

文章编号:1001-9014(2006)04-0275-04

微波处理菘蓝种子的子叶发育与生物光子辐射的相关性

陈怡平^{1,2}, 崔 瑛², 任兆玉³

(1. 中国科学院地球环境研究所, 陕西 西安 710075; 2. 西安工程大学 生物技术系, 陕西 西安 710048;
3. 西北大学 光子技术研究所, 陕西 西安 710069)

摘要:比较研究不同时间长度的微波辐照菘蓝种子对种子萌发率、淀粉酶活性、转氨酶活性、蛋白酶活性、蛋白质含量、游离氨基酸含量、总DNA含量、子叶发育状况及其生物光子辐射强度的影响。采用微波辐射浸泡3h的菘蓝(*Isatis indigotica* Fort)种子。与对照相比,四种处理均能不同程度提高菘蓝种子萌发率、淀粉酶活性、转氨酶活性、蛋白酶活性,促进蛋白质、游离氨基酸、DNA合成,促进子叶发育,提高了生物光子辐射强度。低剂量微波辐射能提高种子生理生化代谢机能,促进种子萌发和幼苗生长发育,研究发现8s微波预处理效果最为显著。

关键词:菘蓝;微波;生物光子辐射;发育

中图分类号:Q931.1 **文献标识码:**A

CORRELATION BETWEEN GROWTH DEVELOPMENT AND BIOPHOTON EMISSION OF ISATIS INDIGOTICA COTYLEDON EXPOSED TO MICROWAVE RADIATION

CHEN Yi-Ping^{1,2}, CHUI Ying², REN Zhao-Yu³

(1. Institute of Earth Environment, Chinese Academy of Science, Xi'an 710075, China;
2. Department of Biotechnology, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China;
3. Institute of Photonics and Photo-Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The effects of difference length microwave radiation *Isatis indigotica* on germination ratio, activity of amylase, activity of ALT, activity of AST, activity of proteases, concentration of soluble protein, free amino acid concentration, DNA concentration, cotyledon area and biophoton emission were studied by using the seeds being irradiated with microwave after soaked for 3h. The results show that microwave radiation treatments with different time can improve the germination ratio, activity of amylase, activity of ALT, activity of AST, activity of proteases, concentration of soluble protein, free amino acid concentration, DNA concentration, cotyledon area and biophoton emission. And the microwave radiation of low doses can stimulate the seeds germination and improve the cotyledon development. The effect of 8s pretreatment of microwave therein mentioned is the best for *Isatis indigotica* fort.

Key words: *Isatis indigotica* fort; microwave; biophoton emission; development

引言

自然界中除了萤火虫、水母和一些鱼类能辐射出肉眼可见的超弱光之外,尚有一种肉眼不可见的、来自于所有生命代谢活动的生物光子,它是各种生命活动(例如,细胞跨膜运输、生长发育和细胞分裂)强度的指示器^[1],可是生命活动常常受到外界环境因子的影响。微波就具有相悖的生物学效应,长时间的微波辐射会引起人头疼、疲乏、胃痛、失眠、易

怒等临床症状^[2],然而适量剂量和时间的微波辐射可以提高植物幼苗对增强紫外线辐射的抗性^[3],提高农作物种子的萌发率^[4]。但是,微波辐射种子能否引起代谢指示器的变化?这个问题并不清楚。为此,本文研究以中国常用传统中药板蓝根、大青叶的原植物—菘蓝(*Isatis indigotica*)为实验材料,采用2450MHz的微波炉(Combi-Grill Microwave Oven WD700,剂量为 $1.26 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$)辐射菘蓝种子,研究了微波辐射对菘蓝种子萌发率、种子萌发相关

收稿日期:2005-06-10,修回日期:2006-02-22

Received date: 2005-06-10, revised date: 2006-02-22

基金项目:国家自然科学基金重大项目(40599422);国家自然科学基金(30370269)资助项目

作者简介:陈怡平(1968-),男,陕西洛南人,中国科学院地球环境研究所出站博士后,主要从事环境生物学的研究。

生化参数及生物代谢指示器—生物光子辐射强度的影响,试图了解微波辐射菘蓝种子的生物效果,为进一步探讨其作用机理及提高中药产量和改善中药品质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort) 为实验材料,菘蓝种子为西安交通大学药学院提供。

1.2 方法

1.2.1 微波辐照预处理及种子萌发

实验设 0 秒微波处理组(对照组,CK), 3s 微波处理组(3s), 8s 微波处理组(8s), 13s 处理组(13s), 18s 微波处理组(18s)。选取籽粒饱满,大小均匀的菘蓝种子用清水浸泡 3h,自然晾干后用微波炉(2450MH,WD700)辐照种子 0s、3s、8s、13s、18s、剂量为 $1.26 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$,播种于培养皿,然后在 25C 光照培养箱进行沙培,细沙经 0.1% HgCl_2 消毒。待出芽后每平皿浇 10ml MS 培养液。

1.2.2 生化参数的测定

转氨酶的提取及测定:称 0.5g 出土 6 天的子叶进行转氨酶的提取及转氨酶活力测定,提取方法参考文献方法^[5],标准曲线的制作及测定分别按照 ALT kit (No. 20010819) 和 AST kit (No. 20010820) (北京北化康泰临床试剂有限公司提供);淀粉酶的提取及测定:子叶淀粉酶的提取及活性测定参照文献方法^[11];可溶性蛋白的提取及测定方法参照文献^[6];游离氨基酸的提取及测定:称 0.5g 子叶,加 5ml 10% 的乙酸,冰浴研磨,8 000g 离心 10min,然后用蒸馏水定容至 100ml,采用茚三酮法进行游离氨基酸的测定,方法参考文献^[7];蛋白酶的提取及测定:采用 Chripeeshs 和 Boulter 方法测定蛋白酶活

性^[8];DNA 的提取:DNA 的提取按照 EPICENTRE Master Pure™ Plant Leaf DNA Purification Kit 程序进行。用紫外分光光度计测定样品的 OD 值,并换算出 DNA 含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)。

1.2.3 发芽率及叶面积的测量

待种子萌发结束时统计发芽数,以其百分比表示发芽率。子叶面积的测量采用美国 CID 公司的叶面积仪(CID. INC CI-202)扫描。

1.2.4 生物光子辐射强度的测定

生物光子辐射强度的测定采用单光子计数器(APD: SPCM-AQR-15)。种子生物光子辐射强度以 10min 内 50 粒种子释放的光子数的平均值表示;子叶生物光子辐射强度以 10min 内每株幼苗释放的光子数表示。

1.2.5 统计分析

显著性差异采用 Duncan's 的多重统计分析进行处理。在表 1 中每排数据中带有相同字母表示处理之间没有显著性差异,在图 1 与图 2 每列数据中带有相同字母表示处理之间没有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 对菘蓝种子萌发、生理代谢和子叶发育的影响

表中结果表明,不同时间长度微波预处理对菘蓝种子萌发率、淀粉酶活性、转氨酶活性、蛋白酶活性、蛋白质含量、游离氨基酸含量、总 DNA 含量、子叶发育具有明显的促进作用。与对照相比,3S 预处理,其种子萌发率提高了 3.9% ($P < 0.05$)、淀粉酶活性提高了 29% ($P < 0.05$)、ALT 酶活性提高了 22.6% ($P < 0.05$)、AST 酶活性提高了 32.9% ($P < 0.05$)、蛋白酶活性提高了 5.6% ($P < 0.05$)、蛋白质含量提高了 14.8% ($P < 0.05$)、游离氨基酸含量提高了 25.6% ($P < 0.05$)、总 DNA 含量提高了

表 1 微波预处理菘蓝种子对子叶生理生化代谢参数的影响

Table 1 Influence of microwave pretreatment seeds of *Isatis indigotica* on physiological and biochemical parameters of *Isatis indigotica* cotyledon

	CK	3s	8s	13s	18s
Germination ratio (%)	36.6 ± 1.8d	40.8 ± 3c	50.6 ± 4.2a	49.3 ± 2.5a	45.6 ± 1.9b
Activity of amylase ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	1.30 ± 0.11d	1.68 ± 0.11c	2.48 ± 0.13a	2.01 ± 0.13b	1.63 ± 0.14c
Activity of ALT ($\text{Ug}^{-1} \text{FW}$)	23.5 ± 1.40e	28.80 ± 1.79db	32.76 ± 2.15a	29.6 ± 1.80b	24.50 ± 0.93c
Activity of AST ($\text{Ug}^{-1} \text{FW}$)	15.80 ± 0.84ed	21.00 ± 0.82b	23.60 ± 0.29a	20.10 ± 0.052c	16.30 ± 0.48d
Activity of proteases ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	7.17 ± 0.25d	7.57 ± 0.20cb	8.50 ± 0.35a	8.26 ± 0.21a	7.35 ± 0.18b
Concentration of soluble protein ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	14.80 ± 0.06e	17.00 ± 1.08d	19.50 ± 0.84a	18.10 ± 0.37b	15.70 ± 0.70c
AA concentration (μmol amino acid/ mg protein, h)	69.50 ± 4.99db	87.30 ± 5.50c	120.00 ± 7.10a	125.00 ± 9.03a	75.00 ± 5.68b
Concentration of DNA ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	225.0 ± 25.1e	245.0 ± 22.5dc	353.0 ± 29.9a	278.0 ± 45.6b	255.0 ± 39.2c
Area of cotyledon ($\text{cm} \cdot \text{plant}^{-1}$)	0.431 ± 0.01e	0.501 ± 0.01dc	0.63 ± 0.02a	0.57 ± 0.02b	0.51 ± 0.01c

Note: AA—free amino acid concentration; ALT—alanine aminotransferase; AST—aspartate aminotransferase

8.8% ($P < 0.05$)、子叶面积增大了 16.3% ($P < 0.05$); 8s 预处理, 其种子萌发率提高了 14% ($P < 0.05$)、淀粉酶活性提高了 90% ($P < 0.05$)、ALT 酶活性提高了 39% ($P < 0.05$)、AST 酶活性提高了 49% ($P < 0.05$)、蛋白酶活性提高了 18.5% ($P < 0.05$)、蛋白质含量提高了 31.8% ($P < 0.05$)、游离氨基酸含量提高了 72.6% ($P < 0.05$)、总 DNA 含量提高了 56% ($P < 0.05$)、子叶面积增大了 47% ($P < 0.05$); 13s 预处理, 其种子萌发率提高了 12.7% ($P < 0.05$)、淀粉酶活性提高了 77.6% ($P < 0.05$)、ALT 酶活性提高了 25.9% ($P < 0.05$)、AST 酶活性提高了 27% ($P < 0.05$)、蛋白酶活性提高了 15% ($P < 0.05$)、蛋白质含量提高了 22.3% ($P < 0.05$)、游离氨基酸含量提高了 79.8% ($P < 0.05$)、总 DNA 含量提高了 23.5% ($P < 0.05$)、子叶面积增大 32.2% ($P < 0.05$); 18s 预处理, 其种子萌发率提高了 9.9% ($P < 0.05$)、淀粉酶活性提高了 24% ($P < 0.05$)、ALT 酶活性提高了 4.3% ($P < 0.05$)、AST 酶活性提高了 3.2% ($P < 0.05$)、蛋白酶活性提高了 2.5% ($P < 0.05$)、蛋白质含量提高了 6% ($P < 0.05$)、游离氨基酸含量提高了 7.9% ($P < 0.05$)、总 DNA 含量提高了 13.3% ($P < 0.05$)、子叶面积增大了 18.8% ($P < 0.05$)。

2.2 对菘蓝光子辐射强度的影响

从图 1 与图 2 中可以看出, 不同时间长度微波预处理对菘蓝种子和幼苗生物光子辐射强度具有明显的影响。在微波辐射后 20h 和 45h 的菘蓝种子中 (Fig. 1), 经 3s 微波辐射的菘蓝种子生物光子辐射强度分别高于对照组 44% ($P < 0.05$) 和 51% ($P < 0.05$); 经 8s 微波处理菘蓝种子生物光子辐射强度

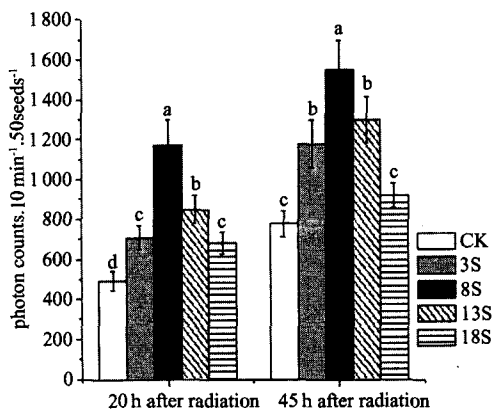


图 1 微波处理对菘蓝种子生物光子辐射强度的影响
Fig. 1 Effects of microwave radiation on biophoton emission in seeds of *Isatis indigortica*

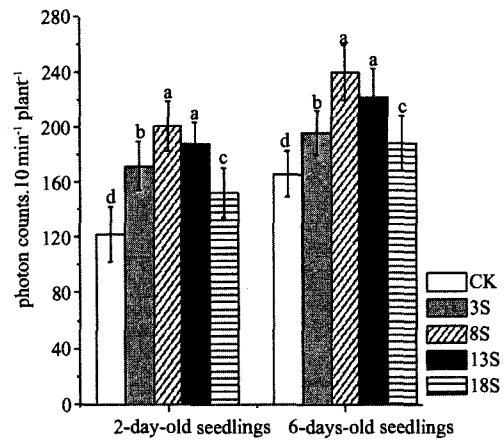


图 2 微波处理对菘蓝幼苗生物光子辐射强度的影响
Fig. 2 Effects of microwave radiation on biophoton emission in seedlings of *Isatis indigortica*

分别高于对照组 137% ($P < 0.05$) 和 99% ($P < 0.05$); 经 13s 微波处理菘蓝种子生物光子辐射强度分别高于对照组 72% ($P < 0.05$) 和 66% ($P < 0.05$); 经 18s 微波处理菘蓝种子生物光子辐射强度分别高于对照组 38% ($P < 0.05$) 和 18% ($P > 0.05$)。在微波辐射后 2 天 (2-day-old seedlings) 和 6 天 (6-day-old seedlings) 的菘蓝幼苗中 (Fig. 2), 经 3s 微波处理菘蓝幼苗生物光子辐射强度分别高于对照组 40% ($P < 0.05$) 和 18% ($P > 0.05$); 经 8s 微波处理菘蓝幼苗生物光子辐射强度分别高于对照组 65% ($P < 0.05$) 和 44.5% ($P < 0.05$); 经 13s 微波处理菘蓝幼苗生物光子辐射强度分别高于对照组 54% ($P < 0.05$) 和 38% ($P < 0.05$); 经 18s 微波处理菘蓝幼苗生物光子辐射强度分别高于对照组 25% ($P < 0.05$) 和 13.8% ($P > 0.05$)。

3 讨论

生物生长发育过程中的生理生化代谢均会受到外界环境因子的调节。微波对生物的作用主要是热效应和非热效应, 非热效应中主要是电磁效应。为了证明微波辐射菘蓝种子是否对萌发过程生理代谢具有刺激作用, 我们测定了种子和子叶中生物光子辐射强度, 因为生物各种生命活动 (例如, 细胞跨膜运输、生长发育和细胞分裂) 都可以通过生物光子辐射强度来反应, 活动越强其生物光子辐射强度越大^[4]。本研究发现经微波辐射的菘蓝种子和子叶生物光子辐射强度显著的高于对照组, 而且生物光子辐射强度与其淀粉酶活性、转氨酶活性、蛋白酶活性、蛋白质含量、游离氨基酸含量、总 DNA 含量, 种

子萌发率,子叶发育速率均呈现正相关性,这充分证明低剂量的微波辐射能够刺激菘蓝种子的生理代谢,提高种子萌发率,促进幼苗生长发育。

究其原委,可能是热效应和电磁效应共同作用于种子,种子内的水分子以及蛋白质、碳水化合物、核酸等生物大分子在微波(2 450MHz)能量场作用下快速振荡、互相碰撞、摩擦、挤压,从而使动能(微波能)转化为热能。而适当热能可以提高酶的活性,加速酶促反应进程^[9]。其次,微波的非热效应可以影响蛋白质、酶及生物大分子的结构,酶的半导体性和酶结构中金属离子的顺磁性,也可以提高酶的活性,加速酶促反应进程^[10]。在这两种效应的作用下,低熵生物大分子淀粉和蛋白质的降解速度加快,机体的生理生化代谢速率加快,熵值增大,种子生命活动的非平衡的稳定状态被打破,导致机体从高度有序向无序的方向发展。由于生物机体是一高度有序的开放系统且处于非平衡状态,犹如一个流动体系的反应器,物料有进有出,反应器中不断地进行着反应,是非平衡的,但整个反应器有处于恒定态。机体要维持这一高度有序性,是以增大环境的熵值为代价^[11]。因为微波处理组机体熵值大于对照组,所以在萌发后的个体发育过程中,与对照相比微波处理组要从环境吸收较多的能量来维持内熵的平衡,这样微波处理组的生化代谢参数(淀粉酶活性、转氨酶活性、蛋白酶活性、蛋白质含量、游离氨基酸含量、总DNA含量)、种子萌发率、生物光子辐射强度及子叶发育速率必然快于对照组,最终表现幼苗发育速率增加。

本文研究证明,虽然不同时间的微波处理对菘蓝种子萌发和苗期生长均有促进作用,但综合而言,以8s的处理效果最好,这一时间剂量可以在中药菘

蓝规范化栽培实践中应用,以促进菘蓝生长和发育,提高我国传统中药大青叶和板蓝根产量。

REFERENCES

- [1] Roschger P, Scott RQ, Devaraj B, *et al.* Observation of phase transitions in intact leaves by intrinsic low-level chemiluminescence [J]. *Photochem Photobiol*, 1993, **57**: 580—583.
- [2] Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S. Bioeffects of microwave—a brief review [J]. *Bioresource Technology*, 2003, **87**: 155—159.
- [3] Chen Yi-Ping. Microwave treatment of eight *Secunds* protects cells of *Isatis indigotica* from enhanced UV-B radiation lesions [J]. *Photochem. Photobiol*, 2006, **82**(2): 503—507.
- [4] Rao YVS, Cnakravorthy NVK, Dpanda BC. Effect of microwave irradiation on germination and initial growth of mustard seed [J]. *Indian J Agron*, 1989, **34**: 376—379.
- [5] WANG Pei-Hong. *Laboratory Manual of Biochemistry* [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press (王佩洪. 生物化学实验指导. 西安: 陕西科技出版社), 1985, 86—88.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Boil. Chem.*, 1976, **72**: 248—254.
- [7] Rosen H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids [J]. *Arch Biochem Biophys.*, 1957, **67**: 10—15.
- [8] Chrispeels MJ, Boulter D. Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of endoptidase [J]. *Plant Physiol.*, 1975, **55**: 1031—1037.
- [9] Daniel R M. The Upper limits of enzyme thermal stability [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **19**: 74—79.
- [10] Samarketu S P, Singh S P, Jha R K. 1996. Effect of direct modulated microwave modulation frequencies exposure on physiology of cyanobacterium *anabena dolilum* [C]. *Asia Pacific Microwave Conference*, 1996, B 2. 1, 155—158.
- [11] YAN Long-Fei, ZHAN Yu-Lin. *Molecular Biology* [M]. Beijing: Agriculture University of China press (阎隆飞, 张玉麟. 分子生物学. 北京: 中国农业大学出版社), 1997, 21—26.