

文章编号: 100F 1498(2004) 03 0310 06

空间环境对草地早熟禾叶片解剖结构 及同工酶酶谱的影响

韩 蕾¹, 孙振元^{1*}, 郭 燕², 佟一超³, 李银凤¹, 彭镇华¹

(1. 中国林业科学研究院生物技术室, 北京 100091; 2. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070;
3. 北京飞鹰绿色食品有限公司, 北京 100045)

摘要: 将“神舟”三号(SZ 3)飞船搭载的草地早熟禾品种纳苏干种子地面种植后, 根据形态变化进行初步筛选, 并通过分株扩繁出突变株系 PM₁、PM₂ 和 PM₃。对这三个草地早熟禾突变株系的叶片解剖结构及过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶进行观察。结果表明, 与对照(CK)相比, 三个变异株系由于细胞数目的增加使叶片宽度明显增加; 叶肉细胞平均直径降低使叶片厚度减少; PM₂、PM₃ 株系叶片泡状细胞的增多, 改变了叶片的形态。过氧化物酶同工酶谱带 CK 有 11 条, 迁移率为 4.63% ~ 47.22%; PM₁ 有 21 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 68.52%; PM₂ 有 18 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 67.59%; PM₃ 有 20 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 63.89%。酯酶同工酶谱带 CK 有 3 条, 迁移率为 59.74% ~ 94.81%; PM₁ 有 8 条谱带, 迁移率为 38.96% ~ 94.81%; PM₂ 有 7 条谱带, 迁移率为 48.05% ~ 94.81%; PM₃ 有 8 条谱带, 迁移率为 49.35% ~ 94.81%。PM₁、PM₂ 和 PM₃ 三个株系与 CK 含有一部分完全相同的谱带, 另一部分谱带发生了较大变化: 分别出现了 CK 中没有的谱带和在 CK 中存在而三个变异株系没有的谱带。同时各谱带的强弱也发生了不同程度的变化。

关键词: 空间环境; “神舟”三号搭载; 草地早熟禾; 解剖结构; 同工酶

中图分类号: S731.2 文献标识码: A

航天技术和太空搭载实验开辟了生物育种的新途径。在空间高真空、微重力、强辐射和超洁净的条件下, 生物生理生化和遗传特性都会发生不同程度的变化^[1]。中国的空间诱变育种工作居于世界领先地位, 目前已经先后将 500 多种植物材料送入太空^[2], 但是在草坪植物中尚未见报道。研究空间诱变育种, 培育优质抗逆草坪植物新品种, 对于城市绿化和改良西部恶劣的生态环境具有积极意义。本研究利用“神舟”三号(SZ 3)飞船搭载草地早熟禾(*Poa pratensis*)品种纳苏(Nassau)干种子, 地面种植后, 筛选出了突变株系。通过对其植株叶片解剖结构的变化观察, 比较过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶的变化, 力图解释空间诱变机理。

1 材料与方方法

1.1 材料

利用“神舟”三号(SZ 3)飞船搭载草地早熟禾栽培品种纳苏干种子, 空间飞行时间为 162 h

收稿日期: 2003 08 22

基金项目: 优质抗逆草坪草早熟禾新品种选育(国家 863 计划, 2002AA241061)

作者简介: 韩蕾(1972—), 黑龙江依兰县人, 助理研究员。

* * 本文通讯作者, E-mail: Sunzy@caf.ac.cn, 010 62889626

(2002 年 3 月 25 日至 2002 年 4 月 1 日), 未搭载种子作为对照。纳苏干种子植于中国林科院实验温室。

1.2 方法

将草炭与珍珠岩按 3:1 比例混匀, 装入直径为 10 cm 的营养钵中。每钵播种 1 粒, 出苗后每隔 10 d 随灌水定量施入有机肥。对照共播种 3 470 粒, 成苗 2 487 株; 处理共播种 1 734 粒, 成苗 1 293 株。通过形态观察筛选出与对照明显不同的 3 个变异植株。第 1 株生长快速, 叶片明显增宽, 分蘖增多 (PM_1); 第 2 株叶片皱缩扭曲, 叶色浓绿, 矮化, 且分蘖数较多 (PM_2); 第 3 株为一株嵌合体突变, 从植株基部萌出三个具有绿色和白色相间条纹叶片的分蘖 (PM_3)。将上述三个变异植株通过分株繁殖成为株系后进行研究。

1.2.1 叶片解剖观察 分别取 3 个变异植株的第 1 片展开叶, 在距叶尖三分之一处横切成小段, 长约 4 mm。将切段浸入 FAA 固定液 24 h 后, 参照《生物学显微技术》^[3] 中石蜡切片的制作方法将材料制成永久制片, 在 LEICA100 显微镜下观察摄影, 并利用纤维长度测定仪(日本赠送)测量各变异株系叶片宽、叶片厚、表皮细胞平均直径及叶肉细胞平均直径。

1.2.2 过氧化物酶同工酶分析 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分析过氧化物酶同工酶^[4]。取新鲜叶片 0.5~1.0 g, 在稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液 5 mL 冰浴中研磨匀浆, 于 12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 冰冻离心 15 min, 取上清液后按 1:1 加入 40% 蔗糖混合上槽, 每槽点样量为 50 μL 。用北京六一仪器厂生产的 DDDY-II4 型稳压电泳仪, 垂直胶规格为 10 cm \times 13 cm, 胶厚 1.5 mm, 采用不连续系统电泳, 分离胶浓度 70 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 浓缩胶浓度 3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 缓冲液用 1 mol Tris-HCl 系统, pH 值为 8.8(分离胶)和 6.8(浓缩胶)。电极缓冲液用 Tris-Gly 系统, pH 值 8.3。开始电流为每槽 0.8 mA, 指示剂进入分离胶后把电流加大到每槽 1.2 mA, 整个电泳历时 4~5 h, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行。最后采用联苯胺试剂进行染色, 待出现清晰谱带后及时照相, 测定各谱带位置并计算迁移率 (R_f)。

1.2.3 酯酶同工酶分析 电泳方法同过氧化物酶同工酶^[4], 染色采用 α 、 β -醋酸萘酯试剂, 待出现清晰谱带后及时照相, 测量各谱带位置并计算迁移率 (R_f)。

2 结果与分析

2.1 各变异植株叶片形态及解剖结构

空间环境对草地早熟禾叶片形态及解剖结构的影响较大。图 1 分别为 CK 及 PM_1 、 PM_2 、 PM_3 叶片横切面, 与 CK 相比, PM_1 、 PM_2 、 PM_3 叶片都明显增宽, PM_2 和 PM_3 的叶片呈皱缩状态。图 2 分别为 CK 及 PM_1 、 PM_2 、 PM_3 主脉与细脉横切面。CK 叶片仅在主脉处有泡状细胞, 而 PM_2 和 PM_3 的叶片在主脉和细脉处均有异常增大的表皮细胞, 即泡状细胞存在。泡状细胞是禾本科植物叶片上表皮所具有的一种特殊结

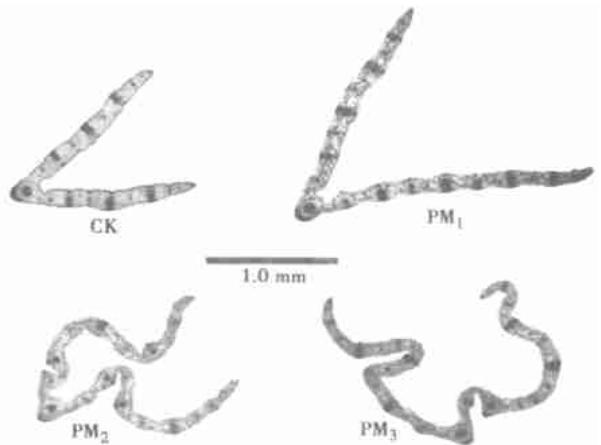


图 1 飞船搭载后草地早熟禾叶片形态变化

构,是这类植物最大的旱生特性。当水分供应不足时,泡状细胞首先失水收缩,使叶片卷曲成筒状以减少蒸腾作用;当有水分供应时,细胞充气,使叶片展平,故泡状细胞又称为运动细胞。研究认为,泡状细胞参与叶片的内卷和折叠运动,与叶片展开角度密切相关^[5,6]。

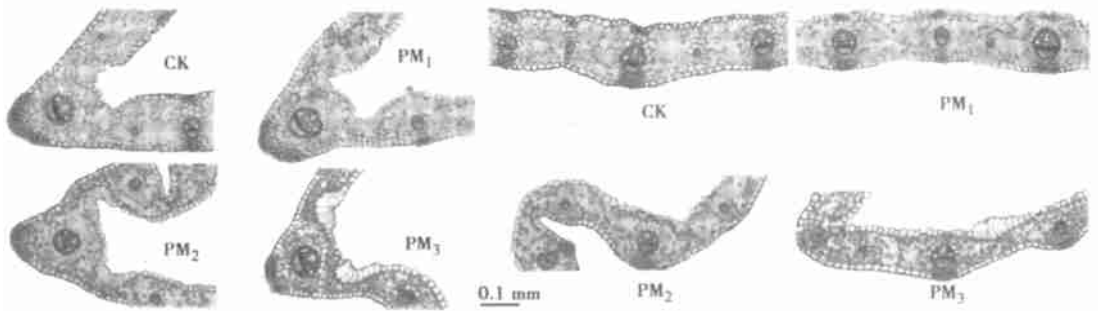


图2 飞船搭载后草地早熟禾叶片解剖结构变化

与CK相比,PM₂和PM₃叶片明显增宽;叶片厚度减少;叶肉细胞和表皮细胞的平均直径均明显减少。PM₁植株叶片明显增宽,厚度比CK的薄,叶肉细胞的平均直径减少,但是表皮细胞的平均直径与CK差异不显著(表1)。PM₁、PM₂和PM₃植株叶片宽度增加主要是由于细胞数目的增加;叶片厚度降低的原因之一是叶肉细胞变小。

表1 飞船搭载后草地早熟禾叶片形态结构变化

观测项目	CK	PM ₁	PM ₂	PM ₃
叶片宽/mm	7.101	9.029	10.873	10.656
叶片厚/mm	0.267	0.226	0.173	0.179
表皮细胞平均直径/ μm	15.05	15.13	11.27	12.38
叶肉细胞平均直径/ μm	15.12	12.65	12.40	12.16

2.2 各变异植株过氧化物酶同工酶变化

过氧化物酶是常见的氧化酶,广泛分布于植物的各器官组织中,与体内许多生理代谢过程有关。从图3看出,经过空间搭载后草地早熟禾的过氧化物酶同工酶谱带变化较大,谱带分布不同,且有强弱变化。

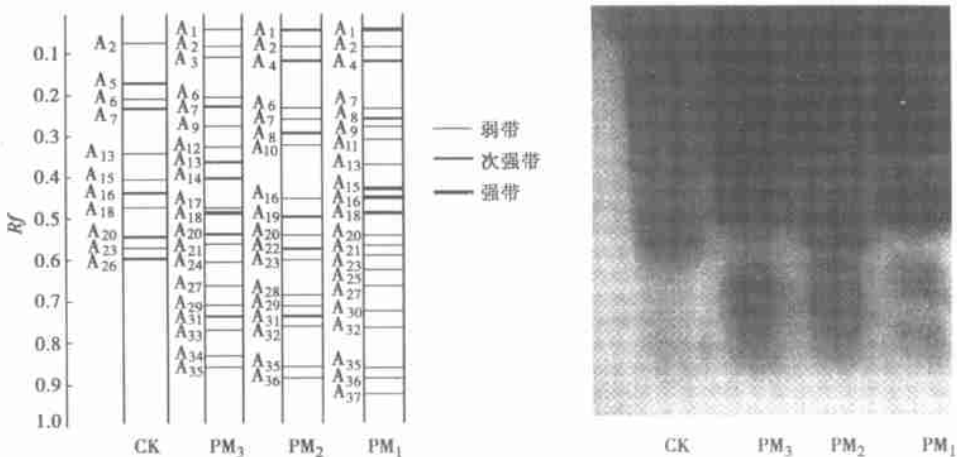


图3 飞船搭载后草地早熟禾过氧化物酶同工酶变化

从图 3 看出 CK 有 11 条谱带, 迁移率为 4.63% ~ 47.22%; PM₁ 有 21 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 68.52%; PM₂ 有 18 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 67.59%; PM₃ 有 20 条谱带, 迁移率为 2.78% ~ 63.89%。A₂、A₇ 和 A₂₀ 3 条谱带是 CK 和处理所共有的, 其中 A₂ 在 CK 和三个突变株系中均为弱谱带; CK 和 PM₃ 中的 A₇ 为次强带, 而 PM₁ 和 PM₂ 中的 A₇ 为弱带; CK 和 PM₃ 中的 A₂₀ 为次强带, 而 PM₁ 和 PM₂ 中的 A₂₀ 为弱带。A₅ 和 A₂₆ 2 条谱带仅在 CK 中存在, 且均为次强带。A₁₁、A₂₅、A₃₀ 和 A₃₇ 4 条谱带仅在 PM₁ 中存在, 且均为弱带。A₁₀、A₁₉、A₂₂ 和 A₂₈ 4 条谱带仅在 PM₂ 中存在, 其中 A₁₉ 和 A₂₂ 为次强带, A₁₀ 和 A₂₈ 为弱带。A₃、A₁₂、A₁₄、A₁₇、A₂₄、A₃₃ 和 A₃₄ 7 条谱带仅在 PM₃ 中存在, 其中 A₃、A₁₂、A₁₇、A₂₄、A₃₃ 和 A₃₄ 为弱带, A₁₄ 为次强带。A₁ 和 A₃₅ 2 条谱带为 CK 没有而其它三个突变株系都有, 且 A₁ 在 PM₁ 中为强带, 在 PM₂ 中为次强带, 在 PM₃ 中为弱带; A₃₅ 在 PM₁、PM₂ 和 PM₃ 中均为弱带。A₆ 在 CK 及 PM₂ 和 PM₃ 中存在, 且均为弱谱带, 在 PM₁ 中没有。A₁₆ 和 A₂₃ 2 条谱带在 CK 及 PM₁、PM₂ 中存在, PM₃ 中没有, 其中 A₁₆ 在 CK 中为次强带, 在 PM₁ 中为强带, 在 PM₂ 中为弱带; A₂₃ 在 CK 及 PM₁、PM₂ 中均为弱带。A₁₃ 和 A₁₈ 2 条谱带在 CK 及 PM₁、PM₃ 中存在, PM₂ 中没有, 其中 A₁₃ 在 CK 和 PM₁ 中为弱带, 在 PM₃ 中为次强带; A₁₈ 在 CK 中为弱带, 在 PM₁ 和 PM₃ 中为强带。A₄ 仅在 PM₁ 和 PM₂ 中存在, 且均为次强带, 而 CK 和 PM₃ 中没有。A₉、A₂₁ 和 A₂₇ 3 条谱带仅在 PM₁ 和 PM₃ 中存在, 且均为弱带, 而 CK 和 PM₂ 中没有。A₁₅ 仅在 CK 和 PM₁ 中存在, 而 PM₂ 和 PM₃ 中没有, 且在 CK 中为弱带, 在 PM₁ 中为强带。A₈、A₃₂ 和 A₃₆ 3 条谱带仅在 PM₁ 和 PM₂ 中存在, 而 CK 和 PM₃ 中没有, 其中 A₈ 在 PM₁ 和 PM₂ 中为次强带; A₃₂ 和 A₃₆ 在 PM₁ 和 PM₂ 中为弱带。A₂₉ 和 A₃₁ 2 条谱带仅在 PM₂ 和 PM₃ 中存在, 而 CK 和 PM₁ 中没有, 其中 A₂₉ 在 PM₂ 和 PM₃ 中均为弱带, A₃₁ 在 PM₂ 和 PM₃ 中均为次强带。

2.3 各变异植株酯酶同工酶变化

酯酶存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中, 主要分布在细胞质的球状颗粒内。由于它们能水解非生理存在的酯类化合物, 包括一些药物, 因此认为可能对植物有去毒作用。经过空间搭载后草地早熟禾的酯酶同工酶谱带变化较大, 谱带分布不同, 强弱也有变化。

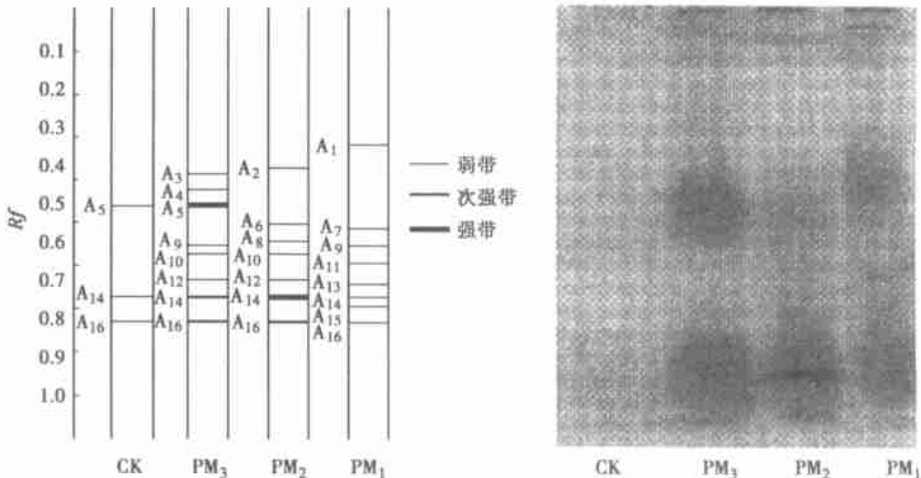


图 4 飞船搭载后草地早熟禾酯酶同工酶变化

从图4可看出CK有3条谱带,迁移率为59.74%~94.81%;PM₁有8条谱带,迁移率为38.96%~94.81%;PM₂有7条谱带,迁移率为48.05%~94.81%;PM₃有8条谱带,迁移率为49.35%~94.81%,其中A₁₄和A₁₆2条谱带为CK和处理共有,A₁₄在PM₂中为强带,在PM₃中为次强带,在CK和PM₁中为弱带;A₁₆在PM₂和PM₃中为次强带,在CK和PM₁中为弱带。A₁、A₇、A₁₁、A₁₃和A₁₅5条谱带仅在PM₁中存在,且均为弱带;A₂、A₆和A₈3条谱带仅在PM₂中存在,且均为弱带;A₃和A₄2条谱带仅在PM₃中存在,且均为弱带。A₉仅在PM₁和PM₃中存在,且均为弱带,而CK和PM₂中没有。A₅仅在CK和PM₃中存在,在CK中为弱带,在PM₃中为强带,PM₁和PM₂中没有。A₁₀和A₁₂2条谱带仅在PM₂和PM₃中存在,且均为弱带,而CK和PM₁中没有。

3 结论与讨论

空间环境使草地早熟禾发生变异,PM₁株系叶片明显增宽,分蘖明显增加,生长快速,用于草坪生产,可有效提高成坪速度;PM₂株系叶片皱缩扭曲,叶色浓绿,植株明显矮化,用于绿化,可有效提高滞尘能力,改善草坪颜色,减少人工修剪草坪的频率,节省养护管理费用;PM₃株系具有多个嵌合体分蘖,叶片颜色新奇,大面积成坪后可有效提高草坪的观赏价值。

空间环境对草地早熟禾解剖结构产生了较大的影响。与CK相比,变异株系由于细胞数目增加,叶片宽度明显增加;叶肉细胞平均直径减少使叶片厚度变薄;PM₂、PM₃株系叶片泡状细胞的增多,改变了叶片的外观形态,有助于植株调节叶片的展开程度。

三个变异株系与CK有一部分完全相同的谱带,这是该品种的特征谱带,也是其遗传稳定性的表现;但也出现了CK中没有的谱带和在CK中存在而三个变异株系没有的谱带。同时,与CK相比,三个突变株系过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶的活性也有明显变化,这说明空间条件能明显改变这两类同工酶的形式和活性。

同工酶是生物体生长过程中一种重要的蛋白质催化剂,是基因表达的产物。同工酶的变化说明空间条件诱导突变体的产生可能是由于基因的变异引起的,其原因可能是微重力或空间粒子辐射引起了DNA或染色体损伤所致^[7]。但是这些突变是否能够稳定遗传尚需进一步证实。

外界因素通过对植物过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶系统的影响而改变某些生理生化过程,进而影响器官发育。酶活力和同工酶谱带的变化是形态结构发生变异的物质基础,形态结构的变化直接改变了草坪的坪用特性。同工酶酶谱的差异是物种遗传差异的重要证据,因此同工酶分析可以作为从分子水平上鉴别遗传变异的一种有效手段^[8]。太空搭载是诱发草地早熟禾产生有益突变的有效手段。

参考文献:

- [1] 江丕栋. 空间生物学[M]. 青岛: 青岛出版社, 2000
- [2] 方晓梅, 蒋兴村. 农作物育种的新途径 空间诱变育种[A]. 见: 中国航天工业公司第710所, 中国航天学会. 中国空间生命科学学术会议论文集[C]. 2003
- [3] 余炳生, 张仪. 生物学显微技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1989
- [4] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999

- [5] 李正理, 张新英. 植物解剖学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984
- [6] 高信曾. 植物学(形态、解剖部分)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989
- [7] 庞士控. 植物抗逆境生理学基础[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1990
- [8] 朱英国, 张为国. 杂交水稻苗期酯酶同工酶与杂种优势关系的研究[J]. 植物学报, 1987, 13(2): 89- 91

The Effect of the Space Condition on the Anatomical Characters of the Leaves and the Ioszyme of Peroxidase and Esterase in *Poa pratensis*

HAN Lei¹, SUN Zhen-yuan^{1,2}, GUO Yan², TONG Yi-chao³, LI Yir-feng¹, PENG Zhen-hua¹

(1. Biotechnology Lab., CAF, Beijing 100091, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; 3. Beijing Feiyang Greenfood Ltd. Co. Beijing 100045, China)

Abstract: Taking the dry seeds of *Poa pratensis* Nassau carried by SZ 3 as the treatment and the seeds which on the earth as CK, three mutations were screened based on presentational characters from the plants treatment and asexual reproduction as PM₁, PM₂ and PM₃. The effect of the space condition on the anatomical characters of the leaves and the ioszyme of peroxidase and esterase in leaves were observed and investigated. The results showed that compared to CK, the width of the leaves of the three mutations increased as the number of epidermis increased, the thickness of the leaves reduced as the average diameter of the mesophyllous cells decreased. The number of the bulliform cells in the leaves of PM₂ and PM₃ increased which changed the shape of the leaves. The results of the ioszyme of esterase showed that there were 11 bands in CK and the *R_f* value was 4.63% ~ 47.22%; 21 bands in PM₁ and *R_f* value was 2.78% ~ 68.52%; 18 bands in PM₂ and *R_f* value was 2.78% ~ 67.59%; 20 bands in PM₃ and *R_f* value was 2.78% ~ 63.89%. The results of the ioszyme of peroxidase showed that there were bands in CK and the *R_f* value was 59.74% ~ 94.81%; 8 bands in PM₁ and the *R_f* value was 38.96% ~ 94.81%; 7 bands in PM₂ and the *R_f* value was 48.05% ~ 94.81%; 8 bands in PM₃ and the *R_f* value was 49.35% ~ 94.81%. There were some same bands both in CK and the mutations, but there were also some other bands changed: some of them existed in the mutations but not in CK; some of them existed in CK but not in the mutations; and the activities of the ioszyme were changed greatly. All of these mutations were valuable to production application and genetic breeding.

Key words: space condition; *Poa pratensis*; anatomical characters; peroxidase; esterase; ioszyme