 0.05$; ** 与未处理比较显著差异水平 $P < 0.01$

* Compared with control group prominent difference level $P < 0.05$; ** Compared with control group prominent difference level $P < 0.01$

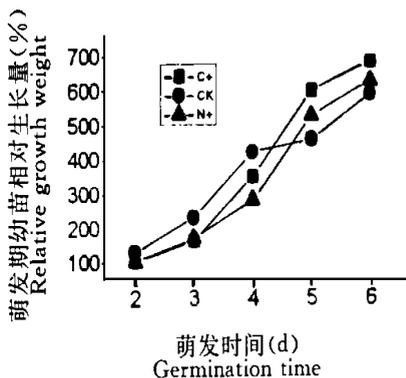


图 1 碳、氮离子注入对甜叶菊幼苗生长的影响
Fig. 1 Effects of C⁺ and N⁺ ion implantations on the growth of *S. rebaudiana* seedling

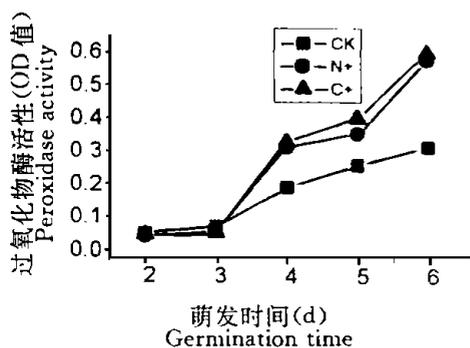


图 2 碳、氮离子注入对甜叶菊萌发期过氧化物酶活性的影响
Fig. 2 Effects of C⁺ and N⁺ ion implantations on peroxidase activities of *S. rebaudiana* during its seed germinating

2.2 种子萌发期间过氧化物酶活性变化

经碳、氮离子注入后,处理组在种子萌发的 1~4 d内,其 POD 活性均低于对照组(图 2),但随萌发天数的增加其 POD 活性迅速提高,其中碳处理组酶活性又高于氮处理组。这与图 1 的结果相吻合,可能是损伤修复后致使生长速度加快的结果。

2.3 碳、氮离子注入对甜叶菊幼苗期及成熟期的生长量及显蕾期的影响

经碳、氮离子注入后的甜菊种子萌发率、萌发速度低于对照组,萌发延迟(表 1) 幼苗成活率不及对照组。将萌发 10 d 幼苗移至大田种植后发现,10 d 龄 4 叶株百分比明显减少。但由于离子注入的效应,处理组存活植株生长至 30 d 时其平均株高、干重和 60 d 蕾株百分比明显高于对照组,其中碳处理组的植株长势优于氮处理组,说明低能离子注入可缩短甜叶菊植株生育周期,促使甜叶菊提早开花结果。这对开花结果的植物来说,是非常有意义的。

2.4 过氧化物酶同工酶酶谱变化

表 2 及图 3 4 5 表明:离子注入后可引起 POD 同工酶酶谱发生多态性变化,其中变化最明显的是 B1 B2 及 B6 酶带,而 B3 B4 和 B5 基本没有受离子注入的影响,但其活性在处理组中增加。对照组中具有 B1 B2 酶带的植株数为 20 株,而碳处理组为 11 株,氮处理组为 6 株。B6 酶带似乎由于氮离子的注入而频率降低(对照组为 22 株,碳处理组为 20

表 2 碳、氮处理组和对照组过氧化物酶同工酶酶谱变化的多态性*
Table 2 Changes of peroxidase isozymogram by Carbon and Nitrogen ion implantation into the *S. rebaudia*

POD 同工酶带 Peroxidase	对照 Control		C ⁺ 处理 C ion treatment		N ⁺ 处理 N ion treatment		总计缺失带 Total disappeared bands
	显带株数 Plants of appeared band	缺带株数 Plants of disappeared band	显带株数 Plants of appeared band	缺带株数 Plants of disappeared band	显带株数 Plants of appeared band	缺带株数 Plants of disappeared band	
B1 bands	21	- 15	12	- 24	8	- 28	- 67
B2 bands	26	- 10	18	- 18	17	- 19	- 47
B3 bands	28	- 8	26	- 10	29	- 7	- 25
B4 bands	31	- 5	30	- 6	32	- 4	- 15
B5 bands	28	- 8	32	- 4	33	- 3	- 15
B6 bands	22	- 14	20	- 16	16	- 20	- 50
总计 Total numbers	156	- 60	138	- 78	135	- 81	- 219

* 表中数据以每处理组 36 株基本株数表示

* The dates in table 2 were POD bands in 36 plants each group

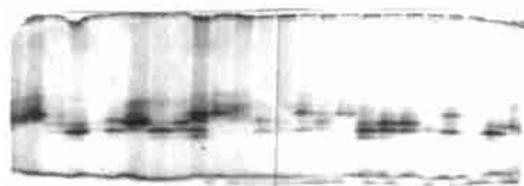


图 3a 碳离子处理组不同植株 POD 同工酶酶谱变化
Fig 3a Changes of peroxidase isozymogram in different plants treated by Carbon ion

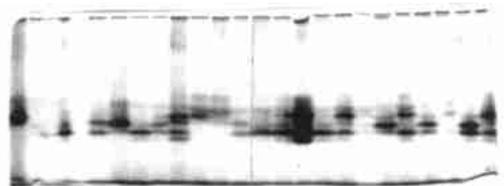
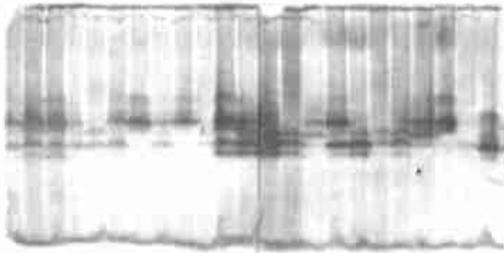
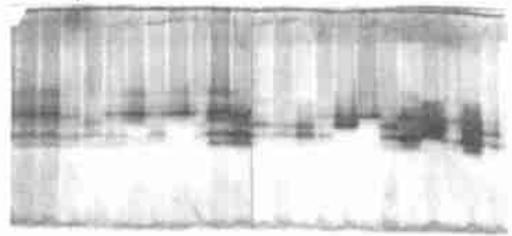


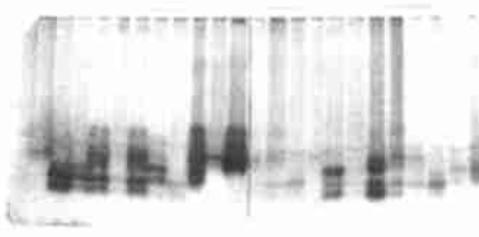
图 3b 氮离子处理组不同植株 POD 同工酶酶谱变化
Fig 3b Changes of peroxidase isozymogram in different plants treated by Nitrogen ion



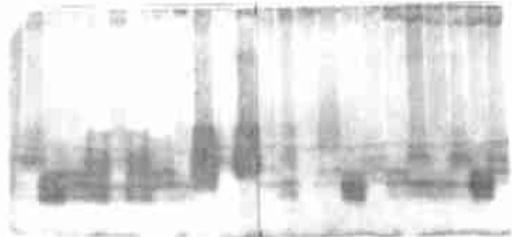
CK. 13~ 24株 (左); C⁺. 13~ 24株 (右)
 CK. No. 13~ 24 (left); C⁺. 13~ 24 (right)
 图 4a 碳离子处理组不同植株 POD 同工酶谱变化
 Fig. 4a Changes of peroxylase isozymogram in different plants treated by Carbon ion



CK. 13~ 24株 (左); N⁺. 13~ 24株 (右)
 CK. No. 13~ 24(left); N⁺. No. 13~ 24(right)
 图 4b 氮离子处理组不同植株 POD 同工酶谱变化
 Fig. 4b Changes of peroxylase isozymogram in different plants treated by Nitrogen ion



CK. 25~ 36株 (左); C⁺. 25~ 36株 (右)
 CK. No. 25~ 36 (left); C⁺. 25~ 36 (right)
 图 5a 碳离子处理组不同植株 POD 同工酶谱变化
 Fig. 5a Changes of peroxylase isozymogram in different plants treated by Carbon ion



CK. 25~ 36株 (左); N⁺. 25~ 36株 (右)
 CK. No. 25~ 36(left); N⁺. No. 25~ 36(right)
 图 5b 氮离子处理组不同植株 POD 同工酶谱变化
 Fig. 5b Changes of peroxylase isozymogram in different plants treated by Nitrogen ion

株,氮处理组为 16 株)。离子的注入也影响到具有完整基本酶带的株数,其中对照组具有 1~ 6 谱带植株数为 12 株,碳处理组为 5 株,氮处理组为 5 株,处理组明显低于对照组,结果还显示氮 N⁺ 离子的注入对甜菊的效应大于碳离子的注入。

3 讨论

离子注入生物体后与体内物质作用的过程,表现出能量和质量的沉积,而且辐射损伤区域只是局部的;又因为离子束是带电荷的粒子,穿透力小,所以离子注入生物体内表现出对生物体损伤小的特点^[2,3]。本实验结果表明:经低能碳、氮离子注入处理后,甜叶菊种子萌发率、萌发速率、幼苗成活率及后期生长等都受到一定影响,特别是在种子萌发前期,离子注入对甜叶菊的效应极为明显,处理组种子萌发率降低,萌发速率低,相对生长量低于对照组,但由于离子注入表现为对生物损伤轻、突变率高、突变谱广等特点,所以随萌发时间的延长,致死效应的消除及 DNA 损伤修复的结果^[3,8],处理组生长速度逐渐加快,相对生长量增加,体内过氧化物酶活性迅速提高,株高及干重迅速增加,并出现提前显蕾开花现象,群体中出现突变频率增高、突变谱广等特征。说明离子的注入不仅对甜叶菊种子萌发生产影响,而且其效应可延续到整个生长发育周期,此结果与丁亮等^[7]的研究结果相同,即低能离子的注入处理不仅对甜叶菊产生表型的生物学效应,而且影响整个基因组变

化。

酶是基因产物,是基因表达的结果。因此,同工酶在结构上的差异体现出基因表达异同,是认识基因活动即基因表达的生化指标^[9]。POD 同工酶属于单基因决定的同工酶^[10]。本实验结果还表明,离子注入后可引起 POD 的同工酶酶谱发生多态性变化,其中变异最明显的是 B1 B2 酶带的减少,具有完整 1~6 谱酶带植株数减少, B3 B4 B5 酶带活性增加。这些现象的出现,推测可能与低能离子注入有关,另一方面与过氧化物酶在植物体内具有的对有毒害的自由基和过氧化物起分解作用及加速植物木质化作用的功能有关,是植物受到外界逆境胁迫条件下自我保护机制启动的表现^[10 11]。这同样说明低能离子的注入不仅使得植物表型发生巨大变化,也能引起遗传物质的结构与功能的变化^[7, 12 13]。

同时,过氧化物酶活性增加,植物木质化作用的加速,可提高植物生长速度,缩短植物开花结果时间^[9]。本实验甜叶菊显蕾开花期的提前结果与前人一致,预示低能离子注入可缩短植物的生育周期,提早开花结果。对于以开花结果为主的植物来说,将具有非常重要的意义。将幼苗移至实验地种植后发现,碳处理组的幼苗生长势明显优于氮处理组

参考文献:

- [1] 舒世珍,陈睦传,陈绍潘,等. 中国甜菊栽培及应用技术. 北京: 农业出版社, 1994 1- 17
- [2] 余增亮. 离子束与生命科学——一个新的研究领域. 物理, 1998 27(6): 333- 338
- [3] 余增亮,霍裕平. 离子注入生物学评述. 安徽农业大学学报, 1994 21(3): 211- 225
- [4] 吴跃进,余增亮,吴家道,等. 离子注入在生物改良上的应用. 核农学报, 1996 17(6): 288- 290
- [5] 舒世珍,朱凤绥,陆挺,等. 氮离子注入甜菊种子效应初报. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 299- 302
- [6] 罗茂春,沈明山,徐金生,等. 低能离子对甜菊生长和叶绿体发育的影响. 厦门大学学报, 2000 39(1): 96- 101
- [7] 丁亮,陈睦传,沈明山,等. RAPD 分析氮离子注入甜菊种子后的幼苗基因组 DNA 变异. 生物物理学报, 1999 15(4): 798- 803
- [8] 岳忠厚. 离子注入生物学效应——一个新的研究领域. 科学, 1993(6): 42- 43
- [9] 吴少伯. 周围组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 植物生理学通讯, 1982(4): 22- 25
- [10] 梅慧生. 植物同工酶研究的某些进展. 植物生理学通讯, 1981(3): 1- 7
- [11] 胡能书,万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985 165- 198.
- [12] 陆廷,卫俊智,朱凤绥,等. 离子注入引起植物变异的研究. 北京师范大学学报, 1991 27(4): 421- 425
- [13] 吴丽芳,李红. 离子束生物工程应用研究进展. 物理, 1999 28(12): 708- 712