

实践八号卫星搭载 8 个苜蓿品种的生理特性与 RAPD 分析

韩微波¹, 杜连莹^{1,2}, 张月学¹, 唐凤兰¹, 刘杰淋¹, 刘凤歧¹

(1. 黑龙江省农业科学院 草业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨师范大学, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:为比较不同基因型苜蓿对空间环境响应的差异,探索空间环境诱变紫花苜蓿的特异性及育种前景,利用实践八号(SJ-8)返回式卫星搭载 8 个苜蓿品种,以未经搭载的种子作为对照,研究空间环境对苜蓿 SP₁ 代生理特性和 RAPD 标记谱带变化的影响。结果表明:经实践八号卫星搭载后,相比对照,8 个苜蓿品种的过氧化氢酶(POD)活性增强,超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,可溶性蛋白含量升高。RAPD 标记分析结果表明:实践八号卫星搭载引起了 8 个苜蓿品种 SP₁ 代 DNA 序列的变化。苜蓿品种 WL232、WL323HQ、BeZa87、Pleven6、龙牧 801、龙牧 803、肇东和草原 1 号的多态性频率分别为 18.06%、14.47%、7.04%、13.70%、15.00%、14.29%、19.23% 和 11.39%。肇东苜蓿多态性位点频率最高,为 19.23%,BeZa87 最低,为 7.04%。

关键词:实践八号;苜蓿;生理特性;RAPD

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)10-0101-03

空间环境主要包括了微重力、太空辐射等因素,被广泛用于农作物诱变育种。自 1987 年以来,杭州植物园利用返回式卫星、神舟飞船和高空气球先后进行了 23 次作物种子等生物材料的空间搭载试验,在水稻、小麦、棉花、青椒、番茄、芝麻和牧草等作物上育成和审定了 40 多个高产、优质和多抗的农作物新品种和许多的优良变异材料。2006 年,我国发射了第一颗育种专用卫星——实践八号,装载了包括 152 种植物、微生物和动物等 2 020 份生物品种材料,并搭载了空间环境探测与机理研究装置^[1-2]。

苜蓿是世界上种植面积最为广泛的豆科牧草,被誉为“牧草王后”,它产量高、品质好、适应性强,是现代牧草产业重点发展的牧草之一。许多研究者利用我国不同年份发射的返回式卫星搭载苜蓿,围绕农艺学^[3]、细胞学^[4-5]和基因组 DNA 变异^[6]开展了相关研究。该研究利用我国发射的实践八号育种专用卫星搭载了八个苜蓿品种,研究空间环境对苜蓿 SP₁ 生理特性的影响,用

RAPD 标记方法研究 SP₁ 基因组 DNA 损伤特性与变异,比较不同基因型苜蓿对空间环境响应的差异,探索空间环境诱变紫花苜蓿的特异性及育种前景。

1 材料与方法

1.1 材料

供试作物为 WL232、WL323HQ、BeZa87、Pleven6、龙牧 801、龙牧 803、肇东和草原 1 号 8 个苜蓿品种。其中 WL232 和 WL323HQ 是从美国引进的紫花苜蓿品种;BeZa87 是从俄罗斯引进的杂花苜蓿品种;Pleven6 是从保加利亚引进的紫花苜蓿品种;肇东苜蓿为黑龙江省紫花苜蓿地方品种;龙牧 801 和龙牧 803 是黑龙江省畜牧研究所育成的紫花苜蓿品种;草原 1 号是内蒙古农业大学育成的紫花苜蓿品种。

1.2 方法

1.2.1 种子处理 每个苜蓿品种随机挑选 3 000 粒种子,用白色棉布袋包装注明,搭载“实践八号”育种卫星(用 SP 表示),相同数量的同批种子作为地面对照(用 CK 表示)。2006 年 9 月 9 日 15 时,在酒泉卫星发射中心用长征二号丙运载火箭成功地将实践八号卫星送入近地点 187 km、远地点 463 km 的近地轨道,在轨运行 15 d 后,返回舱于 9 月 24 日上午 10:43 在四川遂宁成功返回^[2]。

1.2.2 生理指标测定 过氧化氢酶(POD)活性测定用愈创木酚比色法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定用氮蓝四唑(NBT)法;可溶性蛋白含量测

收稿日期:2011-04-20

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2009 BAA24B05);“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011 BAD17B04);国家航天育种工程地面育种资助项目(2009 HT20118);黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2010)

第一作者简介:韩微波(1979-),陕西省兴平市人,硕士,助理研究员,从事牧草辐射诱变育种研究。E-mail:alclever@163.com。

定采用考马斯亮蓝(G-250)法^[7-8]。

1.2.3 RAPD 分子标记方法 采用改进的 CTAB 法提取苜蓿基因组 DNA。

PCR 扩增反应体系 25 μL : 10 \times PCR 缓冲液(内含 Mg^{2+}); RAPD 引物 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; dNTPs 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Taq 酶 1.5 U; 模版 DNA 100 ng。PCR 扩增仪为 Biometra Tgradient。反应程序: (1) 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; (2) 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 45 个循环; (3) 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。共使用 36 个引物, 均购自宝生物工程(大连)有限公司, 每个引物重复试验 2 次。PCR 扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶恒功率电泳分离, 溴化乙锭染色后于紫外灯下观测并照相。

计算公式为多态性位点频率/% = 出现的多态性位点数/扩增出的总位点数 $\times 100$

表 1 实践八号卫星搭载后 8 个苜蓿品种 SP₁ POD、SOD 和可溶性蛋白值比较

处理	过氧化物酶 POD/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	超氧化物歧化酶 SOD/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	可溶性蛋白/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
WL232 CK	5.27×10^4	1.99×10^2	1.29×10^6
WL232 SP	5.69×10^4	1.84×10^2	1.39×10^6
WL323HQ CK	6.12×10^4	1.62×10^2	1.47×10^6
WL323HQ SP	6.70×10^4	1.57×10^2	1.56×10^6
BeZa87 CK	5.49×10^4	1.73×10^2	1.61×10^6
BeZa87 SP	5.69×10^4	1.53×10^2	1.86×10^6
Pleven6 CK	5.62×10^4	1.92×10^2	1.16×10^6
Pleven6 SP	6.14×10^4	1.79×10^2	1.32×10^6
Longmu 801 CK	5.49×10^4	1.69×10^2	1.35×10^6
Longmu 801 SP	5.58×10^4	1.58×10^2	1.58×10^6
Longmu 803 CK	5.03×10^4	1.76×10^2	1.35×10^6
Longmu 803 SP	5.48×10^4	1.69×10^2	1.40×10^6
Zhaodong CK	5.16×10^4	1.91×10^2	1.26×10^6
Zhaodong SP	5.48×10^4	1.84×10^2	1.43×10^6
CaoyuanNo. 1 CK	5.62×10^4	2.13×10^2	1.46×10^6
CaoyuanNo. 1 SP	5.77×10^4	1.86×10^2	1.57×10^6

7.75%、7.53%、6.12% 和 3.70%。

2.2 实践八号卫星搭载苜蓿 SP₁ 的 RAPD 分析

2.2.1 RAPD 多态性表现形式 经实践八号卫星搭载处理后, 8 个苜蓿品种的对照与 SP₁ 之间的 RAPD 多态性表现形式主要有 3 种: (1) 扩增片段数的增多(例如图 1OPF13, 1 和 A); (2) 扩增片段数的减少(例如图 1OPF13, 8 和 H); (3) 扩增出相同谱带, 但谱带强度有差异(例如图 1OPF13, 2 和 B)。不管是哪一种多态性表现形式, 都说明实践八号卫星搭载引起了 8 个苜蓿品种 SP₁ 基因组 DNA 的损伤, DNA 序列发生了较大变化。之前 SOD 和 POD 活性改变, 可溶性蛋白含量变化就是苜蓿遗传信息发生改变的证明。

2.2.2 RAPD 多态性的频率分析 该研究中使用 36 种随机引物对航天搭载的 8 个苜蓿品种及

2 结果与分析

2.1 实践八号卫星搭载苜蓿 SP₁ 生理特性分析

由表 1 可以看出, 经实践八号卫星搭载后, 8 个苜蓿品种的 POD 值均大于对照, POD 值增加幅度大小顺序为 WL323HQ > Pleven6 > 龙牧 803 > WL232 > 肇东 > BeZa87 > 草原 1 号 > 龙牧 801, 比对照分别增加了 9.48%、9.25%、8.95%、7.97%、6.20%、3.64%、2.67% 和 1.64%; SOD 值小于对照, SOD 活性降低的幅度大小顺序为草原 1 号 > BeZa87 > WL232 > Pleven6 > 龙牧 801 > 龙牧 803 > 肇东 > WL323HQ, 分别降低了 12.68%、11.56%、7.54%、6.77%、6.51%、3.98%、3.66% 和 3.09%。可溶性蛋白值均大于对照, 可溶性蛋白含量增加的顺序为龙牧 801 > BeZa87 > Pleven6 > 肇东 > WL232 > 草原 1 号 > WL323HQ > 龙牧 803, 分别增加了 17.04%、15.53%、13.79%、13.49%、

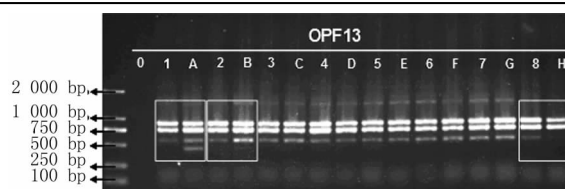


图 1 RAPD 引物 OPF13 扩增产物

M: DNA maker; 0: RAPD control without DNA; 1: WL232 CK; 2: WL323HQ CK; 3: BeZa87 CK; 4: Pleven6 CK; 5: 龙牧 801 CK; 6: 龙牧 803 CK; 7: 肇东 CK; 8: 草原 1 号 CK; A: WL232 SP; B: WL323HQ SP; C: BeZa87 SP; D: Pleven6 SP; E: 龙牧 801 SP; F: 龙牧 803 SP; G: 肇东 SP; H: 草原 1 号

相应未搭载的对照基因组 DNA 进行随机扩增, 其中 21 种随机引物扩增得到带型清晰、重复性好的多态性条带(见图 2), 占全部引物的 58.33%。

经实践八号卫星搭载处理后, 8 个苜蓿品种的 RAPD 多态性频率的大小顺序为肇东 >

WL232>龙牧 801>WL323HQ>龙牧 803>Pleven6>草原 1 号>BeZa87,多态性频率分别为 19.23%、18.06%、15.00%、14.47%、14.29%、13.70%、11.39%和 7.04%。

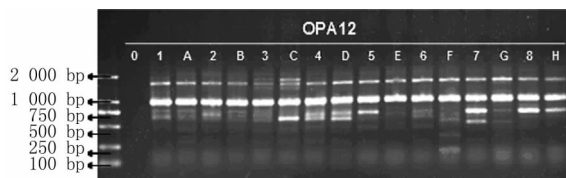


图 2 RAPD 引物 OPA12 扩增产物

M:DNA maker;0:RAPD control without DNA;1:WL232 CK;2:WL323HQ CK;3:BeZa87 CK;4:Pleven6 CK;5:龙牧 801 CK;6:龙牧 803 CK;7:肇东 CK;8:草原 1 号 CK;A:WL232 SP;B:WL323HQ SP;C:BeZa87 SP;D:Pleven6 SP;E:龙牧 801 SP;F:龙牧 803 SP;G:肇东 SP;H:草原 1 号

3 结论与讨论

研究表明,航天搭载后烟草过氧化物酶(POD)活性提高^[9],大青杨可溶性蛋白含量增高^[10],与该研究中的结果一致。同时也有研究报道,航天搭载后提高了烟草^[11]和番茄^[2]的过氧化物酶(SOD)活性,与该研究中的结果相反。推测原因在于:航天搭载的作物种类不一样,对空间环境的诱变反应不一致;种子搭载的航天器发射时间、轨道高度和在太空中停留时间等参数不一致,这都有可能引起试验结果的不一致。

DNA 是遗传信息的载体,DNA 的损伤直接涉及到生物体的遗传变异。王蜜等^[6]利用 RAPD 方法证明经卫星搭载后,部分紫花苜蓿的遗传位点发生较大改变。张月学等^[13]利用 RAPD 方法

发现零磁空间处理的紫花苜蓿突变体和亲本之间存在差异。该研究中利用 RAPD 分子标记方法研究表明,实践八号卫星搭载引起了 8 个苜蓿品种 SP₁基因组 DNA 的损伤,DNA 序列发生了变化。这表明利用 RAPD 方法研究诱变对植物 DNA 的损伤是有效的。

参考文献:

- [1] 刘录祥,郭会君,赵林妹,等.我国作物航天育种 20 a 的基本成就与展望[J].核农学报,2007,21(6):589-592.
- [2] 吕兑财,黄增信,赵亚丽,等.实践八号育种卫星搭载植物种子的空间辐射剂量分析[J].核农学报,2008,22(1):5-8.
- [3] 张月学,刘杰淋,韩微波,等.空间环境对紫花苜蓿的生物学效应[J].核农学报,2009,23(2):266-269.
- [4] 杜连莹,韩微波,张月学,等.实践八号搭载 8 个苜蓿品种细胞学效应研究[J].草业科学,2009,26(12):46-49.
- [5] 任卫波,徐柱,陈立波,等.紫花苜蓿种子卫星搭载后其根尖细胞的生物学效应[J].核农学报,2008,22(5):566-568.
- [6] 王蜜,魏建民,郭慧琴,等.紫花苜蓿空间诱变突变体筛选及其 RAPD 多态性分析(简报)[J].草地学报,2009,17(6):841-844.
- [7] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [8] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2004.
- [9] 贺鹏.航天诱变烤烟品种的发芽特性及酶活性变化研究[D].长沙:湖南农业大学,2008.
- [10] 宋兴舜,吴迪,刘雪梅,等.大青杨航天诱变植株早期抗氧化酶生化指标测定[J].林业科学,2009,45(7):145-149.
- [11] 贺鹏,朱列书,钟波.航天诱变对烤烟大田期 SOD 活性的影响[J].中国农学通报,2008,24(7):123-125.
- [12] 吴岳轩,曾富华.空间飞行对番茄种子活力及其活性氧代谢的影响[J].园艺学报,1998,25(2):165-169.
- [13] 张月学,唐凤兰,张弘强,等.零磁空间处理选育紫花苜蓿品种农薯 1 号[J].核农学报,2007,21(1):34-37.

Physiological Characteristic and RAPD Analysis of Alfalfa Carried by SJ-8 Recoverable Satellite

HAN Wei-bo¹, DU Lian-ying², ZHANG Yue-xue¹, TANG Feng-lan¹, LIU Jie-lin¹, LIU Feng-qi¹

(1. Forage and Grassland Sciences Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: In order to compare the difference of induced response of different gene-type alfalfa, explore space environment on induction characteristic and breeding prospect, the effects of space environment on physiological characteristics and change of RAPD marker were studied. The eight alfalfa cultivars, WL232, WL323HQ, BeZa87, Pleven6, Longmu 801, Longmu 803, Zhaodong and Caoyuan No. 1 were loaded, and seeds not carried by satellite were as control. The results showed that POD and soluble protein were higher than control, SOD was lower than control. 36 primers were used in RAPD analysis, the polymorphic loci rate of WL232, WL323HQ, BeZa87, Pleven6, Longmu 801, Longmu 803, Zhaodong and Caoyuan No. 1 were 18.06%, 14.47%, 7.04%, 13.70%, 15.00%, 14.29%, 19.23% and 11.39%. The polymorphic loci rate of Zhaodong was the highest and BeZa87 was the lowest among eight cultivars.

Key words: SJ-8; alfalfa; physiological characteristic; RAPD