

低能离子注入短命植物多伞阿魏 (*Ferula ferulaeoides*) 抗性生理特征

马 媛^{1,2}, 塔西甫拉提·特依拜^{1,2,*}, 吕光辉^{1,2}, 吕 杰³

(1. 新疆大学资源与环境科学学院, 乌鲁木齐 830046; 2. 绿洲生态教育部重点实验室, 乌鲁木齐 830046;
3. 新疆大学物理科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要:以能量 30 keV、不同剂量 N^+ 离子注入多伞阿魏 (*Ferula ferulaeoides*) 种子用以研究多伞阿魏抗性生理指标的变化, 以期为保护短命植物多伞阿魏提供理论依据。试验结果表明: 随离子注入剂量增大, 多伞阿魏种子发芽率和发芽指数逐渐下降; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性增加、过氧化物酶 (POD)、和过氧化氢酶 (CAT) 活性逐渐升高。剂量过大时, SOD、POD 和 CAT 活性下降; 游离脯氨酸含量逐渐降低, 但在 $6 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时含量升高; 可溶性蛋白质含量先升高再降低, $6 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时为最高值。通过对发芽率、发芽指数的结果进行方差分析, 得出低剂量 N^+ 离子注入可破除多伞阿魏种子休眠, 促进种子萌发; 适当剂量 N^+ 离子注入可激活保护酶、脯氨酸和可溶性蛋白的表达。

关键词: 离子束; 多伞阿魏 (*Ferula ferulaeoides*); 保护酶; 脯氨酸; 可溶性蛋白

文章编号: 1000-0933(2008)09-4115-05 中图分类号: Q142, Q945, Q948, X173 文献标识码: A

Resistance physiology of ephemeral plant *Ferula ferulaeoides* irradiated by low-energy ion beam

MA Yuan^{1,2}, Tahiplot Tiyp^{1,2,*}, LÜ Guang-Hui^{1,2}, LÜ Jie³

1 College of Resource and Environment Sciences, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2 Key Laboratory of Oasis Ecology Ministry of Education, Urumqi 830046, China

3 School of Physics Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4115 ~ 4119.

Abstract: The *Ferula ferulaeoides* seeds were irradiated using different dose of nitrogen ions with 30 KeV energy for studying the responses of resistance physiological indexes. The objective is to provide foundation to protect the ephemeral plant *Ferula ferulaeoides* in arid areas. Results showed that the irradiation with high dose of nitrogen ions significantly inhibited germination rate and germination index. The activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were enhanced with the increase of nitrogen ions. However, excessive nitrogen ions irradiating reduced the activities of SOD, POD and CAT. The peroxidase proline content fluctuated with increase of nitrogen ions irradiation. First it decreased, then increased and reached the peak at dose of $1 \times 10^{16} N^+ / cm^2$, and then decreased. Besides, the soluble protein content significantly increased with the increase of nitrogen ions irradiation, reached the peak at doses of 6×10^{16}

基金项目:新疆维吾尔自治区教育厅创新研究群体基金资助项目 (XJEDU2004G04); 新疆大学绿洲生态教育部重点实验室开放课题资助项目 (XJDX0201-2006-10)

收稿日期:2008-03-21; **修订日期:**2008-06-30

作者简介:马媛 (1977 ~), 女, 新疆人, 博士, 主要从事干旱区生态环境研究. E-mail: xj. mayuan@yahoo. com. cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tash@xju. edu. cn

Foundation item: The project was financially supported by Foundation of Innovational Research Group of Educational Bureau of Xinjiang (No. XJEDU2004G04); The Open Fund of Key Laboratory of Oasis Ecology Ministry of Education (No. XJDX0201-2006-10)

Received date:2008-03-21; **Accepted date:**2008-06-30

Biography: MA Yuan, Ph. D., mainly engaged in eco-environmental in arid regions. E-mail: xj. mayuan@yahoo. com. cn

N^+/cm^2 , then decreased. By analyzing the variance of germination rate and germination index, the conclusion could be drawn the optimum dose of nitrogen ions irradiation could break seed dormancy, improve germination and enhance the activities of protective enzymes and content of proline and soluble protein.

Key Words: ion beam; *Ferula ferulaeoides* Korov.; protective enzymes; proline; soluble protein

多伞阿魏(*Ferula ferulaeoides*)是伞形科阿魏属植物一种,我国境内主要分布于新疆准噶尔盆地南缘、塔城盆地及阿尔泰山山麓等地,生长在砾质及土质荒漠、半固定沙丘及沙地^[1]。多伞阿魏在每个生长季利用早春良好水分条件和充足光热资源迅速进行营养生长,在干热季节来临前,地上部分逐渐枯萎,根及地面芽转入休眠。其营养生长数年后,植株发育成熟,开花结实后植株死亡。因此,多伞阿魏是一种多年生一次性结实早春类短命草本植物^[2]。多伞阿魏植株所分泌的葱蒜样臭味的脂类物质,具有消积、解毒、杀虫和通经等功效,可用于治疗胃病、风湿病和关节疼痛等疾病,是我国少数民族的传统药材。作为早春的重要牧草和药用植物资源,多年来被过度放牧和无节制地开发,造成该种植物资源储量萎缩^[3]。

低能离子束注入技术诞生于 20 世纪 80 年代,区别于传统辐射诱变源,低能离子集能量沉积、质量沉积、动量交换与电荷交换多种因子于一体。具有剂量可控、损伤小、突变谱广、突变率高等优点,具有显著的诱变效应^[4,5]。大量研究表明离子注入生物体会激发生物体产生大量的自由基^[6],适宜能量、剂量的离子注入对植物体具有显著的当代刺激效应,可提高植株抗逆性,并能破除种子休眠,促进种子发芽及幼苗生长^[7,8]。

本研究以多伞阿魏为对象,将不同剂量的低能氮离子注入多伞阿魏种子,研究离子注入剂量与其幼苗发芽及抗性生理生化指标之间的内在相关规律,以此分析多伞阿魏对辐射胁迫的响应机制。以期为保护干旱、半干旱区药用植物多伞阿魏及阿魏属植物提供理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为多伞阿魏(*Ferula ferulaeoides*)种子,由新疆阿勒泰地区青河县农业技术推广站提供。

1.2 试验设计

1.2.1 离子注入

LCD-1000 型离子注入机对供试材料进行 N^+ 注入。将多伞阿魏大小、色泽、饱满程度一致的成熟风干种子分为 8 组分别进行处理,6 组接受离子注入。根据离子束注入其它植物种子剂量组设计以及离子注入植物干种子深度等文献报道,剂量设计为 1×10^{16} 、 3×10^{16} 、 5×10^{16} 、 6×10^{16} 、 7×10^{16} 、 $9 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 。1 组真空对照(CK1),放入真空室进行抽真空处理。1 组空白对照,不经过任何处理(CK2)。注入能量为 30KeV,束流大小为 10mA,脉冲注入,每次脉冲时间为 10s,靶室真空度高于 $2.8 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ 。

1.2.2 发芽试验

每个剂量处理种子和对照种子分别置于垫有两层发芽纸的培养皿中,4℃无光照发芽 60d。每处理 3 次重复,每重复 30 粒种子。发芽期间每天记录发芽种子数,60d 后统计发芽率、发芽指数。发芽第 20 天测定幼苗超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、游离脯氨酸和可溶性蛋白含量。实验均重复 3 次,所有测定值均取平均值。

1.2.3 数据分析统计

将经过不同剂量处理后的种子发芽率、发芽指数数据用 SPSS12.0 软件进行方差分析(ANOVA)和 LSD(Least significant difference)检验。

1.2.4 抗性生理生化指标测定方法

SOD 活性用 NBT 方法测定^[9],POD 活性采用愈创木酚法测定^[10],CAT 活性的测定采用比色法^[11],游离脯氨酸含量的测定参照文献的方法^[9],可溶性蛋白质含量测定按 Bradford 的方法测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 离子注入剂量对多伞阿魏种子发芽率、发芽指数的影响

试验结果显示(表 1),经过低温层积的种子再经不同剂量 N^+ 注入处理,其种子发芽率和发芽指数随着 N^+ 注入剂量的增大,呈现出逐渐降低的趋势。在试验当中低剂量组(1×10^{16} 、 $3 \times 10^{16} N^+ / cm^2$)种子发芽率及发芽指数显著高于两组对照,高剂量组与对照组无显著的差异。表明试验选取的低剂量离子注入能有效的破除阿魏种子的休眠,又由于离子注入的刻蚀作用,改变其种皮的物理通透性,从而提高种子发芽率和发芽指数。

2.2 离子注入对多伞阿魏幼苗 SOD、POD 和 CAT 的影响

多伞阿魏幼苗 SOD 酶活性随离子注入剂量的增大逐渐升高,在 $6 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时 SOD 酶活性达到最高值 275.24 U/g. FW, 分别是 CK1 和 CK2 组活性的 2.15 倍和 2 倍,显著高于两组对照,随后 SOD 酶活性突然降低(图 1)。这可能是在低剂量下,注入离子未接触到种子细胞及遗传物质,而只由于刻蚀作用改变种子种皮通透性。随剂量增大,生物体为了防止膜脂过氧化作用,通过提高参与膜保护的酶的活性来减轻环境中逆境因子对细胞的损伤。但当损伤达到植物体无法修复时,SOD 酶合成受阻,导致其活性受到抑制。

幼苗 POD 和 CAT 活性随着离子注入剂量加大呈现先升高再降低的趋势,幼苗 POD 和 CAT 活性在 $5 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时活性达到最高值,且存在一定相关性(图 2、图 3)。实验结果表明在低剂量时损伤较轻,未产生大量的氧自由基,所以 POD 和 CAT 酶活性未产生显著变化。在 $5 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 和 $6 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时,幼苗 POD 和 CAT 酶活性升高,并协同清除细胞内 H_2O_2 ,以消除细胞受伤害产生 H_2O_2 ,从而保护多伞阿魏幼苗。

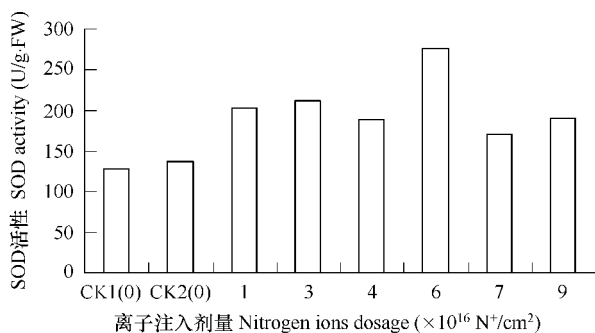


图 1 离子注入对超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of N^+ implantation on superoxide dismutase activity

表 1 多伞阿魏发芽率和发芽指数的影响

Table 1 The effect on germination rate and germination index of *Ferula ferulaeoides*

处理 Treatment (ions/cm ²)	发芽率 Germination rate(%)	发芽指数 Germination index
1×10^{16}	45.55 ± 5.66^a	7.89 ± 1.60^a
3×10^{16}	38.89 ± 4.16^{ab}	3.40 ± 0.58^b
5×10^{16}	30.00 ± 7.20^{bc}	1.51 ± 0.48^{cd}
6×10^{16}	26.67 ± 4.30^c	2.74 ± 0.56^{bcd}
7×10^{16}	23.33 ± 2.72^c	2.51 ± 0.32^{bcd}
9×10^{16}	25.55 ± 5.66^c	3.24 ± 0.24^{bc}
CK1	27.78 ± 4.16^c	3.23 ± 0.42^{bc}
CK2	28.89 ± 4.16^{bc}	3.69 ± 0.16^d

5% 水平差异显著;相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著 Values are significantly different at 5% level

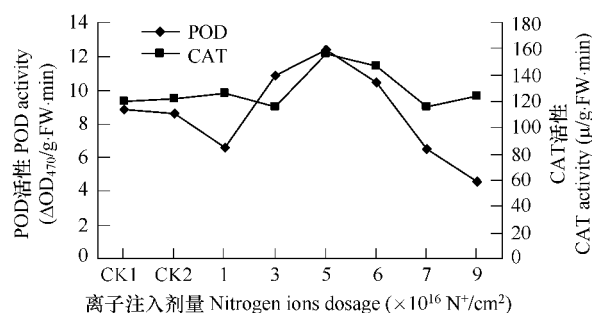


图 2 离子注入对过氧化物酶和过氧化氢酶活性的影响

Fig. 2 Effect of N^+ implantation on peroxidase protein content and catalase activity

2.3 离子注入对多伞阿魏幼苗体内游离脯氨酸含量的影响

多伞阿魏幼苗游离脯氨酸含量随离子注入剂量的增大,呈现先降低再升高最后降低的趋势,游离脯氨酸含量最高值出现在 $1 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量, $6 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 剂量时脯氨酸含量升高,但显著低于最高值(图 3)。

实验结果显示,经过长达 60d 的低温刺激,加之低剂量离子注入改变种皮通透性,并且可能激活了其

内源激素的增加。这使多伞阿魏幼苗在低剂量注入时产生高含量的游离脯氨酸,调节其细胞正常渗透代谢。因此低剂量时种子表现较高的发芽率和发芽势。在 $3 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 和 $5 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量组时,脯氨酸含量降低,可能是由于注入离子的刻蚀作用,影响了幼苗正常的细胞代谢。 $6 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量组时,脯氨酸含量突然升高,可能是激活植物以抵御逆境伤害,并协同 SOD 等酶共同清除活性氧。

2.4 离子注入对多伞阿魏幼苗体内可溶性蛋白质含量的影响

多伞阿魏幼苗可溶性蛋白质含量随离子注入剂量的增大,呈现先升高再降低的趋势,其含量最高值出现在 $6 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量时。实验结果显示(图4),随离子注入剂量增大,其细胞内可溶性蛋白含量增加,可能是由于离子注入激活其保护酶的表达。同时作为渗透调节剂,对植物维持其细胞平衡代谢起到一定作用。当剂量继续增大,影响细胞正常代谢,酶类合成受到抑制。

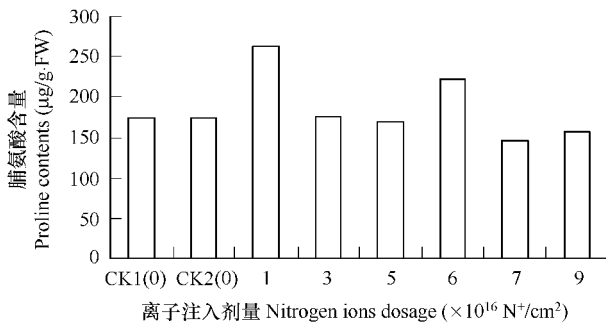


图3 离子注入对脯氨酸含量的影响

Fig. 3 Effect of N^+ implantation on Proline contents

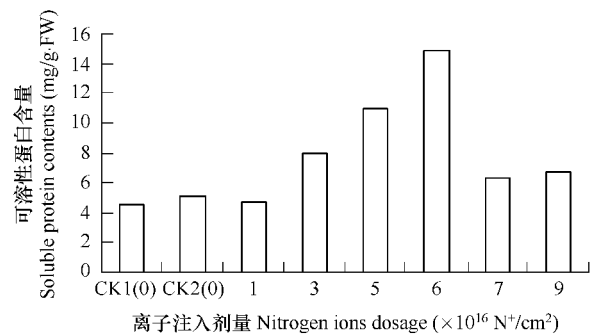


图4 离子注入对脯氨酸含量的影响

Fig. 4 Effect of N^+ implantation on soluble protein contents

3 讨论

试验所选取的低剂量(1×10^{16} 、 $3 \times 10^{16} \text{ N}^+/\text{cm}^2$)离子注入能有效的破除阿魏种子的休眠,这是由于注入离子具有一定的质量,在加速电压作用下具有一定的能量,对阿魏种子有刻蚀作用,形成一定微孔,改变其种皮的物理通透性,从而提高种子发芽率和发芽指数。也可能是低剂量离子注入引起阿魏种子内源激素的变化,提高种子发芽率和发芽指数,这需进一步对阿魏种子内源激素变化进行研究。但高剂量离子注入由于造成植物本身一些无法修复的损伤,所以种子发芽率和发芽指数呈现下降趋势。两对照组发芽率无显著变化,但发芽指数呈现显著性变化。可能是由于真空处理种子脱水,造成其发芽指数的变化^[13,14]。

在许多逆境条件下,植物体内活性氧代谢系统的平衡会受到影响,使活性氧等的量增加。自由基含量增加,能启动膜脂过氧化或膜脂脱脂作用,从而破坏膜结构,对植物体造成伤害。SOD、POD 和 CAT 是酶类自由基净化剂,能清除活性氧。SOD、POD 和 CAT 含量及活性水平的高低,对植物的抗逆能力有十分重要的意义。本试验没有像其他文献报道的,随离子注入剂量的增大,种子发芽率,幼苗酶活呈现“马鞍型”变化趋势。这可能与多伞阿魏自身特性有关,其成熟种子必须经过低温刺激才能发芽,且幼苗纤细活力较其他植物弱。因此伤及其种子细胞的逆境因子,都会影响其幼苗正常生长。幼苗由于胁迫保护酶类活性会应激升高,以减轻逆境伤害,但这影响了多伞阿魏的正常生长。

游离态脯氨酸广泛存在于植物体中。在逆境条件下,如干旱、低温、盐碱及大气污染等,植物体内 Pro 会适量增加^[15]。一般认为,Pro 在抗旱、耐盐碱、耐热、抗冻中起渗透调节作用,可作为植物抗逆性的指标之一^[16]。自 Smirnoff 和 Cumbes 等证实 Pro 具有清除活性氧的作用以来,人们对 Pro 积累与抗氧化作用给予了较大的关注^[17]。因此,在植物体内,游离脯氨酸不仅作为细胞的渗透调节剂在植物对抗低温胁迫时起到平衡细胞代谢的作用,且能够形成保护膜结构,防止膜脂过氧化,从而保持细胞内环境的相对稳定,其含量的增加有利于提高植物的抗寒性及对逆境伤害的保护作用。

离子注入对种子产生的伤害可作为一种逆境胁迫。根据试验剂量设计与多伞阿魏抗性生理指标变化可以得出:低剂量(1×10^{16} 、 3×10^{16} N^+/cm^2)离子注入,可改变阿魏种子种皮的通透性,对水、氧气的交换加强,可以有效提高其种子的发芽率和发芽指数;适当剂量(5×10^{16} 、 6×10^{16} N^+/cm^2)的离子注入可使保护酶类活性和渗透调节物质应激升高,以减轻逆境造成的伤害,但这影响了多伞阿魏幼苗正常生长;高剂量(7×10^{16} 、 9×10^{16} N^+/cm^2)离子注入产生了一些无法修复的损伤,影响植物正常生理代谢保护酶类活性和渗透调节物质合成受阻。本实验反映多伞阿魏在膜保护体系和渗透调节能力方面对逆境具有一定的适应性。在今后其它短命植物离子注入抗性生理研究中,离子注入剂量设计除根据文献报道外,还要根据试验材料选取部位老幼程度、粒度大小进行预试验,选取适合材料的最佳离子注入剂量范围。

References:

- [1] Mao Z M, Zhang D M. The conspectus of ephemeral flora in Northern Xinjiang. *Arid Zone Research*, 1994, 11(3): 1—26.
- [2] Ren J, Tao L. Characterization of ephemeral plants in northern region of Xinjiang. *Pratacul Tural Science*, 2005, 22(5): 19—24.
- [3] Mansur Sabit, Ablajan Sulayman and Zhou J J. The sustainable development of grassland resources and livestock husbandry of Xinjiang. *Pratacul Tural Science*, 2002, 19(4): 11—15.
- [4] Yu Z L. Introduction to Ion Beam Biotechnology. Hefei: Anhui Scientific and Technical Published, 1998. 67—105.
- [5] Yu Z L, He J J, Deng J G, *et al.* Preliminary studies on the mutational mechanism of the ion implantation on rice. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 1989, (1): 12—16.
- [6] Song D J, Yu X, Han J W, *et al.* The relation of ESR spectrum and survival by N^+ ion implantation in *D. Radiodurans* and *E. coli*. *Acta Laser Biology Sinica*, 1998, 7(4): 245—251.
- [7] Lin G P, Yin F S, Li J Z. Effects of Implanted Ion Beam on Germination of Tobacco Seed. *Journal of Anhui agricultural Sciences*, 1994. 22(3): 268—270.
- [8] Zhen W J, Sun Y H, Ma F Y, *et al.* The preliminary study on biological effect of ephedra seeds with low energy ion implantation. *Seed*, 2003, 2: 26—28.
- [9] Zou Q. Experimental Manual of Plant Physiology and biochemical. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000. 96—97.
- [10] Zhang Z L. Experimental Manual of Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press, 1990. 210—212.
- [11] Chen J X, Wang X F. Experimental Manual of Plant Physiology. Guangzhou: South China University and Technology Press, 2002. 120—121.
- [12] Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254.
- [13] Fang S Z, Wang J Y, We Z Y, *et al.* Methods to break seed dormancy in *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja. *Scientia Horticulturae*, 2006, 110: 305—309.
- [14] Nadjafi F, Bannayan M, Tabrizia L, *et al.* Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments*, 2006, 64: 542—547.
- [15] Pan R Z. Plant Physiology. Beijing: Higher Education Press, 2002. 280—281.
- [16] Liao F X, Pan R Z. Accumulation of proline under heat-stress and function on heat-tolerance in *Brassica campestris* L. ssp. *Chinesis* var. *utilis* tsen et Lee. *Journal of South China Normal University*, 2001, 2(5): 45—49.
- [17] Smirnov N, Cumbes Q J. Hydroxy radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem*, 1989, 28(4): 1057—1060.

参考文献:

- [1] 毛祖美, 张佃民. 新疆北部早春短命植物区系纲要. 干旱区研究, 1994, 11(3): 1—26.
- [2] 任翔, 陶玲. 新疆北部短命植物的特征分析. 草业科学, 2005, 22(5): 19—24.
- [3] 满苏尔·沙比提, 阿布拉江·苏莱曼, 周俊菊. 新疆草地资源合理利用与草地畜牧业可持续发展. 草业科学, 2002, 19(4): 11—15.
- [4] 余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998. 67—105.
- [5] 余增亮, 何建军, 邓建国等. 离子注入水稻诱变育种机理初探. 安徽农业大学学报, 1989, (1): 12—16.
- [6] 宋道军, 余汛, 韩建伟等. 离子注入不同辐射敏感性微生物自由基与存活关系的研究. 激光生物学报, 1998, 7(4): 245—251.
- [7] 林国平, 殷凤生, 李吉忠. 离子注入对烟草种子萌发的影响. 安徽农业科学, 1994, 22(3): 268—270.
- [8] 甄卫军, 孙月华, 马凤云等. 低能离子注入麻黄种子生物效应初步研究. 种子, 2003, 2: 26—28.
- [9] 邹琦. 植物生理生化实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000. 96—97.
- [10] 张志亮. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990. 210—212.
- [11] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002. 120—121.
- [15] 潘瑞炽. 植物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2002. 280—281.
- [16] 廖飞雄, 潘瑞炽. 热胁迫下菜心脯氨酸含量变化及其在耐热中的作用. 华南师范大学学报, 2001, 2(5): 45—49.