

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201604022

引文格式: 向巧彦, 黄夕洋, 李虹, 等. 利用 ISSR 分子标记检测空间诱导罗汉果 DNA 突变 [J]. 广西植物, 2017, 37(5):581-586
XIANG QY, HUANG XY, LI H, et al. Effects of space mutation on DNA of *Siraitia grosvenorii* detecting by ISSR molecular markers [J]. Guihaia, 2017, 37(5):581-586

利用 ISSR 分子标记检测空间诱导罗汉果 DNA 突变

向巧彦, 黄夕洋, 李虹, 甘金佳, 梁勇诗, 蒋水元*

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 为探究太空环境对罗汉果造成的诱变效应, 筛选罗汉果新品种培育优异种质, 该研究运用 ISSR 分子标记技术, 对 28 个航天诱变罗汉果及主栽品种进行了全基因组多态性检测和聚类分析。结果表明: 从 100 个 ISSR 引物中筛选得到 17 个引物, 共扩增出 157 个条带, 其中 83 条具有多态性, 多态条带百分率为 52.87%, 遗传相似系数范围为 0.707~0.987。根据 UPGMA 聚类图, 28 个罗汉果样本可以分为 3 类: 聚类 I 为航天种质 B6 ♂和 B3 ♀; 聚类 II 为航天种质 A1 ♀、A14、A18 ♂与主栽品种; 聚类 III 中都为航天罗汉果种质。上述结果暗示 A1 ♀、A14、A18 ♂与其他航天种质已经产生了一定的遗传分化, 具有与主栽品种相似的遗传背景, 可能获得了有益突变。该研究结果为罗汉果新品种培育和杂交亲本选配提供了科学依据。

关键词: 罗汉果, 空间诱变育种, ISSR, 分子标记辅助选择

中图分类号: Q949.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)05-0581-07

Effects of space mutation on DNA of *Siraitia grosvenorii* detecting by ISSR molecular markers

XIANG Qiao-Yan, HUANG Xi-Yang, LI Hong, GAN Jin-Jia,
LIANG Yong-Shi, JIANG Shui-Yuan*

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: In order to investigate genetic variation of *Siraitia grosvenorii* after space flight, and to create elite germplasm, ISSR (inter-simple sequence repeats) molecular markers were used to detect the genome-wide DNA polymorphism and to make cluster analysis of 28 *S. grosvenorii* samples including space-flight accessions and main cultivars. Seventeen primers which had clear polymorphic bands were selected from 100 primers. A total of 157 bands were detected, of which 83 bands were polymorphic with a polymorphic rate of 52.87%. Genetic similarity coefficient ranged from 0.707 to 0.987. UPGMA cluster analysis revealed that 28 samples formed three primary distinct clusters: Cluster I included two space mutation germplasm B6 ♂ and B3 ♀; Cluster II contained space mutation germplasm A1 ♀, A14, A18 ♂ and all the main cultivars; The remaining space mutation germplasm belonged to cluster III. These results were as follows: (1) Space mutation could result in genetic variation of *S. grosvenorii*. (2) A1 ♀, A14 and A18 ♂ might gain positive mutation because their genetic backgrounds were similar with the main cultivars, which could provide useful information for crea-

收稿日期: 2016-10-24 修回日期: 2016-12-14

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 14124002-9, 桂科重 1355001-2-6, 桂科能 1598025-40) [Supported by the Program of Science Research and Technology Development from the Department of Science and Technology of Guangxi (14124002-9, 1355001-2-6, 1598025-40)].

作者简介: 向巧彦(1982-), 女, 广西桂林人, 博士研究生, 助理研究员, 主要研究方向为药用植物分子生物学, (E-mail) xiangqiaoyan@163.com。

*通信作者: 蒋水元, 研究员, 主要从事药用植物栽培与育种研究, (E-mail) jsy@gxib.cn。

ting new elite germplasms in *S. grosvenorii*.

Key words: *Siraitia grosvenorii*, space mutation breeding, ISSR, molecular marker-assisted selection

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是我国特有的葫芦科多年生草质藤本植物,以果实入药,为我国常用大宗中药材之一,具有止咳祛痰、润肠通便等功效(中华人民共和国国家药典委员会,2015)。罗汉果果实中的甜苷 V 为世界上最强的非糖甜味物质之一(李典鹏和张厚瑞,2000),在天然药物和甜味剂开发方面受到广泛关注。罗汉果分布于一个相对狭小的区域,资源匮乏已成为不争的事实。罗汉果药用和甜苷提取需求量的增加,推动了罗汉果种植业的空前发展,原产地被大量开垦发展罗汉果种植,导致野生资源储备锐减;而人工栽培组培苗的推广,使栽培方式由多年生变为一年生,提高产量的同时,却导致栽培品种单一,品种退化严重。罗汉果在种植方面最突出的是品种问题,农学和生物学工作者在罗汉果的高产栽培技术(陈继富等,2012)、组织培养(付长亮等,2005)、多倍体育种(蒋水元等,2009)、新品种选育(马小军等,2008)、遗传转化研究(朱英芝,2012;邢爱佳等,2013;曾雯雯,2015)等方面已开展大量工作,并且选育出一系列优良高产的新品种。到目前为止,利用杂交育种、诱变育种与优良品种选育等常规方法还没有取得突破性进展(闫海锋等,2011)。当前所采用的栽培品种依然为 20 世纪 70 年代形成的青皮果、红毛果等农家品种。

航天育种具有诱变效率高、育种周期短、变异方向不定、可出现常规育种不易出现的变异等特点,近年来已经受到广泛关注,并取得了令人瞩目的研究成果(刘录祥等,2007;梁剑平,2010)。运用航天育种,可以提高罗汉果变异率,扩大种质资源库,创造更多供选择的优异种质。2011 年,一批罗汉果种子搭载“神舟八号”进行太空育种;2012 年,这批种子在广西桂林永福县进行试种。ISSR 分子标记技术,具有多态性高、操作简单、价格低廉的优点,具有较高的稳定性和重复性(Zietkiewicz et al,1994)。本研究运用 ISSR 分子标记技术,首次在 DNA 层面,对航天罗汉果种质进行遗传变异检测,探究太空环境对罗汉果造成的诱变效应,为罗汉果新品种的培育提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

2014 年春,将航天罗汉果种质与主栽品种种植

于广西植物研究所本课题组试验地,当年秋天采集叶片,共计 28 个样本(表 1),硅胶干燥保存。航天罗汉果标号以 A 和 B 开头。主栽品种都为青皮果,航天种质品种为冬瓜果。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取 采用改良 CTAB 法(Doyle JJ & Doyle JL,1987),提取干燥叶片总 DNA。提取步骤:称取干燥叶片 0.1 g,放入研钵中,加适量液氮,快速研磨成粉;在研钵中加入 2 mL 预热 65 °C 2% CTAB (含 2% β -巯基乙醇),研磨混合均匀;将溶液从研钵转入 2 mL 离心管中,65 °C 水浴 1 h,期间每隔 15 min 上下颠倒混匀一次;12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液倒入新离心管;加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),上下颠倒混匀 7 min。12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清吸入新离心管;重复氯仿抽提一次;加入 1/10 体积 NaAc (pH 5.2),等体积异丙醇(-20 °C 预冷),混匀,-20 °C 冰箱中静置 20 min;5 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$,5 min,倒上清液;加入 1 mL 70% 乙醇洗涤一次;5 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$,5 min,倒上清液,1 mL 无水乙醇洗涤 2 次;自然风干,加 50 μL 1 \times TE 溶解;-20 °C 冰箱保存。

1.2.2 DNA 检测 运用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 完整性,用 NanoDropTM/ND-2000C 检测 DNA 浓度和纯度。

1.2.3 ISSR 引物及退火温度筛选 随机选取 8 个样本,对 100 个引物进行筛选。PCR 试剂为 TaKaRa Ex Taq[®] DNA Polymerase (Mg^{2+} free buffer)。25 μL PCR 反应体系中含 DNA 模板 50 ng,其余成分终浓度:1 \times buffer(不含 Mg^{2+}), MgCl_2 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,4 种 dNTPs 各 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,引物 0.5 $\mu\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,Tag 酶 1 U。反应程序为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 2 min,40 个循环,72 °C 延伸 7 min(周俊亚等,2004)。产物用琼脂糖凝胶电泳检测,EB 染色,凝胶成像系统显影、拍照。选择条带多、清晰、亮度强的引物进行引物退火温度筛选。设置 50~55 °C 温度梯度,筛选退火温度,用于 28 个样本的 ISSR 分析。

1.2.4 ISSR 数据分析 ISSR 扩增产物以 0、1 统计建立数据库。在相同的迁移位置上,有带存在赋值为“1”,无此带赋值为“0”,用 GenAEx 6.5 软件(Peakall

表 1 样品列表
Table 1 Checklist of the materials

来源 Origin	编号 No.	名称 Name	性别 (雌♀雄♂) Gender (Female ♀ Male ♂)
航天种质 Space-flight induced accessions	1	A1	♀
	2	A2	♀
	3	A3	♀
	4	A5	♀
	5	A6	♀
	6	A8	
	7	A9	
	8	A10	
	9	A11	♀
	10	A13	
	11	A14	
	12	A15	♀
	13	A16	♂
	14	A17	
	15	A18	♂
	16	A19	
	17	B3	♀
	18	B6	♂
主栽品种 Main cultivar	19	LG1	♂
	20	LG2	
	21	LG3	
	22	YS1	♂
	23	YS2	
	24	LS1	
	25	LS2	♂
	26	BL1	
	27	BL2	
	28	BL3	♂

& Smouse, 2006; PE, 2012) 计算 Nei's (Nei & Li, 1979) 遗传相似系数, 采用 NTSYSpc Version 2.10 e 软件构建 UPGMA 聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测

从图 1 可以看出, DNA 条带亮度高、集中、清

晰、无降解。DNA 的浓度值在 1 765.3~5 186.4 ng · μL⁻¹ 之间, λ_{260/280} 在 2.05~2.16 之间, λ_{260/230} 在 1.80~2.21 之间。纯 DNA 的 λ_{260/280} 比值约为 1.8, 该比值受测量时空白样品和 DNA 样品所用溶剂的 pH 和例子强度影响: 酸性溶剂的比值会低 0.2~0.3, 而碱性溶液比值会高 0.2~0.3。如果偏差太大, 则是蛋白、酚或其他污染在 280 nm 区域附近具有吸收峰; 纯 DNA 的 λ_{260/230} 比值为 1.8~2.2。比值太低说明 DNA 提取技术需要优化 (Desjardins & Conklin, 2010)。本研究中, 溶解 DNA 所用试剂 TE (pH8.0) 为碱性, λ_{260/280} 值在正常范围。因此, 本研究所获得的罗汉果 DNA 浓度高、质量好, 可以满足 ISSR 分析的需要。

2.2 ISSR 引物筛选及引物退火温度筛选

从 100 个 ISSR 引物中筛选出 17 个引物, 筛选的退火温度见表 2 和图 2。

2.3 遗传多样性分析

17 条引物在 28 个样本中共扩增得到 157 条条带, 其中 83 条具有多态性, 多态条带百分率为 52.87%; 各引物扩增的条带数最多为 13 条 (U881), 最少为 6 条 (U808), 平均为 9.2 条; 各引物扩增的多态条带最多为 9 条 (U857), 最少为 3 条 (U808, U834, U835, U845, U889), 平均为 4.9 条 (表 2)。

Nei's 遗传相似系数范围 0.987~0.707, 最大的为 A1 ♀ 和 BL2 (0.987), 最小的为 B6 ♂ 和 LG2。根据 UPGMA 聚类图, 28 个罗汉果样本可以分为 3 类, 聚类 I 为航天种质 B6 ♂ 和 B3 ♀; 聚类 II 为航天种质 A1 ♀, A14, A18 ♂ 与主栽品种; 聚类 III 中都为航天罗汉果种质 (图 3)。

3 讨论与结论

我国通过航天育种已培育出一批具有高产、优质、抗病新品种 (系), 但相应的基础理论研究较薄弱, 需要加强航天诱变的分子基础研究, 解析诱变的分子机制, 提高诱变的预见性和诱变后代选择效率。本研究运用 ISSR 分子标记技术, 从 DNA 层面, 对航天罗汉果的变异进行解析。从 100 个 ISSR 引物中筛选得到 17 个引物, 对 28 个罗汉果样本进行扩增, 共扩增出 157 个条带, 其中 83 条具有多态性, 多态条带百分率为 52.87%; 各引物扩增的条带数最多为 13 条 (U881), 最少为 6 条 (U808), 平均为 9.2 条; 各引物扩增的多态条带最多为 9 条 (U857), 最少为

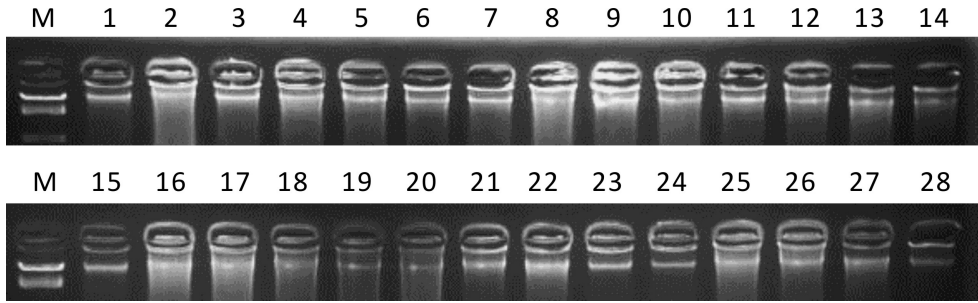


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 M. λ DNA/*EcoR* I + *Hind*II Marker; 1-28. 对应于表 1 的样本编号。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis map of DNA M. λ DNA/*EcoR* I + *Hind*II Marker; 1-28. Corresponding to the sample number in Table 1.

表 2 引物退火温度及多态性

Table 2 Primers annealing temperature and primers polymorphism

编号 No.	引物 Primer	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	位点数 No. of total loci	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率 Percentage of polymorphic loci (%)
1	U808	(AG) ₈ C	55	6	3	50.0
2	U811	(GA) ₈ C	52	8	5	62.5
3	U814	(CT) ₈ A	50	9	5	55.6
4	U815	(CT) ₈ G	50	8	4	50.0
5	U822	(TC) ₈ A	51	8	5	62.5
6	U823	(TC) ₈ C	53	10	8	80.0
7	U826	(AC) ₈ C	53	11	6	54.5
8	U834	(AG) ₈ YT	55	10	3	30.0
9	U835	(AG) ₈ YC	52	9	3	33.3
10	U836	(AG) ₈ YA	54	10	7	70.0
11	U841	(GA) ₈ YC	53	7	4	42.9
12	U845	(CT) ₈ RG	52	8	3	37.5
13	U856	(AC) ₈ YA	52	11	4	36.4
14	U857	(AC) ₈ YG	52	11	9	81.8
15	U881	GGG TGG GGT GGG GTG	53	13	7	53.8
16	U889	DBD(AC) ₇	52	8	3	37.5
17	U899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A	50	10	4	40.0
		总计 Total		157	83	
		平均 Average		9.2	4.9	52.87

3 条 (U808, U834, U835, U845, U889), 平均为 4.9 条; Nei's 遗传相似系数范围 0.987~0.707, 最大的为 A1 ♀ 和 BL2 (0.987), 最小的为 B6 ♂ 和 LG2; 根据 UPGMA 聚类图, 28 个罗汉果样本可以分为 3 类, 聚

类 I 为航天种质 B6 ♂ 和 B3 ♀; 聚类 II 为航天种质 A1 ♀, A14, A18 ♂ 与主栽品种; 聚类 III 中都为航天罗汉果种质。

航天诱变育种产生的变异率一般为 5%~10%,

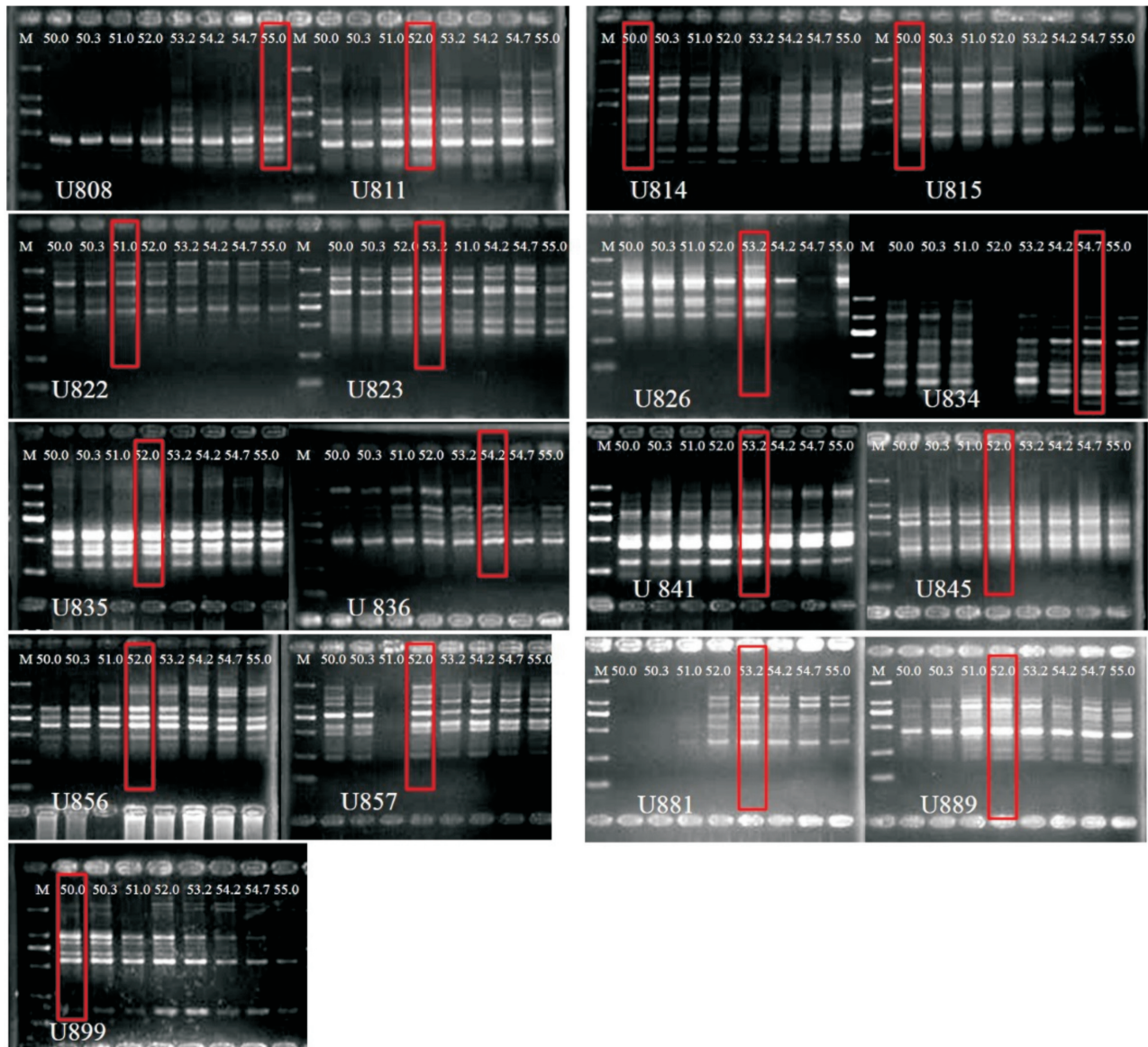


图 2 ISSR 引物退火温度筛选电泳图 M. DL 2000 Marker; 50.0~55.0 为温度 (单位: °C); 方框处所示为筛选出的退火温度。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis map of annealing temperature screening M. DL 2000 Marker; 50.0~55.0 is temperature (unit: °C); Box represents the optimized annealing temperature.

往往从这些突变体中可以筛选到 2%~3% 的有益突变体材料 (潘光辉等, 2005)。本研究中, 航天种质品种为冬瓜果, 主栽品种属于青皮果, 运用 ISSR 分子标记技术, 可以从 DNA 层面区分这两个品种, 与周俊亚等 (2005) 的研究结果一致。青皮果是目前栽培面积最大的罗汉果品种 (周俊亚和唐绍清, 2006), 具有甜苷含量高、大、中果占比高、产量高、适应性强等优点 (孙宗喜等, 2006; 白隆华等, 2007)。本研究中, 根据 Nei's 遗传相似系数构建的 UPMG 聚类图表明, 所有主栽品种聚为一类, 与其品

种分类一致, 大多数航天罗汉果聚为一类, 也与其品种来源一致; 航天罗汉果 A1 ♀, A14, A18 ♂ 与主栽品种聚为一类, 暗示这 3 个种质与其他航天种质已产生了一定的遗传分化, 而具有与主栽品种更为相似的遗传背景, 可能获得了有益突变。本研究结果可以指导航天育种后代的筛选, 重点关注 A1 ♀, A14, A18 ♂, 结合农艺性状和化学成分方面的研究, 从中筛选出优良品系。

在杂交育种中, 亲本选择的原则之一是亲缘关系上存在一定差异, 亲本间差异越大, 后代的杂交优

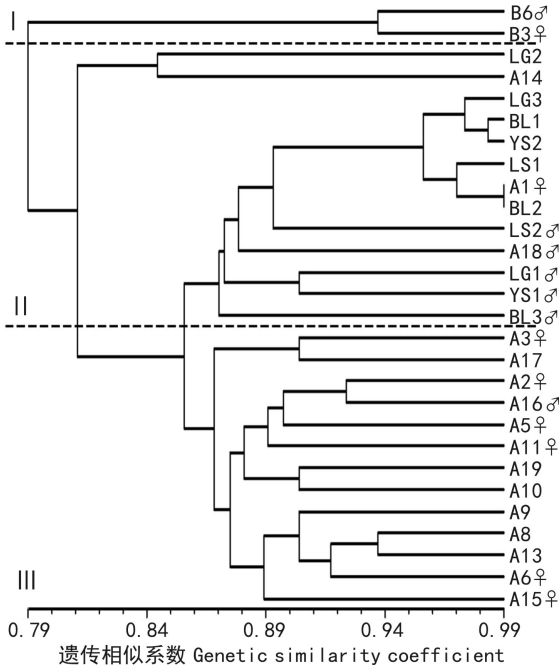


图3 28个样本间基于Nei's遗传相似性系数的UPGMA聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram for 28 individuals based on Nei's genetic similarity coefficient

势可能越明显。根据Nei'遗传相似系数,可以获得两两品种间的最大及最小相似度,指导后续的杂交育种工作,充分利用航天种质,为罗汉果的遗传改良引入新的优良种质。

参考文献:

BAI LH, MA XJ, MO CM, et al, 2007. Study on quantitative assessment of *Siraitia grosvenorii* germplasms by general index [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 32(23):2482-2484. [白隆华, 马小军, 莫长明, 等, 2007. 罗汉果种质资源综合指数定量评价研究 [J]. *中国中药杂志*, 32(23):2482-2484.]

CHEN JF, TIAN QJ, LIU SB, 2012. Effects of different cultivation modes on growth, fructification and fruit quality of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Chin J Trop Crops*, 33(12):2185-2189. [陈继富, 田启建, 刘世彪, 2012. 不同栽培方式对罗汉果生长、结果及品质的影响 [J]. *热带作物学报*, 33(12):2185-2189.]

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol. I) [M]. Beijing: China Medical Science Press:324. [中华人民共和国国家药典委员会, 2015. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社:324.]

DESJARDINS P, CONKLIN D, 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids [J]. *J Vis Exp*, (45):e2565.

DOYLE JJ, DOYLE JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 19:11-15.

FU CL, MA XJ, BAI LH, et al, 2005. Progress on research of tissue culture of *Siraitia grosvenorii* [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 30(5):325-328. [付长亮, 马小军, 白隆华, 等, 2005. 罗汉果组织培养研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 30(5):325-328.]

JIANG SY, JIANG XJ, QIN JS, et al, 2009. Preliminary study on selection of seedless *Siraitia grosvenorii* [J]. *Guihaia*, 29(4):506-509. [蒋水元, 蒋向军, 覃吉胜, 等, 2009. 无籽罗汉果选育的初步研究 [J]. *广西植物*, 29(4):506-509.]

LI DP, ZHANG HR, 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo—a special local product of Guangxi [J]. *Guihaia*, 20(3):270-276. [李典鹏, 张厚瑞, 2000. 广西特产植物罗汉果的研究与应用 [J]. *广西植物*, 2000, 20(3):270-276.]

LIANG JP, LI XH, LU XH, et al, 2010. Application of nuclear irradiation to traditional Chinese medicine [J]. *Nucl Physic Rev*, 21(3):284-290. [梁剑平, 李雪虎, 陆锡宏, 等, 2010. 核辐照技术在中药领域中的应用 [J]. *原子核物理评论*, 21(3):284-290.]

LIU LX, GUO HJ, ZHAO LS, et al, 2007. Achievements in the past twenty years and perspective outlook of crop space breeding in China [J]. *J Nucl Agric Sci*, 21(6):589-592, 601. [刘录祥, 郭会君, 赵林妹, 等, 2007. 我国作物航天育种 20 年的基本成就与展望 [J]. *核农学报*, 21(6):589-592, 601.]

MA XJ, MO CM, BAI LH, et al, 2008. A new *Siraitia grosvenorii* cultivar 'Yongqing 1' [J]. *Acta Horti Sin*, 35(12):1855. [马小军, 莫长明, 白隆华, 等, 2008. 罗汉果新品种'永青1号' [J]. *园艺学报*, 35(12):1855.]

NEI M, LI WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 76(10):5269-5273.

PAN GH, YIN XG, YANG QF, et al, 2005. Research progress on space-flight breeding of crops [J]. *SW Hortic*, 33(4):34-36. [潘光辉, 尹贤贵, 杨琦凤, 等, 2005. 农作物太空育种研究进展 [J]. *西南园艺*, 33(4):34-36.]

PEAKALL R, SMOUSE PE, 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Mol Ecol Notes*, 6(1):288-295.

PEAKALL R, SMOUSE PE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update [J]. *Bioinformatics*, 28(19):2537-2539.

SUN ZX, WANG YW, YOU M, et al, 2006. Comparison study on yield and quality in tissue-cultured seedling of different *Momordica grosvenori* breed [J]. *Biotechnol Bull*, S1:521-524. [孙宗喜, 王有为, 尤敏, 等, 2006. 不同罗汉果品种组培苗产量与质量性状的比较研究 [J]. *生物技术通报*, S1:521-524.]

XING AJ, MA XJ, MO CM, et al, 2013. Cloning and prokaryotic expression of UDP-glycosyltransferase in *Siraitia grosvenorii* [J]. *Acta Horti Sin*, 40(6):1195-1204. [邢爱佳, 马小军, 莫长明, 等, 2013. 罗汉果葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达 [J]. *园艺学报*, 40(6):1195-1204.]

YAN HF, HUANG XY, LIANG P, et al, 2011. Comparative study on biological characteristics between diploid and polyploid *Siraitia grosvenorii* [J]. *Guangxi Sci*, 18(2):177-180. [闫海峰, 黄夕洋, 梁萍, 等, 2011. 二倍体与多倍体罗汉果生物学性状的比较研究 [J]. *广西科学*, 18(2):177-180.]

ZENG WW, 2015. Establishment of genetic transformation system for *Siraitia grosvenorii* and transformation research of CS gene (下转第 598 页 Continue on page 598)