

郑玉红,张 智,陆 波,等. 多倍体诱导和 ^{60}Co γ 射线辐射对彩色马蹄莲 Parfait 分子水平遗传变异的影响 [J]. 江苏农业科学,2015,43(3):142-144. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.045

多倍体诱导和 ^{60}Co γ 射线辐射对彩色马蹄莲 Parfait 分子水平遗传变异的影响

郑玉红¹, 张 智², 陆 波¹, 韩福贵¹, 彭 峰¹, 华小平³

(1. 江苏省中国科学院植物研究所/南京中山植物园, 江苏南京 210014; 2. 江苏骏马农林科技股份有限公司, 江苏张家港 215600;

3. 江苏省东海县花卉研究推广站, 江苏东海 222300)

摘要:采用 RAPD 分子标记,对彩色马蹄莲 Parfait (Pr) 及其秋水仙素诱导的四倍体 (Pr-d) 和 20、40、60 Gy ^{60}Co γ 射线辐射诱变后代 (Pr-1、Pr-2 和 Pr-4) 分子水平的变异进行研究。从 40 个寡聚核苷酸引物种筛选出 14 个合适的引物进行扩增,5 个样品共扩增出位点 90 个,平均每个引物扩增出 6.29 个位点;其中,多态性位点 39 个,多态性位点的比率为 43.33%。此外,还观察到的等位基因数 (n_a) 为 1.4021 个,有效等位基因数 (n_e) 为 1.2965 个,Nei's 基因多样性 (h) 为 0.166 6,Shannon's 多样性指数 (I) 为 0.242 1。可见,多倍体诱导和辐射诱变使彩色马蹄莲 Parfait 在分子水平产生了一定的变异,丰富了彩色马蹄莲遗传多样性。通过聚类分析将 5 个样品可分为 2 支,其中 Pr、Pr-2 和 Pr-d 聚为一支,Pr-1 和 Pr-4 聚为一支。

关键词:多倍体;诱导;彩色马蹄莲;RAPD;遗传相似性;聚类分析;抗病育种;分子生物学

中图分类号: S335.21;S682.2⁺64.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0142-02

彩色马蹄莲 (*Zantedeschia hybrida*) 为天南星科 (Araceae) 马蹄莲属 (*Zantedeschia*) 多年生草本植物,原产于南非^[1]。自 20 世纪 80 年代末引入我国以来,彩色马蹄莲以其花色绚烂、花形高雅、观花期长而深受消费者的喜爱,因此被称为 21 世纪的“明星花卉”。彩色马蹄莲在栽培过程中最严重的病害是软腐病^[2],其在引种到我国长江中下游地区后受高温高湿的影响,软腐病病害问题更加突出,培育抗软腐病的彩色马蹄莲品种是解决这一问题的有效途径。但彩色马蹄莲所有品种对该病的抗性均比较弱;而且目前彩色马蹄莲新品种培育方式以杂交育种为主。很显然,这种育种方式很难培育出抗病的彩色马蹄莲品种。所以,研究人员探索采用物理或化学诱变的方式提高彩色马蹄莲的抗病性,从而培育抗病的彩色马蹄莲品种。本试验采用 RAPD 分子标记技术对彩色马蹄莲品种 Parfait (编号为 Pr) 及其秋水仙素诱导的四倍体 (编号为 Pr-d) 和 20、40、60 Gy ^{60}Co γ 射线辐射诱变后代 (分别编号为 Pr-1、Pr-2 和 Pr-4) 分子水平的变异和差异进行研究,为彩色马蹄莲抗病新品种的培育提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验材料为 2002 年引种自荷兰的彩色马蹄莲品种 Parfait,其佛焰苞粉红色(上红下白),叶片盾剑形,上有斑点,

引种后在本地的适应性良好。除 Parfait 外,还有经 20、40、60 Gy ^{60}Co γ 射线辐射处理的 Parfait 组培苗及秋水仙素诱导的四倍体 Parfait 组培苗共 5 个样品,每个样品组培苗继代次数均在 10 次以上,随机选取 10 株,每株分别取样,然后混合,用于提取 DNA。

1.2 试验方法

1.2.1 模板 DNA 的制备与检测 采用北京百泰克生物技术有限公司出品的新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取彩色马蹄莲叶片 DNA;采用贝克曼库尔特公司生产的 DU800 紫外/可见分光光度计测定 DNA 纯度和含量,并对浓度较高的样品进行稀释,-20℃ 储存,备用。

1.2.2 RAPD-PCR 体系及引物筛选 以提取的彩色马蹄莲 Parfait DNA 为模板,参照陆波等的方法^[3],对北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司和生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 40 条引物进行多态性筛选,选择条带多态性强、扩增位点多的引物对供试的彩色马蹄莲品种及 Parfait 辐射诱变处理和多倍体进行 RAPD 扩增。

1.3 数据分析

每个样品的扩增条带按有(记为 1)、无(记为 0)进行记录,在 Excel 表格上生成数据矩阵。计算扩增条带的多态率,用 POPGen32 软件^[4]进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 彩色马蹄莲样品 RAPD 分子标记结果

利用筛选出来的引物,对彩色马蹄莲 Parfait、Parfait 四倍体和辐射诱变后代进行 RAPD-PCR,最终筛选出具有特异性条带的引物 14 个,共获得 90 个位点,平均每个引物扩增出 6.43 个位点;其中,多态性位点 39 个,多态性位点比例为 43.33%。引物 RAPD-47 和 RAPD-66 扩增出的位点最多,

收稿日期:2013-12-06

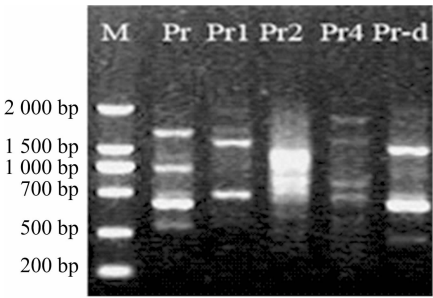
基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2013367);江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2013]161);江苏省农业科技自主创新资金[编号:2014(CX)2067]。

作者简介:郑玉红(1976—),女,河南潢川人,博士,副研究员,主要从事观赏植物资源收集评价和改良等方面的研究。E-mail: friend266@163.com。

均为 9 个;RAPD - 73 扩增出的位点最少,仅 4 个。引物 RAPD - 66 扩增出的多态位点比例最高,为 88.89%;有半数引物扩增出的位点全部为共有位点,多态性位点比例为 0(表 1)。由引物 66 扩增的 RAPD 图谱(图 1)可见,多倍体诱导和⁶⁰Co γ 射线辐射使 Parfait 扩增片段减少,从而表现出多态性。

表 1 5 个彩色马蹄莲样品 RAPD 扩增的结果

引物名称	引物碱基序列 (5'→3')	谱带总数 (条)	多态谱带 (条)	多态谱带比 例 PPB(%)
RAPD - 9	GGGTAACGCC	5	0	0
RAPD - 11	CAATCGCCGT	8	3	37.50
RAPD - 12	TCGGCGATAG	7	0	0
RAPD - 13	CAGCACCCAC	7	4	57.14
RAPD - 15	TTCCGA ACCC	5	0	0
RAPD - 35	GTAGACCCGT	7	6	85.71
RAPD - 37	CAA ACGTCGG	7	5	71.43
RAPD - 39	GTTGCGATCC	5	4	80.00
RAPD - 46	GTCGCCGTCA	6	6	0
RAPD - 47	CCGCATCTAC	9	3	33.33
RAPD - 66	CCGATATCCC	9	8	88.89
RAPD - 73	ACCAGTTGG	4	0	0
RAPD - 74	TCTCAGCTGG	6	0	0
RAPD - 77	CAG CGA CAA G	5	0	0
平均		6.43	2.79	32.43



M—Marker, 分子量标准
图1 引物 66 RAPD 扩增结果

2.2 彩色马蹄莲 Parfait 四倍体及其辐射诱变后代分子水平变异分析

5 个陈彩色马蹄莲样品观察到的等位基因数(n_a)为 1.402 1 个,有效等位基因数(n_e)为 1.296 5 个,Nei's 基因多样性(h)为 0.1666,Shannon's 多样性指数(I)为 0.242 1。

2.3 彩色马蹄莲 Parfait 多倍体及其辐射诱变与其他品种的亲缘关系的聚类分析

由表 2 可知,40 Gy ⁶⁰Co γ 射线辐射诱变后代(Pr - 2)与四倍体 Parfait(Pr - D)遗传相似系数最大,为 0.886 6;Parfait 与其 60 Gy ⁶⁰Co γ 射线辐射诱变后代(Pr - 4)间遗传相似系数最小,为 0.701 0;所有样品遗传相似系数的平均值 0.791 8。

由图 2 可以看出,5 个样品可分为 2 类,Pr、Pr - 2 和 Pr - D 聚为一支;Pr - 2 和 Pr - 4 聚为一支。

3 结论与讨论

自 20 世纪 80 年代以来,我国共引入彩色马蹄莲品种 40 多个。此后,我国研究人员对彩色马蹄莲的快繁技术^[5-6]、栽培措施^[7-9]、花期调控^[10-12]和抗病生理^[13-14]等进行了广泛

表 2 基于 RAPD 扩增的 5 个彩色马蹄莲样品遗传相似系数和遗传距离

样品	遗传相似系数/遗传距离				
	Pr	Pr - 1	Pr - 2	Pr - 4	Pr - D
Pr	****	0.824 7	0.752 6	0.701 0	0.804 1
Pr - 1	0.192 7	****	0.742 3	0.835 1	0.752 6
Pr - 2	0.284 3	0.298 0	****	0.804 1	0.886 6
Pr - 4	0.355 2	0.180 3	0.2180	****	0.814 4
Pr - d	0.218 0	0.284 3	0.120 4	0.205 3	****

注:**** 上方为遗传相似系数,**** 下方为遗传距离。

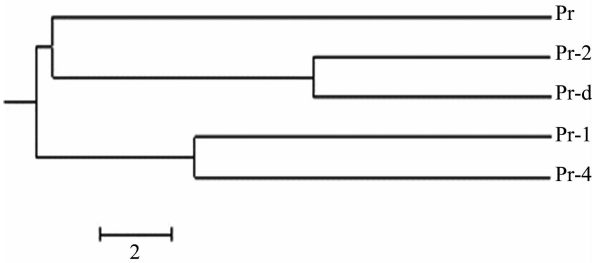


图2 5 个彩色马蹄莲样品 RAPD 标记聚类图示

的研究,但关于彩色马蹄莲的分子生物学方面的研究仅有零星的报道^[15-17]。在彩色马蹄莲品种间的亲缘关系和多样性分析方面,迄今只有张永春等利用 ISSR 对 10 个彩色马蹄莲品种进行鉴定^[17]。本试验利用 RAPD 技术研究多倍体诱导和⁶⁰Co γ 射线辐射对彩色马蹄莲品种 Parfait 分子水平遗传变异的影响,结果表明,Parfait、Parfait 四倍体及其⁶⁰Co γ 射线辐射处理多态性条带比率最高为 88.89%,平均值为 43.33%,多态性主要表现为多倍体诱导和⁶⁰Co γ 射线辐射使 Parfait 的扩增片段减少,但这种多态性远远低于彩色马蹄莲品种间多态性^[17];但与陈臻等基于 ISSR 标记¹²C⁶⁺重离子辐射下的彩色马蹄莲多态性十分接近^[18]。各样品间的遗传相似系数最大为 0.886 6,低于彩色马蹄莲品种间的遗传相似系数^[17],说明多倍体诱导和⁶⁰Co γ 射线辐射处理致使 Parfait 分子水平的变异已经达到了品种水平。在对其变异性状及其稳定性进行观测的基础上,培育出彩色马蹄莲新品种是完全可能的。同时,各样品多态性条带比率最高达 88.89%,表明通过建立彩色马蹄莲品种分子指纹图谱鉴别彩色马蹄莲品种以解决市场上彩色马蹄莲品种混乱的问题是可行的。

参考文献:

[1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 13 卷第 2 分册[M]. 北京:科学出版社,1990.
[2] 谷春艳,范加勤,杨 雪,等. 彩色马蹄莲细菌性软腐病菌的鉴定及其群体感应淬灭的研究[J]. 南京农业大学学报,2009,32(3): 71 - 77.
[3] 陆 波,郑玉红,彭 峰,等. 均匀设计法优化彩色马蹄莲品种的 RAPD - PCR 反应体系[J]. 北方园艺,2012(11):123 - 126.
[4] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1. 31: microsoft window - based freeware for population genetic analysis[CP /CD]. Edmonton: University of Alberta, 1999.

戚智尧,王铁良.膜下滴灌水肥耦合对青椒维生素 C 含量的影响[J].江苏农业科学,2015,43(3):144-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.046

膜下滴灌水肥耦合对青椒维生素 C 含量的影响

戚智尧,王铁良

(沈阳农业大学水利学院,辽宁沈阳 110161)

摘要:在温室膜下滴灌条件下研究水肥耦合对青椒维生素 C 含量的影响,以探讨温室青椒生产的水肥最优配比。试验设置了氮、磷、钾、灌水量 4 个因素,每个因素设置 5 个水平。通过正交螺旋组合得到不同因素水平的试验处理,采用 SPSS 软件分析了监测数据。结果表明,磷是影响青椒维生素 C 含量的重要因素,钾次之;在一定范围内,水肥协同促进作用明显,当磷肥 292.5 kg/hm^2 、钾肥 150 kg/hm^2 、氮肥 300 kg/hm^2 、灌水量 260 mm 时,青椒的维生素 C 含量最高。

关键词:水肥耦合效应;青椒;维生素 C 含量

中图分类号: S641.307;S641.306

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)03-0144-03

自 2003 年以来,我国辣椒年栽培面积基本稳定在 130 万 hm^2 左右^[1]。近年来,对于氮、磷、钾、灌水量 4 个因素对青椒影响的研究日益受到重视。高树涛等进行的磷肥不同用量对辣椒品质的影响研究认为,施磷量的增加可明显提高辣椒果实的长度、肩宽、果肉厚度,从而提高辣椒的产量^[2]。任媛媛等认为,在氮和磷供应充足的情况下增施钾肥,可促进辣椒植株个体发育,增加单株结果数量及单果质量^[3]。贯立茹等认为,采用水肥一体化灌溉施肥方式, 225 kg/hm^2 施氮水平(中等氮肥)日光温室彩椒产量、经济效益及其单位氮素增收均为最高^[4]。董俊霞等认为,氮对辣椒果实中可溶性糖含量的影响较大;钾对果实维生素 C 含量变化的影响较大^[5]。米国全等认为,水肥因子对辣椒和番茄产量影响最大的是施氮量,其次是灌水量和施钾量,并且各因素之间存在交互作用^[6]。

张凤翔等进行的水肥耦合对冬小麦生长和产量的影响试验结果表明,水肥对产量在一定范围内有明显正效应^[7]。徐岩等进行的水肥耦合对日光温室生菜品质和产量影响效应的研究试验结果表明,氮、磷、钾和灌水量对生菜产量的影响存在差异,其中磷肥对产量的贡献率最大,其次是灌水量、氮肥、钾肥^[8]。冯鹏等利用水肥耦合效应对玉米产量及青贮品质的影响研究结果表明,水肥处理对青贮玉米原料水分含量影响较大^[9]。目前对于青椒的研究仍以单一因素或水与单一肥料的研究较多,而关于水肥耦合的研究,主要针对玉米、小麦等作物,对于温室蔬菜氮、磷、钾、灌水量 4 个因素的耦合效应研究较少。本研究在膜下滴灌条件下研究氮、磷、钾、灌水量 4 个因素对温室青椒的耦合效应,寻求温室青椒生产的水肥最优组合,实现水肥相互促进的灌溉模式,以期生产实践提供理论依据。

收稿日期:2014-10-08

基金项目:辽宁省教育厅一般项目(编号:L2012239)。

作者简介:戚智尧(1989—),男,辽宁鞍山人,从事生态环境及节水灌溉理论和技术研究。E-mail:877048936@qq.com。

通信作者:王铁良,博士,教授,从事生态环境及节水灌溉理论和技术研究。E-mail:tieliangwang@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验区概况

试验地点位于沈阳农业大学试验基地 43 号温室大棚,海拔 44.7 m ,年平均气温 $6.2 \sim 7.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$,全年降水量 $600 \sim 800 \text{ mm}$ 。土壤为壤土,田间持水率为 34.3% 。pH 值为 7.09 ,

[5]林 荣,王秀琴.马蹄莲的组织培养和快速繁殖[J].广西植物,1989,9(2):97-102.

[6]范加勤,张雯雯,张 娜,等.几个彩色马蹄莲品种的离体培养与快速繁殖[J].南京农业大学学报,2005,28(2):28-31.

[7]张军云,杨向红,李 恒,等.彩色马蹄莲试管苗移栽育苗技术研究[J].北方园艺,2009(4):202-204.

[8]徐 琼,彭志云.栽培基质对彩色马蹄莲试管移栽成苗及成球效果的研究[J].农业网络信息,2007(5):215-216,229.

[9]彭 峰,陈嫣嫣,郝日明,等.彩色马蹄莲组培苗壮苗生根及移栽措施研究[J].江苏农业科学,2008(1):126-128.

[10]黄作喜,吴学尉,段辉国,等.彩色马蹄莲种球采收处理技术[J].内江师范学院学报,2004,19(2):35-37.

[11]钱妙芬.马蹄莲花期调控指标探析[J].中国生态农业学报,2003,11(4):32-33.

[12]张璐萍,唐开学,张丽芳.温度、赤霉素、光照对彩色马蹄莲的花

期调控[J].种子,2005,24(10):36-37.

[13]徐 琼,彭志云,徐秉良,等.栽培措施对彩色马蹄莲细菌性软腐病发生的影响[J].植物保护,2008,34(2):87-89.

[14]王 敏,姬广海,修建华,等.云南省马蹄莲细菌性软腐病原鉴定[J].西南大学学报:自然科学版,2007,29(8):79-82.

[15]杨柳燕,张永春,汤庚国,等.彩色马蹄莲 mRNA 差异显示技术体系的建立[J].分子植物育种,2012,11(1):267-272.

[16]刘怀阿,苏建坤,刘 琴,等.白花马蹄莲诱导胡萝卜软腐果胶杆菌 *ubiG* 基因的克隆与功能分析[J].江苏农业学报,2013,29(6):1304-1312.

[17]张永春,汤庚国,褚云霞,等.彩色马蹄莲 ISSR 体系的建立及初步分析[J].分子植物育种,2009,7(4):827-832.

[18]陈 臻,徐秉良,蒲崇建,等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 重离子辐射下彩色马蹄莲生理生化和抗病性的变化及 ISSR 多态性分析[J].核农学报,2013,27(5):552-556.