

太空环境对甘草 DNA 诱变作用和次生代谢产物的影响

高文远^①, 李克峰^①, 高秀梅^②, 胡立民^②

① 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072;

② 天津中医药大学中药研究中心, 天津 300193

E-mail: pharmgao@tju.edu.cn

收稿日期: 2008-03-20; 接受日期: 2008-06-30

国家自然科学基金(批准号: 30472148 和 30772732)资助项目

摘要 甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)种子搭载于一返回式卫星上, 18 天后返回地球(飞行回收舱平均辐射剂量为 0.102 mGy/d, 飞行远地点距地球 350 km, 重力为 $10^{-6} \times g$), 种子萌发并发育成熟. 地面对照种子在相同环境下种植. 甘草叶子用作 ISSR 分析, 甘草一年生根的两种主要次生代谢产物采用高效液相色谱 HPLC 进行分析. 在此实验中, 使用 22 条引物, 其中 6 条产生了不同基因条带. HPLC 分析结果表明, 搭载种子发育成熟的根的甘草酸(GA)和甘草苷(LQ)的含量分别比对照组高 2.19 倍和 1.18 倍. 实验表明空间环境对甘草产生诱变作用并且影响其次生代谢产物. 这些变化表明空间育种是一种新的有效方法并且能对濒危药用植物甘草资源的保护做出贡献.

关键词

甘草

(*Glycyrrhiza uralensis*)

航天

ISSR

DNA 诱变

次生代谢产物

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)是一种非常重要的药用植物, 从有历史记载以来, 它已经被东西方国家用于医用治疗^[1]. 甘草根中两种主要次生代谢产物是甘草酸(GA, 包括甘草酸、GA 水解产物、GCA)和甘草苷(LQ)(图 1). GA 具有抗炎活性并且已经广泛应用于脾脏肿大、咽喉痛、支气管炎和肝炎的治疗^[2], 近期有报道^[3]称甘草酸(GA)可以增强 SARS 感染者的免疫力. 甘草苷(LQ)具有广泛生物活性, 包括抗过敏和抗组织活性^[4]. 然而国内对甘草野生资源的过度开采已经导致野生甘草资源的下降及荒漠化. 因此, 人工种植甘草是野生资源的替代品^[5], 但是低萌发率以及有效成分含量低限制了人工种植甘草的发展^[6,7].

太空诱变是一种新的高科技, 包括太空技术、生物技术和农业育种技术. 高辐射、微重力和其他太空因素可能导致一个物种的遗传变异而产生一个新的

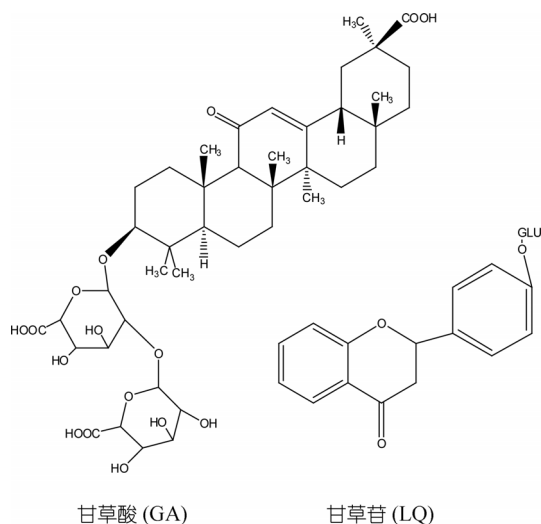


图 1 甘草酸(GA)和甘草苷(LQ)的结构

物种^[8]. 本实验将野生甘草种子搭载于一返回式卫星 18 天, ISSR(inter-simple sequence repeat)技术被用来研究甘草太空飞行后的基因多态性. 使用高效液相色谱法 HPLC 分析太空环境诱变后甘草一年生根和对照组中甘草酸(GA, 包括 GCA)和甘草苷(LQ)的含量.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 材料. 野生甘草种子选育自新疆塔城地区, 搭载于可返回式卫星 18 天(飞行回收舱平均辐射剂量为 0.102 mGy/d, 飞行远地点距地球 350 km, 重力为 $10^{-6} \times g$); 地面对照组储存在 25℃ 干燥环境下. 太空飞行后, 卫星搭载种子和地面对照组同时播种. 采集新鲜叶片用于 ISSR 分析, 其一年生根用于 HPLC 分析.

(2) 试剂. ISSR 分析所有引物从上海生工生物工程技术服务有限公司(上海, 中国)购得, 用于 ISSR 分析的 Taq 酶, 10×PCR 缓冲液, dNTP 均购于宝生物工程(大连)有限公司. 用于 HPLC 的甘草酸 GA 和甘草苷 LQ 标准品购于中国药品生物制品检定所.

1.2 方法

(1) DNA 提取. 从新鲜甘草叶中提取 DNA 基因组, 提取程序参照文献[9].

(2) ISSR 反应. ISSR 25 μL 反应体系: 模板 DNA 10 μL (DNA 含量为 10.5 ng), Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL (含 Mg²⁺), 10 μmol·L⁻¹, 引物 1 μL, ddH₂O 9.25 μL.

反应在 PCR 仪中进行(TC-412, 英国). 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 53℃ 退火 60 s, 72℃ 下延伸 90 s, 共计 40 个循环; 72℃ 延伸 7 min.

取扩增产物 5 μL 点样于 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, ISSR 片段在凝胶成像系统(美国 UVP 公司)上观察并分析.

(3) HPLC 分析. 液相色谱条件: 分析使用 Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1311A 四元泵, G1322A 脱气机, G1314A VWD 可变波长检测器), HP Rev.A.0510 化学工作站, Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm, 大连依利特公司). 甘草酸, 流动相: 甲醇-1%乙酸(65:35, 30 min 内梯度洗脱至 90:10, 保持 5 min), 检测波长 254 nm. 甘草苷, 流动相:

乙腈-0.5%乙酸(1:4), 检测波长: 276 nm. 流速: 1.0 mL·min⁻¹.

供试品溶液的制备: 取甘草根 1.0 g, 研成粉末, 加入 60 mL 甲醇(含少量氨水)超声 30 min, 过滤旋干后定容至 5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后为供试品溶液.

2 结果

2.1 ISSR 分析基因多态性

本实验, 使用 22 条引物扩增太空组和地面对照组的 DNA 来筛选引物. 16 个引物产生了相同的 DNA 条带, 6 个引物的扩增产物具有多态性. 表 1 所示为 ISSR 引物序列

每个引物扩增的条带数在 5~11 之间不等, 2 个引物共扩增了 132 条谱带, 其中多态性的条带数为 28 条, 扩增条带的分子量范围在 300~1000 bp 之间, 占总条带数的 21.2%. 表 2 为一些引物的扩增结果.

表 1 6 个多态性引物及其引物序列

引物序号	引物序列(5'→3')
T13761	CAC ACA CAC ACA CAC AG
T13762	GTG TGT GTG TGT GTGTC
T13763	AGA GAG AGA GAG AGA GC
T13764	GAG AGA GAG AGA GAG AA
T13765	ATG ATG ATG ATG C
T13766	CCCTCCCTCCCTCCCT

表 2 甘草中甘草酸(GA)和甘草苷(LQ)的含量 (n=3)

样品	主要次生代谢产物含量/mg·g ⁻¹		
	GA	GCA	LQ
太空组	3.98±0.19*	Nd	6.92±0.96*
对照组	1.82±0.48	Nd	5.86±0.34

P<0.05; 每一个数值代表 $\bar{x} \pm SD$ (n=3); Nd 示没有检测

与对照组相比, 太空组产生了不同条带. 图 2 表明引物 T13761 共扩增了 8 条条带, 其中 4 条具有多态性. 与地面对照组相比, WG1 比地面对照组多了 600 和 650 bp 处两条谱带, 而缺少了 350 bp 处的条带. 引物 T13765 共扩增了 10 条谱带, 其中具有多态性的条带为 3 条. 与地面对照组相比, WG1 甘草多了 2 条 350~400 bp 左右的条带, 而缺少了 150 bp 处的条带.

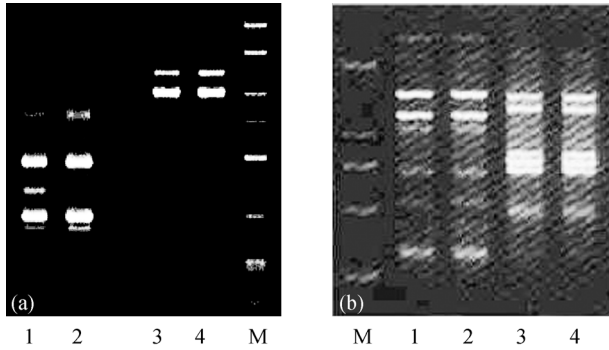


图2 引物 T13761 和 T13765 扩增的太空搭载甘草 ISSR 多态性谱图

泳道 1 和 2 是地面对照组; 泳道 3 和 4 为 WG1 组;
M 为分子量标记

2.2 HPLC 分析甘草酸和甘草苷的含量

研究甘草太空对照组次生代谢产物, 使用 HPLC 方法测定甘草一年生根中主要次生代谢产物的含量. 结果如图 3 和图 4 所示, 甘草酸和甘草苷含量如表 2 所示.

结果表明, 太空组甘草酸和甘草苷的含量是对照组的 2.19 和 1.18 倍, 分别比对照组高, 具有显著差异.

3 结果与讨论

甘草属于豆科, 在中国广泛使用于各种方剂中, 另外, 野生甘草主要生长在酸性和半酸性的地区, 并且对于长期抵制沙漠化土壤具有重要作用^[10]. 野生甘草过度采挖是导致中国西部沙漠化的一个因素. 2000 年, 中国政府加强了对野生甘草采挖的限制, 从而保护自然环境. 随着甘草需求量的增加和野生甘草资源的减少, 人工种植甘草作为一种额外资源已经引起人们的重视. 但到现在, 对于甘草培养仍然有许多问题, 如人工种植甘草次生代谢产物含量低及甘草萌发率低. 太空科学提供了新奇独特的研究机会. 无重力、高辐射量和高电荷, 高能量(HZE)可能导致植物 DNA 诱变和遗传变化^[11].

已经有许多太空搭载实验, 包括马铃薯、番茄以及真菌, 结果表明太空射线已经对这些植物产生了形态变异和 DNA 诱变作用^[12,13]. Gao 等人^[14,15]研究了太空环境对药用植物桔梗(*Platycodon grandiflorum*), 藿香(*Agastache rugosa*)的影响, 已经进行了电子显微

镜, 实验发现这些药用植物在太空飞行过后产生了超微结构的变化.

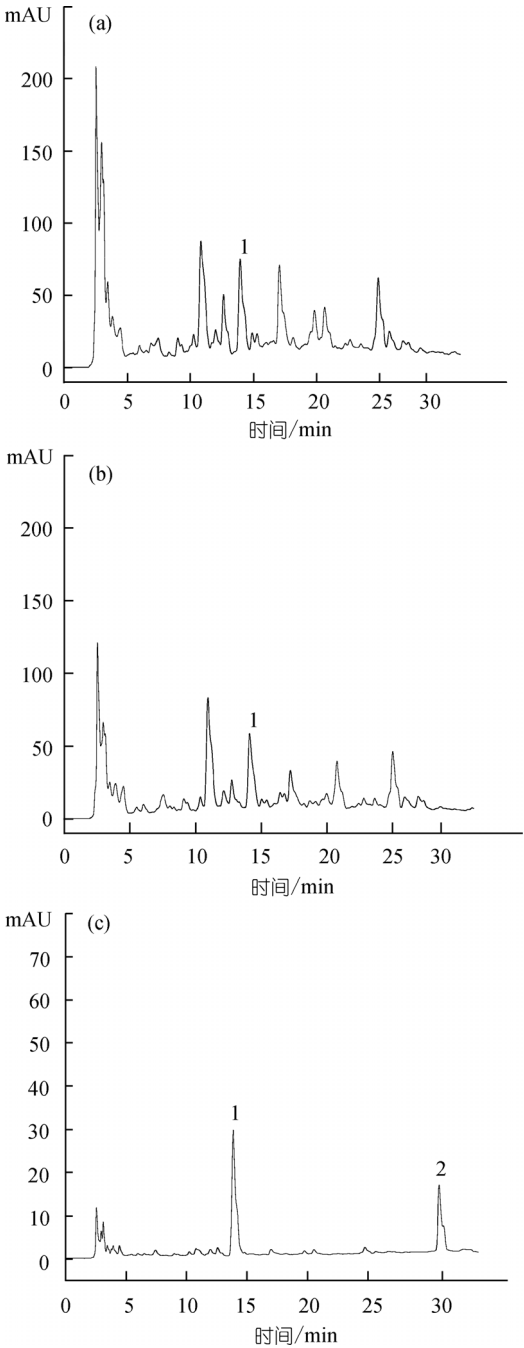


图3 甘草酸(GA)的 HPLC 图

(a) 对照组根; (b) 太空组根; (c) 标准品. 1: GA(甘草酸); 2: GCA(甘草酸水解产物)

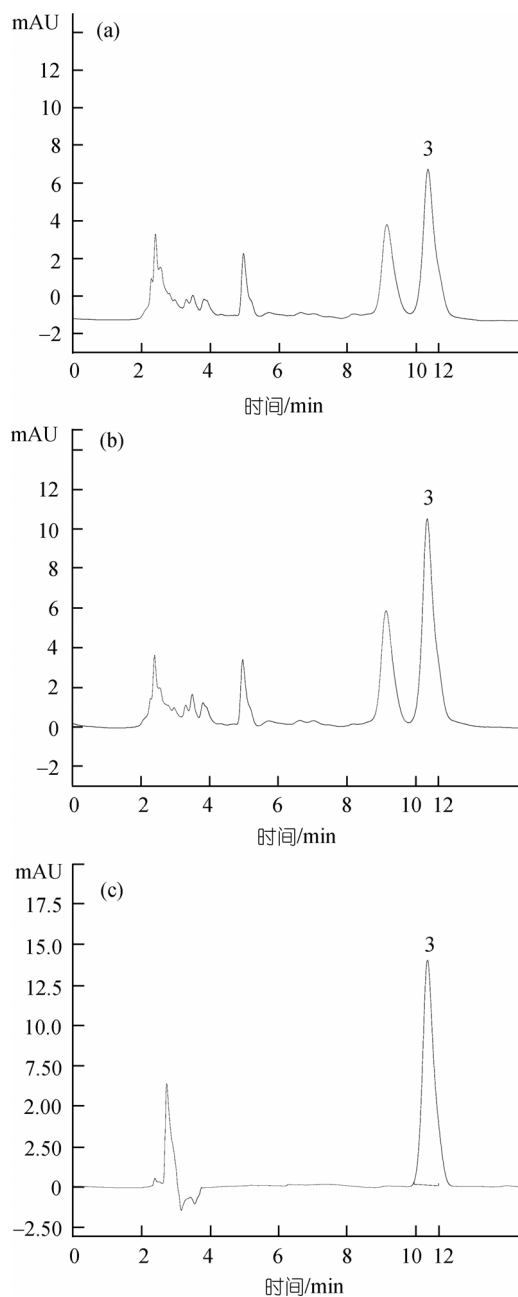


图 4 甘草苷(LQ)的 HPLC 图

(a) 对照组根; (b) 太空组根; (c) 标准品; 3 LQ(甘草苷)

前期对于卫星搭载的甘草种子的生理生化变化研究表明, 在干旱条件下种子具有高萌发率和 POD, CAT 酶活性, 表明太空搭载种子比对照组更能对抗干旱环境. 本实验中卫星搭载甘草的 DNA 诱变作用通过一种有效的检测基因多态性的方法(ISSR)进行.

植物次生代谢产物是用于治疗天然药物和药用植物的主要活性成分, 但是很少有关于太空对次生代谢产物产生影响的报道^[16]. 本实验采用HPLC法分析表明, 甘草根中甘草酸(GA)和甘草苷(LQ)的含量比对照组高, 因此推断在太空飞行后, 甘草酸和甘草苷的生物合成途径已经产生了变化. 这表明太空环境可能影响了甘草次生代谢产物一些功能基因的表达.

为了更深入地了解太空环境对代谢作用的诱变作用, 需要进一步研究太空环境对若干代的诱变作用, 以及相关基因的克隆和测序.

本实验中甘草种子搭载于一可返回式卫星后并种植于地面, 首次使用ISSR技术对太空飞行过的甘草基因多态性进行研究. 结果显示, 太空搭载后的种子产生了不同条带, 表明甘草基因发生了诱变作用. 蒋兴村等人^[17]研究了卫星搭载对水稻种子遗传性的影响, 认为航天诱变材料一般在诱变第 1 代生长发育发生变异, 到第 2 代大多数性状发生广谱分离, 在第 3 代中, 这些变异的性状基本稳定地遗传给后代.

HPLC 结果表明, 太空组(对太空种子发育成熟的根进行测定)甘草酸和甘草苷的含量明显比对照组高. 所有这些研究对于解释太空环境对于药用植物代谢产物的分子诱变机制具有重要作用. 太空诱变育种对于药用植物育种是一个新的、有效的方法.

研究表明, 太空环境引起的生物的变异有些是可以遗传的, 某些材料已经产生了经济效益^[18], 如小麦、大麦、水稻和番茄等. 太空育种产生的优良种质可以丰富种质资源, 并且可以加快育种速度^[19]. 这是关于太空育种甘草的初步报道, 更多研究正在进行中.

参考文献

- 1 Cristina F, Michael E, Eugenio R, et al. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. *J Ethnopharmacology*, 2005, 99: 317—324^[DOI]
- 2 Suzuki H, Ohta Y, Kakino T, et al. Effects of glycyrrhizin on biochemical tests in patients with chronic hepatitis. *Asian Medical Journal*, 1983, 26: 423—438

- 3 Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*, 2003, 361: 2045—2046[DOI]
- 4 Taniguchi C, Homma M, Takano O, et al. Pharmacological effects of urinary products obtained after treatment with Saiboku-To, a herbal medicine for bronchial asthma, on type IV allergic reaction. *Planta Medica*, 2000, 66: 607—611[DOI]
- 5 Shibano M, Kawase S. Basic studies for cultivation of *Glycyrrhiza uralensis*. *Natural Medicines*, 2000, 54: 70—74
- 6 Fenwick J, Lutomski C N. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.—Composition, uses and analysis. *Food chemistry*, 1990, 38: 119—143[DOI]
- 7 Yutaka Y, Takami M, Ikuro S, et al. Pharmaceutical evaluation of *Glycyrrhiza uralensis* roots cultivated in eastern Nei-meng-gu of China. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26: 1144—1149[DOI]
- 8 Mashinsky A L, Nechitailo G S. Results and prospects of studying the gravitationally sensitive systems of plants under conditions of space flight. *Space Research*, 2001, 39: 1—12
- 9 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: 122—127[DOI]
- 10 丘明新, 刘家琼. 我国干旱地区甘草草地资源的利用与保护. *自然资源学报*, 1993, 8: 314—321
- 11 Belyavskaya N A. Biological effects due to weak magnetic field on plants. *Adv space ares*, 2004, 34: 1566—1574[DOI]
- 12 Nechitailo G S, Lu J Y, Xue H, et al. Influence of long term exposure to space flight on tomato seeds. *Adv Space Res*, 2005, 36: 1329—1333[DOI]
- 13 Jian J Q, Rong C M, Xiang D C, et al. Analysis of genetic variation in *ganoderma lucidum* after space flight. *Advances in space research*, 2003, 31: 1617—1622[DOI]
- 14 Gao W Y, Lei F, Paek K Y, et al. Spaceflight of platycodon grandiflorum seeds changes ultrastructure of pedicel and style cells. *J Kor Soc Hort Sci*, 2000, 41: 545—549
- 15 Gao W Y, Shu P Z, Xue L, et al. Effects of spaceflight on medicinal plant *Agastache rugosa*. *China J Chin Materia Medica*, 1999, 24: 203—205
- 16 Gao W Y, Jia W, Xiao P G. Utilization of spaceflight technology on medicinal plant study. *China J Chin Materia Medica* 2004, 29: 611—614
- 17 蒋兴村, 李金国, 陈芳远, 等. “8885” 返地卫星搭载对水稻种子遗传性的影响. *科学通报*, 1991, 36(23): 1820—1824
- 18 Jiang X C. The progression and prospect of the space mutation breeding on crops. *Aerospace China*, 1997, 2: 5—8
- 19 Jia J H, Wang B. Progress in space mutagenesis breeding. *Acta Agriculture Nucleatae Sinica*, 1999, 13 (3): 187—192