

王开拓, 吴田, 蓝增全. 昆明 10 种草坪草的 ISSR 指纹图谱构建[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(2): 73–77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.012

昆明 10 种草坪草的 ISSR 指纹图谱构建

王开拓¹, 吴田², 蓝增全³

(1. 西南林业大学生命科学学院, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学园林学院, 云南昆明 650224;

3. 西南绿色发展研究院, 云南昆明 650224)

摘要:草坪业在发展过程中出现一些种的混淆, 为了区分不同草坪草, 采用昆明常见的 10 种草坪草为样本, 利用简单重复序列(inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)分子标记技术构建昆明地区常见草坪草的指纹图谱。从 28 条引物中筛选出 15 条特异性较好的引物, 对其进行退火温度筛选。结果表明, 引物 UBC834、UBC842、UBC844 退火温度分别为 58、58、55 ℃ 时多态性较好。对引物 UBC834、UBC842、UBC844 的电泳图谱进行 0、1 读带, 构建了 3 个草坪草的数字指纹图谱, 可以将供试的 10 种草坪草全部区分开来。

关键词:草坪草; ISSR; 指纹图谱; 多态性

中图分类号: S688.401 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)02-0073-04

近年来草坪业在我国发展迅猛, 特别是在城市绿化和一些运动场中应用极为广泛, 对人类赖以生存的生活环境起着保护、美化和改善作用。而昆明地处我国西南地区, 气候独特, 四季如春, 素有“春城”的美称。陈蕴等对我国草坪草的引种工作和一些主要问题进行了综述和分析^[1]。彭燕等以我国主要草坪草的研究进展为基础, 提出研究和利用草坪草种质资源的对策^[2]。黄鹤平等选用 10 个草坪草品种进行栽培研究, 对昆明地区的草坪草引种进行了评价^[3]。昆明市对城市的美化正在不断地加强, 对草坪草的数量和质量要求也不断提高。但是, 由于草坪草经修剪后通常叶色、叶宽、叶片硬度等均会发生变化, 且没有花序, 因此难以通过植物学性状区分草种, 不利于有针对性地对草坪进行养护管理。而通过构建某一地区常见的草坪草 DNA 指纹图谱, 为后续的草种分辨提供了途径。

微卫星 DNA (simple sequence repeats, 简称 SSR)、限制性长度片段多态性 (restriction fragment length polymorphism, 简称 RFLP)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称

RAPD) 等分子自标记技术均可以构建指纹图谱, 它们都从不同的角度反映物种的遗传信息^[4-7]。简单重复序列(inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)是一种基于 PCR 扩增进行检测的分子标记技术, 它对简单重复序列之间的区域进行多态性扩增, 是由 Zietkiewicz 等^[8]提出的。ISSR 结合了其他分子标记技术的特点, 如操作简单、稳定性好、多态性丰富、成本低等^[9-10], 为指纹图谱的构建提供了快速可靠的技术基础。指纹图谱是品质混杂的检测工具^[11], 利用 ISSR 分子标记技术构建指纹图谱在品种鉴定上的应用越来越广泛, 前人已经在苹果^[12]、桑树^[13]、凤梨^[14]、复烤烟^[15]等多种植物材料上建立了指纹图谱。在草坪草上, 刘君等利用 ISSR 标记技术对 9 份狗牙根的遗传多样性进行了研究, 构建了 9 份材料的指纹图谱^[16]。胡雪华等以上海结缕草 (*Zoysia japonica*) JD-1 和细叶结缕草 (*Zoysia tenuifolia*)、沟叶结缕草 (*Zoysia matrella*)、结缕草为材料, 利用 ISSR 分子标记技术在 4 个材料中构建了指纹图谱^[17]。本试验以昆明常见的 10 种草坪草为材料, 利用 ISSR 分子标记技术构建指纹图谱, 为后续从分子角度对其进行相互区分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用草坪草材料分别为沟叶结缕草 [*Zoysia matrella* (L.) Merr.]、结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.)、细叶结缕草 (*Zoysia tenuifolia*

收稿日期: 2019-07-15

基金项目: 中央支持地方高校古茶生态文化研究平台。

作者简介: 王开拓 (1992—), 男, 安徽淮南人, 硕士研究生, 主要从事植物遗传与种质资源研究。E-mail: 809271790@qq.com。

通信作者: 吴田, 博士, 副教授, 主要从事植物分子生物学研究, E-mail: 461257271@qq.com; 蓝增全, 硕士, 教授, 主要从事生态学, E-mail: kmlanzengquan@qq.com。

Willd. ex Trin.)、黑麦草(*Lolium perenne* L.)、高羊茅(*Festuca elata*)、草地早熟禾(*Poa pratensis* L.)、紫羊茅(*Festuca rubra* L.)、细弱剪股颖(*Agrostis tenuis* Sibth.)、匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)和狗牙根[*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]。将其种子在西南林业大学园林学院实验室温室培养箱中于 25 ℃ 光照培养发芽。

1.2 DNA 提取与检测

每个草坪草品种剪下由多颗种子萌发的幼嫩叶片进行液氮研磨,使用 TIANGEN 试剂盒提取总 DNA。对提取的 DNA 原液进行 1.0% 琼脂糖凝胶、GoldView 核酸染料电泳,检测其质量。保存在 -20 ℃ 冰箱中。

1.3 ISSR-PCR 反应体系及扩增条件

本试验所用 PCR 反应体系为 25 μL: ddH₂O 18 μL, dNTP 2 μL, 10 × Buffer 2.5 μL, DNA 模板 100 ng, 引物 10 μmol/L, Trans Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。扩增程序为 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 60 s, 55 ℃ 退火 60 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 40 个循环; 72 ℃ 再延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

ISSR 引物筛选。PCR 反应结束后,将扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中检测。电泳条件为上样量 3 μL, 1 × TAE 缓冲液, 90 V 电压下 45 min。电泳结束后在凝胶成像系统上观测、拍照。用 10 个草种样本从 28 条引物(表 1)中筛选出条带清晰、多态性高以及重复性好的引物。

表 1 ISSR 引物序列

引物	序列(5'→3')	引物	序列(5'→3')
UBC814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC
UBC818	CACACACACACACACAG	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTRG
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCTCA	UBC846	CACACACACACACACART
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCA	UBC847	CACACACACACACACARC
UBC824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	UBC848	CACACACACACACACARG
UBC825	ACACACACACACACACT	UBC850	GTGTGTGTGTGTGTGYC
UBC826	ACACACACACACACACC	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT
UBC827	ACACACACACACACACG	UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC855	ACACACACACACACACYT
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	UBC856	ACACACACACACACACYA
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	UBC857	ACACACACACACACACYG
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	UBC858	TGTGTGTGTGTGTGTGRT
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	UBC866	CTCCTCTCTCTCTCTCTC

1.4 指纹图谱的构建

用筛选出的引物分别对 10 种草坪草进行 PCR 扩增,调整退火温度。保存电泳结束后的图片,选择清晰、稳定以及重复性好的条带进行谱带记录。有带记为 1,无带记为 0,形成 0、1 矩阵。

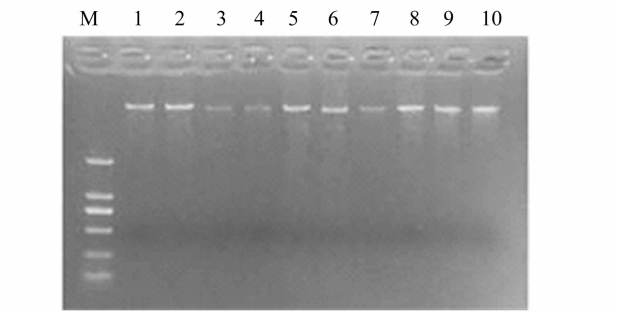
2 结果与分析

2.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

由图 1 可知,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, DNA 样品均只有 1 条清晰完整的带,质量较好,能满足 ISSR 分析的需要。

2.2 ISSR 引物的初筛选

由图 2 可知,以沟叶结缕草的基因组 DNA 为模板,从 28 条引物中预筛选出 15 条能扩增出产物的引物,分别是 UBC818、UBC825、UBC826、UBC827、UBC834、UBC836、UBC840、UBC841、UBC842、



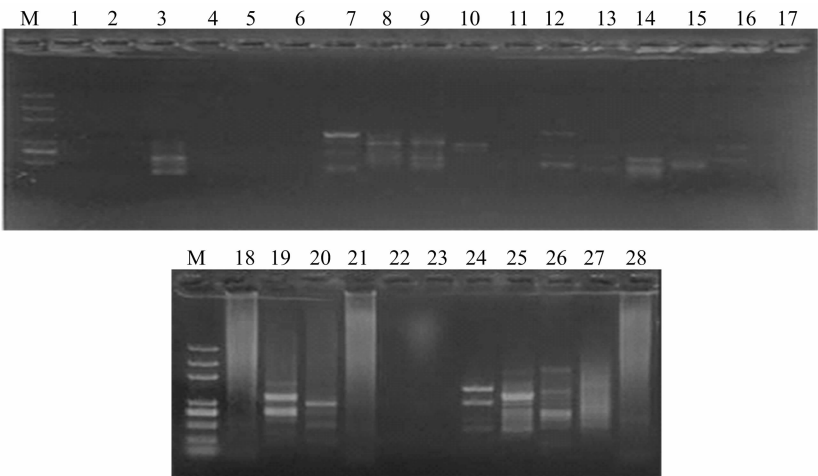
M—DNA marker, 由上到下的条带大小分别为 2 000、1 000、750、200、100 bp; 1—沟叶结缕草; 2—细叶结缕草; 3—黑麦草; 4—高羊茅; 5—草地早熟禾; 6—结缕草; 7—紫羊茅; 8—细弱剪股颖; 9—匍匐剪股颖; 10—狗牙根。图 3、图 4 同

图 1 10 种草坪草 DNA 检测结果

UBC844、UBC848、UBC850、UBC855、UBC866、UBC857。

2.3 引物退火温度的确定

对 15 条引物进行退火温度的筛选,部分引物的



M—DNA marker，由上到下的条带大小分别为 5 000、3 000、2 000、1 000、750、200、100 bp，图 3、图 4同；泳道 1~28 分别代表引物 UBC814、UBC815、UBC818、UBC822、UBC823、UBC824、UBC825、UBC826、UBC827、UBC834、UBC835、UBC836、UBC840、UBC841、UBC842、UBC844、UBC845、UBC846、UBC847、UBC848、UBC850、UBC853、UBC854、UBC855、UBC856、UBC857、UBC858、UBC866

图2 ISSR 引物筛选结果

退火温度筛选结果如图 3 所示。由图 3 可知,引物 UBC844 在退火温度高于 55 ℃时,扩增产物出现缺失现象;但退火温度低于 55 ℃时,非特异性条带较

多,随着温度的降低,条带弥散现象加重;在 55 ℃时,条带之间界限分明,背景清晰,带型稳定。因此引物 UBC844 的最优退火温度选择 55 ℃。

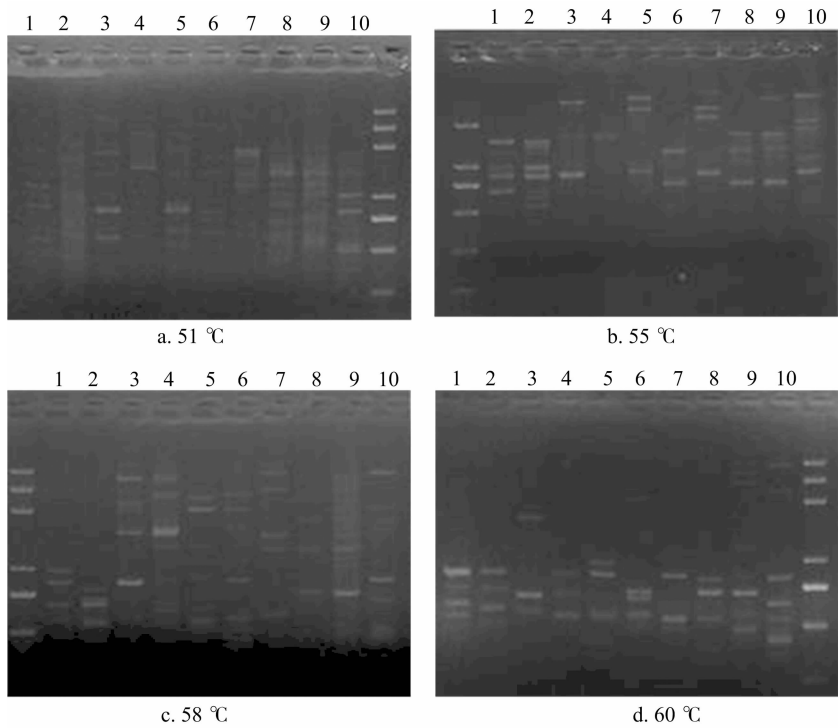


图3 引物 UBC844 退火温度的探索

如图 4 所示,经筛选发现引物 UBC834 和 UBC842 的退火温度在 58 ℃时,其 PCR 跑胶图片最为清晰,并且能够较好地地区分 10 种草坪草品种。

2.4 草坪草 DNA 指纹图谱的构建

由上述 ISSR - PCR 扩增图谱发现,引物

UBC834、UBC842 和 UBC844 均可以将供试的 10 种草坪草品种全部区分开来。对 3 个引物的扩增图谱选择较为明亮的条带分别进行 0、1 读带,构建 3 个草坪草的数字指纹图谱(表 2)。

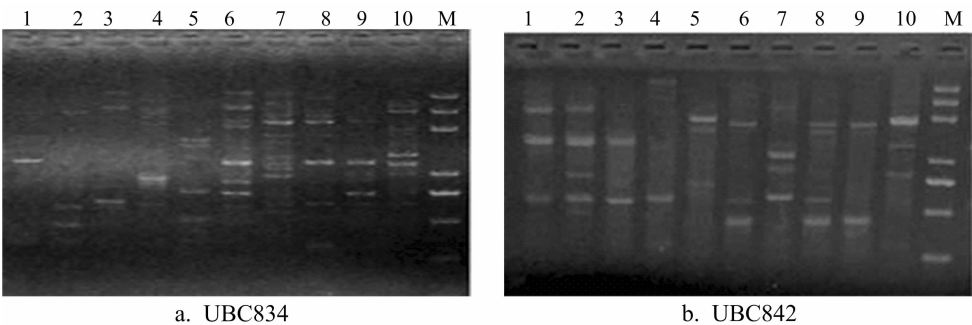


图4 不同引物的 PCR 扩增图谱

表 2 10 种草坪草的 ISSR 数字指纹图谱

材料名称	数字指纹图谱		
	UBC834	UBC842	UBC844
沟叶结缕草	0000000100000	01000100010	00010111
细叶结缕草	0001000000001	01000101010	00010110
黑麦草	1010000000010	00000100010	10000010
高羊茅	0010000010000	10000000010	00010000
草地早熟禾	0000010000101	00101000100	11000010
结缕草	1010100101100	00010000011	00001001
紫羊茅	1010100010000	01000011010	11100010
细弱剪股颖	0100100100010	00011000011	00011001
匍匐剪股颖	0000000100110	00011000001	10011001
狗牙根	0001001100010	00010101001	10110110

3 讨论与结论

草坪草在城市绿化、足球场、高尔夫球场等一些功能性运动场上的应用越来越广泛,草坪业不断发展壮大,关于草坪草的研究也在不断地深入。李春杰等对混播草坪的研究发现,草坪中的黑麦草在建植后比列逐渐下降,高羊茅所占比例变化不大,早熟禾比例不断上升,但在建植后的 1.5 年时间内,黑麦草始终占据优势^[18]。刘伟等通过不同的施氮量和修剪高度,探讨了比较适合高羊茅与日本结缕草混播的管理措施^[19]。贺佳圆等研究了不同混播比例的高羊茅与草地早熟禾对草坪质量的影响,发现草地早熟禾与高羊茅混播比例为 2 : 8 时,草坪质量最佳^[20]。混播草坪已成为当今草坪建设的主要方式之一,昆明地区草坪基本以混播的形式存在,难以区分,不利于草坪针对性的施肥、病虫害等管理。

本试验以昆明地区常见草坪草为材料,从 28 条 ISSR 引物中筛选出 3 条多态性、稳定性以及重复性均良好的引物,分别为引物 UBC834、引物 UBC842、引物 UBC844。利用这 3 条引物对 10 种草坪草的基

因组 DNA 进行扩增,结果表明,3 条引物均可以完全区分 10 种草坪草,利用这 3 条引物构建了昆明地区 10 种草坪草的 3 个数字指纹图谱。利用上述指纹图谱作为标准谱带,为昆明的草坪草品种鉴定提供了依据。在后续一些难以区分的混播草坪维护中,通过提取其 DNA,使用引物 UBC834、UBC842 或 UBC844,对其进行 PCR 扩增,然后将跑胶图片与本研究的标准谱带进行对比,即可鉴别出混播草坪的品种类型,然后有针对性地进行管理。本研究也为后续昆明地区草坪草遗传多样性分析、种质资源鉴定等提供了一定的技术基础。

参考文献:

[1]陈 蕴,吴开贤,罗富成. 我国草坪草引种研究现状与进展[J]. 草业科学,2008,25(10):128 - 133.

[2]彭 燕,张新全,周寿荣. 我国主要草坪草种质资源研究进展[J]. 园艺学报,2005,32(2):359 - 364.

[3]黄鹤平,郑 旺,黄青峰,等. 昆明地区 10 个草坪草品种的引种与评价[J]. 西南农业学报,2016,29(4):934 - 939.

[4]郭志慧,杨红宇,张成林,等. 利用形态性状以及 SSR 标记鉴定 4 个川西北老芒麦品种(系)[J]. 草业科学,2016,33(9):1718 - 1727.

[5]吴 婷,魏 珊,米丽华,等. 不同产地连翘的 DNA 指纹图谱构建与聚类分析[J]. 中草药,2016,47(5):816 - 820.

[6]孙 宁,付小琼,王秀玲,等. 棉花区试品种的 AFLP 指纹图谱分析[J]. 中国农学通报,2012,28(15):36 - 41.

[7]张俊超,谢文刚,赵旭红,等. 利用 EST - SSR 标记构建中国老芒麦品种 DNA 指纹图谱及种质遗传多样性[J]. 草业科学,2017,34(10):2052 - 2062.

[8]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176 - 183.

[9]贾俊香,崔连伟,李 娜,等. 大葱 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. 北方园艺,2017(12):92 - 96.

[10]王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613 - 616.

[11]林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1993:73 - 74.

曹 访,刘 莉,采克俊,等. 五月龄翘嘴红鲌性腺组织小 RNA 转录谱的分析比较[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):77-82.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.013

五月龄翘嘴红鲌性腺组织小 RNA 转录谱的分析比较

曹 访¹, 刘 莉², 采克俊¹, 吴成龙¹, 周俊波¹

(1. 湖州师范学院生命科学院/浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室/中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室, 浙江湖州 313000; 2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001)

摘要:采用转录组高通量测序方法,比较分析幼龄翘嘴红鲌精巢、卵巢组织中小 RNA 转录谱。结果显示,精巢、卵巢的小 RNA 分布的峰值分别为 28、29 nt,与一般物种的 22~24 nt 有较大的差异;在小 RNA 库中,经比对注释的比例很低,分别为 2.5%、2.1%。在比对注释的斑马鱼 miRBase、斑马鱼 ncRNA、piRNA、Rfam 数据库中,精巢组织中被 miRBase 数据库注释的比例最高,为 1.49%;而卵巢组织中被 miRBase 和 piRNA 数据库注释的比例接近,分别为 0.94% 和 0.96%。比较表达量相对较高的共有 miRNA 分子,均是胚胎发育相关的分子,且大多是精巢组织的表达量高于卵巢组织,这些 miRNA 分子在个体发育中可能具有重要意义。初步获得了翘嘴红鲌不同性腺组织的转录谱,为今后进一步分析小 RNA 在生殖发育中的调控作用奠定了基础。

关键词:翘嘴红鲌;精巢;卵巢;miRNA;转录谱;分析;比较

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)02-0077-06

生物体内的小分子非编码 RNA 通过转录和转录后调节形成遗传信息的表达调控网络,在细胞的分裂分化、个体生长发育和繁殖等生命活动过程中具有重要的作用。已发现的这类小 RNA 包括 siRNA (small interfering RNA)、miRNA (microRNA)、hsRNA (heterochromatin associated small RNA) 和 piRNA (piwi interacting RNA) 等。发掘新的小分子非编码 RNA、研究其生物学功能及作用机制在生命科学研究中具有重要意义,目前研究较多的是

miRNA。鱼类的 miRNA 也已在斑马鱼、红鳍东方鲀等几个模式种以及非模式鱼类的虹鳟鱼中被发现报道^[1-2]。

miRNAs 是一类非编码、长度约 22 nt 的小 RNA 分子,由 60~80 nt 的茎环前体分子衍生而来,广泛存在于动物、植物甚至病毒中。miRNAs 通过调节靶标 mRNAs 的稳定性和翻译效率,在基因的表达中起着非常重要的作用,影响着各个生理过程,包括代谢、细胞凋亡、神经系统发育、免疫防御、肿瘤病理过程等。自从 1993 年首次在秀丽线虫中发现 miRNA (lin-4) 以来^[3],有大量关于 miRNAs 的生物合成、功能和作用机制的研究^[4-6]。尽管 miRNAs 的作用早已发现,但有关 miRNA 转录组的研究最近几年才开始。过去主要是通过直接克隆、测序、northern blot 杂交分析等鉴定逐个对 miRNAs 鉴定。

收稿日期:2018-10-17

基金项目:浙江省淡水养殖科技创新团队项目(编号:2012R10026_05);浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076)。

作者简介:曹 访(1980—),男,江苏丰县人,硕士,高级实验师,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:hzzyuef@hotmail.com。

[12] 宣继萍,章 镇,房经贵,等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报,2002,19(6):421-423.

[13] Zhao W G, Miao X X, Zang B, et al. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(9): 851-860.

[14] 葛亚英,张 飞,沈晓岚,等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2012,45(4):726-733.

[15] 樊 杰,张 奇,吴 田,等. 云产品牌卷烟主体烟叶原料的复烤烟指纹图谱的构建[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(6): 627-630.

[16] 刘 君,赵 琴,杨志民. ISSR 分子标记对 9 种狗牙根的鉴定

分析[J]. 草业学报,2012,21(6):159-165.

[17] 胡雪华,何亚丽,安 渊,等. 上海结缕草 JD-1 和结缕草属几个主要坪用草种的 ISSR 指纹分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2005,23(2):163-167.

[18] 李春杰,南志标. 混播对草坪建植与病害的影响[J]. 草业科学,2002,19(8):63-66.

[19] 刘 伟,张新全,李 芳,等. 西南区野生狗牙根遗传多样性的 ISSR 标记与地理来源分析[J]. 草业学报,2007,16(3):55-61.

[20] 贺佳圆,周建军,辛志图,等. 草地早熟禾与高羊茅不同混播比例对草坪质量的影响[J]. 草原与草坪,2016,36(2):92-96.