

## 棉花航天诱变敏感材料的筛选及多态性分析

彭振<sup>1,2</sup>, 宋美珍<sup>1\*</sup>, 喻树迅<sup>1\*</sup>, 范术丽<sup>1</sup>, 于霁雯<sup>1</sup>, 冯丽娜<sup>1,3</sup>, 龚文芳<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业科学院棉花研究所 / 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南安阳 455000;

2. 华中农业大学, 武汉 430070; 3. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 利用“实践八号”育种卫星搭载棉花 10 个品种(系), 对 SP<sub>1</sub> 代、SP<sub>2</sub> 代进行了突变体的筛选、DNA 分子标记检测和田间农艺性状调查, 研究棉花不同材料对航天诱变的敏感性。其中 7 个材料对航天有一定的敏感性, 其分子标记多态性高, 田间农艺性状变化明显。结果表明, 太空能够诱导棉花种子发生基因变异, 航天诱变可作为棉花种质资源创新和品种选育的方法之一。

**关键词:** 棉花; 航天诱变; 突变体; 农艺性状; 多态性

**中图分类号:** S562.03 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2010)04-0312-07

## Polymorphism Analysis and Sensitivity Materials Screening of Offspring of Cotton Varieties on Space Mutation

PENG Zhen<sup>1,2</sup>, SONG Mei-zhen<sup>1\*</sup>, YU Shu-xun<sup>1\*</sup>, FAN Shu-li<sup>1</sup>, YU Ji-wen<sup>1</sup>, FENG Li-na<sup>1,3</sup>, GONG Wen-fang<sup>1,2</sup>

(1. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science / Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Dry seeds of ten cotton varieties were carried by the Shijian-8 satellite for space mutation treatment. The SP<sub>1</sub> and SP<sub>2</sub> offspring of cotton varieties were used to screen mutants and analyze DNA molecular polymorphism and investigate the agronomic traits. The aim was to study sensitivity of cotton varieties under space mutation. The results showed that seven susceptible varieties were confirmed and expressed high polymorphism and changed significantly on the agronomic traits. These results indicated that the outer space mutation would be an effective method to develop new cotton varieties.

**Key words:** cotton; space mutation; mutant; agronomy characters; polymorphism

航天诱变育种起步于 20 世纪 60 年代, 我国于 1987 年开始航天诱变育种工作。植物航天育种又称航天诱变育种或空间诱变育种, 是指利用返回式卫星或高空气球将农作物种子带到太空, 利用太空特殊的环境(宇宙射线、微重力、高真空、弱磁场等)对农作物种子产生诱变, 再返回地面选育新种质, 培育新品种的育种新技术<sup>[1]</sup>。航天诱变育种具有变异频率高、变异幅度广、变异性状稳定等特性, 已成为快速培育农作物优良品种的重要途径之一, 其核心是利用空间环境的综合物理

因素对植物的遗传性产生诱变, 获得地面常规方法较难得的甚至是罕见的突变遗传种质, 选育突破性的新品种<sup>[2]</sup>。随着航天事业的发展, 航天诱变效应越来越引起人们的关注和广泛研究, 国外对于航天效应的研究主要集中在不同引力的条件对动物以及低等植物的胚胎发育、生理特性等方面的影响<sup>[3-5]</sup>; 而国内对空间诱变的研究大都着眼于植物育种性状的选育和对生物学特性的影响<sup>[6-7]</sup>, 并在航天诱变育种方面取得了大量成果: 水稻、小麦、大豆和蔬菜等众多植物中获得大量

**收稿日期:** 2009-01-04 **作者简介:** 彭振(1983-), 男, 硕士, pzh8023@yahoo.com.cn; \* 通讯作者, 宋美珍, 女, 博士, 副研究员, songmz@cricaas.com.cn; 喻树迅, 男, 博士, 研究员, yu@cricaas.com.cn

**项目基金:** 国家十一五“863”计划(2007AA100103); 国家科技支撑计划项目(2008BAD97B05)

的突变体,并从中选出一批优良的新品种,有些品种已经在生产上大面积推广应用,产生了巨大的经济效益<sup>[8-14]</sup>。航天诱变育种在棉花上的应用还不多,只是初步探讨了棉花航天诱变产生的生物学效应及机理<sup>[1]</sup>。本文在此基础上从经过航天诱变的 10 个棉花品种中,筛选突变体并做 SSR 标记多态性分析及农艺性状观察。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本试验种子在 2006 年由实践八号育种卫星搭载共处理 10 份材料,包括春棉品种:中 50191、中 04002、中 040029、中 A3023、中 A3025,其中春棉中 A3023、A3025 为海岛棉;夏棉品种:中 501、中 502181、中 YS-4、中 030415、中 030041;材料于 2006 年 9 月 9 日搭载实践八号育种卫星升空,在近地点 187 km、远地点 463 km 的近地轨道共运行 355 h,航程 900 多万 km,9 月 24 日,经过 15 d 太空飞行的“实践八号”育种卫星成功返回。同时各材料均保留一份种子作地面对照。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 田间性状调查。**对棉花的 10 个品种分别进行了苗期观察,并对棉花成熟植株的株高、果枝数、子棉产量、皮棉产量等农艺性状进行了调查。

**1.2.2 SSR 多态性分析。**DNA 提取,参照 Paterson 等的方法。对照品种基因组 DNA 为 25 个单株 DNA 的等量混合物。航天材料都是单株提取 DNA。PCR 反应在美国 Bio-Rad 热循环仪上进行。PCR 反应体系 (10  $\mu$ L): 模板 DNA 2  $\mu$ L, buffer 1  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 0.8  $\mu$ L, dNTP 0.2  $\mu$ L, SSR 上游引物 0.2  $\mu$ L, SSR 下游引物 0.2  $\mu$ L, Taq 酶 0.13  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5.47  $\mu$ L。反应程序: 94℃ 预变性 3 min, 35 个循环 (94℃ 40 s, 56℃ 50 s, 72℃ 1 min), 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 8.0% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 (电泳缓冲液 1×TBE, 电压 150 V, 时间 1.2 h), 0.2% AgNO<sub>3</sub> 染色, BIORAD 凝胶成像系统下观察、照相、读带。本实验方法经 3 次重复,结果稳定。80 对 SSR 引物序列由上海生工生物技术有限公司合成;Taq 酶由上海生工生物技术有限公司生产;其它常规试剂主要购自上海

生工生物技术有限公司。

多态性比率(%)=(多态性引物数/80)×100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 田间变异类型

航天诱变材料变异类型:主要包括生理变异类型和遗传变异类型。

**2.1.1 生理变异类型主要是苗期变异。**(1) 单子叶:包括有生长点(a)、无生长点(b)2 种类型;(2)3 子叶;1 个叶柄 2 片真叶(c);(3)子叶酒杯状突变株(d)等(图 1)。航天处理材料变异种类和变异率见表 1。

表 1 航天处理材料变异种类和变异率

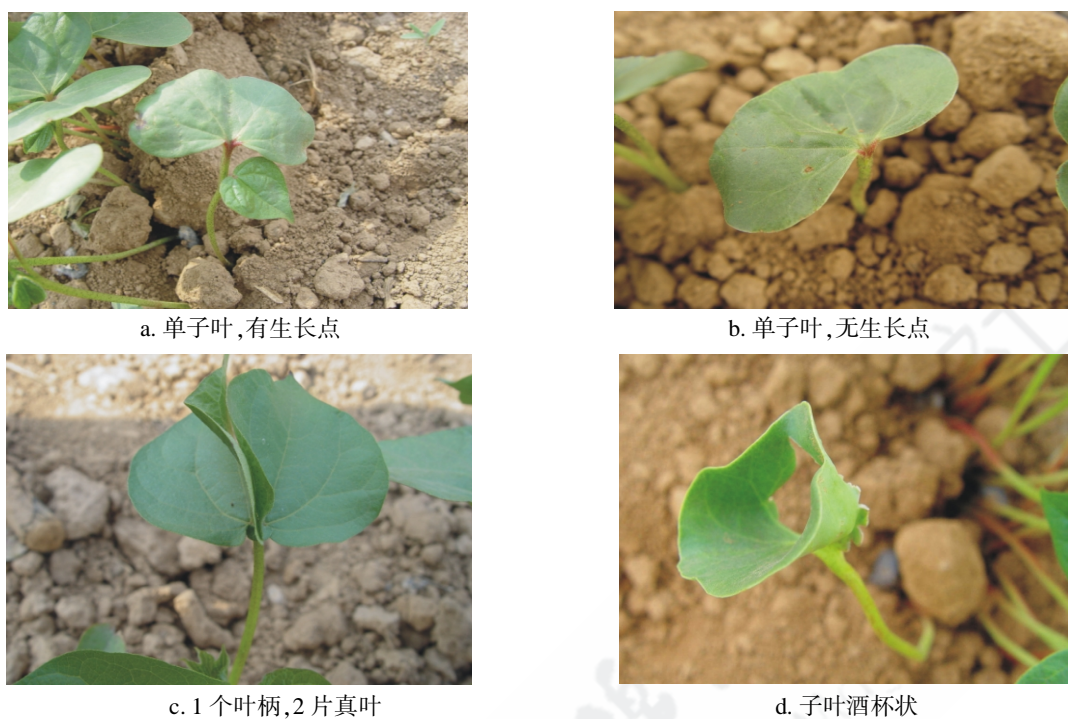
Table 1 The mutation type and rate of Aerospace materials

航天材料	变异种类	变异率
中 502181 SP <sub>2</sub> 代	单子叶,无生长点	1.06‰
中 A3023 SP <sub>2</sub> 代	3 子叶,2 子叶叶柄粘连	1.70‰
	1 叶柄,2 片真叶	1.70‰
中 A3025 SP <sub>2</sub> 代	1 叶柄,2 片真叶	1.54‰
	1 叶柄,2 真叶一大一小	1.54‰
中 YS-4 SP <sub>2</sub> 代	单子叶	1.02‰
	子叶酒杯状	1.02‰
中 30041 SP <sub>2</sub> 代	子叶叶柄相连	1.05‰
	单子叶,有生长点	1.05‰

**2.1.2 遗传变异类型。**主要表现在中 502181 子叶黄斑突变体和中 50191 早熟矮化单株。

中 502181 SP<sub>2</sub> 代苗期子叶叶心部位有黄斑出现(图 2),此性状可能是航天环境引起中 502181 基因发生变异,并且在 SP<sub>2</sub> 代发生分离。鉴于这种性状在子叶期表现,也有可能作为一种子叶期鉴定的新型标记开发。中 502181 SP<sub>1</sub> 代种植 100 个单株,收获种子(即 SP<sub>2</sub> 代)并种成株行,行长 1.5 m,其中 21 个单株在 SP<sub>2</sub> 代子叶有黄斑表现。SP<sub>2</sub> 代共出棉苗 1354 株,其中子叶表现黄斑为 97 株,占总株比例 7.16%,子叶非黄斑单株数:子叶黄斑单株数=13:1。

中 50191 的预期改良目标是缩短生育期,用作麦套春棉。在中 50191 SP<sub>2</sub> 代出现较对照矮化且早熟的单株出现(图 3)。1 号和 2 号单株为筛选到的早熟矮化单株。其中 1 号株高为 81 cm,2 号株高为 98 cm,对照为 108 cm。在 100 个单株中,筛选到 9 个早熟性矮化单株,生育期缩短



a. 单子叶,有生长点

b. 单子叶,无生长点

c. 1个叶柄,2片真叶

d. 子叶酒杯状

图 1 航天处理材料苗期生理变异类型

Fig.1 Physiological variation of Aerospace material seedling



图 2 子叶黄斑突变体

Fig.2 Yellow spot of Cotyledon in upland cotton

1

CK

2



图 3 早熟矮化单株与对照植株

Fig.3 Early ripening and dwarfing mutant with CK



1.1~2.7 d, 并且早熟性单株的单株子棉产量较对照增产 6.05%, 皮棉产量增加 2.14%。

## 2.2 农艺性状的变化

在航天环境的影响下, 航天处理材料的农艺性状都表现了一定的变化。对 SP<sub>1</sub> 与 SP<sub>2</sub> 代, 航天诱变处理对株高、果枝数、单株铃数、衣分、子棉产量、皮棉产量在正向和负向 2 个方面都有影响。其中有几个材料变异明显且幅度大, 具体情况如下:

航天处理中 A3023(海岛棉)的预期目标是提高产量和衣分。通过航天诱变, 子棉、皮棉产量都得到了大幅度的提高; 衣分, SP<sub>1</sub> 代与 SP<sub>1</sub> 代对照相比提高 0.35 个百分点, SP<sub>2</sub> 代与 SP<sub>2</sub> 代对照相比提高了 1.08 个百分点, 可以看出衣分提高相当明显。

航天处理中 040029 的预期目标是提高衣分, 通过航天诱变, SP<sub>1</sub> 代衣分与 SP<sub>1</sub> 代对照衣分相比提高 1.6 个百分点, SP<sub>2</sub> 代衣分与 SP<sub>2</sub> 代对照衣分相比提高 1.13 个百分点, 并且 SP<sub>2</sub> 代衣分与 SP<sub>1</sub> 代衣分相比提高 1.23 个百分点。

航天处理中 502181 的预期目标是提高抗枯萎、黄萎病能力。中 502181 的 SP<sub>1</sub> 代、SP<sub>2</sub> 代, 有较好的抗病植株表现。同时, 中 502181 田间产量下降幅度较大, 然而其实验室分子标记检测多态性比较高, 可能是由于航天环境引起其控制产量性状的基因或与产量性状相关基因发生突变, 引起其产量向提高产量和降低产量 2 个方向发展的现象。子叶黄斑突变体的变异单株与对照相比: 株高、果枝数、子棉产量、皮棉产量、铃重、单株产量都低于对照。

## 2.3 分子标记多态性分析

### 2.3.1 多态性分析结果。

以对照品种基因组 DNA 和各处理材料 SP<sub>1</sub> 代和 SP<sub>2</sub> 代基因组 DNA 分别等量混合样品为模板, 进行 PCR 扩增。用 80 对 SSR 引物进行 PCR 扩增、电泳检测, 扩增产物片段大小介于 100~1000 bp 之间。结果表明: 引物都能扩增出稳定的扩增片段, 与对照比较多态性结果见表 2。

对棉花航天的 10 个品种分别进行 SSR 分子标记检测, 可以得出以下 3 种现象(图 4): 1) 多态性高且 SP<sub>1</sub> 代、SP<sub>2</sub> 代都有相同的多态性出现, 这

表 2 不同材料微卫星多态性分析

Table 2 The results of microsatellite DNAs polymorphic analysis in various materials

材料	多态性引物对数	多态性比率
中 502181 SP <sub>1</sub>	1 对	1.25%
中 502181 SP <sub>2</sub>	2 对	2.50%
中 50191 SP <sub>2</sub>	1 对	1.25%
中 YS-4 SP <sub>1</sub>	3 对	3.75%
中 YS-4 SP <sub>2</sub>	3 对	3.75%
中 30041 SP <sub>1</sub>	2 对	2.50%
中 30041 SP <sub>2</sub>	1 对	1.25%
中 040029 SP <sub>2</sub>	1 对	1.25%
中 A3023 SP <sub>2</sub>	1 对	1.25%

些可能预示着一些变异能够稳定遗传; 2) SP<sub>1</sub> 代多态性高, 但多态性在 SP<sub>2</sub> 代消失, 扩增片段数减少。有些变异在 SP<sub>1</sub> 代有表现, 后代变异消失。此突变可能发生回复突变, 使突变体所失去的野生型性状得到恢复; 3) SP<sub>1</sub> 代多态性不明显, SP<sub>2</sub> 代多态性表现明显; 一些变异在 SP<sub>1</sub> 代无表现, 后面世代才表现出来。此突变应该是发生隐性突变, 突变当代不表现突变性状, 其自交后代才可能表现突变性状。符合一些变异性状在 SP<sub>2</sub> 代及以后世代才能表现出变异的隐性突变特征。

### 2.3.2 性状变异与 SSR 位点变异的关系。

在中 50191 的 100 个诱变后代单株中, 筛选到 9 个生育期缩短 1.1~2.7 d 的早熟性单株, 在株高方面较对照明显变矮小。并且早熟性单株的单株子棉产量与对照相比增产 6.05%, 皮棉产量增加 2.14%, 均达到显著水平。图 5 中 2、3、5、6、9、11、12、13、15 为筛选到的 9 个早熟矮化单株由引物 CIR 280 SSR 标记扩增结果, 扩增产物在 700~800 bp 之间, 与地面对照相比缺失 2 条片段。这 2 条片段可能与产量性状和株高性状相关。

中 YS-4 材料, 引物 CIR183 对 SP<sub>1</sub> 代、SP<sub>2</sub> 代各 100 个单株进行多态性分析(图 6), SP<sub>1</sub> 代 a 型多态性 36 个单株, b 型多态性 21 个单株。SP<sub>2</sub> 代 a 型 24 个单株, b 型多态性 20 个单株。两代之间, 有 11 个单株都表现 a 型多态性, 有 7 个单株都表现 b 型多态性。并且 SP<sub>1</sub> 代 a 型多态性单株产量与地面对照相比增加 35.2%, 差异达到极显著水平。SP<sub>2</sub> 代 a 型多态性单株产量比地面对照增产 14.6%, 差异达到显著水平。

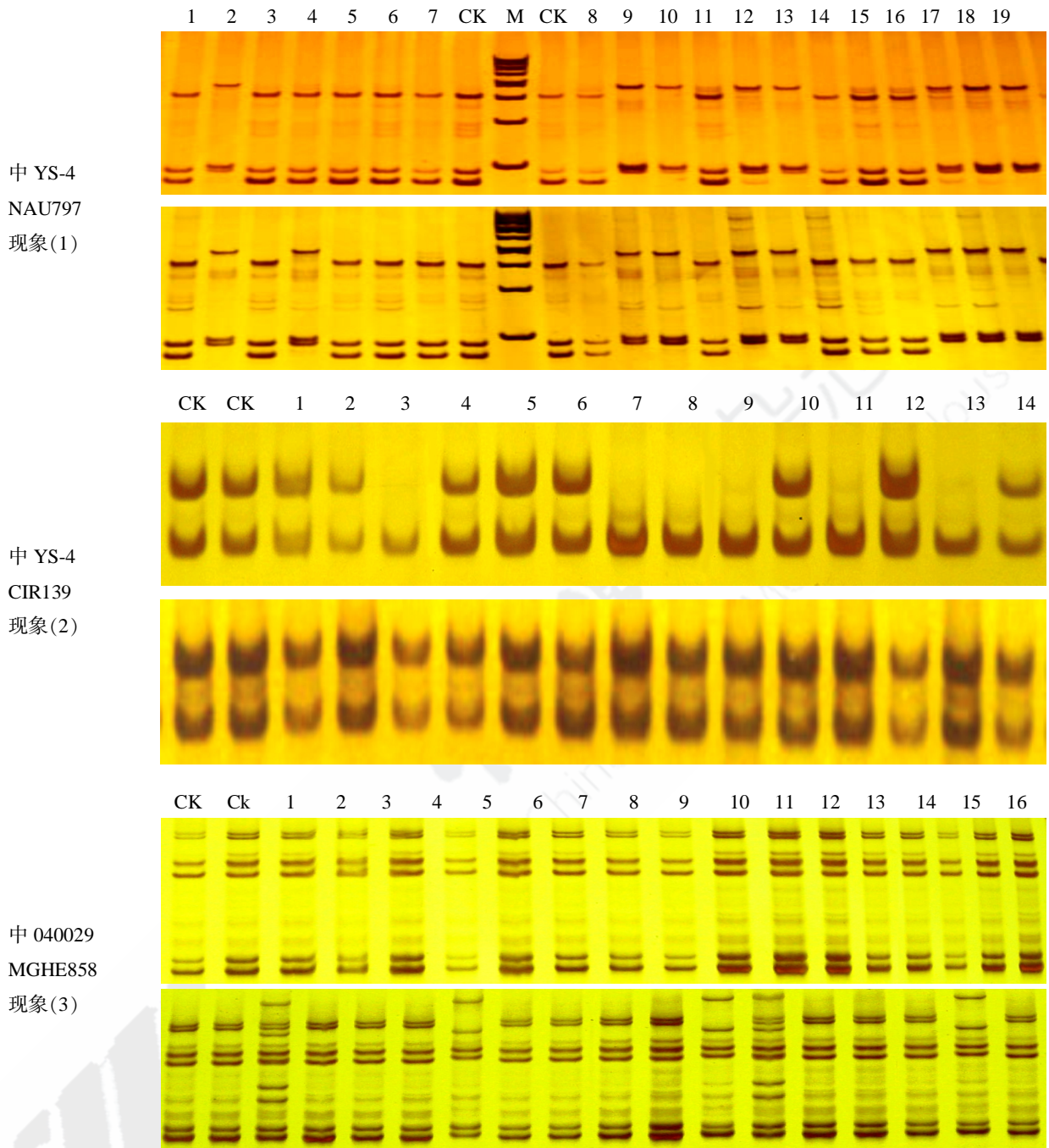


图 4 微卫星扩增结果 3 种现象

Fig.4 The three results of micro-satellites expansion

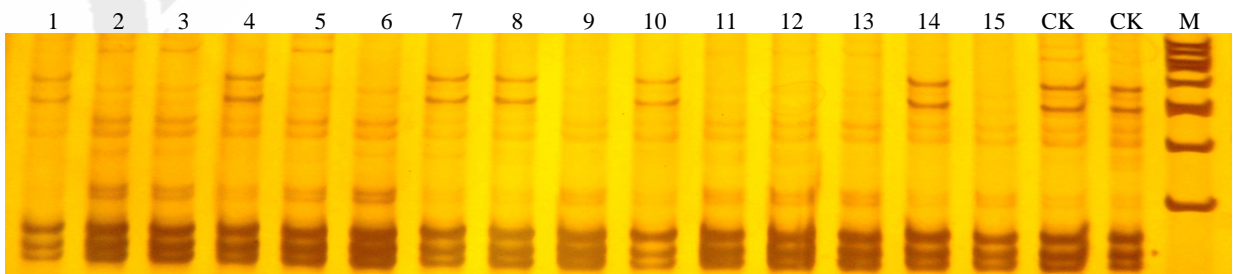


图 5 中 50191 微卫星扩增结果

Fig.5 The results of micro-satellites expansion in Zhong 50191

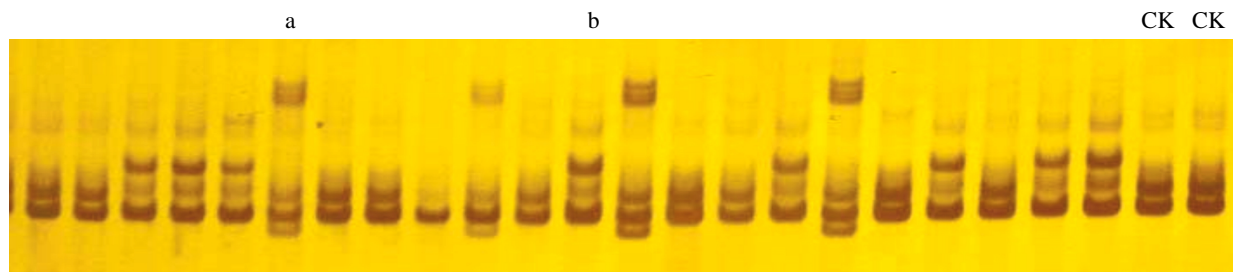


图 6 中 YS-4 微卫星扩增结果

Fig.6 The results of micro-satellites expansion in Zhong YS-4

### 3 讨论

通过对返回式卫星搭载后的 10 个棉花品种种植和选择,获得了不同类型的突变体,用 SSR 技术检测 10 个品种基因位点,发现多个基因位点发生了变异。依据 SSR 分子标记检测结果,可以得出以下 3 种现象:1)多态性高且  $SP_1$  代、 $SP_2$  代都有相同的多态性出现,可能预示着一些变异能够稳定遗传;2) $SP_1$  代多态性高,但多态性在  $SP_2$  代消失,有些变异在  $SP_1$  代有表现,后代变异消失。此突变可能发生回复突变,使突变体所失去的野生型性状得到恢复;3) $SP_1$  代多态性不明显, $SP_2$  代多态性表现明显,一些变异在  $SP_1$  代无表现,后面世代才表现出来。此突变应该是发生隐性突变,突变当代不表现突变性状,其自交后代才可能表现突变性状。符合一些变异性状在  $SP_2$  代及以后世代才能表现出变异的隐性突变特征。

同时基因位点变异类型分为 3 类,扩增的片段数增多、片段数减少和片段长度变化。这些结果与水稻、菜豆、花生和番茄航天育种的研究结果一致<sup>[15-18]</sup>。本试验结果显示 SSR 位点变异与形态变异关系复杂,表明太空处理能够诱导棉花产生变异,有望为高产、优质的花生品种选育提供较好的新种质。

对性状基因的选择,可以在该性状出现之前就通过分子标记进行选择,这可大大缩短育种周期。而从分子水平上对变异材料遗传物质的改变进行检测,将有助于阐明空间诱变的机理,有目的地指导作物空间诱变育种。因此,将材料的 DNA 分子标记多态性与田间农艺性状联系起来,有益于证实棉花航天诱变的机理。

### 参考文献:

- [1] 宋美珍,喻树迅,范术丽,等. 棉花航天诱变的农艺性状变化及突变体的多态性分析[J]. 中国农业科技导报,2007,9(2): 30-37.  
SONG Mei-zhen, YU Shu-xun, FAN Shu-li, et al. Polymorphism analysis of cotton mutants and change agronomy traits of cotton by space mutation[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2007, 9(2): 30-37.
- [2] 温贤芳,张 龙,戴维序. 天地结合开展我国空间诱变育种研究[J]. 核农学报,2004,18(4): 286-288.  
WEN Xian-fang, Zhang Long, Dai Wei-xu, et al. Study of space mutation breeding in China[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(4): 286-288.
- [3] DE Maziè RE A, Gonzalez-Jurado J, Reijnen M, et al. Transient effects of microgravity on early embryos of *Xenopus Laevis*[J]. Adv Space Res, 1996, 17(6/7): 219-223.
- [4] Hughes-Fulford M, Tjandrawinata R, Fitzgerald J, et al. Effects of microgravity on osteoblast growth activation[J]. Gravitational and Space Biol Bull, 1998, 11(2):51-60.
- [5] ALPATOV A M, Hoban-Higgins T M, Fuller C A, et al. Effects of microgravity on Circadian Rhythms in insects[J]. Gravit Physiol, 1998, 5(1): 1-4.
- [6] 徐建龙,李春寿,王俊敏,等. 空间环境诱发水稻多穗矮秆突变体的筛选与鉴定[J]. 核农学报,2003,17(2): 90-94.  
XU Jian-long, Li Chun-shou, WANG Jun-min, et al. Screening and identification of tillering dwarf mutant of rice induced by space environment[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2003, 17(2): 90-94.
- [7] 方金梁,邹定斌,周永胜,等. 航天诱变选育高产高蛋白质水稻新品种[J]. 核农学报,2004,18(4): 280-283.  
FANG Jin-liang, Zou Ding-bin, Zhou Yong-sheng, et al. Breeding of high yield and high protein rice varieties by space mutation[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(4): 280-283.
- [8] 邓立平,郭亚华,张军民,等. 空间诱变在甜椒育种中的应用[J]. 空间科学学报,1996,16(增刊):126-131.  
DENG Li-ping, Guo Ya-hua, Zhang Jun-min, et al. Utilization of



- space flight on sweet pepper breeding[J]. Chinese Journal of Space Science, 1996,16 (suppl):126-131.
- [9] 郑家团, 谢华安, 王乌齐, 等. 水稻航天诱变育种研究进展与应用前景[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3):367-371.  
Zhen Jia-tuan, Xie Hua-an, Wang Wu-qi, et al. Progress and application of the rice space-flight breeding [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(3):367-371.
- [10] 郭亚华, 谢立波, 王雪, 等. 辣椒空间诱变育种技术创新及新品种(品系)培育[J]. 核农学报, 2004, 18 (4):265-268.  
GUO Ya-hua, Xie Li-bo, Wang Xue, et al. Technological innovation of induced breeding of space and selection of new variety on pepper [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(4): 265-268.
- [11] 郑积荣, 曹健, 李桂花, 等. 飞船搭载番茄种子 SP<sub>1</sub> 的变异研究初报[J]. 核农学报, 2004, 18 (4): 311-313.  
ZHENG Ji-rong, Cao Jian, Li Gui-hua, et al. The biological effect of SP<sub>1</sub> tomatoes after boarding on airship[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18 (4):311-313.
- [12] 胡繁荣, 赵海军, 张琳琳, 等. 空间技术诱变创造优质抗逆黄叶高羊茅[J]. 核农学报, 2004, 18(4):286-288.  
HU Fan-rong, Zhao Hai-jun, Zhang Lin-lin, et al. Space technique induced elite abiotic stress tolerant yellow tall fescue[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(4):286-288.
- [13] 谢克强, 张香莲, 杨良波, 等. 太空莲 1、2、3 号新品种的选育[J]. 核农学报, 2004, 18(4):325.  
XIE Ke-qiang, Zhang Xiang-lian, Yang Liang-bo, et al. Breeding of new varieties Taikong Lotus No.1, No.2, No.3 [J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2004, 18(4):325.
- [14] 杨毅, 隋好林, 丛惠芳, 等. 卫星搭载黄瓜主要性状的变异研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(2): 171-175.  
YANG Yi, Sui Hao-lin, Cong Hui-fang, et al. Studies in variation of cucumber characters carried by a recoverable satellite[J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Sciences, 2001, 32(2): 171-175.
- [15] 周峰, 易继财, 张群宇, 等. 水稻空间诱变后代的微卫星多态性分析[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(4): 55-57.  
ZHOU Feng, Yi Ji-cai, Zhang Qun-yu, et al. Polymorphic analysis of microsatellite markers in *Oryza sativa* L. mutants induced by space flight[J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(4): 55-57.
- [16] 张健, 李金国, 王培生, 等. 菜豆空间突变品系的分子生物学分析[J]. 航天医学与医学工程, 2000, 13(6): 410-413.  
ZHANG Jian, Li Jin-guo, Wang Pei-sheng, et al. Molecular analysis of space mutant line of kidney bean[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2000, 13 (6): 410-413.
- [17] 鹿金颖, 刘敏, 薛淮, 等. 俄罗斯“和平”号空间站搭载的番茄随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 航天医学与医学工程, 2005, 18(1): 72-74.  
LU Jin-ying, Liu Min, Xue Huai, et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of tomato from seeds carried in Russian Mir space station [J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2005, 18(1): 72-74.
- [18] 印红, 陆伟, 谢申猛. 搭载后红曲霉菌突变株的染色体 DNA 随机扩增多态性分析研究[J]. 航天医学与医学工程, 2004, 17(5): 374-376.  
YIN Hong, Lu Wei, Xie Shen-meng, et al. Study on space flight-mutants of *Monascus Purpureus* using random amplified polymorphic DNA[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2004, 17(5): 374-376. ●