空间环境对月季组培苗生物学特性的影响*

薛 淮 刘 敏** 鹿金颖 潘 毅 张纯花
中国科学院遗传与发育生物学研究所，北京 100101

摘要 以神舟四号飞船搭载的月季组培苗为材料，研究了空间环境对月季组培苗形态学、细胞学、生理学及分子生物学特性的影响. 研究结果表明，空间处理的月季组培苗株高、叶片数及植株鲜重均显著大于地面对照. 和地面对照相比，空间处理的月季组培苗细胞超微结构发生较大变化，部分细胞出现了细胞壁变形，叶绿体增大，部分叶绿体片层结构扭曲模糊，大多数叶绿体中淀粉粒明显增加，叶绿素含量基本不变；线粒体数目增多，偶见内嵴消失及外膜破裂的现象. 空间处理后月季组培苗叶片中超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶3种保护酶的活性均有增加，丙二醛的含量下降. 用40个随机引物对空间处理和地面对照叶片DNA进行RAPD检测，共扩增出148条带，其中5个引物表现多态性，变异程度为6.34%.

关键词 空间环境 月季 组培苗 生物学特性

我国自1987年以来，已多次利用高空气球、返回式卫星和飞船搭载植物种子[1—8]，但对植物组培苗进行搭载，研究空间条件对植物组培苗生长的影响还未见报道. 本实验利用我国自行研制的神舟四号飞船首次搭载了月季组培苗，通过对其形态学、细胞学、生理学及分子生物学等方面的观察与检测，并与地面对照植株进行比较，揭示了空间环境对月季组培苗生物学特性的影响，为今后在封闭环境下进一步搭载、培养和种植绿色植物的研究提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 将一瓶株高和生长势一致的月季组培苗在无菌条件下转至两个50 mL的离心管中，每个离心管中有5株组培苗. 2002年12月30日将一管月季组培苗在我国自行发射的神舟四号飞船进行搭载，另一管作为地面对照放在组培室内，模拟飞船搭载条件采用悬挂式培养，光照和温度指标与飞船里一致. 神舟四号飞船绕地球108圈，162 h，于2003年1月5日返回地面开舱取出试验材料.

1.1.2 飞船搭载条件 飞行高度为：近地点200 km，远地点351 km；温度为22℃. 每天累计辐射剂量为0.095—0.197 mGy；微重力为10^{-3}—10^{-6} g.

1.1.3 培养基 离心管中培养基采用保水抗振培养基. 培养基配方为：MS + 6-苄氨基嘌呤1 mg·L^{-1} + 萘乙酸0.1 mg·L^{-1}，琼脂6.0 g·L^{-1}，pH 6.2.

1.2 实验方法

1.2.1 形态学指标测定 测定空间处理和地面对照单株月季组培苗的株高、叶片数(以小叶数统计)、鲜重.

1.2.2 叶绿素含量测定 取空间处理和地面对照

2004-05-09收稿，2004-08-05收修改稿
* 国家航天“八六三”计划资助项目(批准号：2002AA744063)
** 通讯作者，E-mail：mliu@genetics.ac.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

月季组培苗叶片，自上往下依次单株取样，丙酮法提取叶绿素，用岛津UV-120分光光度计于663和645 nm下比色测定，根据公式计算叶绿素含量，叶绿素a：$C_a = 12.7D_{663} - 2.69D_{645}$，叶绿素b：$C_b = 22.9D_{645} - 4.68D_{663}$，叶绿素总量：$C_t = C_a + C_b = 20.2\ D_{645} + 8.02\ D_{663}$.

1.2.3 细胞超微结构观察 取空间处理和地面对照每株月季组培苗展开叶片自上往下相同部位1—2 mm^2固定，经脱水、渗透、包埋、切片、染色，最后在JEOL 100CX的透射电子显微镜下观察与照相.

1.2.4 酶活性及丙二醛含量测定 分别取空间处理和地面对照月季组培苗叶片两个混合样，超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)及过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量测定参照文献[9].

1.2.5 随机扩增多态性DNA(RAPD)分子标记检测 叶片DNA提取为CTAB法[10]，并加以改进. 引物序列如表1所示. RAPD反应在TGRADIENT Whatman Biometra PCR仪上进行. RAPD反应采用25 μL扩增体系，包括DNA(20 ng/μL) 5 μL，10×PCR缓冲液2.5 μL，Mg^{2+}(2.5 mmol/L) 2 μL，dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μL，引物(10 ng/μL) 3 μL，*Taq*DNA聚合酶(5 U/μL) 0.24 μL，H_2O 11.76 μL. 扩增程序为：94℃预变性2 min，后接40个循环，包括94℃变性1 min，37℃退火2 min，72℃延伸2 min，循环结束后，72℃继续延伸10 min. 扩增产物在2.0%琼脂糖凝胶电泳上分离，溴化乙锭(EB)染色. 在凝胶成像系统下扫描成像.

表1 RAPD引物及其序列

引物	序列(5′-3′)	引物	序列(5′-3′)	引物	序列(5′-3′)	引物	序列(5′-3′)
S1	GTTTCGCTCC	S11	GTAGACCCGT	S21	CAGGCCCTTC	S31	CAATCGCCGT
S2	TGATCCCTGG	S12	CCTTGACGCA	S22	TGCCGAGCTG	S32	TCGGCGATAG
S3	CATCCCCCTG	S13	TTCCCCCGCT	S23	AGTCAGCCAC	S33	CAGCACCCAC
S4	GGACTGGAGT	S14	TCCGCTCTGG	S24	AATCGGGCTG	S34	TCTGTGCTGG
S5	TGCGCCCTTC	S15	GGAGGGTGTT	S25	AGGGGTCTTG	S35	TTCCGAACCC
S6	TGCTCTGCCC	S16	TTTGCCCGGA	S26	GGTCCCTGAC	S36	AGCCAGCGAA
S7	GGTGACGCAG	S17	AGGGAACGAG	S27	GAAACGGGTG	S37	GACCGCTTGT
S8	GTCCACACGG	S18	CCACAGCAGT	S28	GTGACGTAGG	S38	AGGTGACCGT
S9	TGGGGGACTC	S19	ACCCCCGAAG	S29	GGGTAACGCC	S39	CAAACGRCGG
S10	CTGCTGGGAC	S20	GGACCCTTAC	S30	GTGATCGCAG	S40	GTTGCGATCC

2 结果与分析

2.1 空间环境对月季生长的影响

经空间处理后月季组培苗的株高、叶片数、植株鲜重等均比地面对照显著增加(表2). 空间处理的月季组培苗个体间生长情况差异较大，部分植株与地面对照生长情况相近，只略有增加，部分植株则比地面对照植株有明显的增长(见图1).

图1 地面对照(左)和空间处理(右)月季组培苗生长情况

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 空间环境对月季组培苗生长的影响

处 理	株 高 /cm	单株叶片数	单株鲜重 /g
地面对照	3.89±0.06	23±1.5	0.61±0.04
空间处理	4.69±0.45[a)]	27±3.1[a)]	0.80±0.16[a)]

a) 表示与地面对照相比差异显著($p\leqslant0.05$),$n=5$,叶片数以小叶为计算单位

2.2 空间环境对月季叶绿素含量的影响

空间处理的月季与地面对照相比，叶绿素a含量略有下降，叶绿素b含量有少许增加，叶绿素总量有所增加，但均未达到显著水平(表3).

表3 空间环境对月季叶绿素含量的影响($mg\cdot g^{-1}$)[a)]

处 理	叶绿素a	叶绿素b	叶绿素总量
地面对照	3.298±0.002	1.700±0.001	4.998±0.002
空间处理	3.291±0.031	1.727±0.043	5.018±0.047

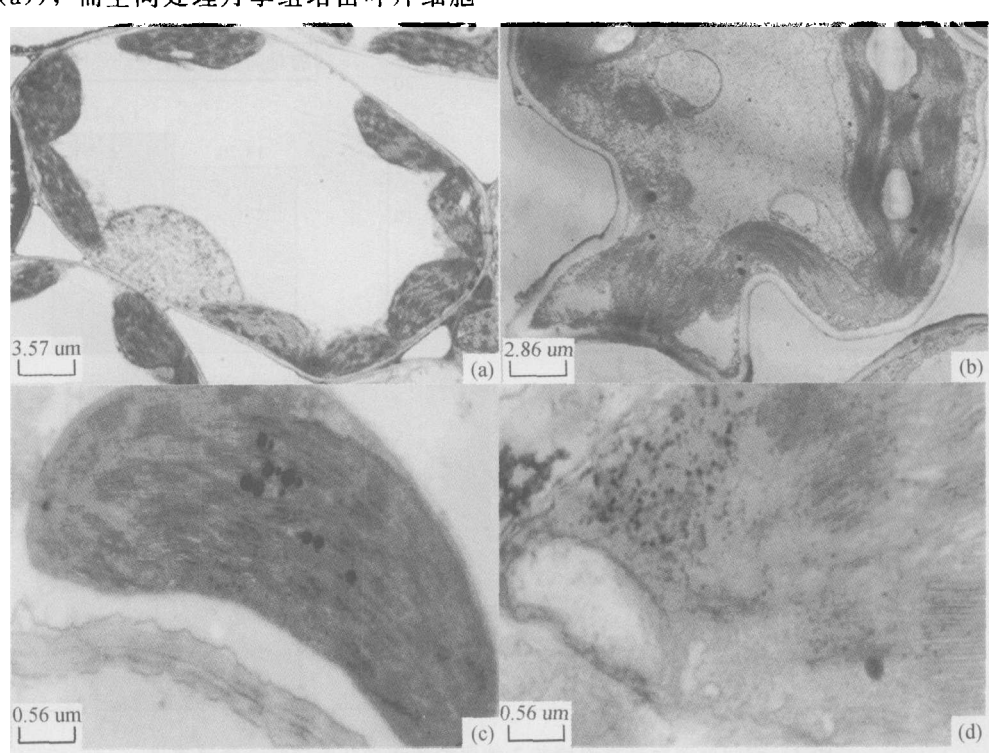
a) $n=5$

2.3 空间环境对月季叶片细胞超微结构的影响

细胞超微结构的观察发现，空间环境对月季叶片细胞超微结构产生了较大影响. 地面对照月季组培苗叶片细胞之间结合紧密，整体呈规则的球型或椭圆型(图2(a))，而空间处理月季组培苗叶片细胞结合疏松，部分细胞出现了细胞壁扭曲、收缩变形的现象(图2(b)). 地面对照细胞的叶绿体片层结构规则，层次清晰，堆叠紧密，淀粉粒较少(图2(c)). 经空间处理后，叶绿体体积普遍增大，部分叶绿体形状变得不规则，基质片层结构扭曲、模糊(图2(d)). 大部分叶绿体中淀粉粒明显增多(图2(g)). 地面对照的线粒体结构严整，嵴明显且排列规则(图2(e)). 空间处理后部分细胞线粒体数目增多，个别线粒体内嵴模糊不清和外膜破裂；细胞间区域分布的胞间连丝变得丰富，有的很粗大，其附近常聚集很多线粒体；空间处理后，部分细胞质中内质网数量增多，一些内质网体积增大(图2(f)).

2.4 空间环境对月季保护酶活性及丙二醛含量的影响

与地面对照相比，空间处理的月季组培苗叶片的SOD，CAT及POD 3种保护酶活性均有所增加，其中SOD活性增加了7.0%；POD活性增加了9.5%；CAT活性提高了18.5%，经方差分析，均达到了显著水平. 空间处理月季的丙二醛(MDA)含量比地面对照下降了8.9%，达到了极显著水平(图3).



?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

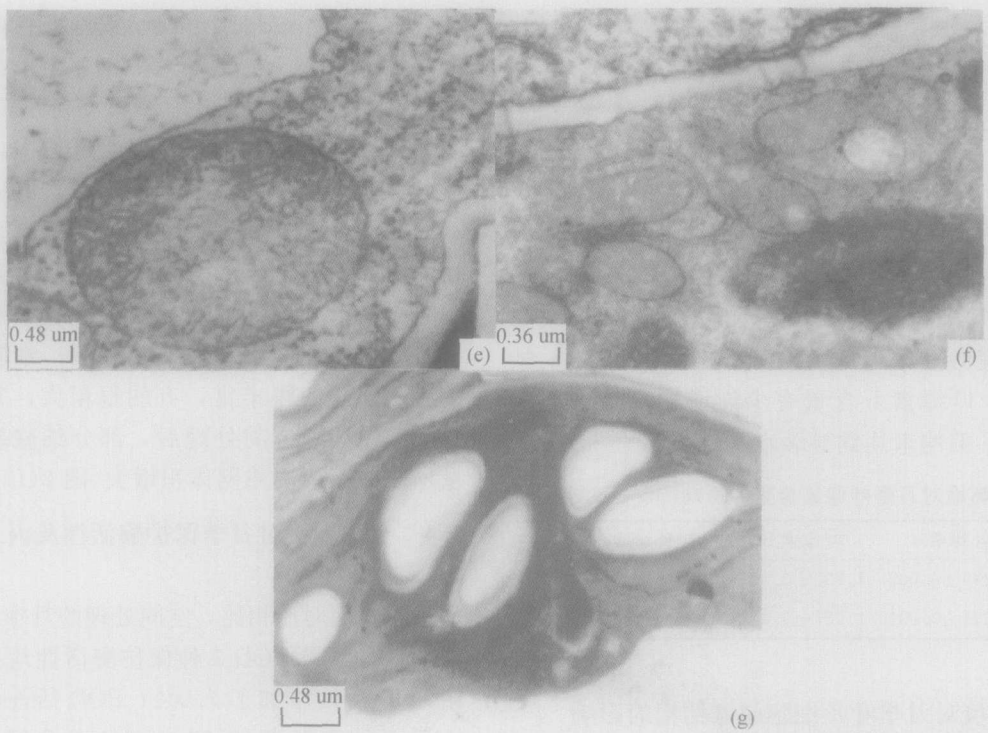


图2 空间环境对月季组培苗叶片细胞超微结构的影响

(a) 地面对照月季整体细胞形状；(b) 空间处理月季整体细胞形状；(c) 地面对照月季细胞叶绿体结构；(d) 空间处理月季细胞叶绿体结构；(e) 地面对照月季细胞线粒体结构；(f) 空间处理月季细胞线粒体及胞间连丝结构；(g) 空间处理后月季细胞叶绿体中淀粉粒明显增多

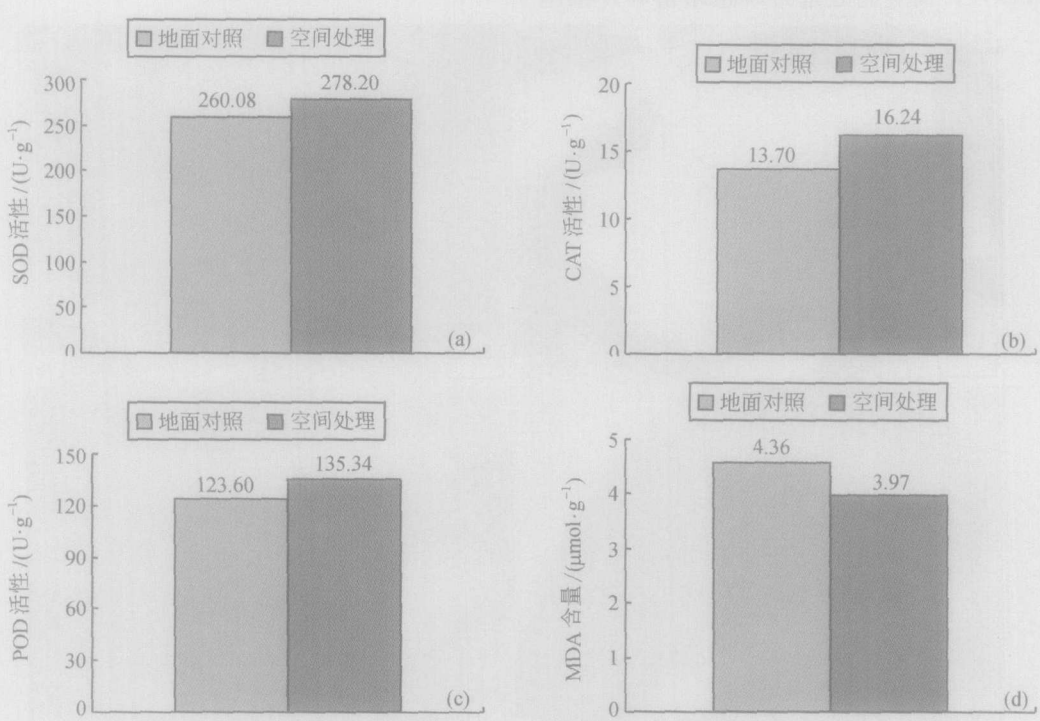


图3 空间处理后月季组培苗3种保护酶活性及丙二醛含量的变化

(a) SOD；(b) CAT；(c) POD；(d) 丙二醛

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5 RAPD分子检测

用40个随机引物对空间处理和地面对照的月季组培苗基因组DNA进行PCR扩增，有36个引物扩增出了DNA片段，共扩增出148条带，每个引物扩增出的带在1—10条之间，其中31个引物的扩增DNA带带型一致，5个引物在地面对照和空间处理扩增出的DNA带带型表现多态性，5个多态性引物分别为S7，S12，S27，S32，S40. 由图4可见，与地面对照相比，空间处理的月季组培苗样品在引物S7扩增的带型中缺少了1条600 bp的带，多了1条1050 bp的带；在引物S12扩增的带型中多了1条510 bp的带；在引物S27扩增的带型中多了1条1280 bp的带；在引物S32扩增的带型中缺少了1条610 bp的带，多了1条1150 bp的带；在引物40扩增的带型中缺少了1条990 bp的带，多了两条带，其大小分别为560 bp和920 bp. 由此可见空间处理的月季组培苗和地面对照相比有9条带出现了差异，地面对照共扩增出142条带，空间处理月季组培苗的DNA变异频率(空间处理样品出现变异的带数/地面对照所扩增的总带数)为6.34%.

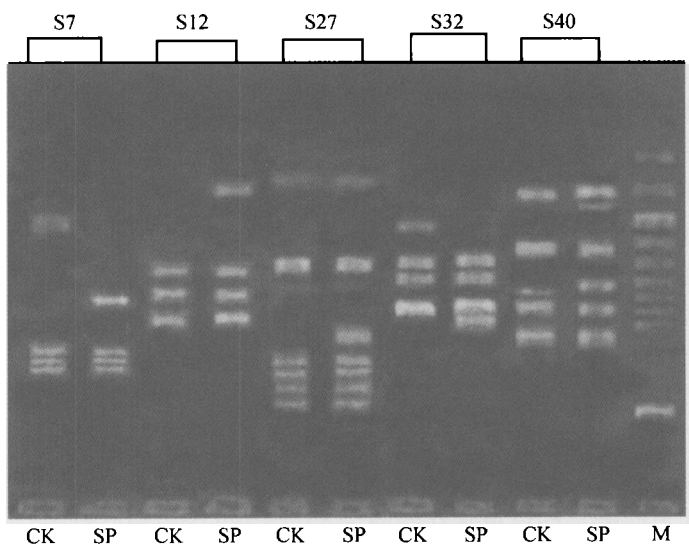


图4 空间处理与地面对照月季RAPD分子标记扩增结果

CK，地面对照；SP，空间处理；M，DNA标记；S7，S12，S27，S32，S40为随机引物

3 结论

空间环境中的微重力、宇宙射线、宇宙磁场等条件对于地球上正常生长的植物来说是逆境胁迫条件. 这种逆境引起月季组培苗叶片保护酶活性的提高，膜质过氧化产物丙二醛含量的降低；叶片细胞超微结构也发生很大的变化，如部分细胞细胞壁扭曲、叶绿体片层结构排列松散、个别线粒体嵴模糊且膜破裂等. 这些变化与有些植物在逆境胁迫下的反应是一致的. 在正常情况下，植物体内活性氧产生与清除处于平衡状态，SOD，CAT和POD作为氧自由基的清除剂，三者协调一致，使植物自由基维持在一个低水平上，从而防止自由基对植物细胞的伤害. 在干旱、盐、低温等逆境胁迫条件下，植物体内活性氧代谢系统的平衡受到影响，增加了自由基的产生量，植物体通过保护酶活性或稳定性的增加提高清除自由基的能力[11—13]. 植物在干旱、盐、低温、高温等逆境胁迫条件下，引起叶绿体和线粒体超微结构的显著变化[14—17]. 植物在微重力状态下，细胞形状、细胞壁、液泡、淀粉粒、叶绿体、线粒体等细胞器、以及细胞骨架的微管系统等均发生了变化[18].

我们对神舟四号飞船上搭载的月季组培苗样品的DNA进行了RAPD分析，结果显示，5条引物在空间处理与地面对照月季组培苗之间所扩增的条带数存在差异，出现了DNA多态性，这可能与空

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间射线、宇宙磁场、重粒子等环境因素对其DNA复制的影响有关，这与一些文献所报道的空间环境对植物遗传物质的影响相同[19]. 如“中蔬4号”番茄种子经卫星搭载回收后，选育出的抗病高产突变体和对照相比进行了RAPD分析，研究结果表明二者在DNA水平上发生了变异[20]. Halstead等研究发现空间环境条件可导致植物体基因组水平的变化甚至损伤植物染色体，并推测这可能是空间环境损伤生物细胞的一种共同机制[21]. 又如刘敏等对卫星搭载后育成的甜椒87-2与对照进行RAPD分子检测，从42个随机引物中筛选到了4个在扩增物上有差异的引物，表明太空椒87-2的遗传物质发生了变化[22].

由于空间环境条件极其复杂，物理因素很多，究竟哪些因素起主导作用难以确定. 由于飞船舱体和装载植物容器的屏蔽作用，在太空环境中微重力、超真空等因子的作用是否大于宇宙射线，且飞船发射时强振动等已知的及很多未知的因素是否可能会对植物产生各种影响，现都无法确定. 本实验初步探讨了空间环境对活体植物生物学特性的影响，但限于空间试验的特殊性和试验空间的限制，许多研究还需重复验证，尤其是对其变化机理还有待于继续深入探索. 但本研究已经证明我国自行研制的神舟四号飞船已基本上能满足绿色植物在空间封闭环境中生长的要求.

参 考 文 献

1 郭亚华，邓立平，张军民，等. 空间条件对番茄诱变遗传的影响. 空间科学学报，1996，16(增刊)：162—163

2 吴岳轩，曾高华. 空间飞行对番茄种子活力及其活性氧代谢的影响. 园艺学报，1998，25(2)：165—169

3 储钟稀，钱晓燕. 空间条件对黄瓜种子萌发及植株生长发育的影响. 中国微重力科学与空间实验首届学术讨论会论文集. 北京：中国科学技术出版社，1987，201—205

4 李忠娴，谢建坤，张思文，等. 卫星搭载小麦主要性状的遗传变异研究. 空间科学学报，1996，16(增刊)：114—119

5 邱 芳，李金国，翁曼丽，等. 空间诱变绿豆长荚型突变系的分子生物学分析. 中国农业科学，1998，31(6)：38—43

6 金文林，李桂英，施巾帼，等. 空间环境诱导的红小豆高世代性状变异及选择策略. 核农学报，2003，17(2)：95—100

7 李社荣，刘雅楠，刘 敏，等. 玉米空间诱变效应及其应用的研究. 核农学报，1998，(5)：274—280

8 樊秋玲，刘 敏. 空间育种研究进展. 航天医学与医学工程，2002，15(3)：231—234

9 陈建勋，王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州：华南理工大学出版社，2002，199—121，124

10 Paterson A, Brubaker C, Wendel J. A rapid method for extraction of (*Gossypium spp*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 122—127

11 孙国荣，彭永臻，严秀峰，等. 干旱胁迫对白桦实生苗保护酶活性及质脂过氧化作用的影响. 林业科学，2003，39(1)：165—167

12 李绍庆. 低温胁迫下红厚壳幼苗保护酶活性及丙二醛含量的变化. 思茅师范专科学院学报，2002，17(3)：84—85，89

13 张士功，高吉寅，宋景芝，等. 甜菜碱对NaCl胁迫下小麦细胞保护酶活性的影响. 植物学通报，1999，16(4)：429—432

14 陈立松，刘星辉. 水分胁迫对荔枝叶片超微结构的影响. 福建农业大学学报，2001，30(2)：171—174

15 刘爱峰，赵檀芳，段友臣. 盐胁迫对大麦叶片细胞超微结构影响的研究. 大麦科学，2000，(3)：20—22

16 杨凤仙，董俊梅，杨晓霞，等. 低温胁迫下棉叶叶绿体、液胞超微结构的变化. 山西农业大学学报，2001，(2)：116—117

17 苗 琛，利荣千，王建波. 甘蓝热胁迫叶片细胞的超微结构研究. 植物学报，1994，36(9)：730—732

18 刘 敏，薛 淮，王亚林，等. 水平回转对马铃薯细胞超微结构的影响. 细胞生物学杂志，2002，24(6)：365—367

19 Dutcher F R, Hess E L, Halstead T W. Progress in plant research in space. Adv Space Res, 1994, 14: 159—171

20 韩 东，李金国，梁红健，等. 利用RAPD分子标记检测空间飞行诱导的番茄DNA突变. 航天医学与医学工程，1996，9(6)：412—416

21 Halstead T W, Dutcher F R. Plants in space. Annual Review of Plant Physiology, 1987, (38): 317—345

22 刘 敏，李金国，王亚林，等. 卫星搭载的甜椒87－2过氧化物酶检测及RAPD分子标记检测初报. 核农学报，1999，13(5)：291—294

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net