

狐米草低能重离子各诱变株系 ITS 序列比较^{※*}

闫茂华^{1,2}, 薛华杰¹, 陆长梅¹, 吴国荣¹, 钦佩^{1,3}

(1. 南京师范大学生命科学学院 江苏省资源生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097;

2. 连云港师范高等专科学校 初等教育系, 江苏 连云港 222006; 3. 南京大学 生命科学院, 江苏 南京 210093)

摘 要: 为了检验狐米草低能重离子各诱变株系在表型、生物量和内部生理生化状态发生变化的同时, 其遗传物质 DNA 是否发生改变, 试验检测了狐米草对照株系与各诱变株系的 ITS 序列。结果发现, 所检测的狐米草 10 个诱变株系的 ITS 序列与对照株系完全一致, 仅与美国德克萨斯州和路易斯安那州的狐米草株系差别 1—2 个碱基, 显示低能重离子束诱变并没有导致狐米草株系在 ITS 区段发生变异。

关键词: 狐米草; 低能重离子诱变; ITS

中图分类号: S54

文献标识码: A

近 20 年来, 随着分子辐射生物学的迅速发展, DNA 作为辐射关键靶分子的观点已得到广泛认同。^[1] 高能或低能重离子辐射对生物材料中的 DNA 和染色体损伤与诱变也有大量报道。^[2] 在辐射诱变育种中, 虽然短期的逆境胁迫也会造成生物材料部分性状的变异, 但只有具备稳定性遗传的变异(即 DNA 发生永久性改变)才能满足育种的需要。^[2] 周长芳^[2] 等人研究表明, 经过低能重离子束诱变后, 表型上与对照株系存在显著差异的 10 个诱变株系在生物量、单位面积光合能力、有机和无机营养成分的含量以及抗逆性等方面与对照株系之间也存在一定差异。这些株系所表现出来的性状差异是因为环境条件还是由于遗传物质的改变而造成的尚不清楚。通过分子标记技术进行辅助辐射诱变育种, 可以尽早确定变异原因, 提高选择的准确性。^[2,3] 目前检测各株系之间遗传物质的差别, 常采用分子标记的方法。^[3] 分子标记分析各诱变株系的遗传物质存在明显差异, 不仅可以证明辐射导致 DNA 变异, 同时也获得与表型及内在生理特征相关的证据, 为不同株系的鉴别提供可靠方法。

在被子植物分类鉴定中, 根据实验目的不同可采用多种分子标记法^[4]: ITS 序列测定法、RAPD 法及 ISSR 法等。由于 ITS 区(包括 ITS1 和 ITS2)具有高度保守性和核苷酸序列的高度变异性, 使得这些间隔区 DNA 序列较容易排序, 而相对其他片段的高度变异性又使得该序列较适合于种内和种间不同居

群的分子标记研究; 随机扩增 DNA 多态性分析(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)和 ISSR 等由于其使用随机引物而带来高度灵敏性, 多用于种内不同居群的分子标记研究。^[5,6] 通过查找 GenBank 对比发现, 同样生长于美国的德克萨斯州和路易斯安那州狐米草两个居群的 ITS 序列具有一定差异。因此, 本试验主要检测狐米草对照株、诱变株共 11 个株系的 ITS 序列, 观察它们之间是否发生稳定的变异。

1 材料与方法

实验材料由南京大学生命科学学院盐生生态实验室提供。共包括 10 个诱变株系(分别取名为 N1—N10)和 1 个野生株系(CK)的狐米草, 于 2005 年 4 月初种植在南京师范大学生命科学学院植物园内的露天向阳、各自独立的实验池内。每周用人造海水(自来水溶解粗海盐配制成 2.5% 盐度的盐水)浇灌一次以模拟沿海滩涂环境; 每月用 Hoagland 营养液浇灌一次以补充各种营养成分; 并根据地面湿润状况适时喷灌自来水。待株系长至 7 月, 取各株系幼嫩叶片进行实验。

另有德克萨斯州和路易斯安那州的两个狐米草居群的 ITS 序列来源于 GenBank, 它们的登录号分别为 AJ489795 和 AJ489794。

2 实验方法

2.1 植物总 DNA 的提取

取 100mg 的狐米草各株系新鲜叶片于研钵中,

* 收稿日期: 2006—10—12

※ 江苏省科学技术委员会自然科学基金资助项目, 项目编号: 2005SWX08Z005; 江苏省资源生物技术重点实验室资助项目, 项目编号: 164070300803

加液氮研磨至匀浆状,连同液氮转至 50 mL 加盖塑料离心管中,待液氮挥发后,用 3S Spin Plant 基因组 DNA 提取试剂盒(上海申能博采公司提供)进行完整基因组 DNA 提取。分光光度法测定 DNA 浓度,并辅以电泳与 EB 染色后在紫外灯下观察测定。提取的基因组 DNA 直接用于 PCR 扩增。

2.2 ITS 区片段扩增与纯化

rDNA ITS 区(包括 ITS1、5.8S 和 ITS2)的扩增采用 White^[7]等设计的 ITS 通用引物 ITS4(5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS5(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3');按反应程序(预变性 95℃ 5 min,变性 94℃ 1 min,复性 54℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,30 个循环后延伸 72℃ 10 min)进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果,PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒(申能博采公司)纯化。

2.3 DNA 测序与 ITS 序列确定

纯化后的 PCR 产物经 ABI 377 DNA 自动测序仪(PE Applied Biosystem, USA)检测。ITS 序列始末端的决定,参考了 GenBank 中其他狐米草居群的 ITS 序列。

2.4 数据分析

所得序列用 Mega 3 软件进行比对,并制图。

3 结果与分析

S.patens	TCGTGACCCCT	AACAAAAATA	GACTGTGAAT	TTGTCATCCA	AGCCGTCGGG	50
S.patens in Texas						50
S.patens in Louisiana						50
S.patens	TGACGGTGCC	AGCACCGTCT	CTCGGCATAG	GCCATTTTCC	TTCTGACGGA	100
S.patens in Texas				C.....	C.....	100
S.patens in Louisiana				C.....		100
S.patens	GGGGAGGTGG	CCCCAAAGAA	CCCACGGCGC	TGTATGGCGT	CAAGGAACAC	150
S.patens in Texas						150
S.patens in Louisiana						150
S.patens	TATGTTGCAT	GCTCAGGGCC	ACGATCGGCG	TGCTGAACGG	GTCTGTGTCT	200
S.patens in Texas						200
S.patens in Louisiana						200
S.patens	GCTATGCTAC	CTGAATGTAT	ATAAGACTCT	CGGCAACGGA	TATCTTGGCT	250
S.patens in Texas						250
S.patens in Louisiana						250
S.patens	CTTGATCGA	TGAAGAACGT	AGCAAAATGC	GATACCTGGT	GTGAATTGCA	300
S.patens in Texas						300
S.patens in Louisiana						300
S.patens	GAATCCCGTG	AACCATCGAG	TTTTTGAACG	CAAGTTGGCC	CTGAGGCCTC	350
S.patens in Texas						350
S.patens in Louisiana						350
S.patens	TTGGTTGAGG	GCACGTCTGC	CTGGGCGTCA	CGCCAAAGA	CACTCCCTTG	400
S.patens in Texas						400
S.patens in Louisiana						400
S.patens	CAATCCTTGC	GTGGGATGTG	GTGTTTGGCC	TTCCATTCTC	TACTTATAAG	450
S.patens in Texas						450
S.patens in Louisiana						450
S.patens	GTGTGGTAGG	CTAAAGGAAG	TGGCTTCTGG	CTGTGGTGCC	AGTCACAGCA	500
S.patens in Texas						500
S.patens in Louisiana						500
S.patens	CTTGGTGGAT	GACACATGTT	GTTCTCGAAG	TTGTGACTTG	TACTGATTCC	550
S.patens in Texas						550
S.patens in Louisiana						550
S.patens	GGTAACATTG	GCCCTCTGTA	CCCCATGGAT	TGAGCATCGA	TTGCTTGCAC	600
S.patens in Texas						600
S.patens in Louisiana						600

图 2 狐米草各株系的 ITS 序列与来源于德克萨斯州和路易斯安那州狐米草的 ITS 序列比较

Figure 1 ITS sequence comparison among S. patens strains used in this experiment and strains from Texas and Louisiana

用 ITS 序列的通用引物对上述 PCR 产物进行测序时发现,对照株系以及 10 个诱变株系的 ITS 序列

3.1 狐米草各株系 ITS 区段 PCR 扩增结果

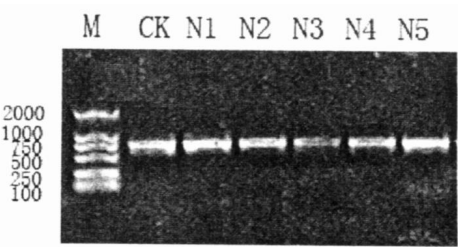


图 1 狐米草部分株系 ITS 区段 PCR 扩增图谱

Figure 1 ITS PCR products of strains of S. patens.

(M:DNA marker; CK, N1~N5:strains of S. patens)

利用上海申能博彩公司提供植物基因组 DNA 提取试剂盒,提取了包括对照株系在内的狐米草 11 个株系的基因组 DNA。分光光度法检测提取液的 OD 值发现,各株系的 OD_{260/280} 值均处在 1.7—1.9 之间,表明提取的基因组 DNA 质量较好。用提取的基因组 DNA 作为 PCR 模板直接进行 PCR 反应,所得 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后发现,所有待测株系均在 700bp 处有一条清晰明亮的条带(图 1)。PCR 产物再经上海申能博彩公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

3.2 狐米草各株系 ITS 序列测序结果比较

完全一致,但与 GenBank 上登录的生长于德克萨斯州和路易斯安那州两个株系的 ITS 序列相比,后者

在 ITS1 区域的第 86 位和第 92 位的碱基有一定的不同(详见图 2)。

4 讨论

rDNA ITS¹ 和 ITS² 区属于非编码区,受环境选择压力小,具有高度的变异性,从而拥有较多的信息;而其长度的高度保守性又使得这个区域的 DNA 序列较易排序;并且该段序列在核基因组中以中等重复序列存在,总长度仅有 600bp 左右(包括 5.8s 区),PCR 反应时对模板的要求很低,易于操作。因此,该段序列被广泛应用于属下种间以及种内不同居群与品系间的鉴别。

本实验采用的狐米草对照株系源于美国特立华州,并且经过狐米草愈伤组织产生的组培苗,其 ITS 序列与生长于美国德克萨斯州和路易斯安那州两个株系的 ITS 序列间有 1—2 个碱基的不同。狐米草的繁殖多是通过营养繁殖、组织培养以及种子繁殖

(种子繁殖率极低),生长于不同地区、不同居群之间 ITS 序列存在差异,说明它们确实具有稳定性遗传的差异。

本实验涉及的 10 个诱变株系是利用愈伤组织经过 N⁺、Zn²⁺、Ar⁺ 等重离子束低能注入技术处理,诱导而来。^[2]虽然两年的田间栽培研究表明,各株系在表型、光合能力、营养成分以及抗旱性等方面存在较大差异,但 ITS 序列检测结果表明,各株系的 ITS 区段序列与对照株系的完全一致。这显示低能重离子辐射并没有使得狐米草各株系在 ITS 区段产生变异。为了进一步检测各株系之间的遗传差异,我们另外采用 RAPD 法对各株系的遗传性状进行了分析。RAPD 分析的初步结果显示:各株系间遗传物质确实存在一定的区别,表明狐米草各诱变株系之间的差异可能由于遗传物质的不同造成。

参考文献:

[1]周长芳,钦佩.低能重离子生物学研究进展[J].南京林业大学学报:自然科学版,2003,27(1):81—86.
[2]周长芳.低能重离子生物诱变机制及其在狐米草遗传育种中的应用[D].南京大学生命科学学院,2003.
[3]辛业芸.分子标记技术在植物学研究中的应用[J].湖南农业科学,2002(4):9—12.
[4]王建波,张文驹,陈家宽.核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J].植物分类学报,1999,37(4):407—416.
[5]陈若雷,宋道军,余增亮,等. RAPD 分析 N⁺ 注入紫花苜蓿种子后幼苗基因组 DNA 变异[J].高技术通讯,2001(11):12.
[6]常凤启,刘选明,李银心,等.低能 N⁺ 辐照拟南芥诱导基因组 DNA 碱基变异分析[J].中国科学:C 辑,2003,33(2):117.
[7]White T J, Bruns T, Les S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T eds. PCR Protocols: a Guide to Methods and Application[M]. San Diego: Academic Press, 1990:315—322.

作者简介:闫茂华(1966—),江苏连云港人,连云港师范高等专科学校初等教育系副教授,南京师范大学生命科学学院细胞生物学硕士生,主要从事植物生理生化及生物多样性方面的教学与研究;陆长梅(1969—),女,江苏南通人,南京师范大学生命科学学院副教授,博士,主要从事植物生理生化与植物资源开发等方面的研究工作。

ITS Sequence Comparison among Strains
of *Spartina Patens* Mutated by Low Energy Heavy Ion

YAN Mao—hua^{1,2}, XUE Hua—jie¹, LU Chang—mei¹, WU Gu—rong¹, QIN Pei^{1,3}

(1. Jiangsu Key Lab for Bioresource Technology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;
2. Lianyungang Teachers College, Lianyungang 222006, China; 3. Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Low energy heavy ion radiation has caused many changes in characters of shapes, biomasses and interior physiology etc among strains of *Spartina patens*. In order to test whether DNA sequences have also been changed, ITS sequences of 10 mutated strains and the control strains are assayed and compared in this paper. Results show that ITS sequences from these 11 strains are all the same, and they are different at 1—2 sites with strains from states of Texas and Louisiana of USA. These demonstrate that low energy heavy ion radiation has not caused variation in ITS section among these 10 mutated strains.

Key words: *Spartina patens* (Ait.) Muhl; mutated strains; ITS sequence; comparison