

辐射八宝景天 ISSR 遗传多样性分析

王欢欢¹, 郭春景², 张 兴³, 车代弟¹, 王金刚¹

(1. 东北农业大学 园艺学院园林系 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省科学院, 黑龙江 哈尔滨 150001, 3. 黑龙江省自然资源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要: 为研究辐射所得八宝景天植株的遗传多样性, 采用 ISSR 分子标记技术对 0、30、50 Gy 3 个梯度辐射所得的 6 株八宝景天突变体的亲缘关系进行分析, 以确定突变体之间的遗传差异。结果表明: 23 条 ISSR 引物能在 6 个植株间扩增出 175 条谱带, 其中 127 条是多态性谱带, 多态率高达 72.57%, 表现出了较高的多态性。从聚类树状图中可以看出, 6 个植株间的相似系数在 0.5805 ~ 0.7886, 平均相似系数为 0.6846, 对照植株和辐射植株有一定的差异性。随着辐射剂量的增大, 遗传距离增大, 相似系数减小, 相应的变异系数增大。

关键词: 八宝景天; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S 688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)09-0149-03

八宝景天 (*Sedum spectabile* Baireau) 为景天科景天属, 别名蝎子草, 多年生草本。作为地被植物, 生长繁茂, 铺地景观极佳, 可有效弥补乔灌木生长缓慢、下层空隙大等不足, 园林中常用来布置花坛、岩石园、花境。其抗逆性强, 管理粗放, 已成为景观设计中不可缺少的园林植物。⁶⁰Co- γ 射线辐照能提高植物的突变频率, 促进遗传基因重组, 有利于远缘杂交成功, 对提高育种效率具有重要的理论和生产实践意义。现采用景天扦插植株与⁶⁰Co- γ 射线结合进行辐射育种, 此研究未见报道。因此, 采用 ISSR 分子标记技术, 对不同梯度辐射所得突变体的亲缘关系进行分析, 以确定突变体之间的遗传差异, 可为景天育种方面提供分子生物学依据¹⁻²。

1 材料与方法

1.1 试验材料

八宝景天植株由黑龙江省科学院自然资源研究所提供。钴源由黑龙江省科学院物理研究所提供, 放射能量为 15×10^4 Ci。取八宝景天顶部株茎 7 ~ 8 cm 留 3 ~ 4

片新发嫩叶, 扦插生根后进行辐射处理, 辐射剂量为 0、30、50 Gy^[3], 剂量率 10 Gy/min。用于 ISSR-PCR 反应的 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶等购自上海生工, 引物由北京赛百胜公司合成。

1.2 试验方法

辐射 50 d 后取形态变异八宝景天新生幼叶 6 株, 编号 M-0(0 Gy), M-1(30 Gy), M-2(50 Gy), M-3(50 Gy), M-4(50 Gy), M-5(50 Gy) 共 6 个 (见图 1), 采用改良 CTAB 法可提取高纯度、高浓度的 DNA (图 1)。优化后 ISSR 反应条件: 总体积 20 μ L, 10 \times PCR-Buffer 2.0 μ L, Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTPS 2 mmol/L, 引物 0.75 μ mol/L, 模板 DNA 为 25 ~ 30 ng, *Taq* DNA 聚合酶 1 U^[4,5]。

扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min, 35 个热循环, 每个热循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 结束循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min。扩增后在浓度 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外分析仪检测并照相。

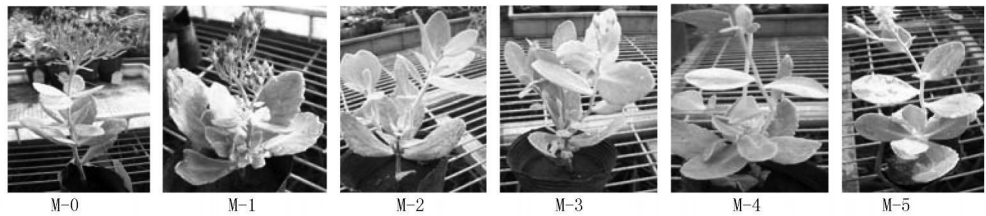


图 1 6 个八宝景天样品表形图

第一作者简介: 王欢欢(1984), 女, 黑龙江省密山人, 在读硕士, 研究方向为园林植物遗传育种。

通讯作者: 郭春景(1962), 男, 博士, 研究员, 现主要从事园林生态研究工作。E-mail: whhahaha@163.com。

收稿日期: 2010-01-26

1.3 数据处理与统计分析

对清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析, 按扩增条带有无计数, 某一扩增带出现则赋值为“1”, 不出现赋值为“0”, 把图形资料转换成数据资料。根据 *Nei-Li* 系

数法计算样品间的相似系数, 类平均方法 UPGMA 进行系统聚类分析。

2 结果与分析

2.1 6 株八宝景天的总 DNA 检测

采用改良 CTAB 法提取总 DNA 后用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 可看到整齐、完整、无拖尾、质量较高的 DNA 亮带(图 2)。

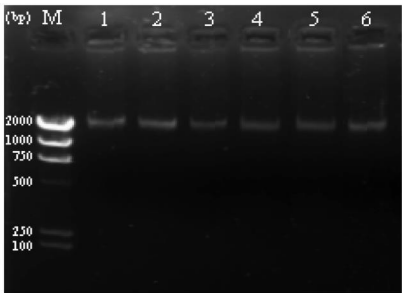


图 2 6 个八宝景天总 DNA 的电泳图

2.2 ISSR 分子标记结果分析

在随机选择的 93 条 ISSR 引物中选出扩增谱带清晰且重复性好的 23 条引物(表 1)。由图 3 可知 6 个植株之间多态性条带清晰可辨, 共扩增出 175 条谱带, 每个引物可扩增出谱带 5~10 条, 平均扩增出 7.6 条谱带, 其

中多态性条带共计 127 条 多态率达 72.57%。扩增条带多态性最高的引物是 FI-18、FI-33、FI-35、FI-41、FI-43、FI-72 多态率高达 80%以上。

表 1 23 个 ISSR 随机引物扩增结果

引物编	序列(5'-3')	扩增带	多态性条	多态率
		总数/ 条	带数/ 条	/ %
FI-16	TCT CTC TCT CTC TCT CC	9	6	66.67
FI-17	TCT CTC TCT CTC TCT CG	8	5	62.50
FI-18	ACA CAC ACA CAC ACA CT	8	7	87.50
FI-19	ACA CAC ACA CAC ACA CC	8	5	62.50
FI-20	ACA CAC ACA CAC ACA CG	7	5	71.43
FI-27	AGA GAG AGA GAG AGAG(CT)T	7	5	71.43
FI-28	AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)C	8	4	50.00
FI-29	AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)A	6	3	50.00
FI-33	GAG AGA GAG AGA GAG A(CT)T	10	10	100.00
FI-35	GAG AGA GAG AGA GAG A(CT)G	8	7	87.50
FI-37	CTC TCT CTC TCT CTC T(AG)C	9	7	77.78
FI-40	CAC ACA CAC ACA CAC A(AG)C	7	4	57.14
FI-41	CAC ACA CAC ACA CAC A(AG)G	7	6	85.71
FI-43	GTG TGT GTG TGT GTG T(CT)C	9	8	88.89
FI-47	TCT CTC TCT CTC TCT C(AG)G	6	4	66.67
FI-48	ACA CAC ACA CAC ACA C(CT)T	6	4	66.67
FI-49	ACA CAC ACA CAC ACA C(CT)A	7	5	71.43
FI-50	ACA CAC ACA CAC ACA C(CT)G	7	4	57.14
FI-66	GAC AGA CAG ACA GAC A	9	6	66.67
FI-69	GAT AGA TAG ACA GAC A	9	7	77.78
FI-72	CTT CAC TTC ACT TCA	6	5	83.33
FI-73	GGA GAG GAG AGG AGA	8	6	75.00
FI-81	(GGT)(AGT)(GGT) CAC ACA CAC ACA CA	6	4	66.67
合计		175	127	72.57

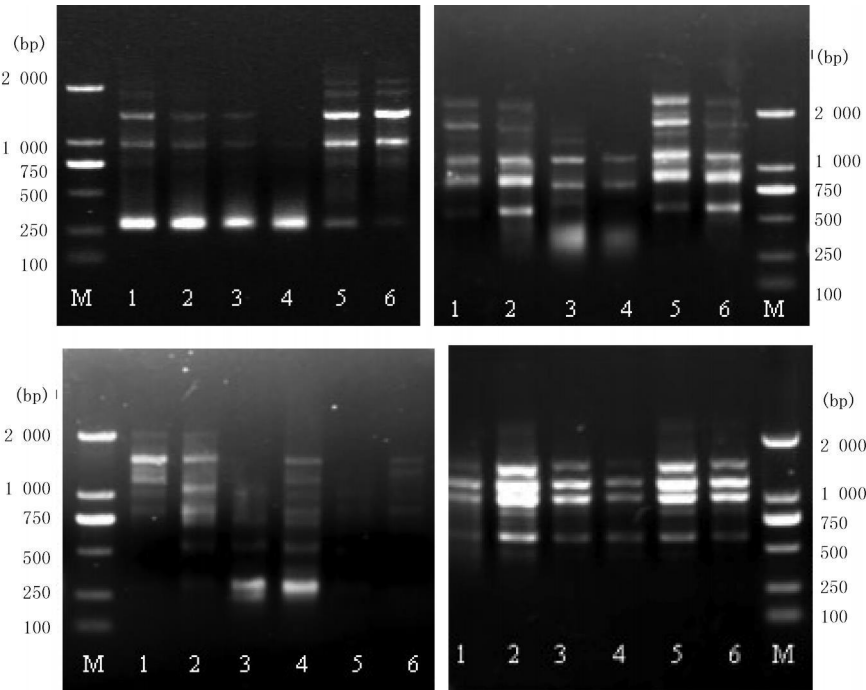


图 3 引物 FI-19、FI-18、FI-43、FI-66 对 6 种八宝景天 DNA 基因组扩增图谱

2.3 6 株八宝景天之间的遗传多样性分析

利用 NTsys 3.2 分析软件统计了 6 株景天之间的遗传相似系数, 对其进行聚类分析。从表 3 中可知, 6 个样品间的遗传相似系数在 0.5805~0.7886 之间, 平均相

似系数为 0.6846。

2.4 基于 ISSR 分子标记的聚类分析

如图 4 所示, 当相似系数取 0.6561 时, 所有的样品聚为一类, 说明植物材料间具有共同的遗传基础, 相似

性系数相对较高;当相似系数取 0.6886 时,样品间可分二大类,对照样品(M-0)与 30 Gy (M-1)聚为一类,50 Gy 所有样品聚为一类;当相似系数取 0.7011 时,所有样品分为 3 类,辐照剂量 50 Gy 的 M-2、M-3 样品得以区分出来;当相似系数取 0.7486 时,所有样品分为 4 类,对照样品(M-0)与 30 Gy (M-1)样品得以区分。当相似系数<0.7886 时,能够把 6 个样品全部区分开来。说明射线不同程度的影响了样品八宝景天基因组,随着辐射剂量由 0~50 Gy,辐照样品与对照样品的遗传距离增大,相似系数减小,相应的变异系数增大,也证明射线对样品的损伤效应直接或间接的作用在了基因水平上。

表 2 6 株景天植株基因型相似性系数矩阵

M-0	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	
M-0	1.0000					
M-1	0.7011	1.0000				
M-2	0.6149	0.6686	1.0000			
M-3	0.5805	0.7029	0.7486	1.0000		
M-4	0.6782	0.7200	0.6743	0.6514	1.0000	
M-5	0.6149	0.6686	0.7486	0.6800	0.7886	1.0000

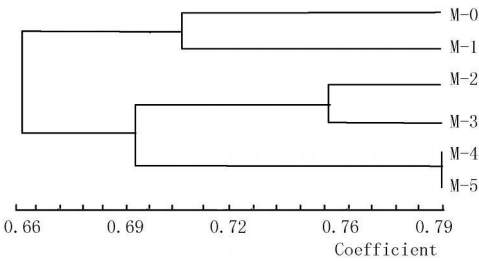


图 4 6 株景天植株的聚类分析图

3 结论与讨论

试验证明 ISSR 技术在鉴别辐射八宝景天遗传基因多样性方面的可行性。23 条引物能在 6 个样品间共扩增 175 条谱带,平均每条引物扩增 7.6 条,其中 127 条是多态性条带,多态率为 72.57%,表现出了较高的多态性。从聚类树状图可知,6 种植株间的相似系数在 0.5805~0.7886,平均相似系数为 0.6846。样品可聚成 2 类:0 Gy 与 30 Gy 可聚为 A 类;50 Gy 所有样品可聚为 B 类。结果也表明,随着辐射剂量 0、30、50 Gy 递增,植株的基因组 DNA 变异越明显。虽然 DNA 序列的多态性并不等于基因水平上的多态性,它仅是一种分子表型、基于 DNA 序列的变化,不一定是基因突变,但 DNA 序列上的碱基缺失、重复、移码等,却是产生基因突变的基础。所以随着辐照剂量的增大,植株 DNA 的可能突变的几率越高,可能的突变谱也越广,产生突变植株后代的几率和变异后代的变异程度也越高。该研究结论在生产上的实际应用还有待于进一步的验证,但为八宝景天辐射诱变育种研究提供了参考。

参考文献

[1] Urbina-Lopez D, Vicente Ramirez I. Morphological and molecular diversity of Agave tequilana Weber var. Azul and Agave angustifolia Haw. var. Lirio [J]. Industrial Crops and Products 2009, 29(1): 220-228.
[2] Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plantbreeding [J]. Euphytica, 2002, 128: 9-17.
[3] 史燕山, 骆建霞, 赵国防, 等. 晚香玉[®] Co-γ 射线辐射诱变适宜剂量的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 748-750.
[4] 刘美, 赵桂琴, 刘欢, 等. 早熟禾 ISSR 反应体系的优化[J]. 中国草地学报, 2009, 31(5): 107-111.
[5] 桂腾琴, 孙 敏, 乔爱民, 等. 正交设计优化果梅 ISSR 反应体系[J]. 果树学报, 2009, 26(1): 108-112.

Analysis on the Genetic Diversity of Radiated *Sedum spectabile* Bureau by ISSR

WANG Huan-huan¹, GUO Chun-jing², ZHANG Xing³, CHE Dai-di¹, WANG Jin-gang¹

(1. Department of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Heilongjiang Academy of Science, Harbin, Heilongjiang 150001; 3. Heilongjiang Natural Resources Research Institute, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: The aim was to discuss the genetic diversity of *Sedum spectabile* Bureau obtained by radiation. The genetic relationship of *Sedum spectabile* Bureau obtained by radiation with different gradient(0、30、50 Gy) was analyzed by ISSR molecularmarker technology to determine the genetic diversity among these mutants. 175 bands were amplified with 23 ISSR primers among 6 kinds of *Sedum spectabile* Bureau, of which, 127 bands were polymorphic and the polymorphism rate reached to 72.57%, which showed higher polymorphism. The dendrogram showed that the similarity coefficient among 6 kinds of plants were 0.5805~0.7886 and the average similarity coefficient was 0.6846. There were certain differences on the similarity coefficient between the control plant and radiated plants. The genetic distance between the radiated sample and the control sample was increased, the similarity coefficient was decreased and the corresponding variation coefficient was increased with the increment of the radiation dose.

Key words: *Sedum spectabile* Bureau; ISSR; genetic diversity