刘 君,李 东,曾 林,等. 利用 ISSR 分子标记分析辣椒种质资源遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):80-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.022

利用 ISSR 分子标记分析辣椒种质资源遗传多样性

刘 君,李 东,曾 林,邓 刚,李 纱,钟小蓉

(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

摘要:运用 ISSR 标记对 8 种辣椒进行了遗传多样性的研究。用 30 条 ISSR 引物进行筛选,有 21 条可扩增出清晰可辨条带,而这 21 条引物在 8 种材料中共扩增出 382 个条带,其中 270 个条带(70.6%)表现出多态性;根据 Nei 和 Li 等的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD)对 8 种材料进行分析,结合 SPSS 16.0 分析软件进行聚类,构建其遗传相关聚类图谱。

关键词:辣椒;ISSR;分子标记;遗传多样性

中图分类号: S641.303.2 **文献标志码**: A **文章编号**:1002-1302(2016)07-0080-03

辣椒(*Capsicum annuum*)别名番椒,于明末清初传入我国,至今已有 300 多年的栽培历史[1]。我国辣椒种植面积有 33 万~40 万 hm^2,主要分布为福建的小米椒、四川的朝天椒、江南的羊角椒、河南的樱椒、山东的大红椒等。作为在食品烹饪加工中不可缺少的佐料佳品,其味辛香,性温热,有刺激性,同时兼具很高的营养价值,是人们喜爱的蔬菜和调味品,每年产量和经济效益稳居蔬菜作物之首[2-3]。

在真核生物基因组中散步着大量的简单串联重复序列(simple sequence repeat,SSR)[4]。SSR 通常为 1~4 个碱基组成的 4~10 个或者更多个串联重复单元。简单序列重复区间扩增多态性(inter-simple sequence repeat,ISSR)[5]是在 SSR 基础上发展起来的一种新的标记技术。其基本原理是在 SSR 序列的 5′或 3′端加 1~4 个锚定碱基,并以此为引物对两侧具有反向排列 SSR 的一段基因组 DNA 序列进行扩增。ISSR 是一种快速、可靠的标记技术,具有更好的稳定性和重复性,在植物领域中已经广泛用于重要的农作物如水稻[6]、小麦[7]和棉花[8]等的品系鉴定、遗传作图、基因定位及遗传多样性分析等研究中。当前,ISSR 标记亦存在一些缺点,限制了其在某些方面的应用,目前 ISSR 标记技术主要应用在植物方面,而在动物方面的应用鲜有报道。辣椒以其独特的蔬菜和调味品地位越来越受到人们的关注,本研究采用 ISSR 分子标记对不同来源的 8 个辣椒种子的遗传多样性进行了系统分析。

1 材料和方法

1.1 材料处理

收稿日期:2015-06-13
基金项目:四川省教育厅项目(编号:15ZB0210);四川理工学院大学生创新创业项目(编号:CX20130410);四川理工学院校级项目(编号:2014RC09)。
作者简介:刘 君(1978—),男,四川乐山人,博士研究生,副教授,主要从事基因组学、微生物的研究。Tel:(0813)5505266;E-mail:lj88398376@163.com。
通信作者:李 东,博士研究生,副教授,主要从事食品科学、食品工艺、食品安全与检测、食品分子生物学方面的研究。E-mail:4469344@qq.com。

1.1.1 材料 本试验 8 种辣椒材料及编号见表 1。脱氧核苷三磷酸(dNTP,2.5 mmol/L)、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL);PCR 引物序列见表 2。

表 1 8 个辣椒材料

编号	名称
A	2011-4
B	新 9A
C	郭 228
D	丰三 A
E	细线
F	万一
G	261A
H	色 2011-2

1.1.2 仪器与设备 PCR 扩增仪:Eppendorf AG22331 Hamburg;电泳仪:nYY-12 型电脑三恒多用电泳仪;凝胶成像系统:TANON-200。

1.1.3 材料处理 8 种辣椒种子在实验室培养成幼苗,取其幼苗在 -80 ℃的冰箱中冷冻 24 h 后,取出研磨成粉末后立即装入 1.5 mL 离心管中。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 使用改良的 CTAB 法提取辣椒基因组 DNA;采用琼脂糖凝胶电泳法检测辣椒 DNA 的完整性。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增体系 PCR 反应在基因扩增仪中进行。PCR 反应体系为 25 μL,反应体系如表 3。PCR 扩增条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火(温度由引物决定)30 s,72 ℃ 60 s,40 个循环;72 ℃ 10 min。

1.2.3 ISSR 产物的检测 扩增产物在 3% 的琼脂糖凝胶中电泳,然后采用凝胶成像系统拍照保存。

1.2.4 数据分析 统计条带的有无,强带和可重复出现的弱带记为有,否则为无。采用 Nei 和 Li 等的计算法 $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ 和 $GD = -\ln GS$,来计算两两材料间的相似性系数(GS)和相似距离(GD),其中 N_{ij} 为材料 i 和 j 共有的条带数,N_i 和 N_j 分别为材料 i 和 j 各自的条带数。利用 SPSS 16.0 分析软件进行聚类,构建遗传相关聚类图谱。

表 2　ISSR 引物序列

引物名称	引物序列（5′→3′）	引物名称	引物序列（5′→3′）	引物名称	引物序列（5′→3′）
ISSR－01	ATATATATATATATATT	ISSR－11	CTCTCTCTCTCTCTCTT	ISSR－21	ACACACACACACACACC
ISSR－02	ATATATATATATATATG	ISSR－12	CTCTCTCTCTCTCTCTA	ISSR－22	ACACACACACACACACG
ISSR－03	ATATATATATATATATC	ISSR－13	CTCTCTCTCTCTCTCTG	ISSR－23	TGTGTGTGTGTGTGTGC
ISSR－04	TATATATATATATATAC	ISSR－14	CACACACACACACACAT	ISSR－24	TGTGTGTGTGTGTGTGG
ISSR－05	TATATATATATATATAG	ISSR－15	CACACACACACACACAG	ISSR－25	ACCACCACCACCACCACC
ISSR－06	AGAGAGAGAGA AGAGT	ISSR－16	GTGTGTGTGTGTGTGTC	ISSR－26	AGCAGCAGCAGCAGCAGC
ISSR－07	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR－17	GTGTGTGTGTGTGTGTT	ISSR－27	AGTAGTAGTAGTAGTAGT
ISSR－08	AGAGAGAGAGAGAGAGG	ISSR－18	TCTCTCTCTCTCTCTCC	ISSR－28	ATGATGATGATGATGATG
ISSR－09	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR－19	TCTCTCTCTCTCTCTCG	ISSR－29	CCGCCGCCGCCGCCGCCG
ISSR－10	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR－20	ACACACACACACACACT	ISSR－30	CTCCTCCTCCTCCTCCTC

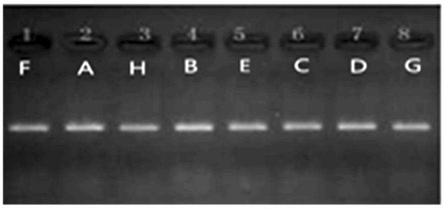
表 3　ISSR－PCR 扩增体系

组成成分	体积（μL）
DNA 模板	2.0
10 × *Taq* PCR buffer（Mg^{2+}）	2.5
dNTP（2.5 mmol/L）	2.0
ISSR 引物（50 ng/μL）	2.0
Taq 酶（5 U/μL）	0.5
ddH_2O	16.0
总计	25.0

2　结果与分析

2.1　辣椒 DNA 质量和完整性

通过改良的 CTAB 法提取 8 种辣椒幼苗的基因组 DNA，琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示，提取的 DNA 条带明亮完整，无拖尾现象。说明提取出的 DNA 中蛋白质和多糖的污染少，提取的基因组 DNA 质量可以满足 ISSR 分析的要求。



A—2011-4；B—新9A；C—郭228；D—丰三A；E—细线；　F—万一；G—261A；H—色2011-2。图2、图3同。

图1　8 个辣椒品种 DNA 凝胶电泳结果

2.2　引物的扩增效果

如表 4 所示，30 个 ISSR 引物对 8 个辣椒的多态性分析结果表明：除 ISSR－01、ISSR－02、ISSR－03、ISSR－23、ISSR－25、ISSR－26、ISSR－27、ISSR－29 外，有 21 个 ISSR 引物可获得稳定的多态性条带。21 个引物共扩增出 382 个条带（图 2），片段大小为 250～2 000 bp，各个引物扩增的条带数为 1～8 个，多态性条带为 270 个，平均多态率为 70.7%。

2.3　不同试验材料间的遗传相似系数

以引物 ISSR－15 为代表，说明不同材料之间的遗传相似系数。表 5 是引物 ISSR－15 的扩增条带数，表 6 是辣椒分子标记遗传多样性条带数。通过表 5 和表 6 可得出两两辣椒品种之间的遗传相似系数以及遗传距离。表 7 为两两辣椒品种之间的遗传相似系数比较。表 8 为两两辣椒间的遗传距离比较。

表 4　ISSR 引物扩增条带数汇总

引物	ISSR 条带数（个）								
	A	B	C	D	E	F	G	H	总数
ISSR－01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－04	1	1	1	0	0	0	0	0	3
ISSR－05	1	1	1	2	2	1	2	2	12
ISSR－06	0	1	2	1	2	2	2	0	10
ISSR－07	2	2	2	0	0	0	0	0	6
ISSR－08	2	2	2	2	2	1	2	2	15
ISSR－09	3	3	3	2	2	2	4	4	23
ISSR－10	3	3	3	3	2	3	2	3	22
ISSR－11	1	1	1	1	0	0	0	0	4
ISSR－12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－13	2	2	2	2	2	0	2	0	12
ISSR－14	4	4	4	4	4	4	4	4	32
ISSR－15	5	6	5	6	5	5	4	4	40
ISSR－16	2	2	2	2	0	1	0	0	9
ISSR－17	3	2	2	2	2	2	0	2	15
ISSR－18	1	1	1	1	0	1	0	0	5
ISSR－19	5	5	5	5	0	3	0	5	28
ISSR－20	3	4	4	3	2	4	2	3	25
ISSR－21	5	6	5	5	6	5	0	6	38
ISSR－22	2	2	2	2	2	2	2	0	14
ISSR－23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－24	0	2	2	0	2	0	0	0	6
ISSR－25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－28	3	3	3	3	4	3	3	4	26
ISSR－29	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ISSR－30	8	7	6	6	2	8	0	0	37
总数	56	60	58	52	41	47	29	39	382

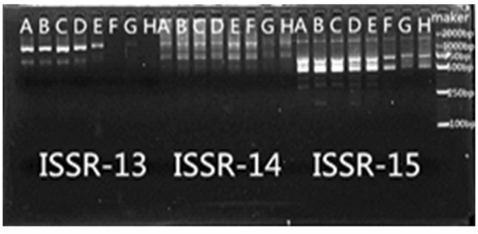


图2　辣椒 ISSR 扩增产物电泳结果

表 5　引物 ISSR -15 扩增条带数汇总

引物	扩增条带数(个)								
	2011 -4	新 9A	郭 228	丰三 A	细线	万一	261A	色 2011 -2	总数
ISSR -15	5	6	5	6	5	5	4	4	40

表 6　辣椒分子标记遗传多样性汇总

材料	2011 -4	新 9A	郭 228	丰三 A	细线	万一	261A	色 2011 -2
2011 -4	—							
新 9A	5	—						
郭 228	4	5	—					
丰三 A	4	5	5	—				
细线	5	5	4	5	—			
万一	3	3	3	3	3	—		
261A	4	4	4	4	4	3	—	
色 2011 -2	4	4	4	4	4	4	3	—

表 7　辣椒品种两两间遗传相似系数的比较

材料	2011 -4	新 9A	郭 228	丰三 A	细线	万一	261A	色 2011 -2
2011 -4	1.00							
新 9A	0.91	1.00						
郭 228	0.80	0.91	1.00					
丰三 A	0.73	0.83	0.91	1.00				
细线	0.91	0.91	0.80	0.91	1.00			
万一	0.60	0.73	0.60	0.55	0.60	1.00		
261A	0.89	0.80	0.89	0.80	0.89	0.67	1.00	
色 2011 -2	0.89	0.80	0.89	0.80	0.89	0.89	0.75	1.00

表 8　辣椒品种两两间遗传距离的比较

材料	2011 -4	新 9A	郭 228	丰三 A	细线	万一	261A	色 2011 -2
2011 -4	0.000							
新 9A	0.094	0.000						
郭 228	0.223	0.094	0.000					
丰三 A	0.315	0.186	0.094	0.000				
细线	0.094	0.094	0.223	0.094	0.000			
万一	0.511	0.315	0.511	0.598	0.511	0.000		
261A	0.117	0.223	0.117	0.223	0.117	0.400	0.000	
色 2011 -2	0.117	0.223	0.117	0.223	0.117	0.117	0.288	0.000

用引物 ISSR -15 进行扩增,得出 8 种材料在引物 ISSR -15 中的扩增条带数为 40 条。而 8 种材料两两之间进行成对比较共得到 29 个 GS 值,并且两者之间的遗传相似系数变化范围为 0.55 ~0.91,平均遗传相似系数为 0.806,平均遗传距离为 0.227。ISSR -15 引物对 2 个辣椒品种间遗传相似系数之间的差异不大,利用两两品种遗传相似系数越大、品种亲缘关系越近的原理,8 个辣椒品种间的遗传相似系数变化范围为 0.55 ~0.91。

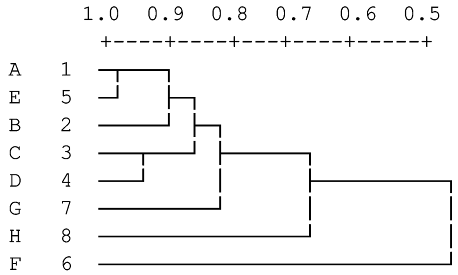


图3　引物 ISSR-15 对 8 个辣椒的聚类分析

2.4　聚类分析

根据 8 个辣椒 DNA 在引物 ISSR -15 的遗传相似系数进行聚类,结果如图 3 所示。再根据表 5 可将 8 个辣椒品种分为 3 类:第 1 类为 2011 -4、新 9A、细线,3 个辣椒两两遗传相似系数为 0.91,因此三者之间的亲缘关系最近;第 2 类为郭 228、261A、色 2011 -2,亲缘关系较近;第 3 类为丰三 A、万一,遗传相似系数为 0.55,亲缘关系较远。

3　结论

利用 ISSR 分子标记分析辣椒种质资源遗传多样性研究,用 30 条 ISSR 引物进行筛选,有 21 条可扩增出清晰可辨条带,而这 21 条引物在 8 种材料中共扩增出 382 个条带,其中 270 个条带(70.6%)表现出多态性;另外,以引物 ISSR -15 为例,分析 8 个辣椒品种间的亲缘关系,可将 8 个辣椒品种分为 3 类:第 1 类为 2011 -4、新 9A、细线,3 个辣椒两两遗传相似系数为 0.91,三者之间的亲缘关系最近;第 2 类为郭 228、261A、色 2011 -2,亲缘关系较近;第 3 类为丰三 A、万一,遗传相似系数为 0.55,亲缘关系较远。因此,根据 Nei 和 Li 等的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD)公式,再利用SPSS

刘 颖,李冬杰,王沛沛,等. 怀牛膝组织培养和快速繁殖体系的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):83-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.023

怀牛膝组织培养和快速繁殖体系的优化

刘 颖, 李冬杰, 王沛沛, 朱 昀, 李朝炜, 魏景芳
(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050000)

摘要:为优化怀牛膝(*Achyranthes bidentata* BL.)组织培养和快速繁殖体系,以怀牛膝茎段作为外植体,选择 MS 为基本培养基,研究不同激素配比对组培快繁的影响。结果表明,3 种激素对于外植体芽诱导中影响顺序依次为 6-BA>IBA>KT,最佳芽诱导优化培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+0.2 mg/L KT。诱导丛生芽增殖的培养基以 MS+1.3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+0.2 mg/L KT 为最优,增殖系数达 6.03。优化生根培养以 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 效果最佳,生根率最高,达 95.1%。组培苗移栽至炭灰∶营养土∶蛭石(体积比 1∶2∶1)的基质中,成活率达到 100%,且植株生长健壮。

关键词:怀牛膝;组织培养;快速繁殖;优化
中图分类号: Q945.5;S567.23+9.043 **文献标志码**: A **文章编号**:1002-1302(2016)07-0083-04

怀牛膝(*Achyranthes bidentata* BL.)属苋科牛膝属多年生草本植物,高 70~120 cm,生长于河南沁阳、武陟、修武、温县一带,为中国著名的"四大怀药"之一[1]。其根呈圆柱形,直径 5~10 mm,土黄色;茎有棱角或四方形,绿色,有的还带有紫色;叶片一般是椭圆形或是椭圆披针形,基部呈楔形或是宽楔形。怀牛膝因其根含皂苷元、齐墩果酸、蜕皮激素、牛膝多糖等有效成分,具有补肝肾、强筋骨、通血脉、降血压、镇痛、引药下行和泻浊通淋等功效[2],所以越来越受到人们的青睐,具有广阔的开发利用前景。为了满足市场需求,须要对其进行大规模的培养栽培。近年来,对于牛膝的组织培养研究也有相关报道[3-5],但对于外植体选择、激素配比及丛生芽分化上还存在一些问题[6-7]。本研究选取怀牛膝茎段为外植体,建立并优化怀牛膝的组织培养及快繁体系,以期获得最佳的组培条件,整体提高怀牛膝组培的效率,为其药用成分的长期工厂化生产奠定基础。

收稿日期:2015-11-18
基金项目:国家科技专项(编号:2011ZX08001-003);河北省科技支撑计划(编号:14237503D)。
作者简介:刘 颖(1980—),女,河北新河人,硕士,讲师,研究方向为药用植物细胞工程。E-mail:llp327@163.com。
通信作者:魏景芳,博士,教授,研究方向为植物细胞工程。E-mail:Wjfang@126.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由河北科技大学植物组织培养实验室提供,以含有 1~2 个芽眼的怀牛膝 2 cm 幼嫩茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 选取怀牛膝 2 cm 带腋芽茎段,先用去离子水冲洗,再加入稀释的洗洁精清洗,之后置于超净工作台上。用 75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,然后用 0.1% 氯化汞消毒 3 min,最后用无菌水冲洗 3 次,用消毒滤纸吸干水分,在无菌条件下,把消毒后的茎段切成 0.5 cm 的小段待接种。

1.2.2 芽诱导培养基的优化 以 MS 为基本培养基(蔗糖 3%、琼脂 0.8%,pH 值为 5.7~5.8),添加不同浓度的 6-BA、IBA、KT,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表(表 1),以筛选出最佳的激素组合,确定最佳的诱导培养基。将消毒处理后的外植体置于诱导培养基上,每种培养基中接种 3 个,重复 3 次,置于培养室中,进行培养并定期观察不同外植体的诱导及分化情况,14 d 后统计每个外植体诱导出的丛生芽数。

16.0 分析软件进行聚类,构建了遗传相关聚类图谱,为辣椒抗病育种以及综合防治提供了重要的理论参考。ISSR 标记技术以其多态性高、稳定性强、简便快捷等优势在未来必将在更多物种、更多领域中获得广泛的应用。

参考文献:

[1]王永平,张绍刚,张 婧,等. 我国辣椒产业发展现状及趋势[J]. 河北农业科学,2009,13(6):135-138.
[2]毛亦卉,向拉蛟. 对我国辣椒产业发展对策思考[J]. 辣椒杂志,2007,5(3):1-4.
[3]赵 宁. 从干红辣椒中提取辣椒红素的研究[D]. 北京:北京化工大学,2004:1-2.
[4]Kashi Y,King D,Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation[J]. Trends in Genetics,1997,13(2):74-78.
[5]Godwin1 I D,Aitken E A B,Smith L W. Application of inter simple sequence repeat(ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis,1997,18(9):1524-1528.
[6]黄光文,陈觉梁,王伟成,等. 运用 ISSR 标记鉴别水稻品种的初步研究[J]. 杂交水稻,2006,21(3):64-67.
[7]张立荣,刘大群,徐大庆,等. 小麦 ISSR 分析初探[J]. 河北农业大学学报,2004,27(1):10-13.
[8]袁洪波,艾尼江,赵建军,等. 棉花黄萎病菌致病力分化与 ISSR 遗传变异分析[J]. 华北农学报,2013,28(5):84-89.