

# 甜叶菊茎段腋芽诱导培养基和 $\text{NaN}_3$ 诱变条件筛选及 诱变试管苗 POD 同工酶分析

何克勤, 胡能兵, 崔广荣, 周玉丽

(安徽科技学院植物科学学院, 安徽 凤阳 233100)

**摘要:** 以甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 茎段为外植体, 采用  $L_9(3^4)$  正交表对腋芽诱导培养基中的激素种类和浓度 (0.0、0.1 和 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; 0.0、0.5 和 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA; 0.000、0.005 和 0.010  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ) 进行筛选; 在此基础上对诱变过程中  $\text{NaN}_3$  溶液的浓度 (3、6 和 9  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和处理时间 (1、2、4 和 8 h) 进行比较, 并初步筛选出最佳的  $\text{NaN}_3$  诱变条件; 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (PAGE) 对经上述  $\text{NaN}_3$  诱变处理后培养 5、10 和 15 d 的试管苗 POD 同工酶谱的变化进行了分析。结果表明: 在添加了不同激素组合的培养基上均能诱导出腋芽, 但腋芽数和苗高有差异; 经综合比较后可确定适宜于甜叶菊腋芽诱导的培养基为添加 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 和 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的 MS 培养基 (含 5.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉和 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖, pH 6.0)。经  $\text{NaN}_3$  诱变处理后, 茎段在腋芽诱导培养过程中的死亡率随  $\text{NaN}_3$  浓度提高和处理时间延长逐渐增加, 平均腋芽数和苗高则下降, 且多数处理组试管苗矮化; 根据半致死剂量确定的最佳  $\text{NaN}_3$  诱变处理方法为将甜叶菊茎段置于 9  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液中浸泡 4 h。PAGE 分析结果表明: 甜叶菊诱变试管苗的 POD 同工酶谱均可分为 a、b 和 c 区, 但在不同培养时间各处理组 POD 同工酶的条带数和活性有所变化。在培养 5 和 10 d 后各处理组诱变试管苗 POD 同工酶的活性和条带数量有明显差异, 而在培养 15 d 后各处理组诱变试管苗 POD 同工酶活性有差异, 但条带数量没有明显变化, 表明用适宜浓度的  $\text{NaN}_3$  进行诱变处理可导致甜叶菊试管苗短期的应激效应。

**关键词:** 甜叶菊; 茎段; 腋芽诱导; 激素组合;  $\text{NaN}_3$  诱变; POD 同工酶

中图分类号: Q943.1; Q554+.6; S566.9.03.52 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)03-0074-06

**Screening of induction medium and  $\text{NaN}_3$  mutation condition for axillary bud from stem segments of *Stevia rebaudiana* and POD isoenzyme analysis of mutation plantlets** HE Ke-qin, HU Neng-bing, CUI Guang-rong, ZHOU Yu-li (College of Plant Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(3): 74-79

**Abstract:** Taking stem segments of *Stevia rebaudiana* Bertoni as explants, the type and concentration of hormones (0.0, 0.1 and 0.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; 0.0, 0.5 and 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA; 0.000, 0.005 and 0.010  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ) in induction medium of axillary bud were selected by  $L_9(3^4)$  orthogonal table. On the basis,  $\text{NaN}_3$  concentration (3, 6 and 9  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and treatment time (1, 2, 4 and 8 h) in mutation process of stem segments were compared and the optimal mutation condition of  $\text{NaN}_3$  was screened preliminarily. And change of POD isoenzyme zymograms of plantlets cultured for 5, 10 and 15 d after above-mentioned  $\text{NaN}_3$  mutation treatment was analyzed by polyacrylamide gel electro-phoresis (PAGE). The results show that axillary bud can be induced on all media containing different hormone combinations, but their axillary bud number and plantlet height are different. By comprehensive comparison, it is determined that the appropriate medium for axillary bud induction of *S. rebaudiana* is MS medium (containing 5.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  agar powder and 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  sucrose, pH 6.0) added 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA. With rising of  $\text{NaN}_3$  concentration and prolonging of treatment time, the death rate of stem segments treated by  $\text{NaN}_3$  increases gradually during induction culture process of

收稿日期: 2011-12-28

基金项目: 安徽省教育厅省级重点自然科学基金项目 (KJ2010A073); 安徽科技学院青年基金项目 (ZRC2011281); 蚌埠市科技计划项目 (科学 051)

作者简介: 何克勤 (1979—), 女, 安徽凤阳人, 硕士, 实验师, 主要从事实验管理及植物组织培养和育种方面的研究工作。

axillary bud, and average number of axillary bud and plantlet height decrease, moreover, mutation plantlets in most treatment groups dwarf. According to the median lethal dose, it is confirmed that the optimal  $\text{NaN}_3$  mutation treatment method is putting stem segments of *S. rebaudiana* in  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  solution soaking for 4 h. The PAGE analysis result shows that POD isoenzyme zymogram of all *S. rebaudiana* mutation plantlets can be divided to a, b and c regions, but band number and activity of POD isoenzyme in different treatment groups change during different culture times. After cultured for 5 and 10 d, activity and band number of POD isoenzyme of mutation plantlets in different treatment groups have obvious differences, while there is difference in activity of POD isoenzyme but without obvious change in band number of POD isoenzyme after cultured for 15 d. It is suggested that  $\text{NaN}_3$  mutation treatment with suitable concentration can cause stress effect of *S. rebaudiana* plantlets in short term.

**Key words:** *Stevia rebaudiana* Bertoni; stem segment; axillary bud induction; hormone combination;  $\text{NaN}_3$  mutation; POD isoenzyme

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 又称甜菊, 为菊科 (Compositae) 多年生草本植物, 原产巴拉圭与巴西交界的山区, 于 20 世纪 80 年代初引入中国并栽培成功。从甜叶菊叶片中提取的甜菊糖苷的甜度可达蔗糖的 300 倍以上, 是目前已知最甜的天然糖料, 已广泛应用于食品、饮料、医药等行业。甜叶菊甜味剂在人体内不参与代谢、不蓄积、不致癌、无毒性, 具有防治高血压、糖尿病、肥胖症、心脏病和龋齿等功效, 被誉为最有发展前途的新糖源, 是继甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.)、甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 之后的一种极具开发价值的糖源<sup>[1-4]</sup>。甜叶菊为异花授粉植物, 群体的基因组成多为杂合型, 自交不亲和且遗传性状不稳定, 其后代难以保持原有的优良性状; 而且甜叶菊的种子小、极易丧失活力, 种子带菌又会导致苗期及后期发生病害<sup>[5-6]</sup>。目前, 国内现有的甜叶菊有性种植品种严重退化, 总糖苷 (St) 含量和莱鲍迪 A<sub>3</sub> 苷 (RA) 含量低, 而现有的无性种植品种叶片产量低, 因此, 迫切需要对甜叶菊栽培品种进行育种改良。

利用  $\text{NaN}_3$  对植物进行诱变育种是常用的化学诱变育种方法之一, 而将组织培养技术与化学诱变技术相结合进行诱变育种, 具有诱导频率相对较高、筛选比较方便等优势<sup>[7-11]</sup>。目前研究者们已将  $\text{NaN}_3$  诱变技术成功应用于蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite* Rehb. f.)、板栗 (*Castanea mollissima* Blume)、玉米 (*Zea mays* L.) 和大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 等<sup>[9, 12-14]</sup> 多种植物的育种。但由于  $\text{NaN}_3$  对植株有很大的伤害作用, 可导致植株畸形和死亡, 所以在离体诱变过程中筛选合适的处理剂量和处理时间是诱变能否成功的关键, 不同种类和不同部位外植体适宜的  $\text{NaN}_3$  处理剂量和时间都存在差异<sup>[9, 14]</sup>。杨国志等<sup>[15]</sup> 认为: 在进行西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld] 离体诱变培

养时用  $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  处理 1.5 h 较为适宜; 安学丽等<sup>[16]</sup> 的实验结果显示: 用体积分数 0.4% 甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理玉米种子 8 h 可达“半致死量”; 陈超等<sup>[17]</sup> 认为: 用体积分数 0.5% EMS 处理 6~8 h 较适合蝴蝶兰类原球茎的诱变。一般认为<sup>[18]</sup>, 诱变剂浓度高、处理时间长可获得高比例的突变体, 但获得的植株总数量相对较少; 而诱变剂浓度低、处理时间短可获得大量再生植株, 但突变体比例可能较低, 给后续的突变体鉴定带来不便。因此, 在对植物进行离体化学诱变时, 应对诱变剂浓度和处理时间进行摸索<sup>[19-20]</sup>, 以获得较好的诱变效果。

目前, 国内外有关甜叶菊组培快繁的研究已有较多的报道<sup>[21-22]</sup>, 但采用  $\text{NaN}_3$  进行甜叶菊离体诱变的研究尚未见报道。为此, 作者首先对甜叶菊最佳腋芽诱导培养基进行筛选; 并在此基础上用不同浓度 ( $3$ 、 $6$  和  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $\text{NaN}_3$  溶液处理甜叶菊茎段, 初步筛选出离体化学诱变体系; 此外, 还采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (PAGE) 对诱变 5、10 和 15 d 的甜叶菊 POD 同工酶谱差异进行了比较, 以期对甜叶菊离体化学诱变育种奠定前期实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用甜叶菊试管苗由安徽科技学院植物科学学院组织培养室提供, 为‘皖甜 1 号’亲本-18 培养 25 d 的生根苗。

### 1.2 方法

1.2.1 腋芽诱导培养基的筛选 以 MS 培养基为腋芽诱导的基本培养基, 并添加  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉和  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖, 用  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KOH 溶液调至 pH 6.0。

采用L9(3<sup>4</sup>)正交表设计培养基中NAA、6-BA和TDZ的质量浓度,其中,NAA质量浓度分别为0.0、0.1和0.2 mg·L<sup>-1</sup>;6-BA质量浓度分别为0.0、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>;TDZ质量浓度分别为0.000、0.005和0.010 mg·L<sup>-1</sup>。

取长势较一致的试管苗,将每个单株的茎剪成长约1.0 cm的茎段,接种至上述腋芽诱导培养基上。每处理接种4瓶,每瓶接种4个茎段,各3次重复。在培养温度(25±2)℃、光照度2 000 lx、光照时间12 h·d<sup>-1</sup>的条件下培养,30 d后统计腋芽数和苗高并记录腋芽生长状况,计算平均腋芽数,并据此筛选出最佳腋芽诱导培养基。

1.2.2 NaN<sub>3</sub>溶液浓度和处理时间的筛选 在筛选出最佳腋芽诱导培养基配方的基础上,设计了12个离体诱变体系,也即分别使用3、6和9 mmol·L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>溶液浸泡1、2、4和8 h。

取长势较一致的试管苗,将每个单株的茎剪成长约1.0 cm的茎段,分别置于3、6和9 mmol·L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>溶液中浸泡1、2、4和8 h后,用无菌水漂洗3次,接种于经上述实验获得的最佳腋芽诱导培养基上,以未经NaN<sub>3</sub>溶液浸泡的茎段为对照;每处理接种4瓶,每瓶接种4个茎段,各3次重复。在培养温度(25±2)℃、光照度2 000 lx、光照时间12 h·d<sup>-1</sup>的条件下培养,30 d后统计腋芽数和苗高,并计算平均腋芽数和茎段死亡率。

1.2.3 POD同工酶的提取及电泳分析 取经过上述12个处理组以及对照组诱导培养5、10和15 d的植株,每瓶取0.5 g,每处理选3瓶取样,视为3次重复;按质量体积比(W/V)1:1的比例加入提取缓冲液(0.065 mol·L<sup>-1</sup> Tris-柠檬酸溶液,pH 8.2),冰浴研磨后于4℃条件下10 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,上清液置于-20℃冰箱中保存、备用。

采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法(PAGE)进行POD同工酶电泳检测,其中,浓缩胶和分离胶的质量体积分数分别为4%和7%<sup>[23]</sup>,点样量20 μL;电泳初始电压150 V,0.5 h后调至200 V继续电泳3 h。采用联苯胺法<sup>[12]</sup>进行染色,并拍照记录谱带。

### 1.3 数据处理与统计分析

上述各处理的平均腋芽数、平均苗高和茎段死亡率按以下公式进行计算:平均腋芽数=诱导腋芽数/接种茎段数;平均苗高=腋芽高度总和/诱导腋芽数;茎段死亡率=(死亡茎段数/接种茎段数)×100%。

实验数据为3次重复的平均值,采用Excel 2003和DPS 3.01分析软件进行数据处理。

## 2 结果和分析

### 2.1 甜叶菊茎段腋芽诱导培养基的筛选结果

在含不同激素组合的诱导培养基上甜叶菊茎段腋芽诱导结果见表1。由表1可知:培养30 d后,在各培养基上的茎段均能诱导出腋芽,但各处理组的腋芽数量及苗高有明显差异(图1)。处理4的平均腋芽数最多,为7.6;处理1和9的平均腋芽数最少,仅为1.5。差异显著性分析结果表明:处理2、6和7以及处理1和9间的平均腋芽数差异均不显著,而其他处理组间的平均腋芽数均存在显著差异(P=0.05)。

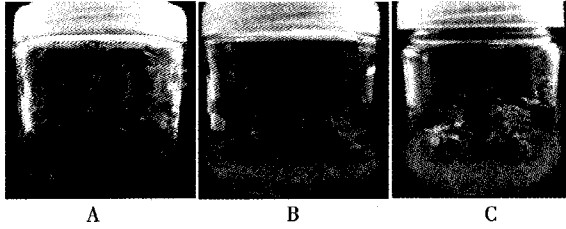
表1 在含不同激素组合的诱导培养基上甜叶菊茎段腋芽诱导结果的比较<sup>1)</sup>  
Table 1 Comparison of induction results of axillary bud from stem segments of *Stevia rebaudiana* Bertoni on induction media with different hormone combinations<sup>1)</sup>

处理 Treatment	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> Conc. of hormone			平均腋芽数 Average number of axillary bud	苗高/cm Plantlet height
	6-BA	NAA	TDZ		
1	0.0	0.0	0.000	1.5f	6.6a
2	0.5	0.0	0.005	7.3b	3.5e
3	1.0	0.0	0.010	6.4c	3.1f
4	0.0	0.1	0.005	7.6a	3.0f
5	0.5	0.1	0.010	2.5e	5.9c
6	1.0	0.1	0.000	7.2b	6.2b
7	0.0	0.2	0.010	7.3b	2.8fg
8	0.5	0.2	0.000	4.6d	2.6g
9	1.0	0.2	0.005	1.5f	5.2d

<sup>1)</sup>同列中不同的小写字母表示差异显著(P=0.05) Different small letters in the same column indicate the significant difference (P=0.05).

由表1还可知:处理6的苗高达到6.2 cm且生长良好;处理1和9的苗高也分别达到6.6和5.2 cm且生长良好,但部分苗生根;处理5的苗高达到5.9 cm但有部分苗发黄;其余5个处理组苗高仅为2.6~3.5 cm且均有部分苗发黄。差异显著性分析结果表明:处理3、4和7以及处理7和8间的苗高差异均不显著,而其他处理间的苗高均有显著差异。

综合考虑平均腋芽数、苗高及腋芽生长状况,以处理6的腋芽诱导效果最好,由此确定适宜于甜叶菊腋芽诱导培养基的培养基为含1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA、0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA、5.0 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉和30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖的MS培养基(pH 6.0)。



A:  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA- $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; B:  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA- $0.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  TDZ; C:  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA- $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA.

图1 在含不同激素组合的诱导培养基上培养30 d后甜叶菊试管苗形态比较

Fig. 1 Comparison of plantlet morphology of *Stevia rebaudiana* Bertonii cultured for 30 d on induction media with different hormone combinations

## 2.2 $\text{NaN}_3$ 处理浓度和处理时间的筛选结果

经不同浓度  $\text{NaN}_3$  溶液浸泡1、2、4和8 h后,甜叶菊茎段腋芽诱导培养结果见表2和图2。结果表明:用  $\text{NaN}_3$  溶液浸泡对甜叶菊茎段的死亡率、平均腋芽数和苗高均有较明显的影响。随  $\text{NaN}_3$  溶液浓度的提高和处理时间的延长,甜叶菊茎段的死亡率逐渐增大,其中,用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡8 h,茎段的死亡率最高,达到92.4%;而用不同浓度  $\text{NaN}_3$  溶液浸泡1~2 h的茎段死亡率均很低(0.0%~12.5%),说明在用  $\text{NaN}_3$  溶液诱变过程中处理时间是导致甜叶菊茎段死亡的主要因素。各处理组平均腋芽数和苗高则随着  $\text{NaN}_3$  溶液浓度的提高和处理时间的延长大体呈现下降的趋势。与对照(未经  $\text{NaN}_3$  溶液处理)相比,大部分处理组的试管苗都出现少许发黄且矮化现象。 $\text{NaN}_3$  溶液浸泡处理可导致甜叶菊茎段腋芽诱导

成苗率下降、腋芽数减少以及较为普遍的苗矮化现象,有的芽在成苗过程中死去(图2),并且随着  $\text{NaN}_3$  浓度的提高和处理时间的延长这些现象更加严重。

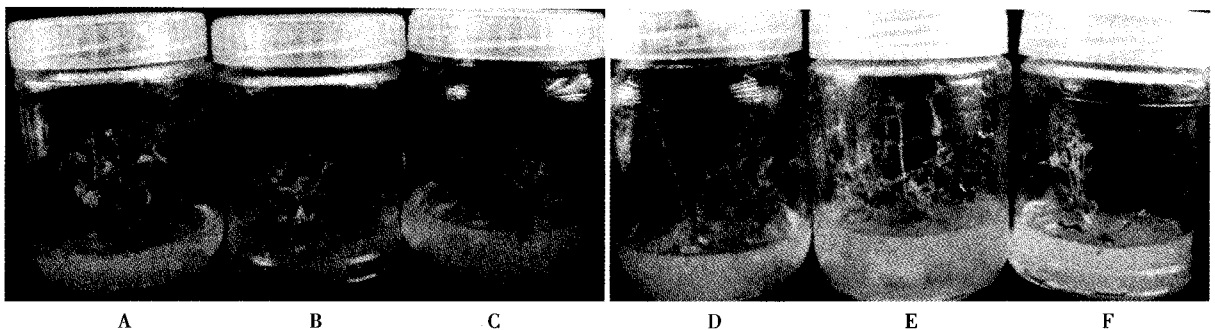
一般认为,最适诱变浓度和处理时间的确定通常以达到半致死剂量为最佳<sup>[13,18]</sup>,  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡4 h处理组甜叶菊茎段的死亡率恰好接近50%,并且平均腋芽数与对照有显著差异,苗矮化现象明显但长势较正常。据此认为,  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡4 h为甜叶菊茎段腋芽诱导时的最佳诱变条件。

表2 经不同浓度  $\text{NaN}_3$  溶液处理不同时间后甜叶菊茎段腋芽诱导结果的比较<sup>1)</sup>

Table 2 Comparison of induction results of axillary bud from stem segments of *Stevia rebaudiana* Bertonii treated by  $\text{NaN}_3$  solutions with different concentrations and treatment times<sup>1)</sup>

$\text{NaN}_3$ 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Conc. of $\text{NaN}_3$	处理时间/h Treatment time	死亡率/% Death rate	平均腋芽数 Average number of axillary bud	苗高/cm Plantlet height
3	1	0.0i	5.5ab	5.1a
6	1	0.0i	5.6ab	3.6d
9	1	12.5f	5.4ab	3.2e
3	2	0.0i	5.6ab	4.6b
6	2	5.0g	4.9b	3.6d
9	2	2.7h	5.5ab	2.9f
3	4	29.8e	4.6b	4.2c
6	4	30.0e	5.2ab	3.0ef
9	4	49.0d	4.9b	2.8f
3	8	67.7c	1.4c	4.0c
6	8	89.1b	1.5c	4.1c
9	8	92.4a	0.6c	2.9f
0(CK)	0	0.0i	6.5a	5.1a

<sup>1)</sup> 同列中不同的小写字母表示差异显著 ( $P=0.05$ ) Different small letters in the same column indicate the significant difference ( $P=0.05$ ).



A: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡4 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; B: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡4 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; C: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡4 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; D: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡8 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h; E: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡8 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h; F: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡8 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h.

图2 经  $\text{NaN}_3$  溶液处理后培养30 d甜叶菊试管苗形态比较

Fig. 2 Comparison of plantlet morphology of *Stevia rebaudiana* Bertonii cultured for 30 d after treated by  $\text{NaN}_3$  solution

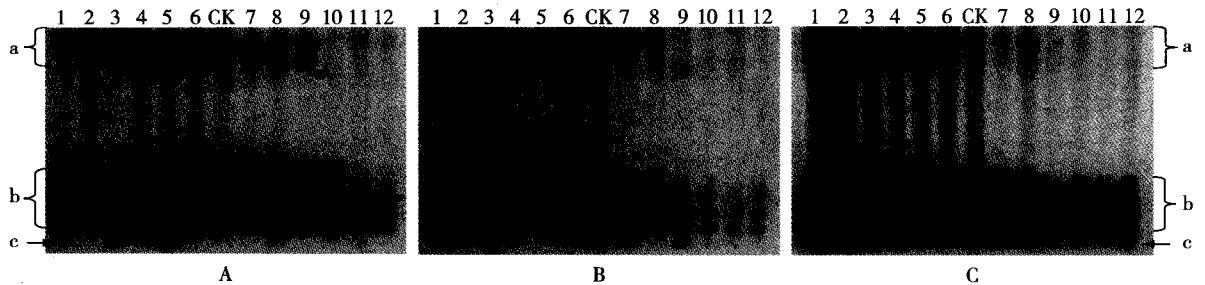
### 2.3 甜叶菊诱变试管苗的 POD 同工酶电泳分析

经不同浓度  $\text{NaN}_3$  溶液处理不同时间后培养 5、10 和 15 d 甜叶菊茎段诱变试管苗的 POD 同工酶电泳图谱见图 3。由图 3 可知:甜叶菊诱变试管苗的 POD 同工酶谱可分为 a、b 和 c 3 个带区,且 c 带区仅有 1 条带;各处理组诱变试管苗在各带区的条带数量及酶活性有一定差异,但随试管苗培养时间的延长,各处理组 POD 同工酶条带数量的差异逐渐减小,仅表现为酶活性的差异。

各处理组甜叶菊诱变试管苗 POD 同工酶谱的 a 带区条带数量差异不大,仅表现为酶活性的差异。各处理组 b 带区的条带数量有差异,经  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 1 h、 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 8 h 和  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 8 h 后培养 5 d 的诱变试管苗 b 带区的条带数较其他处理组少,而培养 10 和 15 d 的诱变试管苗仅表现出酶活性的差异。POD 同

工酶谱的 c 带区仅 1 条带,经  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 1 h、 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 1 h、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 2 h 和  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 2 h 后培养 5 d 的诱变试管苗,以及经  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 1 h、 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 1 h、 $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 2 h、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 4 h 和  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  溶液浸泡 4 h 后培养 10 d 的诱变试管苗均有 c 带区,其余处理组培养 5 和 10 d 的诱变试管苗均缺失该条带;各处理组培养 15 d 的诱变试管苗均有 c 带区,仅酶活性有一定差异。

根据 POD 同工酶电泳分析结果可见:经  $\text{NaN}_3$  诱变处理后,甜叶菊诱变试管苗会在短时间(5 和 10 d)内诱发应激效应,POD 同工酶条带数量及活性均有差异;但随培养时间延长(15 d),诱变试管苗的应激效应逐渐减弱,各处理组诱变试管苗的 POD 同工酶仅表现出酶活性的差异。



CK: 未经  $\text{NaN}_3$  处理 Without treated by  $\text{NaN}_3$ ; 1: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 1 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 1 h; 2: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 1 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 1 h; 3: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 1 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 1 h; 4: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 2 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 2 h; 5: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 2 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 2 h; 6: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 2 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 2 h; 7: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 4 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; 8: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 4 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; 9: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 4 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 4 h; 10: 用  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 8 h With  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h; 11: 用  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 8 h With  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h; 12: 用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 8 h With  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  soaked for 8 h.

A: 培养 5 d Cultured for 5 d; B: 培养 10 d Cultured for 10 d; C: 培养 15 d Cultured for 15 d.

图 3 经  $\text{NaN}_3$  溶液处理后不同培养时间甜叶菊茎段诱变试管苗的 POD 同工酶图谱  
Fig. 3 POD isoenzyme zymograms of mutation plantlets from stem segments of *Stevia rebaudiana* Bertonii at different culture times after treated by  $\text{NaN}_3$  solution

## 3 讨论和结论

在预备实验的基础上,对甜叶菊腋芽诱导培养基中激素种类及浓度、诱变处理剂  $\text{NaN}_3$  的处理浓度和处理时间进行了比较和筛选,结果表明:适宜于甜叶菊‘皖甜 1 号’亲本-18 腋芽诱导的培养基为添加  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉

和  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖的 MS 培养基(pH 6.0),在此培养基上进行茎段诱导培养,平均腋芽数达到 7.2,苗高达到 6.2 cm,且组培苗生长状况良好。用  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$  浸泡 4 h;在该处理条件下,茎段将近一半死亡,植株生长正常但明显矮化,苗高仅 2.8 cm,诱导出的腋芽数减少,平均值为 4.9。

对经  $\text{NaN}_3$  诱变处理后培养 5、10 和 15 d 的诱变试管苗 POD 同工酶酶谱的分析结果表明: $\text{NaN}_3$  处理

对培养前期(5和10 d)诱变试管苗POD同工酶的影响较大,主要表现为酶活性和条带数量的差异;随培养时间的延长(15 d), $\text{NaN}_3$ 的影响效应减弱,仅表现为酶活性的差异,条带数量差异不大。由此可以看出:用适宜浓度的 $\text{NaN}_3$ 进行处理,对甜叶菊仅能造成短期的可逆性伤害。本研究结果仅为甜叶菊 $\text{NaN}_3$ 诱变育种提供了基础资料,有关 $\text{NaN}_3$ 对甜叶菊茎段的诱变效果以及诱变株的鉴定和筛选尚有待进一步的实验研究。

#### 参考文献:

- [1] 谢印芝. 新一代糖源:天然高纯度甜菊糖甙 Reb-A 和 Stv[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 10001.
- [2] 尚宏芹. 甜叶菊组培苗生根培养的研究[J]. 北方园艺, 2010(6): 170-172.
- [3] 倪军明, 李军平. 甜菊糖工业发展现状与前景[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(3): 156-158.
- [4] 赫福霞, 于品, 李茫雪, 等. 多因子正交试验对甜叶菊丛生芽诱导条件的筛选[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 79-81, 129.
- [5] 娄玉霞, 宋磊, 李新国, 等. 甜叶菊叶片离体培养及试管无性系的建立[J]. 上海师范大学学报:自然科学版, 2000, 29(4): 74-77.
- [6] 沈秀丽, 徐仲. 甜叶菊组织培养条件的研究: I. 外植体、激素浓度、琼脂浓度对愈伤组织形成及芽诱导的影响[J]. 中国糖料, 1996(3): 24-26.
- [7] 张子学, 杨久峰, 檀赞芳. 植物生长调节剂对甜叶菊增殖和生根的影响[J]. 中国林副特产, 2008(2): 13-15.
- [8] 董振红, 王贵民, 王彦超, 等. 甜叶菊茎尖组培苗生根及移栽的研究[J]. 中国糖料, 2008(2): 28-29, 39.
- [9] 崔广荣, 张子学, 张从宇, 等. 蝴蝶兰 $\text{NaN}_3$ 离体化学诱变及再生植株 RAPD 检测[J]. 热带作物学报, 2010, 31(4): 592-599.
- [10] 刘进平, 郑成木. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用[J]. 上海农业学报, 2004, 20(1): 19-21.
- [11] GOH M W K, KUMAR P P, LIM S H, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae) [J]. Euphytica, 2005, 141(1/2): 11-22.
- [12] 万善霞, 秦岭, 于同泉, 等. 水分胁迫对板栗幼苗过氧化物酶、超氧化物歧化酶活力及同工酶谱的影响[J]. 北京农学院学报, 1997, 12(3): 20-25.
- [13] 付凤玲, 李晚忱, 荣廷昭, 等. 用 $\gamma$ 射线和叠氮化钠诱变的玉米愈伤组织筛选耐旱和雄性不育材料[J]. 核农学报, 2005, 19(5): 356-359.
- [14] 姜振峰, 刘志华, 李文滨, 等. 叠氮化钠对大豆 $M_1$ 的生物诱变效应[J]. 核农学报, 2006, 20(3): 208-210.
- [15] 杨国志, 张明方, 顾掌根, 等.  $\text{NaN}_3$ 处理条件下西瓜直接再生试验体系研究[J]. 长江蔬菜:学术版, 2009(6): 11-14.
- [16] 安学丽, 蔡一林, 王久光, 等. 甲基磺酸乙酯(EMS)对玉米自交系诱变效应的研究[J]. 玉米科学, 2003, 11(3): 74-75, 84.
- [17] 陈超, 王桂兰, 乔永旭, 等. 蝴蝶兰类圆球茎的化学诱变试验[J]. 核农学报, 2006, 20(2): 99-102, 98.
- [18] 夏英武. 作物诱变育种[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 24-30.
- [19] 崔广荣, 张子学, 张从宇, 等. 秋水仙素对蝴蝶兰试管苗叶切片胚状体发生期的化学诱变[J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3368-3373.
- [20] 张计育, 李国平, 乔玉山, 等. 秋水仙素对草莓离体叶片再生和多倍体诱导的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(3): 69-73.
- [21] HWANG S J. Rapid *in vitro* propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert [J]. Journal of Plant Biology, 2006, 49(4): 267-270.
- [22] IBRAHIM I A, NASR M I, MOHAMMED B R, et al. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana* [J]. Sugar Technology, 2008, 10(3): 254-259.
- [23] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1999.

(责任编辑: 佟金凤)