

# 太空环境对仙客来诱变效应的研究

李 谨<sup>1</sup>, 耿金鹏<sup>1</sup>, 曹天光<sup>1</sup>, 尉文彬<sup>2</sup>, 郑志兴<sup>2</sup>, 展 永<sup>1</sup>

(1 河北工业大学 理学院, 生物物理研究所, 天津 300401; 2 张家口市农业科学院 园林花卉研究所, 河北 张家口 075000)

**摘 要:**以仙客来干种子为试材,利用“神舟八号”飞船搭载进行太空诱变处理,以此探究太空环境对仙客来造成的诱变效应。结果表明:太空诱变产生的 M<sub>1</sub> 代仙客来植株在花色和花形上与对照株相比表现出明显的表观性状差异;对突变株进行的 RAPD(Random amplified polymorphic DNA)试验分析中,28 条随机引物中有 27 条引物扩增出现多态性,总共扩增出 156 条条带,其中 91 条呈现出多态性,多态性比率达到 58.33%。所有突变株的 DNA 分子均发生了显著变化,变异率从 23.08%到 33.97%不等。综合分析显示,太空环境对当代植株造成了显著的诱变效应,经辐照后的植株在分子水平上均发生了明显的变异,而基因组的改变进一步导致了植株表观性状的变异。

**关键词:**太空环境;仙客来;表观性状;突变株;随机扩增多态性 DNA

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>62 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0112-04

仙客来(*Cyclamen persicum* Mill.)属报春花科的多年生草本植物,原产于南欧及地中海一带。其具有很高的观赏价值,市场需求量巨大,经济效益显著。但仙客来用种子繁殖优良品种后代严重分离,优良性状很难保持,栽培品种的分离和退化是仙客来发展面临的主要问题,也成为制约仙客来商品化生产的主要因素之一<sup>[1]</sup>。太空环境可以对植物的种子产生诱变作用,从而使其后代发生广幅的遗传变异,为育种提供丰富的材料基础。

太空环境相对于地球环境具有高真空、微重力、高能电离辐射以及强地磁场,这些特殊条件,对进入空间环境的植物材料具有明显的诱变作用。“空间诱变育种”是指利用返回式卫星、高空气球以及高空模拟试验搭载生物种质材料,在近地空间的物理和化学因素影响下使生物后代发生变异,经地面选育,培育新品种的方法<sup>[2]</sup>。

研究和实践证明,航天育种在有效创造罕见突变基因资源和培育作物新品种方面已发挥出越来越重要的作用,成为空间生命科学研究的重要组成部分,并凸显

出良好的产业发展优势<sup>[3]</sup>。研究表明,植物种子或生物细胞经空间搭载后能诱发明显的变异,如有丝分裂指数、细胞生长的改变、微核及染色体畸变增加等<sup>[4-5]</sup>。

我国花卉空间诱变育种工作开始于 20 世纪 80 年代。中国科学院遗传研究所自 1987 年以来,先后将一串红、鸡冠花、矮牵牛等 27 种花卉种子送入太空,待返回地面培育观测,这些花卉出现了地面上无法获得的变异品种,有益变异多,变异幅度大,极大地增加了花卉的观赏价值,大大缩短了花卉育种周期<sup>[6]</sup>。

在花卉诱变育种工作中,常用 RAPD(Random amplified polymorphic DNA)分子标记技术在分子水平上鉴定植物突变体、监测基因组结构、建立植物基因图谱<sup>[7]</sup>。RAPD 技术是 Williams 等<sup>[8]</sup>在 PCR 基础上发展起来的一种分子标记方法,具有简单易行,分析速度快,多态性高等优点,可用于 DNA 损伤和变异的监测,广泛应用于鉴定突变体等方面。车代弟等<sup>[9]</sup>成功的利用 RAPD 技术对 20 个仙客来品种进行研究,从分子水平将仙客来进行分类,为其优良品种的选育提供科学理论依据。

该研究通过“神舟八号”飞船搭载仙客来种子进行太空诱变处理,对太空诱变产生的 M<sub>1</sub> 代植株进行观测鉴定,分析其表观性状变化,筛选出突变株,利用 RAPD 技术研究仙客来变异株与对照株之间 DNA 变异情况,以期从分子水平上进一步探讨空间诱变机理提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用张家口市农业科学院提供的火焰纹品种 T84

**第一作者简介:**李谨(1986-),女,博士研究生,研究方向为辐照生物学。E-mail:Davidjin2013@163.com.

**责任作者:**展永(1954-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事生物大分子动力学及辐照生物学等教学与研究工作。E-mail:Yong\_zhan@163.com.

**基金项目:**河北省科技计划资助项目(09220102D);河北省自然科学基金资助项目(2013202192)。

**收稿日期:**2014-09-09

火焰纹橙红色仙客来干种子作为试验材料。仙客来干种子搭载了“神舟八号”飞船进行为期 16 d 的太空飞行。待飞船返回地面后,太空组和对照组干种子统一存放在 4℃ 冰箱内保存。

## 1.2 试验方法

1.2.1 田间试验 2012 年 3 月太空组和对照组仙客来干种子统一种植于张家口市农业科学院花卉种植基地,保持温度 17~23℃,湿度 60%~80%,光照强度 30 000~50 000 lx。并对花形和花色进行定期观测。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用 CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 方法<sup>[10]</sup> 提取太空仙客来 (T84-1, T84-2, T84-3, T84-4) 的总 DNA, 以没经过太空辐射的仙客来 (T84-CK) 为对照。

1.2.3 随机引物的筛选 从 100 种大小为 10 个碱基的随机引物中(购自北京赛百盛科技公司)筛选出 28 条用于仙客来 T84 品种的引物。28 条引物的序列如下: A02: TGCCGAGCTG; A06: GGTCCCTGAC; A08: GTGACGTAGG; A09: GGGTAACGCC; A10: GTGATCGCAG; A11: CAATCGCCGT; A13: CAGCACCCAC; A15: TTCCGAACCC; A16: AGCCAGCGAA; A17: GACCGCTTGT; A18: AGGTGACCGT; A19: CAAACGTCGG; A20: GTTGCGATCC; K07: AGCGAGCAAG; K14: CCCGCTACAC; K15: CTCCTGCCAA; K16: GAGCGTCGAA; K18: CCTAGTCGAG; K19: CACAGGCGGA; N02: AC-CAGGGGCA; N04: GACCGACCCA; N09: TGCCGGCTTG; N15: CAGCGACTGT; N19: GTCCGTACTG; N20: GGTGCTCCGT; T05: GGGTTTGGCA; T15: GGATGC-CACT; T20: GACCAATGCC。

1.2.4 RAPD-PCR 反应条件 PCR 反应总体系为 25 μL: 其中模板 DNA 80 ng, 200 μmol/L dNTP 取 2.5 μL, 引物 200 nmol/L 取 5 μL, 10× Buffer (100 mmol/L Tris HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 取 2.5 μL, Dye 取 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶取 0.5 μL, 其余用 ddH<sub>2</sub>O 填充。反应在 CFX96PCR 扩增仪(美国产)上进行。反应程序为: 94℃ 预变性 4 min, 92℃ 变性 1 min, 37℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并成像观察。

## 1.3 数据分析

该研究对电泳结果进行分析, 有条带的记录为“1”, 无条带的记录为“0”; 使用 POPGEN32 软件计算多态位点百分率。

突变株的突变率  $M = (\text{每个突变株相比对照株的差异条带数目} / \text{对照株总条带数目}) \times 100\%$ 。定义 DNA 突变率公式如下:  $M = n_d / N \times 100\%$ , 其中,  $n_d$  表示突变株相比对照组的差异条带数目,  $N$  表示对照株总条带数目。

## 2 结果与分析

### 2.1 表观性状的变化

由图 1 可知, 与对照组相比, 太空辐照后的植株在花色和花形上均出现不同程度的变异。辐照后花色变异: 辐照组植株的花色变得更为绚丽, 由橙红色 (T84-CK) 突变为海棠色 (T84-1) 和波斯玫瑰红 (T84-3); 辐照后花形变异: 平瓣花形 (T84-CK) 发生了更具观赏性的变化, T84-1 花瓣变得狭长扭曲, 平向展开; T84-2 花瓣狭长扭曲, 并且花瓣边缘带白边; T84-3 花瓣变得略圆, 密实一致性好; T84-4 花瓣边缘带白边。

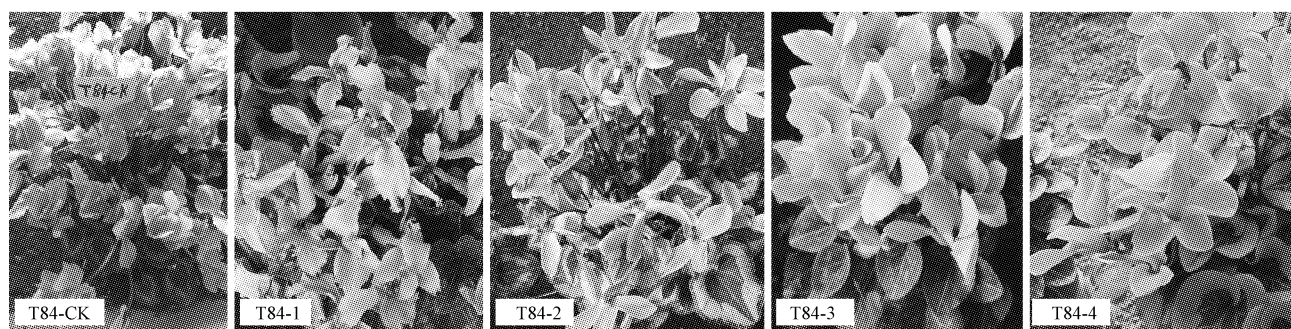


图 1 对照组和变异株的表观形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of control plant and mutated plants

### 2.2 基因组 DNA 的 RAPD 试验分析

2.2.1 RAPD 扩增条带多态性统计分析 该研究用 28 条随机引物扩增了对照株和 4 株变异株的 DNA, 结果显示, 对照株共扩增出 156 条稳定且清晰的条带, 扩增产物分子量大小为 100~2 000 bp; 每条引物产生的条带数目

3~9 条不等(表 1), 其中有 27 条引物扩增出现多态性条带 91 条, 其多态性比率达到 58.33%。图 2 为引物 A06 扩增结果, 引物 A06 在 T84-CK 上共扩增出 3 条条带, 而 T84-1、T84-3 和 T84-4 在 720 bp 处各缺失 1 条条带; T84-2 在 720 bp 和 820 bp 处均缺失 1 条条带。



表 1 仙客来 T84 品种的  
28 种 RAPD 引物的扩增结果

Table 1 The amplified results of 28 RAPD primers

引物编号 Primer No.	扩增条带数目 Number of amplified bands	多态性条带数目 Number of polymorphic bands	多态性条带比率(PPB) Percentage of polymorphic bands/%
A20	5	4	80.00
K14	4	2	50.00
K18	4	2	50.00
K19	6	3	50.00
N02	8	4	50.00
N04	4	3	75.00
N09	9	7	77.78
N15	6	4	66.67
T15	5	3	60.00
A02	5	2	40.00
A06	4	1	25.00
A08	3	2	66.67
A09	3	2	66.67
A10	7	4	57.14
A11	7	4	57.14
A13	6	5	83.33
A15	5	3	60.00
A16	6	4	66.67
A18	3	1	33.33
N20	7	6	85.71
T05	6	0	0
A19	5	3	60.00
K07	6	1	16.67
K16	7	5	71.43
T20	6	3	50.00
A17	5	3	60.00
N19	5	4	80.00
K15	9	6	66.67
总计	156	91	58.33

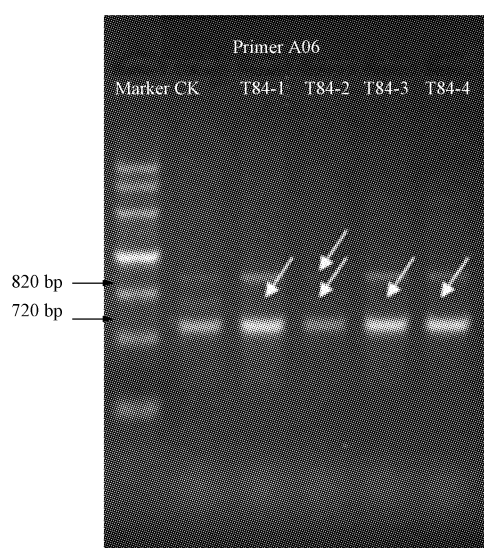


图 2 对照和突变株在引物 A06 上产生的 RAPD 扩增谱图

Fig. 2 RAPD patterns of the control plant and mutated plants were generated by primer A06

2.2.2 变异率分析 仙客来 T84 对照组总条带数  $N=156$ , 与对照组相比 T84-1、T84-2、T84-3、T84-4 的差异条带数目分别为 36、48、53 和 44。根据 DNA 突变率公式, 计算出其变异率分别为 23.08%、30.77%、33.97% 和 28.21%。4 株仙客来变异株的 DNA 全部发生了较大的改变, 这表明太空诱变处理的确引起了当代仙客来基因组 DNA 的变化, 为研究太空环境对仙客来造成的损伤效应提供了分子水平的证据。

### 3 讨论与结论

多年的植物空间诱变应用实践证明, 太空诱变育种是继常规育种、分子生物学技术育种的又一有效育种新途径。该研究通过植株的形态学观察和 RAPD 试验分析对搭载“神舟八号”飞船的仙客来干种子在太空环境下的突变效应进行了第一子代植株的分析研究, 发现太空组植株出现了明显的突变, 太空组植株在花色和花形方面产生了明显变异, 由此证明太空飞行可以产生高于地面的随机突变率和更宽的变异谱而造成生物的遗传突变, 该研究结果对获取更优秀的观赏植物的遗传育种展示了美好的前景。

花色和花形的奇异是反映花卉观赏价值的重要指标之一, 该研究中发现辐照后的仙客来在花色和花形的表现性状上均产生了显著变异, 突变株具有较高的观赏价值。汤泽生等<sup>[11]</sup>利用“神舟四号”飞船搭载凤仙花种子, Yu 等<sup>[12]</sup>和 Cai 等<sup>[13]</sup>利用“神舟三号”飞船分别搭载了水稻种子和烟草种, 刘建福等<sup>[14]</sup>利用“神舟八号”飞船搭载武夷岩茶, 研究结果均显示太空诱变后的植株与对照株相比具有明显的表现性状变化, 突变株均呈现出较高的变异价值, 这些结论均与该研究结果相类似。

DNA 是生物性状遗传的物质基础, 决定着外部的形态。研究 DNA 的变化, 可以从分子水平上研究太空辐照后仙客来表现性状变异的原因。RAPD 技术已经成功的应用于太空诱变引起的 DNA 多态性研究中。

该研究用 28 条随机引物对太空仙客来突变株的基因组 DNA 进行了初步研究, 分析其基因组 DNA 之间的多态性变化。结果显示太空组仙客来的 DNA 均发生了改变, 呈现出较高的分子多态性差异, 变异率高, 变异幅度大。Mei 等<sup>[15]</sup>、刘敏等<sup>[16]</sup>以及 Nechitailo 等<sup>[17]</sup>均使用了 RAPD 方法研究航空搭载后的玉米、辣椒和番茄在分子水平上的变化, 结果表明辐照后的植株在 DNA 分子水平上发生了明显的变异, DNA 变异率差异较大。

花卉品种的培育素来以追求新奇为代表, 其观赏价值的高低往往取决于变异程度的大小<sup>[2]</sup>, 随着人们的生活质量的改善和欣赏水平的提高, 对花卉品种的要求也不断推陈出新。而常规花卉育种存在突变频率低, 变异幅度小, 育种周期长等缺点。太空环境会使植物产生突变效应, 太空诱变能明显改善植物的某些性状, 可以获

得地面常规育种难以得到的罕见突变,并且具有变异率高,变异幅度大等特点。对于花卉而言,由于人们对观赏角度的多元化以及欣赏部位的多角度性,太空诱变的不定向性恰恰成为花卉诱变育种的优势,把太空诱变作为遗传育种的新途径已受到国内外遗传育种界的广泛重视<sup>[6,18]</sup>。综上所述,太空环境对仙客来干种子具有明显的当代诱变效应,不仅造成了仙客来的表现性状的变化,同时也引起了其遗传物质的改变。该研究为仙客来育种和分子遗传学研究提供了有价值的试验材料和新种质,为进一步的品种选育和诱变机理研究奠定基础,同时也为太空诱变育种规律的研究提供了试验依据。

### 参考文献

- [1] 胡江川,柳金英.我国仙客来发展现状、问题及对策[J].北方园艺,2008(7):98-101.
- [2] 王雁,李璐滨,韩蕾.空间诱变技术及其在我国花卉育种上的应用[J].林业科学研究,2002,15(2):229-234.
- [3] 刘录祥,郭会君,赵林妹.我国作物航天育种 20 年的基本成就与展望[J].核农学报,2007,21(6):589-592.
- [4] Gaubin Y, Kovalev E E, Planel H, et al. Development capacity of artemia cysts and lettuce seeds flown in Cosmos 936 and directly exposed to cosmic rays[J]. Aviation Space and Environmental Medicine, 1979, 50(2):134-138.
- [5] Vaulina E, Anikeeva I, Kostina L. Radiosensitivity of higher plant seeds after spaceflight[J]. Advance in Space Research, 1984, 4(10):103-107.
- [6] 蒋兴村.我国农作物空间诱变育种研究概况[J].现代化农业,1998,(11):2-4.
- [7] 董喜存,李文建,余丽霞,等.用随机扩增多态性 DNA 技术对重离子辐照大丽花花色突变体的初步研究[J].辐射研究与辐射工艺学报,2007,25(1):62-64.
- [8] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6531-6535.
- [9] 车代弟,秦智伟,王金刚.仙客来(*Cyclamen persicum* Mill.)的种质资源 RAPD 分析[J].植物研究,2002,22(3):314-317.
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Research, 1980(8):4321-4325.
- [11] 汤泽生,杨军,赵燕,等.航天诱变凤仙花 SP1 代花、果实和种子的研究[J].西华师范大学学报(自然科学版),2005,26(1):48-51.
- [12] Yu X, Wu H, Wei L J, et al. Characteristics of phenotype and genetic mutations in rice after spaceflight[J]. Advance in Space Research, 2007, 40, 528-534.
- [13] Cai L T, Zheng S Q, Huang X L. A crinkly leaf and delay flowering mutant of tobacco obtained from recoverable satellite-flown seeds[J]. Advances in Space Research, 2007, 40:1689-1693.
- [14] 刘建福,黄安民,钟书淳,等.“神舟八号”航天搭载武夷岩茶形态变异研究[J].福建茶叶,2013,35(5):8-10.
- [15] Mei M, Qiu Y, Sun Y, et al. Morphological and molecular changes of maize plant after seeds been flown on recoverable satellite[J]. Advances in Space Research, 1998, 22(12):1691-1697.
- [16] 刘敏,李金国,王亚林,等.卫星搭载的甜椒 87-2 过氧化物同工酶检测和 RAPD 分子检测初报[J].核农学报,1999,13(5):291-294.
- [17] Nechitailo G S, Lu J Y, Xue H, et al. Influence of long term exposure to space flight on tomato seeds[J]. Advance in Space Research, 2005, 36:1329-1333.
- [18] Duttcher F R, Hess E L, Halstead R W. Progress in plant research in space[J]. Advance in Space Research, 1994, 14(8):159-171.

## Study on the Mutagenic Effects of Space Environment on *Cyclamen persicum* Mill.

LI Jin<sup>1</sup>, GENG Jin-peng<sup>1</sup>, CAO Tian-guang<sup>1</sup>, WEI Wen-bin<sup>2</sup>, ZHENG Zhi-xing<sup>2</sup>, ZHAN Yong<sup>1</sup>

(1. School of Sciences, Hebei University of Technology, Tianjin 300401; 2. Institute of Garden Flowers, Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou, Hebei 075000)

**Abstract:** To explore the mutagenic effect of space environment on *Cyclamen persicum* Mill., dry seeds were carried by Chinese “Shen Zhou VIII”. After recovery, these seeds were planted and investigated. The results showed the first generation of the space-exposed plants displayed considerable changes of phenotypic traits in flower color and flower shape compared with their control plants. Mutated plants which acquired new phenotypic traits after space flight were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Among 28 random primers used in this experiment, 27 primers generated different DNA band type. 156 DNA bands were produced, among which 91 DNA bands were polymorphic with the percentage of polymorphism being 58.33%. The DNA of mutated plants had changed, and the DNA mutation rates varied from 23.08% to 33.97%, which suggested that dramatic changes on DNA molecular level occurred after the plants had been exposed to the space environment. Results of the study demonstrated that the mutagenic effects could occur in the seeds flown in space, and the space environment could make changes in some of the genes, and these changes in the genes would induce phenotypical changes.

**Keywords:** space environment; *Cyclamen persicum* Mill.; phenotypic traits; mutants; random amplified polymorphic DNA analysis