

CNIC-01198

CSANS-0115

氮离子注入甜菊的生物学效应^{*}

王彩莲 慎 玫 陈秋方

(浙江省农业科学院原子能利用研究所, 杭州)

陆 挺

(北京师范大学低能物理研究所, 北京)

舒世珍

(中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京)

摘 要

用不同能量和剂量的氮离子注入甜菊干种子, 研究其生物学效应, 并与⁶⁰Co γ 射线照射作对比。结果表明, 离子注入可诱发各种可见染色体结构变异及有丝分裂行为异常。随着注入离子的剂量和能量的提高, 染色体畸变细胞率呈增加趋势。染色体畸变细胞率与氮离子注入剂量的直线回归关系不显著; 但与 γ 射线照射剂量的直线回归关系极其显著。离子注入和 γ 射线照射对幼苗的生长都有一定的影响, 苗高随剂量提高而下降, 但对叶片数和节数的影响不明显。 γ 射线对甜菊 M_1 代的损伤大于氮离子束。

^{*} 国家和北京市自然科学基金资助项目

Biological Effect of Nitrogen Ion Implantation on *Stevia* (In Chinese)

WANG Cailian SHEN Mei CHEN Qiufang

(Institute for Application of Atomic Energy,
Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou)

LU Ting

(Beijing Normal University, Beijing)

SHU Shizhen

(Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

ABSTRACT

Dry seed of *stevia* were implanted by 35~150 keV nitrogen ions with various doses. The biological effect in M_1 was studied. The results showed that nitrogen ion beam was able to induce variation on chromosome structure in root tip cells. The rate of cells with chromosome aberration was increased with ion beam energy and dose added, but there was on significant linear regression relationship between ion dose and aberration rate. The results indicated the seedling height reduced with the increasing of dose for ion beam. The biological effect of nitrogen ion beam on M_1 *stevia* was lower than that of γ -rays.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China and Natural Science Foundation of Beijing.

前 言

甜菊属菊科 (*Compositae*), 又名甜叶菊、甜草, 是一种新兴的糖料作物。甜菊叶含糖甙, 其甜度为蔗糖的 150~300 倍, 而热能仅为蔗糖的 1/300, 是高甜度、低热能、有益健康的天然糖源。对糖尿病、肥胖症及小儿龋齿具防治作用^[1], 是一种理想的天然甜味剂。40 年代初作为糖料植物在国际上开始引起重视。我国于 1977 年从日本引种成功, 并在 20 多个省试种推广, 现已成为世界主要甜菊糖生产国。

由于甜菊为自交不亲和异花授粉作物, 品质极易杂交退化, 因此甜菊的优质新品种选育与甜菊糖的生产应用密切相关。由于甜菊种子十分细小, 表皮极薄, 对低能离子的阻挡作用很弱, 是研究离子注入生物效应的好材料。舒世珍等^[2]曾应用离子注入技术选育出较好的甜菊新品系。但有关离子注入甜菊的生物学效应未见详细报道。本文通过对甜菊 M_1 代的幼苗生长情况和细胞学观察, 评价了不同能量与剂量离子注入的生物学效应, 并与 γ 射线处理进行对比, 为将离子注入技术应用于甜菊品种改良提供理论和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

甜菊栽培品种“济宁”下种子。

1.2 诱变处理

氮离子注入在北京师范大学低能物理研究所进行, 能量设 35, 75 和 150 keV 三档, 每档能量的离子注入剂量为 $0, 10^{14}, 10^{15}$ 和 $10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$, 注入方式为间断式脉冲。 ^{60}Co γ 射线照射在本所辐照厅进行, 其剂量为 40, 80, 120 和 160 Gy, 剂量率为 0.83 Gy/min 。

1.3 细胞学观察

甜菊种子于室温下浸种催芽, 取 0.5~1.0 cm 的根用卡诺液固定, 改良品红染色, 压碎法制片, 进行显微观察。每处理观察 5~10 个根尖, 每个根尖随机观察 600 个左右细胞。计数根尖分生组织内携有可见染色体结构变异及有丝分裂行为异常的细胞数, 计算出现变异的细胞频率, 并作统计分析。

1.4 苗期性状考查

甜菊种子在室温下浸种催芽、生长, 40 d 后测量苗高, 考查单株叶片数和节数。

2 结果与分析

2.1 氮离子注入的细胞学效应

氮离子注入甜菊种子后, 在 M_1 代根尖细胞内可诱发各类可见染色体结构变异和有丝分裂行为异常, 包括染色体桥、微核、断片、落后染色体和三极分裂等。随着注入离子剂量和能量的提高, 染色体畸变细胞率呈上升趋势 (见表 1), 染色体畸变细胞率的剂量效应大于能量效应。

表 1 离子注入甜菊的染色体畸变细胞率/%

剂 量 N^+/cm^2	能 量 /keV		
	35	75	150
0	$0.57 \pm 0.16 \text{ aA}$	$0.57 \pm 0.16 \text{ aA}$	$0.57 \pm 0.16 \text{ aA}$
10^{14}	$0.89 \pm 0.17 \text{ bB}$	$0.92 \pm 0.16 \text{ bB}$	$0.97 \pm 0.14 \text{ bB}$
10^{15}	$1.03 \pm 0.11 \text{ cC}$	$0.99 \pm 0.14 \text{ bcB}$	$1.06 \pm 0.16 \text{ cB}$
10^{16}	$1.17 \pm 0.15 \text{ dD}$	$1.03 \pm 0.15 \text{ cB}$	$1.25 \pm 0.15 \text{ dC}$

注: 数字右侧小写 (大写) 英文字母相同者, 系 Duncan 多重比较法统计在 0.05 (0.01) 水平上无显著差异, 下同。

2.1.1 剂量效应

方差分析表明, 离子注入诱发的染色体畸变细胞率均极显著高于对照。剂量间的差异表现在 $10^{16} N^+/\text{cm}^2$ 与 10^{14} 和 $10^{15} N^+/\text{cm}^2$ 的极显著差异及 $10^{15} N^+/\text{cm}^2$ 与 $10^{14} N^+/\text{cm}^2$ 的显著差异。但离子注入剂量与染色体畸变细胞率的直线回归关系不显著 ($t=1.30$)。

2.1.2 能量效应

氮离子注入甜菊种子诱发染色体畸变的能量效应表现不明显, 方差分析差异不显著 ($F=0.30$)。比较不同能量离子注入处理的剂量效应则可发现, 随着离子注入剂量的提高, 75 keV 处理离子束诱发的染色体畸变细胞率的增加幅度相对小于 35 和 150 keV 能量处理。新复极差检验也显示, 75 keV 离子束处理各剂量间染色体畸变细胞率的差异均未达极显著水平 (见表 1)。而 35 keV 处理各档剂量间的差异均达极显著差异。离子注入的能量与剂量的互作效应不显著 ($F=0.90$)。

2.2 离子束与 γ 射线处理细胞学效应的比较

2.2.1 剂量效应的差异

γ 射线对甜菊根尖细胞染色体具有较大的致畸、致异作用。随着 γ 射线剂量的提高, 染色体畸变细胞率明显增加, 剂量间差异极显著 ($F=62.04^{**}$)。 γ 射线处理剂量与染色体畸变细胞率呈极显著的直线回归关系 (见图 1)。但离子注入剂量与染色体畸变细胞率的直线回归关系不显著, 剂量间差异小于 γ 射线处理。在本试验的剂量范围内, 氮离子束诱发最高染色体畸变细胞率的处理剂量为 150 keV, $10^{16} N^+/\text{cm}^2$, 与 γ 射线 120 Gy 相似。

2.2.2 诱发染色体畸变类型的差异

由表 2 可见, 离子注入与 γ 射线照射甜菊干种子, 均可在 M_1 代根尖细胞内诱发各类可见染色体结构变异及有丝分裂行为异常。在畸变类型中, 也均以诱发微核为主。离子注入和 γ 射线处理的染色体畸变细胞率与微核率分别达显著相关 ($r=0.9062$) 和极显著相关 ($r=0.9883$)。微核率随处理剂量的提高而增加, 其余类型变异的出现具较大的随机性。但两种诱变源对染色体断片和染色体桥的诱发具有一定的偏向性。在某一处理剂量下, 离子束诱发的染色体断片率相对高于染色体桥的出现频率; 而 γ 射线照射除 80 Gy 处理外, 其余剂量处理染色体桥的出现频率均高于断片出现频率。

2.3 氮离子注入对幼苗生长的影响

离子束处理对甜菊幼苗的生长有一定的影响, 主要表现在幼苗高度下降。幼苗生长

的损伤程度随离子注入剂量的增加而递增, 剂量间与能量间的差异均达极显著水平 (见表 3 和表 4)。单株叶片数, 除 75 keV 的 10^{15} 和 10^{16} N^+ /cm² 处理和 150 keV 的各处理与对照相比达显著或极显著差异外, 其余处理与对照均无显著差异。单株节数, 除 150 keV 的各处理与对照差异显著外, 其余处理与对照无明显差异。

表 2 离子束和 γ 射线诱发的染色体畸变类型

诱变处理	剂量	观察细胞数	畸变细胞率/%	微核 个数/%	断片 个数/%	染色体 桥个数%	落后染色 体个数/%	多极 个数/%
离子束 N^+ /cm ²	0	3937	0.58	19 0.48	2 0.05	0 0	1 0.03	1 0.03
	10^{14}	6346	0.93	38 0.60	9 0.14	6 0.09	4 0.06	2 0.03
	10^{15}	7246	1.04	50 0.69	11 0.15	6 0.08	8 0.11	0 0
	10^{16}	4711	1.17	44 0.93	5 0.11	5 0.11	1 0.02	0 0
γ 射线 Gy	0	3937	0.58	19 0.48	2 0.05	0 0	1 0.03	1 0.03
	40	4039	0.87	22 0.54	2 0.05	4 0.10	5 0.12	2 0.05
	80	3169	0.98	21 0.66	6 0.19	1 0.03	3 0.09	0 0
	120	2763	1.27	22 0.80	1 0.04	10 0.36	2 0.07	0 0
	160	1987	1.71	21 1.06	4 0.20	6 0.30	2 0.10	1 0.05

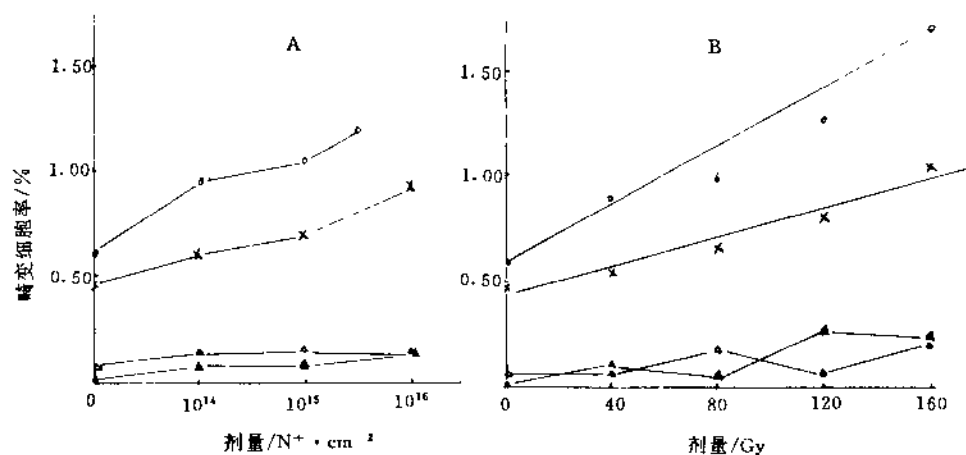


图 1 不同类型染色体畸变的剂量效应曲线

A: 氮离子注入; B: γ 射线照射;
O-O: 畸变细胞率; Δ Δ : 断片率;
 $\times$ - $\times$: 微核率; $\blacktriangle$ $\blacktriangle$: 染色体桥。

表 3 离子注入对幼苗生长的影响

能量 keV	剂量 N ⁺ /cm ²	苗 高 cm	叶 数 片	节 数 个
35	0	12.53±0.13 aA	14.07±0.31 aA	4.87±0.31 aA
	10 ¹⁴	11.97±0.15 bB	13.87±0.31 aA	4.67±0.31 aA
	10 ¹⁵	11.00±0.16 cC	13.60±0.20 aA	4.53±0.31 aA
	10 ¹⁶	10.30±0.12 dD	13.40±0.20 aA	4.40±0.20 aA
75	0	12.53±0.13 aA	14.07±0.31 aA	4.87±0.31 aA
	10 ¹⁴	11.15±0.19 bB	13.67±0.31 ab AB	4.47±0.31 aA
	10 ¹⁵	10.37±0.30 cC	13.40±0.20 bAB	4.47±0.50 aA
	10 ¹⁶	9.51±0.18 dD	13.20±0.20 bB	4.20±0.20 aA
150	0	12.53±0.13 aA	14.07±0.31 aA	4.87±0.31 aA
	10 ¹⁴	10.45±0.37 bB	13.47±0.31 bAC	4.27±0.31 bA
	10 ¹⁵	9.85±0.30 cC	13.20±0.20 bBC	4.13±0.31 bA
	10 ¹⁶	9.01±0.18 dD	13.00±0.20 bBC	4.00±0.20 bA

表 4 不同能量氮离子注入对幼苗生长的影响

能量 keV	苗 高 cm	叶 数 片	节 数 个
0	12.53±0.13 aA	14.07±0.31 aA	4.87±0.31 aA
35	11.09±0.15 bB	13.62±0.24 acA	4.53±0.27 aA
75	10.35±0.22 cC	13.42±0.24 bcA	4.13±0.72 aA
150	9.77±0.26 dD	13.22±0.24 bcA	4.13±0.27 aA

表 5 γ 射线照射对幼苗生长的影响

能量 Gy	苗 高 cm	叶 数 片	节 数 个
0	12.53±0.13 aA	14.07±0.31 aA	4.87±0.31 aA
40	11.51±0.11 bB	13.87±0.31 aA	3.93±0.31 aA
80	9.79±0.18 cC	12.87±0.31 bB	3.47±0.31 aA
120	9.35±0.31 dD	9.87±0.31 cC	3.20±0.20 aA
160	7.01±0.18 eD	6.60±0.72 dD	2.80±0.20 aA

2.4 离子束与 γ 射线处理对幼苗损伤的比较

γ 射线对甜菊幼苗生长有较大的损伤作用,各处理的苗高均较对照明显降低,差异达极显著水平。80 Gy 以上剂量 γ 射线处理的叶片数较对照明显减少,且 3 种剂量间的差异极显著,各处理的节数与对照的差异均不明显(见表 5)。上述结果表明,离子束和 γ 射线处理对幼苗损伤的规律相似,均可使幼苗高度明显下降,而对叶数和节数的影响不大,但 γ 射线的损伤效应大于离子束注入。

综上所述,离子注入甜菊干种子对 M₁ 代根尖细胞染色体的致畸作用是明显的,在诱发的染色体畸变类型中,以微核、染色体断片为主。染色体畸变细胞率在离子注入剂量

间存在着极显著差异,但两者不呈直线回归关系。而不同能量离子注入诱发的染色体畸变细胞率无显著差异,能量效应表现不明显。离子注入生物体后产生一系列复杂的质能沉积及电荷交换等活动,因而表现出与 γ 射线处理不同的细胞学效应。 γ 射线照射以诱发微核与染色体桥为主,染色体畸变细胞率与剂量呈直线回归关系。在本试验剂量范围内,离子注入诱发最高染色体畸变细胞率的处理剂量为 150 keV , $10^{16}\text{ N}^+/\text{cm}^2$,与 γ 射线 120 Gy 相似。

舒世珍等^[2]以氮离子注入甜菊种子,使 M_1 代优质糖甙含量提高。王彩莲等^[3]在水稻研究中发现,氮离子注入水稻休眠种子,可在 M_2 代产生较高频率的叶绿素突变。周立人等^[4]在研究离子束对大麦 M_1 胚芽细胞的诱变效应时发现, H^+ 离子注入能诱发多种类型的染色体畸变。但陆挺^[5]、卫增泉^[6]等报道,低能离子在生物介质中的射程不到 $1\text{ }\mu\text{m}$,即注入离子不能直接进入胚分生细胞作用于生物大分子,而是通过对细胞膜的刻蚀、注入离子的质量沉积、能量传递及电荷交换等活动,产生诱变致畸作用,因此离子束对染色体结构的致畸能力相对较弱。由本试验结果可以推断,离子注入的剂量和能量效应在染色体水平上难以得到充分体现,而在诱发微突变、点突变上可能具有较大潜力。因而将离子注入技术应用于甜菊的品质育种将有较大的发展前途。

本试验结果表明,离子束处理使甜菊幼苗高度下降,而对单株叶数和节数影响不大。但舒世珍等^[2]报道,离子束处理甜菊种子对苗期生长有刺激作用。这可能是由于处理剂量、能量及其它条件差异所引起的。

本文仅报道了氮离子注入甜菊的 M_1 生物学效应,有关离子注入对甜菊的诱变效应及对糖甙成分的影响将另作报道。

参 考 文 献

- 1 舒世珍等,中国甜菊栽培及应用技术,北京:农业出版社,1994,1~7
- 2 舒世珍等,安徽农业大学学报,1994,21(3):299~302
- 3 王彩莲等,核农学报,1995,9(1):13~19
- 4 周立人等,安徽农业大学学报,1994,21(3):269~274
- 5 陆挺等,北京师范大学学报(自然科学版),1993,29(3):204~206
- 6 卫增泉等,辐射研究与辐射工艺学报,1993,11(2):90~94