

航天搭载诱导百日草的生物学效应

李多芳, 田安然, 耿金鹏, 曹天光, 展永

(河北工业大学 生物物理研究所, 天津 300401)

摘要:以百日草种子为试材,通过生物统计和分子标记的方法,对航天搭载处理的百日草干种子当代植株生长状况进行了研究。结果表明:航天搭载处理使百日草种子的发芽率有所下降;而航天搭载处理组的百日草当代幼苗黑斑病的感染率有一定升高;在航天搭载处理组的变异植株中发现 1 株稳定的三叶共生变异株 H1-2,变异株的叶片明显小于对照植株的叶片。随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析表明,与对照植株相比 H1-2 基因组的变异率为 13.4%。航天搭载诱导百日草生物学效应的研究为花卉的航天诱变育种提供了一定的参考依据。

关键词:航天搭载;百日草;叶序;RAPD

中图分类号:Q 691 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)23-0097-04

20 世纪 80 年代,我国利用返回式卫星搭载植物种子进行航天诱变育种,开辟了植物育种的新途径^[1]。之后,返回式卫星和神舟系列飞船多次搭载植物种子获得大量植物变异种质资源^[2-4]。目前关于航天搭载诱变花卉的生物效应已有报道,并培育出了白莲、毛百合、玫瑰等多个具有经济价值的航天花卉新品种(系)^[5-6]。随着我国航天技术的不断发展,航天花卉育种产业的发展将受到越来越多的关注。

空间环境的主要特点是高真空、微重力和强辐射。有研究表明微重力环境主要影响生物体早期胚胎的发育,而辐射环境则主要在生长过程产生影响,航天诱变效应是二者相互作用的复杂效应^[7]。由于空间环境的特殊性,航天诱变育种具有变异率高、变异幅度大、稳定较快等优势^[8]。在植物的航天诱变研究中发现航天搭载能够诱发植物产生染色体 DNA、蛋白质、细胞等多个层次的生物变异,从而最终导致植物生物性状的变异^[9-11]。花卉选育的重点是性状的观赏价值,培育的目标主要是实现品种的多样化和性状的新奇特。航天搭载诱变往往能够在较短时间内获得大量的稳定变异性状,且有可能获得地面诱变难以得到的罕见变异性状。航天搭载的空间环境为花卉诱变提供了独特的条件。尽管航天诱变花卉的生物学效应已有一些研究,但由于

航天搭载成本高、条件有限等因素的限制,目前航天搭载花卉的诱变效应研究仍然有待进一步的完善。

该试验研究了航天搭载诱导百日草干种子后当代幼苗的生物学效应。通过表型性状的统计和分子水平的检测,来探讨航天搭载对百日草性状变异的影响,以期今后建立传统育种与现代科学技术相结合的新型育种模式提供一定的试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为百日草(*Zinnia elegans* Jacq.)干种子,将同一批粉色百日草种子分成 2 组,一组为对照,一组进行航天搭载。

1.2 试验方法

1.2.1 空间诱变 供试百日草种子搭载“神舟八号”飞船在近地太空环境中飞行。飞船于 2011 年 11 月 1 日 5:00 发射,于 11 月 17 日 19:00 顺利回收,整个航天飞行历时 172 h,飞行高度在 200~330 km。经航天搭载的百日草种子回收并在河北工业大学植物培养温室中进行种植。

1.2.2 幼苗培养 将对照组(CK)和航天搭载组(SF)的百日草种子同时播种在装有营养土的穴盘中,置于温室中培养。每盘适当浇水,保持土壤湿润,7 d 后统计各组的发芽数。待幼苗长至 2 叶 1 心期将其移植于花盘中,观察记录幼苗的生长状况。在相同的自然条件下对对照组和航天搭载组的百日草植株感染黑斑病的情况进行统计调查。在培养过程中发现幼苗的叶序发生明显变异,且在航天搭载组中发现 1 株稳定的叶序变异株 H1-2。对叶序变异株 H1-2 进行性状观察,同时采集其叶片进行 DNA 指纹分析。

1.2.3 RAPD 分子标记 采用随机扩增多态性 DNA

第一作者简介:李多芳(1985-),女,河北邯郸人,博士研究生,现主要从事大分子动力学与辐射生物学和物种进化等研究工作。E-mail:duofang_6608@163.com.

责任作者:展永(1954-),男,教授,博士生导师,研究方向为大分子动力学离子与通道及辐射生物学和分子马达。E-mail:yongz2013@163.com.

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2013202192)。

收稿日期:2015-07-24

(Random amplification polymorphism DNA, RAPD) 技术对百日草野生型植株和叶序变异株进行 DNA 指纹分析。首先使用植物基因组试剂盒提取百日草叶片的基因组 DNA, 并对其进行质量和浓度检测。其次, 从 200 条随机引物中筛选出扩增条带稳定清晰且带型多样的 13 条随机引物, 引物序列如表 1 所示。最后对百日草 DNA 进行 PCR (Polymerase chain reaction) 扩增, 并对扩增结果进行初步的统计分析。PCR 反应的总体积为 25 μ L: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L 的 dNTP 2 μ L, 5 μ mol/L 的随机引物 4 μ L, DNA 模板 50 ng, 5 U/ μ L 的 Taq 酶 0.5 μ L, 超纯水若干。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 38 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 13 条筛选的随机引物序列

Table 1 The sequence of the random primers screened

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物名称 Primer name	碱基序列 Primer sequence
A04	AATCGGGCTG	E16	GGTGACTGTG
A09	GGGTAACGCC	F05	CCGAATTCCC
A20	GTTGCGATCC	H18	GAATCGGCCA
B12	CCTTGACGCA	J20	AAGCGGCTC
C01	TTCGAGCCAG	M13	GGTGGTCAAG
C05	GATGACCGCC	N02	ACCAGGGGCA
C08	TGGACCGGTG		

2 结果与分析

2.1 航天搭载对百日草种子活力的影响

种子发芽率是种子活力的体现, 也是评估植物诱变效应的重要指标。从图 1 可以看出, 对照组播种 20 粒, 发芽 17 粒, 发芽率为 85%。航天搭载处理组共播种 10 粒, 发芽 8 粒, 发芽率为 80%。结果表明, 航天搭载处理后百日草种子的发芽率有所下降。但总体来说, 对照组和航天搭载组种子的发芽率无明显差异。

2.2 百日草黑斑病发病情况

黑斑病是百日草常见的病害之一, 是由致病真菌引

起, 植株发病与高温高湿的环境有关。被侵染的植株初期表现为叶片出现黑褐色斑点, 后期则导致叶片的变褐干枯, 花瓣皱缩干枯, 严重影响植株的正常生长和观赏价值。从图 2 可以看出, 在对照组的 19 株百日草植株中有 5 株染病, 染病率为 26.3%; 航天搭载组 8 株中有 4 株感染, 染病率为 50.0%。从百日草植株的染病情况来看, 航天搭载组与对照相比黑斑病的染病率有所增加。

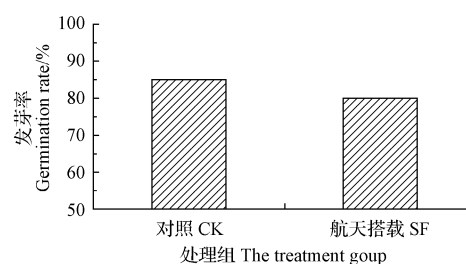


图 1 不同处理组百日草种子的发芽率

Fig. 1 The germination rate of *Zinnia elegans* Jacq. seeds of different treatment groups

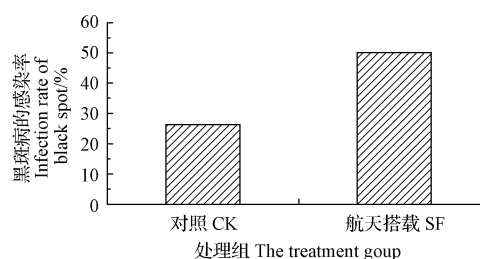
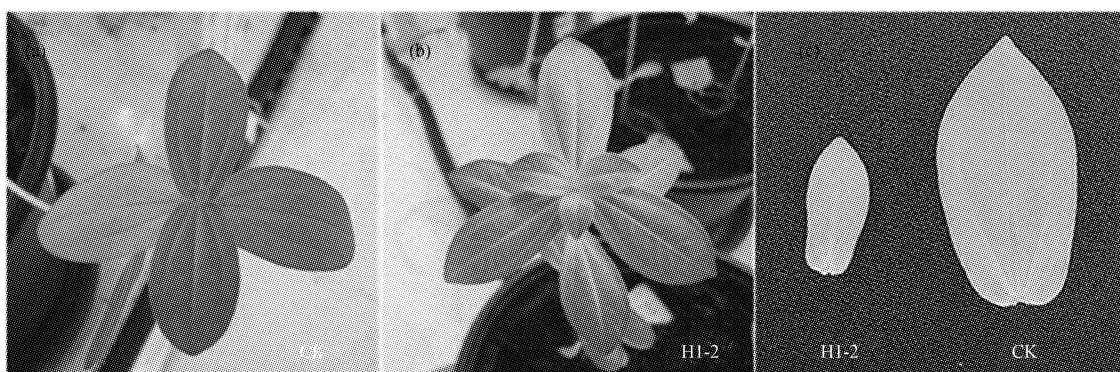


图 2 不同处理组百日草黑斑病的染病率

Fig. 2 The infection rate of black spot in different treatment groups of *Zinnia elegans* Jacq.

2.3 叶序变异株的性状分析

航天诱变和中子辐照处理的百日草幼苗中均发现了叶序的变异植株。因此该试验以叶序变异株为材料, 对其性状进行分析。由图 3a 可知, 野生型的百日草植



注: (a) 野生型植株是垂直对生叶序; (b) 变异株 H1-2 为三叶共生叶序; (c) 野生型百日草和变异株 H1-2 的叶片大小对比。

Note: (a) The wild plant with vertical opposite phyllotaxy; (b) The variant plant of H1-2 with clover symbiotic phyllotaxy; (c) The comparison of leaf size between wild plant and mutant H1-2.

图 3 航天搭载处理组中百日草叶序变异株的性状特征

Fig. 3 The trait characteristics of phyllotaxy variant induced by space flight of *Zinnia elegans* Jacq.

株为垂直对生叶序。航天搭载处理组中发现 1 株三叶共生变异株 H1-2(图 3b)。变异株 H1-2 共生的 3 个叶片大小相同呈中心对称,上下 2 组叶片角度互错。变异株 H1-2 的叶片颜色深绿,叶面光滑,纹理对称清晰,具有较强的观赏性。此外,同一位置处的叶片明显小于对照植株叶片(图 3c)。从第 3 组叶片开始三叶共生叶序性状稳定。由此可见,航天搭载能够诱导百日草叶序发生变化且这种变化相对稳定。

2.4 叶序变异株基因组 DNA 的多态性分析

随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术是一种分子标记技术,能够快速有效的检测基因组变异情况,因此被广泛应用于花卉遗传多样性的研究中^[12]。为从分子水

平上进一步探索叶序变异株间的差异,该研究从 200 种随机引物中筛选出 13 种随机引物对百日草叶序变异株的基因组进行分析。从图 4 可以看出,在引物 N02 的扩增结果中 H1-2 变异株在分子量为 750 bp 处缺失 1 条条带,而在分子量为 600 bp 处多出 1 条条带。在引物 C08 的扩增结果中在分子量为 700 bp 处增加 1 条条带。对 15 种随机引物的扩增结果进行统计分析得到,对照组植株共扩增出 67 条条带,航天变异株 H1-2 扩增出 62 条条带。对比二者的扩增结果得到差异条带数目为 9 条。定义变异条带数目/对照组的总条带数目为基因组变异率,由此得到航天搭载变异株 H1-2 的基因组变异率为 13.4%。

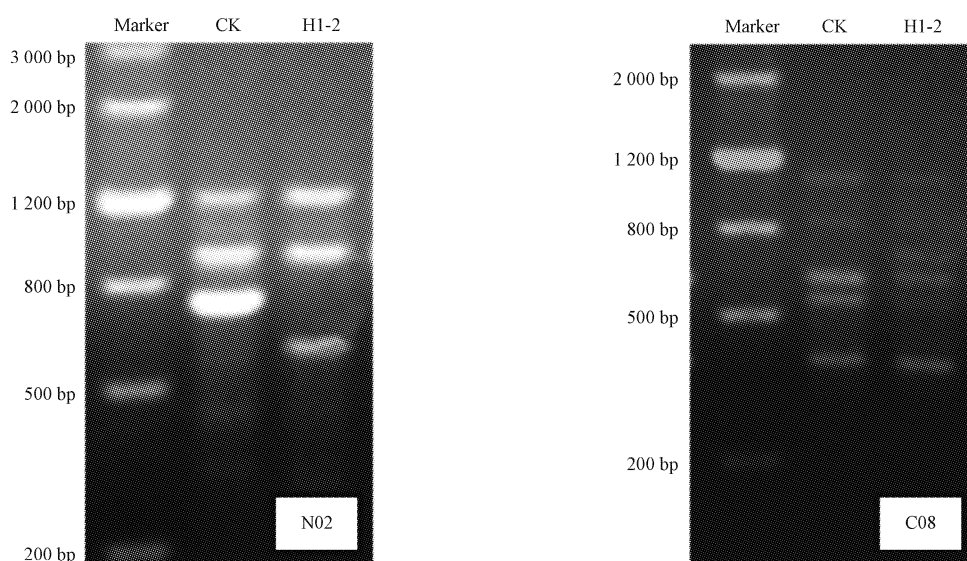


图 4 随机引物 N02 和 C08 的扩增结果

Fig. 4 The amplification result of the random primers N02 and C08

3 结论与讨论

该研究对航天搭载处理后百日草当代幼苗的生物性状进行了调查分析,结果表明航天搭载诱变处理能够使百日草当代种子的发芽率下降,而使黑斑病的感染率有所上升。在对航天搭载组植株的性状观察中发现了 1 株稳定的三叶共生突变体,其叶片大小明显小于对照,叶型具有较高的观赏性。RAPD 分析表明与对照植株相比变异株 H1-2 的基因组发生明显变异,变异率为 10.4%。对航天搭载百日草的生物效应研究为航天花卉育种的发展提供了一定的试验基础。

航天诱变育种作为一种新兴的产业,在植物的新品种培育中得到越来越广泛的应用^[13-16],在花卉的诱变育种中更具有独特的优势。航天诱变育种技术已被应用在白莲^[17]、毛百合^[18]、露地菊^[19]、玫瑰^[6]、薰衣草^[20]、仙客来^[21]、月季^[22]、凤仙花^[23]、孔雀草^[24]等多种花卉诱变研究中。在航天诱变的生物效应的研究中,发现了航天搭载对不同品种的植株花部性状、花产量和株型等方面

均有影响。除产生叶序变异之外,CAI 等^[25]研究发现航天搭载能够使番茄叶片发生卷曲。LI 等^[20]发现经航天搭载的四季薰衣草叶片边缘锯齿发生较大变化。因此航天搭载对不同品种的植株性状的变异是多样化的、随机的。孟宪水等^[6]研究发现航天搭载对玫瑰锈病的抗性有一定影响,为航天诱变百日草抗病性研究提供了依据。在分子水平上,刘敏等^[26]和李金国等^[27]的研究均表明航天搭载对植物的基因组有一定影响。综上所述,航天搭载诱变花卉在表型性状、抗病性和分子生物学等多个方面的研究还有待进一步的完善。随着我国航天事业的发展,航天诱变育种技术在今后花卉的诱变育种中具有十分广阔的应用前景。

参考文献

- [1] LIU L X. Development of space breeding in China[J]. Aerospace China, 2009(3):11-15.
- [2] 蒋兴村. 空间诱变进展及前景[J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊): 77-82.
- [3] 李永辉, 涂北根, 焦长兴, 等. 植物空间诱变育种研究进展[J]. 江西农

业学报,2008,20(1):21-25.

[4] 严硕,高文远,路福平,等.药用植物空间育种研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(3):385-388.

[5] 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.

[6] 孟宪水,吕传润,董桂芝,等.玫瑰花航天育种技术研究[J].山东林业科技,2009(5):25-28.

[7] 李文建,党秉荣,王转子,等.空间辐射生物学研究进展[J].原子核物理评论,2010,127(2):206-211.

[8] 胡广化,刘建秀,郭海林.我国植物空间诱变育种及其在草类植物育种中的应用[J].草业科学,2006,15(21):15-21.

[9] OU X F, LONG L K, ZHANG Y H, et al. Spaceflight induces both transient and heritable alterations in DNA methylation and gene expression in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mutation Research, 2009, 662: 44-53.

[10] MA Y, CHENG Z, WANG W, et al. Proteomic analysis of high yield rice variety mutated from space flight [J]. Advances in Space Research, 2007, 40: 535-539.

[11] 王彩莲.空间环境对水稻的细胞学效应研究[J].核农学报,1998,12(5):269-273.

[12] 韩凌,雷家军.RAPD技术在花卉育种中的应用[J].中国农学通报,2006,22(8):83-87.

[13] 郭亚华,谢立波,邓立平.利用空间诱变育成“太空椒”系列新品系研究[J].北方园艺,2003(6):41-43.

[14] NECHITAILO G S, LU J Y, XUE H, et al. Influence of long term exposure to space flight on tomato seeds [J]. Advances in Space Research, 2005, 36: 1333-1339.

[15] QI J J, MA R C, CHEN X D, et al. Analysis of genetic variation in *Gano-*

derma lucidum after space flight [J]. Ads Space Res, 2003, 31(6): 1617-1622.

[16] 单成钢,倪大鹏,王维婷,等.丹参种子航天搭载的生物学效应[J].核农学报,2009,23(6):947-950.

[17] 谢克强,良波,张香莲,等.白莲二次航天搭载的选育研究[J].核农学报,2004,18(4):300-302.

[18] 杨利平,张方,薛志军.空间条件对毛百合的影响[J].河北林果研究,1999,14(3):230-233.

[19] 洪波,何森,丁兵,等.空间诱变对露地栽培菊矮化性状的影响[J].木本植物研究,2000,20(2):212-214.

[20] LI J, GENG J P, CAO T G, et al. Mutagenic effects of the space environment on *Mealycup Sage* (*Salvia farinacea* Benth.) [J]. Acta Biophysica Sinica, 2014, 30(3): 207-215.

[21] 李谨,耿金鹏,曹天光,等.太空环境对仙客来诱变效应的研究[J].北方园艺,2015(4):112-115.

[22] 薛淮,刘敏,鹿金颖,等.空间环境对月季组培苗生物学特性的影响[J].自然科学进展,2005,15(2):173-178.

[23] 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,2005(1):47-51.

[24] 陈肖英,郑平,徐明全,等.太红 1 号孔雀草选育研究初报[J].热带农业科学,2010,30(7):30-34.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 李金国,李敏,王培生,等.番茄种子宇宙飞行后的过氧化物同工酶及 RAPD 分析[J].园艺学报,1999,26(1):33-36.

Biological Effect of *Zinnia elegans* Jacq. Induced by Space Flight in SP1 Generation

LI Duofang, TIAN Anran, GENG Jinpeng, CAO Tianguang, ZHAN Yong

(Institution of Biophysics, Hebei University of Technology, Tianjin 300401)

Abstract: Using the seeds of *Zinnia elegans* Jacq. as the test materials, the growth and development of plants induced by space flight in SP1 generation were investigated with the methods of biostatistics and molecular marker. The results showed that after experiencing space flight, the germination rate of *Zinnia* decreased slightly, and the infection rate of the black spot of *Zinnia* increased. In the space flight groups, a stable clover symbiotic variant H1-2 was found. The leaf size of the variant H1-2 was obviously less than that of the wild plant. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis showed that compared with the control plants, the genomic variation rate of the variant H1-2 was 13.4%. The studies of the mutagenic effects of space flight on *Zinnia elegans* Jacq. provided an experimental basis for space mutation breeding of ornamental plants.

Keywords: space flight; *Zinnia elegans* Jacq.; phyllotaxy; RAPD