

刘胜洪,周玲艳,杨妙贤,等.⁶⁰Co- γ 射线诱变紫花苜蓿 WL525HQ 的 SSR 研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):238-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.082

⁶⁰Co- γ 射线诱变紫花苜蓿 WL525HQ 的 SSR 研究

刘胜洪,周玲艳,杨妙贤,刘 文,赵 钢

(仲恺农业工程学院生命科学学院,广东广州 510225)

摘要:为了探究⁶⁰Co- γ 射线对紫花苜蓿诱变产生的微卫星变异及其辐射敏感性,用2 000 Gy剂量的⁶⁰Co- γ 射线辐射处理紫花苜蓿 WL525HQ 的种子。紫花苜蓿 WL525HQ 在人工温室栽培后,比较了辐照组和对照组之间各20个不同单株的简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)的多态性变化。结果表明:7对引物均可扩增出紫花苜蓿 WL525HQ 的多态性位点,其中有5对引物的多态性位点百分比达到100%。经过计算该品种的多态性位点百分率(percentage of polymorphic band, PPB)值和多态性信息量(polymorphism information content, PIC)值发现,辐照组的 PPB 平均值达97.73%,略低于对照组的98.94%;而辐照组的 PIC 平均值为0.853 0,略高于对照组的0.849 2。说明⁶⁰Co- γ 射线使紫花苜蓿不同单株之间的 SSR 位点多态性产生了一定程度的变异,但也体现出 WL525HQ 品种对⁶⁰Co- γ 射线具有较高的耐受力。

关键词:紫花苜蓿;辐射;SSR;多态性;WL525HQ

中图分类号: S335.2⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0238-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)属多年生优良豆科牧草,是世界上种植最多、应用较为广泛、生产潜力大的重要牧草。由于紫花苜蓿具有适应性强、品质好、产量高等优点,素有“牧草之王”的美誉,在现代草业和畜牧业的可持续发展中占有重要地位^[1]。

研究表明,通过空间诱变、零磁空间诱变、辐射诱变均可引起苜蓿 DNA 水平上的变异^[2-3],其中,⁶⁰Co- γ 射线诱变是苜蓿育种的重要手段之一。⁶⁰Co- γ 射线具有能量高、穿透力强的特点,可造成 DNA 分子碱基变化、脱氧核糖变化、单链断裂、双链断裂以及 DNA 交联等,致使染色体发生变异,从而对苜蓿的某些性状进行改良^[4]。目前,苜蓿的诱变育种工作已经在国内外广泛展开,苜蓿的辐射敏感性、育种的适宜剂量及其辐射诱变规律等工作成为各国学者普遍关注和研究的课题^[5]。

与其他 DNA 分子标记相比,简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记具有数量丰富、信息含量高、重复性好等特点,并且 SSR 标记覆盖整个基因组,呈现多基因特点,表现为共显性遗传^[6-7]。因此本研究利用 SSR 分子标记技术可以在基因组范围内较广泛地观察紫花苜蓿的变异情况,对于苜蓿育种研究具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 辐照处理与种植

本试验所用的材料为 WL525HQ 紫花苜蓿,在华大生物

科技有限公司辐照中心进行⁶⁰Co- γ 辐射处理,辐射剂量为2 000 Gy,对照组为未经辐射处理。紫花苜蓿种子用0.1% HgCl₂消毒5 min,然后用去离子水冲洗3次后播种于仲恺农业工程学院钟村教学农场大棚内。分别取20张辐照处理组、对照组植株的幼嫩叶片进行后续试验。

1.2 DNA 的提取及 PCR 扩增产物检测

分别取辐照处理组、对照组苜蓿叶片0.1 g,放入研钵,加入约1 g 石英砂、1.6 mL 提取液[2% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、1.5% 聚乙烯吡咯烷酮-40、0.9% NaCl、6.2% NaAc·3H₂O、5% HAc],提取方法采用十二烷基硫酸钠法^[8],并通过1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

采用9对稳定性好、多态性高的 SSR 引物^[9-11](表1)进行扩增。扩增反应体系为:0.5 μ L DNA 样品(30 ng),2 μ L 10 \times buffer,1.2 μ L MgCl₂(25 mmol/L),0.5 μ L dNTPs(10 mmol/L),0.4 μ L 上游引物(10 μ mol/L),0.4 μ L 下游引物(10 μ mol/L),1 μ L Taq 酶(0.5 U/ μ L),15.6 μ L 双蒸水。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,55~57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物采用含 7 mol/L 尿素的 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。

1.3 数据分析与统计

根据条带的有无,在 Excel 表格上构建 0,1 矩阵图,多态性位点百分率(percentage of polymorphic band, PPB)按照以下公式计算:

多态性百分率 = 多态性位点数量/总位点数量 \times 100%。

等位点频率的计算方法参考等位基因的频率计算方法^[12]:等位点频率 p = 位点数量/总位点数量。计算出等位点频率后,用 Picalc 软件计算位点的多态性信息量(polymorphism information content, PIC)。

收稿日期:2014-08-10

基金项目:广东省科技计划(编号:2012A030700005);广东省产学研结合项目(编号:2012B090900010)。

作者简介:刘胜洪(1972—),男,广东兴宁人,硕士,高级实验师,主要研究方向为农学。E-mail:sh-liu01@163.com。

通信作者:赵 钢,博士,教授,主要从事草地生态学的研究。

E-mail:zhaogangnm@sina.com。

表 1 紫花苜蓿 SSR 引物序列

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
Afca11	CTTGAGGGAAC TATTGTGAGT	AACGTTTCCCAAAACATACTT
MTLE2A	CGGAAAGATTCTTGAATAGATG	TGGTTCGCTGTTCTCATG
W6019	TGGAATTG GGTATATAGGAAG	GCCATAAGAACTTCCACTT
Alf1	CTTGGAAC TATGTGTGAGT	ACCGTTTCCCAAAACATACTT
Alf2	TTTTCCCAC TCATTAG	TTGAGATTCAAHHHTTAC
Alf3	CCCATCAACATTTTCA	TTGATTGGAACGAGT
Afca1	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG

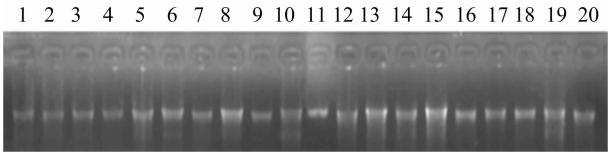
2 结果与分析

2.1 DNA 的提取

本研究采用高盐低 pH 值的 SDS 核酸提取法^[8]。琼脂糖凝胶电泳结果表明,点样孔清晰无杂质,基因组 DNA 条带清晰完整(图 1)。紫外分光光度结果分析表明,样品 $D_{320\text{ nm}}$ 值接近 0, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.85~1.98 之间,说明提取的 DNA 纯度较高,符合 PCR 扩增的要求。

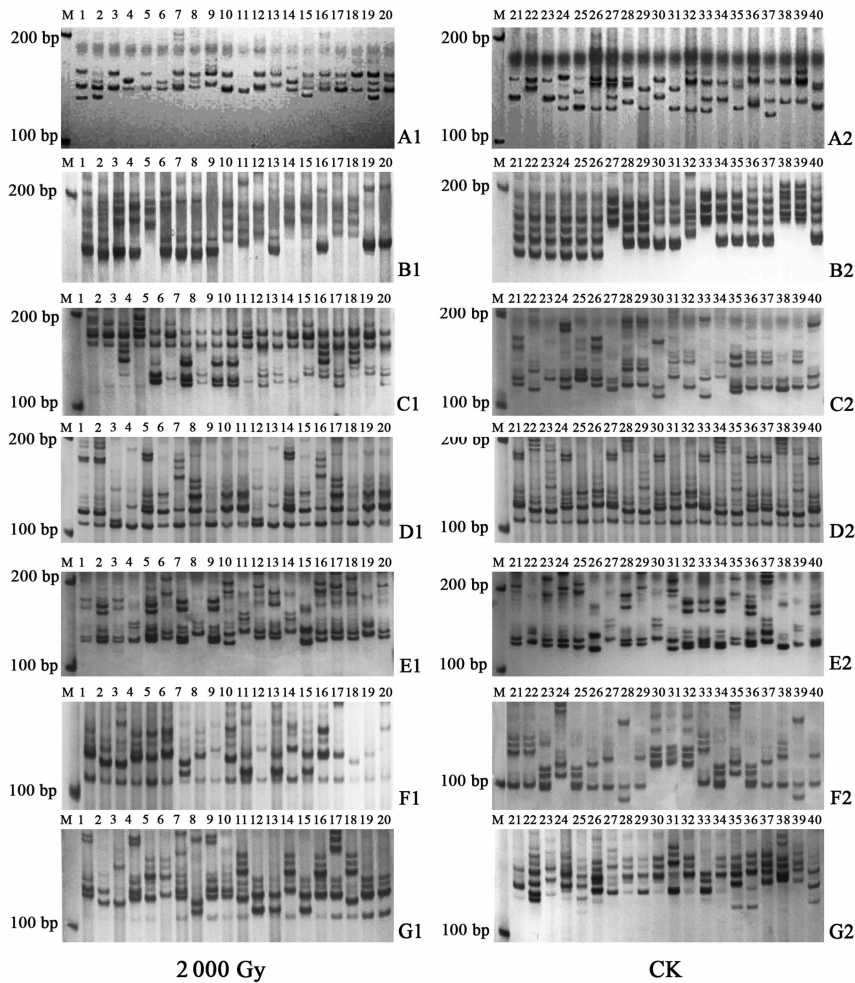
2.2 PCR 扩增产物的电泳检测

用 7 对 SSR 引物对紫花苜蓿处理组、对照组的 DNA 进行 PCR 扩增。结果表明,7 对引物的主要扩增位点位于 100~



1—20 表示不同单株的苜蓿样品
图 1 部分紫花苜蓿的 DNA 的抽提

200 bp 之间,处理组和对照间的 SSR 位点发生了不同程度的变化,仅有少量片段未发生变化,如 W6019 引物扩增的位点在 110 bp 处变化不明显(图 2 中的 D1、D2)。从图 2 中的 A1、A2、B1、B2 来看,引物 Afca1、Afca11 在辐射处理后 SSR 扩



1~20 为 2 000 Gy 处理的不同单株的苜蓿样品; 21~40 为对照组的不同单株的苜蓿样品; M: DNA marker; A1~G1、A2~G2 的引物分别是 Afca1、Afca11、MTLE2A、W6019、Alf1、Alf2、Alf3

图 2 紫花苜蓿 PCR 扩增结果

增带数量未发生变化;从图 2 中的 D1、D2、F1、F2 看,引物 W6019、Alf2 在辐射处理后 SSR 扩增带数量出现增加,条带位置有所改变;其余的 3 对引物在辐射处理后 SSR 扩增条带数量均减少(图 2 中的 C1、C2、E1、E2、G1、G2)。

2.3 辐射处理苜蓿的多态性分析

通过 PCR 扩增结果进一步统计各个 SSR 位点的多态性,结果如表 1 所示。可见所使用的 7 对引物均可扩增出多态性位点,引物 Afca1、Afca11 在苜蓿辐射处理后的 SSR 扩增总位点数未发生变化;引物 W6019、Alf2 在苜蓿辐射处理后 SSR 扩增总位点数出现增加的现象,条带位置有所改变;其余的 3 对引物在辐射处理后 SSR 扩增总位点数均减少。7 对引物中有 5 对引物的多态性位点百分率达到 100%。经过计算苜蓿的 PPB 值、PIC 值后发现,对照组的 PPB 平均值略高于辐射处理组,而对照组的 PIC 平均值略低于辐射处理组。说明 2 000 Gy 剂量的⁶⁰Co- γ 辐射对紫花苜蓿 WL525HQ 品种有一定的诱变作用,同时紫花 WL525HQ 对⁶⁰Co- γ 射线具有较高的耐受力。

表 2 紫花苜蓿 WL525HQ 的 SSR 多态性分析

引物名称	处理	多态性位点 点数(个)	总位点数 (个)	PPB 值 (%)	PIC 值
Afca1	辐射	10	10	100.00	0.880 3
	对照	10	10	100.00	0.890 6
Afca11	辐射	13	13	100.00	0.826 5
	对照	13	13	100.00	0.906 3
MTLE2A	辐射	10	10	100.00	0.752 0
	对照	17	17	100.00	0.841 0
W6019	辐射	14	15	93.33	0.860 4
	对照	12	13	92.30	0.706 9
Alf1	辐射	11	11	100.00	0.880 3
	对照	12	12	100.00	0.854 4
Alf2	辐射	17	17	100.00	0.951 0
	对照	15	15	100.00	0.895 2
Alf3	辐射	11	12	91.67	0.820 3
	对照	14	14	100.00	0.850 2
总值	辐射	86	88	97.73	0.853 0
	对照	93	94	98.94	0.849 2

3 结论与讨论

紫花苜蓿是多年生豆科植物,其叶、茎均含有较多的蛋白质、酚类、单宁等次生代谢物。因此,在提取苜蓿基因组 DNA 的时候,应该选取含有次生代谢产物较少的幼嫩叶片,比较有利于 DNA 的提取。高质量 DNA 的提取是植物基因组研究的基础^[13]。本研究使用的高盐低 pH 值的核酸提取方法能抑制或避免细胞内各种物质与核酸发生反应,有效去除核蛋白,抑制各种酶活性,适用多种植物中提取 DNA 和 RNA^[14]。本研究提取的 DNA 样品中虽然存在少量 RNA,但依然取得了较好的 PCR 扩增效果。

苜蓿是异花授粉植物,品种内个体间基因型杂合,在种子繁育时通常采用开放式授粉,品种内个体间相互传粉造成个体间基因型不同^[9],有学者利用 PL34HQ(南澳品系)品种自交系进行 SSR 研究,发现苜蓿品种内不同单株间存在多态性差异^[15]。另外,各地农业品种主管部门在苜蓿品种的选育过

程中亦未将分子标记作为选育依据。因此,本研究对照组的 不同单株间存在多态性差异。

目前,植物诱变育种主要利用化学诱变、紫外线诱变、辐射诱变、太空诱变等手段,对植物的种子、枝条、愈伤组织(离体培养)等进行诱变,均已证明可以引起植物微卫星 DNA 发生变异^[16]。利用诱变突变技术能够诱发各种有用的基因突变,产生自然界稀有的或用常规方法较难获得的新类型、新性状、新基因。辐射诱变技术已成为我国科学工作者开创农作物诱变遗传改良的一种有效途径^[17]。

但是,不同作物或同种作物不同品种对诱变存在生理或遗传的敏感差异。不同品种的一品红的生理指标因辐射敏感性不同而随辐射呈现完全不同的变化趋势^[18];叶开玉等对 4 个猕猴桃品种辐照后的嫁接成活率、植株生长量的调查发现,随辐射剂量的变化,猕猴桃的嫁接成活率及生长量在品种间差异较大^[19];章铁等发现,兰花在辐射后,突变体与对照品种之间有稳定的分子多态性差异^[20];在对茄子^[21]、甘蓝型油菜^[22]、大豆^[23]、苜蓿^[24]、茶树^[25]和芝麻^[26]的诱变研究中发现,作物对诱变的敏感性可分为极敏感型、敏感型、中间型、迟钝型 4 个类型^[27]。通过本研究发现,紫花苜蓿 WL525HQ 品种在⁶⁰Co- γ 射线照射后,其微卫星位点发生了一定程度的变异,但其具有较高的⁶⁰Co- γ 射线耐受力,属辐射迟钝型^[24,27]。因此,在实际辐射育种过程中可选择适当的辐照剂量,以提高作物品种的成活率和变异率。

参考文献:

[1]尹 强,武海霞,王志军,等. 环境因子对苜蓿田间自然干燥的影响[J]. 草地学报,2013,21(1):188-195.

[2]杨红善,常根柱,包文生. 紫花苜蓿的航天诱变[J]. 草业科学,2013,30(2):253-258.

[3]刘录祥,郑企成. 空间诱变与作物改良[M]. 北京:原子能出版社,1997.

[4]朱彩霞,古佳玉,邵 群,等. 植物 DNA 双链断裂损伤修复机制研究进展[J]. 中国农业科技导报,2010,12(5):17-23.

[5]张月学,杨茹冰,徐香玲,等. ⁶⁰Co- γ 射线辐射紫花苜蓿种子的细胞生物学效应研究[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(S1):142-146.

[6]刘卫东. SSR 标记分离技术的研究概况[J]. 咸宁学院学报,2007,27(6):80-84.

[7]Akkaya M S,Bhagwat A A,Cregan P B. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA markers in soybean[J]. Genetics,1992(132):1131-1139.

[8]刘 文,柯辉朋,梁 红. 动植物总核酸提取试验[J]. 仲恺农业技术学院学报,2008,21(3):17-21.

[9]王小山,陈志宏,韩建国,等. 采用微卫星(SSR)标记研究苜蓿品种鉴定初报[J]. 草地学报,2007,15(4):344-347.

[10]魏臻武,符 昕,耿小丽,等. 苜蓿遗传多样性和亲缘关系的 SSR 和 ISSR 分析[J]. 草地学报,2007,15(2):118-123.

[11]魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报,2004,13(3):62-67.

[12]Frankham R,Ballou J D,Briscoe D A. 保育遗传学[M]. 黄宏文,康明,译. 北京:科学出版社,2005:48.

[13]朴政玉,曲柏宏,孙祎龙. 苜蓿基因组总 DNA 提取及 RAPD 反应条件优化[J]. 湖北农业科学,2006,45(4):403-405.

王健胜,王 婕,梁亚红,等. 不同苜蓿品种农艺性状的分析与评价[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):241-243.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.083

不同苜蓿品种农艺性状的分析与评价

王健胜¹,王 婕²,梁亚红¹,宋淑利¹,刘丽君¹,赵千卿¹,刘沛松¹,杨风岭¹

(1. 平顶山学院,河南平顶山 467000;2. 三门峡市农业科学研究院,河南三门峡 472000)

摘要:以国内外 9 个苜蓿品种为材料,对其株高、主茎节数、叶面积、叶长、叶宽、分枝数、根长 7 个农艺性状进行分析评价。结果表明,不同苜蓿品种间主要农艺性状均存在显著差异,其中游客、公农 2 号品种的农艺性状综合表现最好;苜蓿不同性状间的相关性较差,除叶片性状外,其余性状间均未达显著水平;主成分分析显示,排名前 3 的主成分为叶片因子、主茎节因子、分枝因子;以农艺性状为基础对苜蓿品种作聚类分析,9 个苜蓿品种被划分为 3 个类群。研究结果将为苜蓿引种、品种选育、种质资源科学评价提供有效依据。

关键词:苜蓿;农艺性状;主成分分析;聚类分析

中图分类号:S541⁺.102 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0241-03

苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生豆科植物^[1],具有广泛的生态适应性和稳定的生产力,是世界上栽培最早、分布面积最广的优良豆科牧草之一。苜蓿在我国已有 2 000 多年的栽培历史,南、北方均有种植。苜蓿不仅具有较高的营养品质及较强的抗逆性,而且具备良好的固氮功能,因此,除了作为重要的蛋白质牧草外,苜蓿在水土保持^[2]、土壤改良^[3]、生态环境改善^[4]等方面也发挥着重要作用。苜蓿主要农艺性状的分析是苜蓿引种、亲本选配及相关遗传研究的重要基础。为有效开展不同区域苜蓿品种的引进,并对不同苜蓿品种进行科学评价,相关学者对此进行了较多研究。武自念等对国内外 12 个苜蓿品种的 6 个农艺性状作了主成分分析,筛选出贡献率较高的 3 个主成分,并在此基础上对 12 份苜蓿材料作了

系统聚类分析^[5]。曹宏等开展了 22 个紫花苜蓿品种的引种试验和生产性能评价,结果表明甘农 2 号、苜蓿王、新疆苜蓿、甘农 3 号等品种的综合评价较好,可根据不同生态环境及种植目标进行适宜种植^[6]。衣兰智等对不同苜蓿品种在青岛地区的适应性作了分析,综合评价表明 23 个苜蓿品种中 WL323、牧歌 401、驯鹿 3 个品种的综合生产性能较好,适宜在青岛地区辅以膜侧种植模式进行大面积推广^[7]。国内其他学者也对苜蓿农艺性状作了较多研究^[8-10]。虽然关于苜蓿农艺性状的研究较多,但由于不同研究苜蓿材料的特异性及研究目标的特定性,其研究结果只适用于特定苜蓿研究材料,对其他苜蓿品种的引进和评价意义不大。为此,本研究以 5 个国外品种、4 个国内品种为研究对象,对其主要农艺性状进行初步探讨,以期对这些苜蓿品种的引种推广及相关研究提供理论依据。

收稿日期:2014-11-16

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:KJT142102110171);河南省教育厅自然科学研究计划(编号:12B180025)。

作者简介:王健胜(1978—),男,陕西礼泉人,博士,讲师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:wjsheng1998@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料的 9 个苜蓿品种中,三得利、421Q、游客、赛迪

[14]刘 文,梁 红,杨碧忍,等. 一种高等植物小片段 RNA 分子标记方法[J]. 生物多样性,2012,20(1):86-93.

[15]武自念,魏臻武,赵 艳,等. 多叶苜蓿自交一代遗传关系的 SSR 分析[J]. 中国草地学报,2010,32(6):27-33.

[16]潘伟明,刘 文,杨妙贤,等. 武植 3 号中华猕猴桃微卫星 DNA 变异的研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(10):2344-2347,2352.

[17]刘录祥,郭会君,赵林妹,等. 我国作物航天育种 20 年的基本成就与展望[J]. 核农学报,2007,21(6):589-592,601.

[18]李 畅,苏家乐,刘晓青,等. 不同敏感型一品红品种对⁶⁰Co γ 射线辐照诱变的生理响应[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2010,31(4):95-98.

[19]叶开玉,李洁维,蒋桥生,等. 猕猴桃⁶⁰Co-γ 射线辐射诱变育种适宜剂量的研究[J]. 广西植物,2012,32(5):694-697.

[20]章 铁,刘秀清,孙晓莉,等. ⁶⁰Co-γ 射线辐射诱变蝴蝶兰 M1 代花型突变体的 RAPD 分析[J]. 激光生物学报,2011,20(1):

27-31.

[21]何娟娟,刘富中,陈钰辉,等. 茄子航天诱变后代变异及其 SSR 标记多态性研究[J]. 核农学报,2010,24(3):460-465,489.

[22]谢 琳,牛应泽,罗 谊. 航天诱变对甘蓝型油菜根尖的细胞学效应[J]. 核农学报,2008,22(2):179-182.

[23]郑 伟,郭 泰,王志新,等. 航天搭载大豆 SP2 农艺性状诱变效应初报[J]. 核农学报,2008,22(5):563-565,606.

[24]尚 晨,张月学,李集临,等. γ 射线和高能混合粒子场辐照紫花苜蓿品质变异的比较分析[J]. 核农学报,2008,22(2):175-178.

[25]杨跃华 林树祺. 茶树人工诱变技术的研究Ⅲ. 不同品种茶树的辐照敏感性[J]. 茶叶科学,1990,10(2):53-58.

[26]张秀荣,李培武,李英德,等. 芝麻不同品种对空间诱变的敏感性及生物效应研究初报[J]. 中国油料作物学报,1998,6(2):26-27.

[27]康玉凡,申庆宏,乔玉梅. 我国苜蓿品种的适宜辐射剂量[J]. 内蒙古农牧学院学报,1998,19(2):71-77.