

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射和 PEG 胁迫对紫花苜蓿组培苗生理指标及基因组 DNA 甲基化水平的影响

朱琨, 柳英卓, 刘畅, 李珊珊, 刘鑫宇, 李波

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 抗性基因工程与寒地生物多样性保护黑龙江省重点实验室,
黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:【目的】探究紫花苜蓿(*Medicago Sativa*)对 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射和聚乙二醇-6000(PEG)模拟干旱胁迫生理及DNA甲基化水平的影响。【方法】以3种愈伤组织分化组培苗为材料,其中G3和G4为辐射紫花苜蓿种子的变异植株叶片愈伤组织分化组培苗,CK为未辐射苗,对3种组培苗分别进行PEG胁迫,分析其生理指标及基因组DNA甲基化水平的变化。【结果】紫花苜蓿组培苗对辐射和PEG胁迫的生理响应不同,辐射提高其渗透调节物质(可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸)含量、过氧化物酶(POD)活性和相对电导率(RC),降低了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量;3种渗透调节物质含量及POD和SOD活性均随PEG胁迫浓度增加呈先增后降变化趋势,CAT活性、MDA含量和RC均随PEG胁迫浓度增加而增加。隶属函数值综合分析,3种紫花苜蓿组培苗抗旱性强弱为 $G4>G3>CK$ 。【结论】辐射增加甲基化水平($G4>CK$),PEG胁迫降低甲基化水平。 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射可提高紫花苜蓿组培苗抗旱性,可通过DNA甲基化修饰调节对辐射和干旱胁迫响应,诱导的基因组表观遗传变化在紫花苜蓿突变体筛选和适应干旱环境中发挥重要的调控作用。

关键词:紫花苜蓿组培苗; $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射;PEG胁迫;生理指标;DNA甲基化

中图分类号:S541.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)06-0053-09

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2024.06.006



紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是抗旱且需水较多的豆科牧草,其营养价值为牧草之首,水分匮乏时会受到干旱胁迫的危害,从而导致其产量等农艺性状的变化,此时紫花苜蓿体内发生了一系列的生理反应,以消除或减轻干旱胁迫的危害^[1-2]。提高紫花苜蓿对干旱的耐受能力,将极大地促进我国紫花苜蓿产业的发展和对生态环境的改良^[3]。近十几年来,我国草原生态环境脆弱,优良牧草退化严重,利用辐射诱变结合

组织培养技术可在短期内获得有价值的突变体,提高农作物变异频率,根据育种目标选择可直接利用的新品种或作为有开发价值的种质资源^[4],可大大提高草地生产能力,改良牧草品质,提高牧草抗逆性。目前辐射诱变技术已成为一种有效的育种方法,已经在海滨雀稗(*Paspalum vaginatum*)^[5]、沟叶结缕草(*Zoysia matrella*)^[6]、鹅观草(*Roegneria sp.*)^[7]等牧草育种中得到广泛应用,经过辐射后筛选出的抗旱性更好的植株。

植物DNA的甲基化水平在植物非生物胁迫过程中发挥着重要的调控作用,可通过激活胁迫相关基因的表达等方式引起植物DNA甲基化水平的变化,从而增强植物抵御和适应干旱胁迫的能力^[8]。DNA甲基化比较稳定,形成后可遗传给后代,前人应用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)、高效液相色谱法(HPLC)等技术研究了高羊茅(*Festuca arundina-*

收稿日期:2023-10-09;**修回日期:**2023-12-04

基金资助:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(145109312);2023年国家级大学生创新创业训练计划项目(202310232055)

作者简介:朱琨(1986-),女,黑龙江鹤岗人,博士研究生,副教授,主要从事园林植物资源和抗性研究。
E-mail:zhukunyuanyuan@163.com

*通信作者。E-mail:libo1962@163.com

cea)^[8]、老芒麦(*Elymus sibiricus*)^[9]和紫花苜蓿^[10]等牧草基因组胞嘧啶甲基化水平的变化,分析逆境胁迫下甲基化模式差异。本研究通过聚乙二醇—6000模拟干旱胁迫,比较不同干旱胁迫程度对辐射和未辐射苜蓿组培苗生理的响应,初步分析DNA甲基化水平与苜蓿对辐射和干旱胁迫响应之间的关系,为开辟苜蓿抗旱分子育种提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

紫花苜蓿龙牧806叶片诱导愈伤组织分化的组培苗由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院植物组织培养研究室提供,其中⁶⁰Co— γ 射线辐射苜蓿种子获得的高株叶片G3(800 Gy)、G4(600 Gy)和未辐射种子植株叶片愈伤组织分化组培苗^[11]分别记为G3、G4、CK。

1.2 试验方法

1.2.1 苜蓿组培苗继代培养 在MS基本培养基(MS+30 g蔗糖+8.5 g琼脂粉)中,对龙牧806苜蓿叶片诱导愈伤组织分化的组培苗(G3、G4、CK)剪取单芽茎段进行继代培养。

1.2.2 组培苗PEG胁迫处理 将对照(CK)组培苗切取单芽茎段接种于MS基本培养基中,每个培养瓶接种4~6个单芽茎段,待茎段培养至带有4~5个茎节(约为6~8 cm)时即可用于模拟干旱胁迫处理。将组培苗分别转入含有15%、20%、25%、30%和35%PEG—6000(简称为PEG)浓度培养基中进行胁迫处理,每种浓度PEG的MS培养基中转入30株组培苗,在光照培养架上培养,观察组培苗形态的变化,统计处理3 d后组培苗的存活率,试验设置3次重复,确定有效的PEG胁迫浓度。

在筛选的有效PEG胁迫浓度范围内,对CK、G3、G4组培苗进行同样方法的模拟干旱胁迫处理,在解除干旱胁迫后,将3种组培苗转接在MS基本培养基中,对PEG胁迫下存活的苜蓿组培苗进行扩大培养和相关生理指标的测定。

1.2.3 生理指标测定 对苜蓿组培苗进行渗透调节物质、抗氧化酶活性、膜脂过氧化产物和膜透性测定,试验设置3次重复。

渗透调节物质测定:可溶性蛋白(Soluble protein,

SP)含量采用考马斯亮蓝法测定,可溶性糖(Soluble sugar,SS)含量采用蒽酮比色法测定,脯氨酸(Proline, Pro)含量采用酸性茚三酮法测定^[12]。

抗氧化酶活性测定:过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性采用愈创木酚比色法测定,过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性采用分光光度法测定、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性采用NBT光化还原法测定^[13]。

膜脂过氧化产物和膜透性测定:丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸法,相对电导率(Relative conductivity, RC)采用电导法^[13]。

1.2.4 HPLC法测定组培苗基因组甲基化水平 DNA的提取及水解:利用植物基因组提取试剂盒(TIANGEN)对苜蓿组培苗基因组DNA进行提取,按试剂盒说明书进行操作。使用NanoDrop 2000对所提取的基因组DNA浓度进行测定。

总DNA煮沸变性后置于冰上静置5 min,在100 μ L(约含3 μ g)的DNA溶液中加入70%高氯酸50 μ L,在沸水中水解60 min,后用5 mol/L的KOH将pH值调到3~5,12 000 r/min离心10 min,取上清过滤后进行HPLC测定。将所得样品用1 mL的dd H₂O溶解,上样前用0.22 μ m微孔滤膜过滤。

基因组HPLC检测:高效液相色谱仪为Agilent Technologies 1290 Infinity II,紫外检测波长285 nm;色谱柱为ZORBA $\times$ RRHD Eclipse plus C18;流动相为10 mmol/L磷酸二氢钾,柱体积为4.6 $\times$ 250 mm;流速为0.35 mL/min,进样量为0.6 μ L,柱温为30 $^{\circ}$ C。

标准曲线绘制:参考陈强方法^[14],精确称取胞嘧啶(C)和5-甲基胞嘧啶(5-mC)标准品各10 mg溶于1 mL高氯酸中,稀释至4、10、20和50 mg/L 4个浓度,根据各成分峰面积和浓度绘制标曲。总甲基化水平(%)=5-mC/(C+5-mC) $\times$ 100%,C和5-mC分别是2种形式C的浓度,由标准曲线计算得出。

1.2.5 抗旱性综合评价 抗旱性综合评价采用隶属函数法,所有指标的处理组数据代入隶属函数公式(正相关指标)或反隶属函数公式(负相关指标),对各指标进行处理得到各指标的隶属值,累加后求得平均抗旱隶属值。

隶属函数值公式: $R(X_{ij}) = (X_{ij} - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$,反隶属函数值为 $R(X_{ij}) = 1 - (X_{ij} - X_{\min}) / (X_{\max} -$

$X_{\min}$), X_{ij} 表示 i 基因型 j 指标的干旱胁迫系数, $X_{\max}$ 、 $X_{\min}$ 分别表示各指标的最大和最小抗旱胁迫系数。

抗性隶属值累加平均隶属值公式: $X = \sum U(X_{ij}) / n$, 其中 X 为平均抗旱性的隶属函数值

每个单项指标的抗旱胁迫系数 = (不同胁迫处理下平均测定值 / 对照平均测定值) $\times 100\%$ [15]

权重系数 $W_i = R_i / \sum R$, W_i 为 i 指标在所有综合指标中的权重系数, R_i 为某一指标的权重, $\sum R$ 为各指标的总权重。

综合评价 (D) = 隶属函数值 $\times$ 权重系数

1.2.6 数据处理与分析 采用 Excel 2010 对数据进行整理, SPSS 21.0 分析软件对各生理数据进行方差分析 (ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫对苜蓿组培苗存活率的影响

对 15%~35% PEG 胁迫浓度 3 d 的苜蓿组培苗存活率进行分析, 15% PEG 胁迫浓度组培苗存活率为 83.30%, 而 35% 的 PEG 胁迫浓度组培苗存活率仅为 13.33%。根据 15%~35% PEG 胁迫浓度组培苗存活率变化建立线性关系, 得到回归方程 $y = -2.4828x + 107.83$ ($R^2 = 0.940$), 可知 PEG 胁迫半致死和致死浓度分别为 23.29% 和 43.43%, 因此选择 15%、20%、

25% 和 30% PEG 浓度对组培苗进行各生理指标测定分析。

2.2 辐射和 PEG 胁迫对苜蓿组培苗生理生化指标的影响

2.2.1 渗透调节物质 辐射处理下苜蓿组培苗 3 种渗透调节物质含量的变化见表 1。G3 和 G4 在未 PEG 胁迫下, 可溶性蛋白含量分别为 CK 的 2.49 和 7.32 倍, 可溶性糖含量分别为 CK 的 1.44 和 2.12 倍, 脯氨酸含量分别为 CK 的 1.55 和 1.32 倍, G3 和 G4 的可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸含量均高于 CK, 辐射组的 3 种渗透调节物质含量与其未辐射组比较差异均显著 ($P < 0.05$), 说明一定辐射处理的苜蓿组培苗可积累更多的 3 种渗透调节物质。

3 种组培苗渗透调节物质含量均随 PEG 胁迫浓度增加呈先增后降的趋势 (图 1)。组培苗在 20% PEG 胁迫浓度时可溶性蛋白含量最高, 胁迫 CK、G3 和 G4

表 1 辐射对组培苗渗透调节物质含量的影响

Table 1 Effects of radiation on the content of osmotic regulatory substances in tissue cultured seedlings

材料	SP 含量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	SS 含量/%	Pro 含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
CK	1.32 ± 0.11^c	1.08 ± 0.04^c	18.70 ± 0.25^c
G3	3.28 ± 0.14^b	1.56 ± 0.03^b	28.98 ± 0.33^a
G4	9.64 ± 0.13^a	2.30 ± 0.03^a	24.70 ± 0.33^b

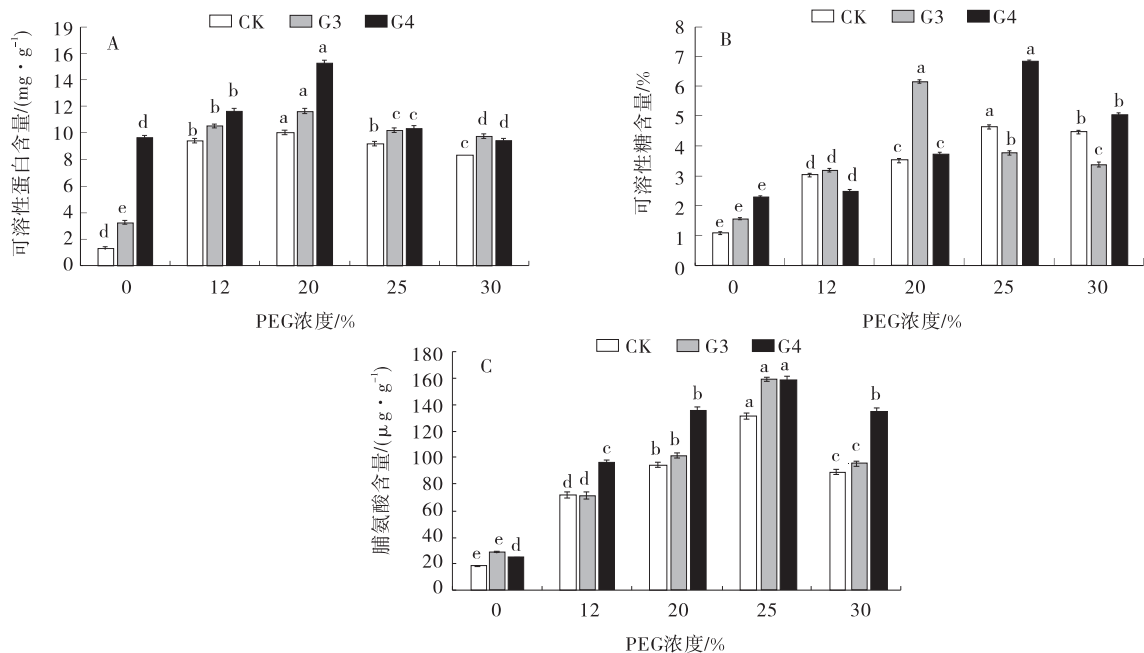


图 1 PEG 胁迫下组培苗渗透调节物质含量的变化

Fig. 1 Changes in the content of osmotic regulatory substances in tissue cultured seedlings under PEG stress

注: 不同小写字母表示同组组培苗的不同处理间差异显著水平 $P < 0.05$, 下同。

的SP含量分别为未胁迫CK的7.61、8.84和11.58倍,可溶性蛋白含量为G4>G3>CK(图1-A);组培苗可溶性糖含量在20%或25%PEG胁迫浓度时可溶性糖含量最高,胁迫CK、G3和G4的可溶性糖含量分别为未胁迫CK的4.29、5.69和6.31倍(图1-B);组培苗在25%PEG胁迫浓度时脯氨酸含量最高,胁迫CK、G3和G4的脯氨酸含量分别为未胁迫CK的7.01、8.52和8.50倍,脯氨酸含量为G3>G4>CK(图1-C)。PEG胁迫组培苗3种渗透调节物质含量均高于其未胁迫组,除G4的30%PEG胁迫组的可溶性糖含量外,其他各胁迫组3种渗透调节物质含量与其未胁迫

胁迫CK比较差异均显著($P<0.05$),总体分析在一定的PEG胁迫下,3种组培苗均可积累更多的可溶性蛋白、可溶性糖和脯氨酸。

2.2.2 抗氧化酶活性 G3和G4在未PEG胁迫下,POD活性为CK的1.19和1.68倍,SOD活性为CK的0.56和0.82倍,CAT活性为CK的0.89和0.82倍,辐射组培苗的POD活性均高于未辐射组,SOD和CAT活性均低于未辐射组,除G3的SOD活性外,其他辐射组的3组抗氧化酶活性与其未辐射组比较差异均显著($P<0.05$),辐射提高了POD活性(表2),但降低了SOD和CAT活性。

表2 辐射对组培苗抗氧化酶活性的影响

Table 2 Effects of radiation on antioxidant enzyme activity in tissue cultured seedlings

材料	POD活性/($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	SOD活性/($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	CAT活性/($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
CK	13 333.33 $\pm$ 440.96 ^c	87.70 $\pm$ 10.85 ^a	4 293.33 $\pm$ 83.27 ^a
G3	15 888.89 $\pm$ 693.89 ^b	49.22 $\pm$ 16.18 ^{ab}	3 833.33 $\pm$ 61.10 ^b
G4	22 388.89 $\pm$ 254.59 ^a	71.59 $\pm$ 13.24 ^b	3 506.67 $\pm$ 30.55 ^c

苜蓿组培苗POD活性(图2-A)和SOD(图2-B)活性均随PEG胁迫浓度增加呈先增后降的趋势,CAT活性随PEG胁迫浓度增加而增加(图2-C)。组培苗在25%PEG胁迫浓度时POD和SOD活性最高,CK、G3和G4的POD活性为未胁迫CK的2.54、3.26和5.79倍,POD活性为G4>G3>CK,CK、G3和G4的SOD活性为未胁迫CK的2.59、2.68和2.11倍,

SOD活性为G3>CK>G4;组培苗在30%PEG胁迫浓度时CAT活性最高,CK、G3和G4的CAT活性为未胁迫CK的1.29、0.58和0.89倍,CAT活性为CK>G4>G3。除CK和G4的15%PEG胁迫组的SOD活性和25%和30%PEG胁迫组的CAT活性外,其他各胁迫组的POD和SOD活性均高于其未胁迫CK,CAT活性低于其未胁迫CK。除G3的15%

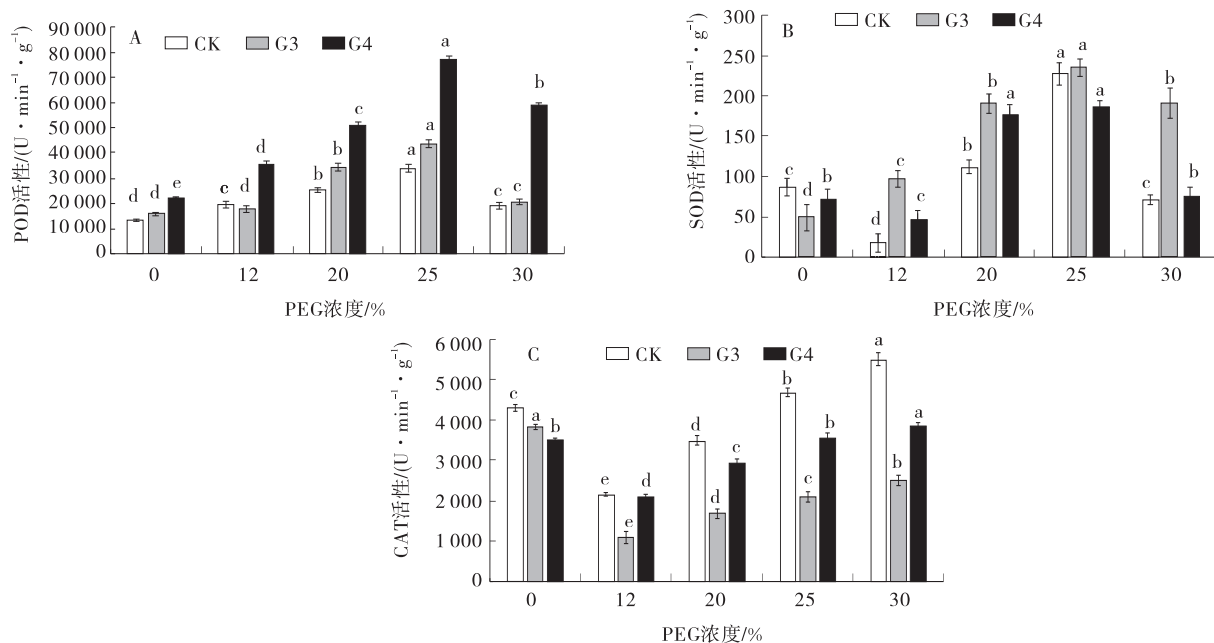


图2 PEG胁迫下组培苗抗氧化酶活性的变化

Fig. 2 Change of antioxidant enzyme activity of tissue culture seedlings under PEG stress

PEG 胁迫组的 POD 活性和 CK、G4 的 30% PEG 胁迫组的 SOD 活性外,其他各胁迫组 3 种抗氧化酶活性与其未胁迫 CK 比较差异均显著($P<0.05$),说明在一定浓度的 PEG 胁迫下,可以改变苜蓿组培苗 3 种抗氧化酶活性。

2.2.3 膜脂过氧化产物和膜透性 G3 和 G4 在未 PEG 胁迫下,MDA 含量分别为 CK 的 11.07 和 1.19 倍,相对电导率分别为 CK 的 0.91 和 0.98 倍,辐射组培苗的 MDA 含量均高于未辐射组,相对电导率低于未辐射组,辐射组的 MDA 含量和相对电导率与其未辐射组比较差异均显著($P<0.05$),说明一定辐射剂量可以改变苜蓿组培苗的膜脂氧化程度和膜透性(表 3)。

苜蓿组培苗 MDA 含量和相对电导率的变化均随

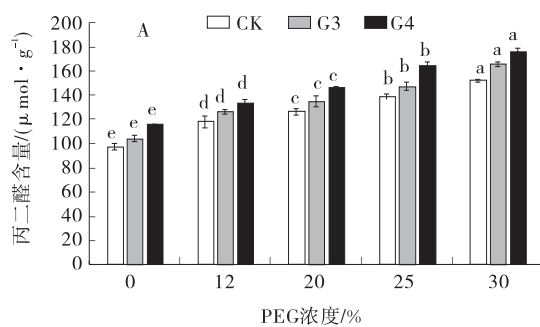


表 3 辐射对组培苗 MDA 含量和相对电导率的影响
Table 3 Effects of radiation on MDA content and relative electrical conductivity in tissue cultured seedlings

材料	MDA 含量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	相对电导率/%
CK	97.13 ± 2.72^c	21.61 ± 0.10^a
G3	103.96 ± 2.77^b	19.71 ± 0.17^b
G4	115.54 ± 0.33^a	21.12 ± 0.19^a

PEG 胁迫浓度增加呈增加趋势(图 3)。30% PEG 胁迫下,CK、G3 和 G4 的 MDA 含量为其未胁迫组 CK 的 1.57、1.71 和 1.81 倍,MDA 含量为 $G4>G3>CK$ (图 3-A)。CK、G3 和 G4 的相对电导率为其未胁迫组 CK 的 2.64、2.31 和 2.55 倍,RC 为 $CK>G4>G3$ (图 3-B)。随着 PEG 胁迫程度的增加,3 种组培苗的膜脂氧化程度和膜透性增加,胁迫组 MDA 含量和相对电导率与其未胁迫 CK 比较差异均显著($P<0.05$)。

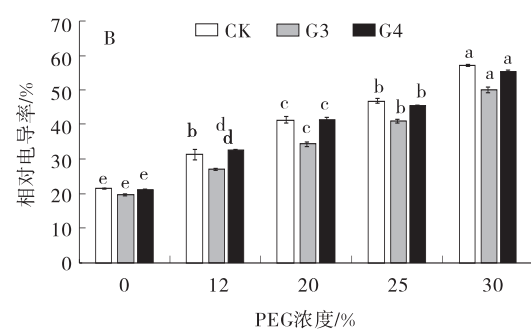


图 3 PEG 胁迫下组培苗 MDA 含量和相对电导率的变化

Fig. 3 Changes of MDA content and relative electrical conductivity of tissue culture seedlings under PEG stress

2.2.4 苜蓿组培苗抗旱性综合分析 依据 3 种苜蓿组培苗各单项指标抗旱胁迫系数的变化幅度,得出各单项指标对 PEG 胁迫的敏感程度,结果为可溶性蛋白含量>脯氨酸含量>可溶性糖含量>POD 活性>相对电导率>SOD 活性>MDA 含量>CAT 活性。其中可溶性蛋白和脯氨酸含量对于干旱胁迫的敏感性较大,CAT 活性的敏感性较小(表 4)。

利用 3 种苜蓿组培苗各单项指标抗旱胁迫系数,采用隶属函数法和综合 D 值法,对 3 组组培苗在各 PEG 胁迫处理下的生理指标变化进行综合评价(表 5),结果表明 3 组组培苗的耐旱性综合评价结果由大到小依次为 $G4>G3>CK$,G4 的抗旱性最强。

2.4 辐射和 PEG 胁迫对苜蓿基因组 DNA 甲基化水平的影响

2.4.1 基因组 DNA 的浓度和纯度检测及标准样品甲基化变化 用 NanoDrop 2000 检测基因组 DNA 的

含量和纯度,苜蓿组培苗基因组 DNA 的含量和纯度均符合试验要求,即纯度在 A_{260}/A_{280} 比值为 1.7~1.8。样品 C 的出峰时间为 0.374 min,样品 5-mC 的出峰时间为 0.538 min(图 4)。C 和 5-mC 的标曲方程分别为 $Y=1.849X$ ($R^2=0.9788$) 和 $Y=1.806X$ ($R^2=0.9818$),其中纵坐标 Y 为峰面积,单位 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$,横坐标 X 为浓度,单位 $\mu\text{mol/L}$ 。依据标曲方程和总甲基化水平计算公式可知各处理样品基因组 DNA 甲基化水平。

2.4.2 辐射和 PEG 胁迫对苜蓿组培苗基因组 DNA 甲基化水平的影响 CK 和 G4 组培苗基因组 DNA 甲基化水平约为 21%~23%,组培苗在未干旱和 25% PEG 胁迫下,G4 基因组 DNA 甲基化水平分别为对照的 1.02 倍和 1.04 倍,G4 基因组 DNA 甲基化水平均高于 CK,且 PEG 胁迫后两组组培苗的 DNA 甲基化水差异显著($P<0.05$)(图 5)。G4 基因组 DNA 甲基化水

表 4 PEG 胁迫下苜蓿组培苗的抗旱胁迫系数

Table 4 Drought resistance coefficients of alfalfa tissue culture seedlings under PEG stress

PEG 浓度/%		抗旱胁迫系数							
		SP	SS	Pro	MDA	RC	POD	SOD	CAT
CK	15	7.152	2.805	3.847	1.214	1.444	1.458	0.204	0.505
	20	7.608	3.244	5.050	1.300	1.909	1.896	1.276	0.815
	25	6.954	4.290	7.011	1.428	2.164	2.542	2.592	1.093
	30	6.308	4.118	4.756	1.566	2.644	1.438	0.816	1.286
G3	15	7.981	2.950	3.821	1.300	1.256	1.346	1.112	0.255
	20	8.839	5.685	5.412	1.392	1.582	2.575	2.173	0.393
	25	7.728	3.473	8.523	1.517	1.892	3.258	2.684	0.491
	30	7.383	3.130	5.107	1.708	2.311	1.554	2.173	0.581
G4	15	8.839	2.287	5.149	1.373	1.502	2.638	0.531	0.491
	20	11.581	3.418	7.279	1.506	1.909	3.800	2.000	0.679
	25	7.834	6.307	8.504	1.694	2.092	5.792	2.112	0.828
	30	7.144	4.648	7.244	1.814	2.553	4.433	0.857	0.894
总和		95.351	46.355	71.703	17.812	23.258	32.730	18.530	8.311

表 5 苜蓿组培苗抗旱综合评价

Table 5 Comprehensive evaluation of drought resistance of alfalfa tissue culture seedlings

组别	隶属函数值								平均隶属函数值	综合 D 值
	SP	SS	Pro	MDA	RC	POD	SOD	CAT		
CK	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.250	0.092
G3	0.394	0.368	0.351	0.538	1.000	0.159	1.000	0.000	0.476	0.434
G4	1.000	1.000	1.000	0.000	0.105	1.000	0.152	0.525	0.598	0.807
权重系数	0.305	0.146	0.217	0.060	0.075	0.105	0.060	0.032		

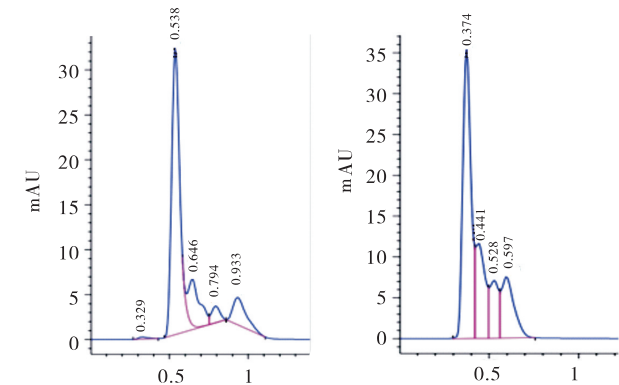


图 4 C 和 5-mC 标准液曲线色谱图

Fig. 4 Standard liquid curves chromatogram of C and 5-mC

平较 CK 略有提高,PEG 胁迫对 CK 和 G4 基因组 DNA 甲基化水平有所降低。

3 讨论

3.1 辐射和 PEG 胁迫对苜蓿生理生化指标的影响

⁶⁰Co- γ 射线辐射表现为低剂量辐射对植物产生刺激效应,高剂量辐射对植物产生抑制或伤害作用,

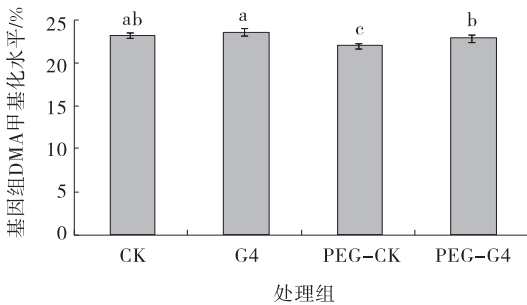


图 5 组培苗基因组 DNA 甲基化水平变化

Fig. 5 Changes of genomic DNA methylation level of tissue culture seedlings

影响细胞内生理生化反应,调控抗氧化酶活性系统等,辐射诱变可产生多种突变类型,但无明确方向性,因此必须对诱变材料进行定向选择,获得有目标的突变体^[16]。在逆境环境中植物细胞膜结构受损,膜脂过氧化程度加重,为了适应外界环境的改变,植物启动渗透调节和抗氧化酶系统防御机制来抵御逆境带来的伤害^[17]。本研究通过 600 Gy 和 800 Gy 低辐射剂量下获得的诱变材料,筛选出的突变体 G4 和 G3 抗旱性均高于 CK,其诱变效应明显,渗透调节物质含量、抗

氧化酶活性、膜脂过氧化和膜透性产生不同的变化。在干旱胁迫下,G3、G4的可溶性蛋白、脯氨酸和可溶性糖含量均高于CK,辐射处理组培苗可溶性蛋白、脯氨酸和可溶性糖含量增加,组培苗渗透调节物质含量变化与郝文芳^[17]研究结果相似;总体看G3、G4的POD和SOD活性高于CK,CAT活性低于CK,组培苗在不同干旱胁迫程度下抗氧化酶合成能力存在差异,POD、SOD和CAT活性变化与赵东晓^[18]的研究结果基本一致;辐射增加膜脂氧化程度,但膜透性影响不明显,干旱胁迫增加了组培苗MDA含量和相对电导率,随着干旱胁迫程度加大,组培苗的膜脂氧化程度和膜透性增加幅度不大,可能是干旱胁迫下启动不同的保护酶系统,有效控制了膜脂过氧化和增加膜稳定性^[19]。⁶⁰Co- γ 辐射通过积累渗透调节物质、提升抗氧化酶活性、维持细胞膜的稳定性来增强苜蓿组培苗的抗旱性。

3.2 辐射和PEG胁迫对苜蓿基因组DNA甲基化水平的影响

植物基因组的DNA中胞嘧啶甲基化主要以5-mC的形式存在,占DNA中胞嘧啶碱基的1/3,但不同物种中胞嘧啶的甲基化比例差别较大^[20]。研究发现辐射效应与表观遗传学调控的联系,诱变与非诱变胁迫条件下植物体能够通过适当调节基因组DNA甲基化,形成新的表观等位基因来应对特定环境^[21]。本研究中G4的基因组甲基化水平高于CK,说明⁶⁰Co- γ 射线诱导提高苜蓿组培苗基因组DNA的甲基化水平,这与郭慧琴^[22]利用HPLC等方法对卫星搭载后紫花苜蓿DNA甲基化变化结果一致,空间搭载提高了苜蓿DNA甲基化水平。

干旱等非生物胁迫可诱导植物DNA甲基化水平的变化,甲基化修饰在植物抵抗逆境胁迫过程中发挥着重要和积极的作用^[23]。干旱胁迫导致牧草DNA甲基化水平产生不同变化,如汤小梅^[24]等采用MSAP技术,对干旱胁迫下黑麦草的DNA甲基化变化进行了研究,全基因组范围内共检测到652个CCGG位点,对照和处理组的总甲基化水平为57.67%和47.39%,干旱胁迫降低了黑麦草总DNA甲基化水平。本研究采用HPLC技术,发现PEG胁迫显著改变苜蓿组培苗基因组DNA的甲基化水平,CK、G4的DNA甲基化水平在PEG胁迫下呈现降低的趋势,与前人的研究结果

一致;G4的DNA甲基化水平高于CK,可能与辐射改变植物基因组DNA甲基化水平有关,与张潇尹^[25]研究UV-B辐射对克隆植物活血丹表观遗传学指标(DNA甲基化水平)变化的结果相似,具体表现为DNA总甲基化水平的下降。基因组表观遗传变化在苜蓿突变体筛选和适应干旱环境中发挥重要的调控作用。深入研究可应用甲基特异性PCR(methylation specific PCR,MSP)等技术,分析辐射和胁迫下苜蓿甲基化模式和变异位点,以期揭示DNA甲基化与辐射诱变效应及甲基化与干旱胁迫间的关系提供依据。

4 结论

辐射和PEG胁迫导致苜蓿组培苗生理产生不同的变化,应用隶属函数法对8项指标变化进行综合评价,PEG模拟干旱胁迫下3组苜蓿组培苗耐旱性强弱为G4>G3>CK。对比辐射和PEG胁迫苜蓿组培苗基因组DNA的甲基化水平,辐射提高了苜蓿组培苗基因组DNA甲基化水平(G4>CK),PEG胁迫降低苜蓿组培苗基因组DNA甲基化水平,⁶⁰Co- γ 射线辐射诱变产生的基因组DNA甲基化水平的变化,可参与到苜蓿对于干旱环境的适应性调节。

参考文献:

- [1] 韩德梁,王彦荣.紫花苜蓿对于干旱胁迫适应性的研究进展[J].草业学报,2005,14(6):7-13.
- [2] 柴澍杰,吴一鸣,赵鑫龙,等.8份多叶羽扇豆种质幼苗对于干旱胁迫的生理响应及抗旱性评价[J].草原与草坪,2023,43(1):137-143.
- [3] 边佳辉,刘自扬,李宗英,等.紫花苜蓿基因工程改良研究进展[J].草业科学,2020,37(1):139-155.
- [4] 张聪,冯俊彦,李明,等.⁶⁰Co辐射诱变选育菜用甘薯耐旱材料[J].分子植物育种,2021,19(20):6827-6833.
- [5] 刘天增,谢新春,张巨明.海滨雀稗⁶⁰Co- γ 辐射诱变突变体筛选[J].草业学报,2017,26(7):62-70.
- [6] 林恬逸.沟叶结缕草愈伤组织干旱胁迫响应及其矮化突变体变异机理的研究[D].杭州:浙江大学,2020.
- [7] 王建丽,张月学,申忠宝,等.⁶⁰Co- γ 射线辐射鹅观草诱变效应研究初报[J].草原与草坪,2009,29(2):10-13.
- [8] 唐晓梅,王艳,马东伟,等.干旱胁迫下高羊茅基因组甲基化分析[J].草业学报,2015,24(4):164-173.
- [9] 闫伟红,马玉宝,陈云,等.干旱胁迫对老芒麦DNA表观遗传变化的MSAP分析[J].草原与草坪,2016,36(1):

- 1—6.
- [10] 赵媛媛. 蒺藜苜蓿逆境表观修饰调控及PcG家族成员鉴定、功能分析[D]. 兰州:兰州大学,2022.
- [11] 李波,刘畅,李红,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射苜蓿种子的变异植株叶片愈伤组织诱导及其诱变效应分析[J]. 干旱地区农业研究,2021,39(2):164—171.
- [12] 张蜀秋. 植物生理学技术教材[M]. 北京:科学出版社出版,2019.
- [13] 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2015.
- [14] 陈强,辛士刚,王俊伟,等. 水稻基因组DNA总甲基化水平测定方法[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2011,29(4):560—563.
- [15] 马菲,袁庆华,辛宝宝,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 诱变白三叶海发抗旱突变体幼苗的筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报,2017,22(1):29—40.
- [16] 胡瑶,张跃龙,李宏告,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射对砧根幼苗生理特性的影响[J]. 核农学报,2020,34(3):453—459.
- [17] 郝文芳,赵洁,蔡彩虹,等. 3种胡枝子抗氧化酶和渗透调节物质对干旱和增强UV-B辐射的动态响应[J]. 环境科学学报,2013,33(8):2349—2358.
- [18] 赵东晓,施新琴,董亚茹,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射及PEG胁迫对桑树幼苗生理特性和相关基因表达的影响[J]. 核农学报,2021,35(7):1485—1494.
- [19] 刘金龙,王莹,许爱云,等. 干旱胁迫下5种禾本科牧草幼苗期的生理特性[J]. 草业科学,2018,35(5):1106—1115.
- [20] 袁超,张少伟,牛义,等. 植物DNA甲基化作用机制的研究进展[J]. 生物工程学报,2020,36(5):838—848.
- [21] 杨震,郭会君,赵林妹,等. $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线诱导的小麦基因组DNA的甲基化变异[J]. 核农学报,2015,29(1):1.
- [22] 郭慧琴,任卫波,解继红,等. 卫星搭载后紫花苜蓿DNA甲基化变化分析[J]. 中国草地学报,2013,35(5):29—33.
- [23] 王日寰,王芳,王舰. 水分胁迫下马铃薯基因组DNA甲基化水平变化分析[J]. 分子植物育种,2020,18(7):2250—2257.
- [24] Tang X M, Tao X, Wang Y, *et al.* Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique[J]. Molecular genetics and genomics: MGG, 2014, 289(6):1075—1084.
- [25] 张潇尹. UV-B辐射对克隆植物活血丹生长的影响及其表观遗传学机制[D]. 西安:西北大学,2020.

Effects of $^{60}\text{Co}-\gamma$ radiation and PEG stress on physiological indexes and genomic DNA methylation levels of alfalfa tissue culture seedlings

ZHU Kun, LIU Ying-zhuo, LIU Chang, LI Shan-shan, LIU Xin-yu, LI Bo¹

(1. College of Agriculture, Forestry and Life Sciences, Qiqihar University, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Protection of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar 161006, China)

Abstract:【Objective】To explore the effects of alfalfa (*Medicago sativa*) on physiology and DNA methylation levels under $^{60}\text{Co}-\gamma$ radiation and polyethylene glycol 6000 (PEG—6000) stress. 【Method】Three kinds of callus differentiation tissue culture plantlets were used as materials, among which G3 and G4 were the callus differentiation tissue culture plantlets from the leaves of mutant plants irradiated with alfalfa seeds (CK was not irradiated). Three types of tissue cultured seedlings were subjected to PEG stress respectively, The changes of physiological indexes and genomic DNA methylation level were analyzed. 【Result】The physiological and biochemical responses of alfalfa tissue culture seedlings to radiation and PEG stress were different. Radiation increased the content of osmoregulatory substances (soluble proteins, soluble sugars, and proline), peroxidase (POD) activity, and relative conductivity (RC), and decreased the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (CAT), and malondialdehyde

(MDA) content. Content of three osmotic regulating substances, peroxidase and superoxide dismutase activities of the three types of tissue cultured seedlings showed a trend of first increasing and then decreasing with the increase of PEG stress concentration. The catalase activity, malondialdehyde content, and relative conductivity all showed an increasing trend with the increase of PEG constant worry concentration. According to the comprehensive analysis of membership function values for drought resistance coefficients of 8 physiological indicators, the order of drought resistance of the three alfalfa tissue culture seedlings is $G4 > G3 > CK$. 【Conclusion】 Comparing the methylation level of genomic DNA of tissue culture seedlings under radiation treatment and PEG stress, radiation increased the methylation level ($G4 < CK$), and PEG stress decreased the methylation level. $^{60}\text{Co}-\gamma$ radiation could improve the drought resistance of alfalfa tissue culture seedlings, and regulate the response to radiation and drought stress through DNA methylation modification. The induced epigenetic changes in the genome played an important regulatory role in screening alfalfa mutants and adapting to drought environments.

Key words: alfalfa tissue culture seedling; PEG stress; $^{60}\text{Co}-\gamma$ radiation; physiological and biochemical characteristics; DNA methylation

(责任编辑:刘建荣)