

藜科 6种耐盐植物遗传多样性的 EST-SSR 分析

徐照龙^{1,2}, 易金鑫², 余桂红², 张大勇², 何晓兰², 王秀娥¹, 马鸿翔²
(¹南京农业大学农学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 南京 210014)

摘要: 利用 EST-SSR 标记分析了藜科 6种耐盐植物的遗传基础和遗传多样性, 以期为藜科耐盐植物遗传育种提供快速、可靠的分子标记辅助选择工具。采用 31 对藜科海蓬子属和碱蓬属的 EST-SSR 引物对藜科 6种植物进行 PCR 扩增, 其中 16 对引物得到较好扩增, 引物通用率为 51.6%, 共检测到 18 个多态性位点, 每位点等位基因数 2~4 个, 多态性丰富。进一步采用 Nei's 遗传距离聚类分析表明 6种植物可以分为 3 组, 主成分分析也支持上述分组, 而且 DY529957、DY529903 和 DY529885 3 个 EST 在分组中贡献率最高。经与 GenBank 中序列相似性比对, 前两者分别编码生长素抑制蛋白 (Auxin-repressed protein, ARP) 和植物防御素 (Defensins, Def), 都参与植物逆境胁迫响应, 但分属于不同代谢途径; 后者则编码未知蛋白。总体而言, 16 对 SSR 引物在藜科 6种植物间具有较好的通用性, 能够揭示该 6种植物间广泛的遗传多样性, 及其存在不同耐盐机制提供分子证据。

关键词: 藜科; EST-SSR; 遗传多样性; 耐盐机制

EST-SSR Based Genetic Diversity Analysis on Salt Tolerant Plants from Six Species in Chenopodiaceae

XU Zhao-long^{1,2}, YI Jin-xin², YU Guihong², ZHANG Da-yong²,
HE Xiaolan², WANG Xiu-e¹, MA Hong-xiang²
(¹College of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095;
²Institute of Agribiotechnology, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014)

Abstract This report focus on EST-SSR based evaluation of genetic diversity in salt tolerant plant from six species in *Chenopodiaceae*. Thirty-one pairs of EST-SSR primers were designed according to ESTs sequence collected from *Salicornia* and *Suaeda* genera. Only sixteen out of all primer pairs successfully amplified the DNA fragments by using PCR procedure across all samples, which demonstrated 51.6% over all primers was transferrable. Total 18 polymorphic loci were detected by the 16 primer pairs, and allele number at each locus ranged from 2 to 4, indicating a wide range of genetic diversity. Clustering analysis based on Nei's genetic distance showed that the six plants could be grouped into three clades, and the division was confirmed by principal component analysis. Moreover, this grouping profile was mainly attributed to polymorphism of three ESTs, e.g. DY529957, DY529903 and DY529885. According to the sequence similarity, the three ESTs were assumed to encode an auxin-repressed protein (ARP), defensins (Def) and hypothetical proteins, respectively. Both ARP and Def were well documented to be involved in salt stress responds but from different pathways in plants. This result implies that different mechanism might be involved among the genera.

Key words Chenopodiaceae; EST-SSR markers; Genetic diversity; Salt tolerance mechanism

收稿日期: 2010-03-24 修回日期: 2010-09-08
基金项目: 国家自然科学基金 (30971798); 江苏省农业科技自主创新基金 (CX(10)433)
作者简介: 徐照龙, 在读硕士, 主要从事植物耐盐研究。E-mail: aaxulong@yahoo.com.cn

通讯作者: 马鸿翔, 研究员, E-mail: mahx@jaas.ac.cn; 易金鑫, 副研究员, E-mail: yij@jaas.ac.cn

藜科植物主要分布于温寒带半干旱及盐碱地区,多为盐生或旱生植物。其中许多具有重要的经济价值,如海蓬子 (*Salicornia bigelovii* Torr)、碱蓬 (*Suaeda glauca* Bge)、菠菜 (*Spinacia oleracea* L)、甜菜 (*Beta vulgaris* L)、三角叶滨藜 (*Atriplex triangularis* L)和灰绿藜 (*Chenopodium glaucum* L)等,多数藜科植物在极端的盐碱条件和长期进化过程中形成了许多独特的耐盐或耐旱的适应机制,因此藜科植物是既能产生经济效益又能防治荒漠化、改善盐碱地环境并维护生态平衡的重要植物种类^[1]。了解藜科植物的遗传多样性,可更加深入地理解植物耐盐机制,对利用生物技术进行品种的遗传改良具有重要意义。

由于分子标记可以从基因水平揭示植物种类的遗传差异,因而被广泛地应用于遗传多样性研究。EST-SSR标记为一种基于EST的新型SSR标记,该标记来自表达基因,因而不仅具有基因组来源的传统SSR标记所有优势,而且可能与基因功能密切相关,具有在植物物种之间可转移性的优点。目前,EST-SSR被广泛应用于遗传图谱构建、遗传多样性和通用性评价、种质鉴定、系统发育与进化研究等方面^[2-4]。本研究根据GenBank中公布的藜科植物相关的EST序列,开发EST-SSR标记,并研究这些EST-SSR标记在藜科海蓬子属、碱蓬属、滨藜属、甜菜属、藜属及菠菜属之间的多态性,以期揭示藜科植物耐盐性的遗传基础及多样性,为遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

收集了藜科6种植物,包括甜菜属叶用甜菜、菠菜属菠菜、藜属灰绿藜、滨藜属三角叶滨藜、碱蓬属碱蓬和盐角草属海蓬子。

1.2 DNA提取

6种植物各取2~4株典型植株,混合提取DNA,均采用CTAB法提取^[5],0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

1.3 藜科EST的收集、EST-SSR引物设计及PCR反应

上述藜科6种植物中,海蓬子和碱蓬的耐盐性最强,也是本文重点研究的海水蔬菜植物。因此,从NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中下载了盐角草属和碱蓬属所有的EST序列,分别为1303条和1177条。利用SSR序列检索工具SSR Hunter 1.3 (<http://en.biorsoft.net/dna/SSRHunter>,

<http://www.premierbio.com/primerdesign/index.html>)查找含有SSR的EST序列,选择重复单元碱基数在6以下,而且重复单元内碱基数与该单元重复次数之积大于或等于18的EST序列,共40条,其中9条冗余序列。利用在线引物设计软件Primer Premier 5.0 (<http://www.premierbio.com/primerdesign/index.html>)设计SSR引物,长度和退火温度分别在20bp和58℃左右。扩增片段包含SSR位点,预期产物大小在100~300bp。去除冗余序列后设计31对引物。PCR反应总体积为20μl,模板DNA(20ng/μl) 1μl,正反向引物(10μmol/L)各0.4μl,10xPCR Buffer 2μl, MgCl₂(25mmol/L) 1.6μl, dNTP(2.5mmol/L) 1.6μl, Taq(5U/μl) 0.2μl, ddH₂O 12.8μl。反应程序:94℃预变性4min, 94℃变性30s, 55~62℃退火30s和72℃延伸30s, 35个循环; 72℃终延伸7min。

1.4 PCR产物电泳和数据统计

PCR产物用12%的PAGE非变性胶在150V电压、50mA电流下电泳3h,用银染法染色^[6]。照相机拍照记录数据。选取的6种植物来自于6个属,遗传距离较远,仅有1或2种植物特有的位点出现频率较高,考虑到未来分子标记辅助育种的应用,此类位点信息含量相对较低,为此,根据预测条带大小,尽可能选择信息量高的位点,即6种植物中一半及以上在同一位点扩增出条带的位点统计为多态性位点,否则为特异性位点。有条带记为1,否则为0。

1.5 数据分析

上述0/1数据用于聚类分析(WARD, PROC CLUSTER/SAS)和主成分分析(PROC PRINCOM/SAS)。参照Martínez等^[7]方法,等位位点直接记录条带的大小,用IDENTITY 1.0 (<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/MANUAL.rtf>)分析,计算出杂合度期望值(H_e)^[8]和观察值(H_o)、等位位点数(n)和有效等位位点数(n_e)^[9]、多态性信息量(PI)^[10]、一致性概率(PI)^[11]和鉴别力(DP)^[12-13]。

2 结果与分析

2.1 藜科6种植物EST-SSR引物的扩增

截至2009年12月28日,在GenBank中,藜科6种植物所在的属共收录了EST(expressed sequence tag)34488条(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),其中碱蓬属和盐角草属的EST总数为2480条。本文采用SSR Hunter软件对上述EST进行筛选。共获得重复单元核苷酸个数与该单元重复次数之积18以上的EST-SSR 40条,9条冗余序列,共此设计了31对非冗

余引物, 其中 16对引物在 3种以上植物扩增出多态性条带(表 1)。引物对 6种植物的扩增情况如图 1。

表 1 产生多态性的 16个 ESTs片段长度和微卫星序列数目

Table 1 Fragment length of sixteen ESTs with polymorphism and them icrosatellite sequence

EST 代号 ID	引物序列 (正向 反向) Primer pair (forward/reverse)	重复单元 Repeat unit	重复次数 No. of repeat	预期扩增产物 (bp) Predicted PCR product
EC 906222	5'-GGA CGA GGAATCATCT-3' 5'-CGGGAA CGA CAA ATCTAT-3'	TCCTC	5	289
EC 906203	5'-G CCAAGATCCA CTAG GCTTGTT-3' 5'-GGTCCAA TGGGAGG TGGCTT-3'	CTG	10	129
EB485012	5'-CAGCAGG CA CAAG TGTCTT-3' 5'-CAGCACTA CATT TTGTG TACTA-3'	TATATT	4	208
EB484761	5'-GGTCA TCTTCCTATCCCTTCACAA-3' 5'-GGCTTCA TCTATCACAATGCCATT-3'	ATGC	5	218
EB484626	5'-CCCTTCATCACTCCCAACGAATT-3' 5'-GGCTA GTTTGCA TTGGG TTGTTT-3'	ACA	7	267
DY 530070	5'-G CATCATCCTCTA CTA CTGTT-3' 5'-CGTCCCTCA TCATCATTACA-3'	GAAAA	5	202
DY 529957	5'-CAACACCCTCATCA TCATT-3' 5'-GACAAA CCCCCTAA TGCA T-3'	TCTTT	5	222
DY 529950	5'-CCACCCTCATCAT TATCAT-3' 5'-GAGACAA GGAGCAAA CACCAT-3'	TCTTT	5	162
DY 529903	5'-GGG CAG GTACTTTCA CAA TT-3' 5'-CGTAGA AGGTGTCTCTGCAA-3'	GCTA	5	291
DY 529885	5'-CTGTGAAGGAAA TATTGCTCA-3' 5'-CCTCCA CTTATTTGGCATTTCT-3'	AGA	9	187
DY 529883	5'-GGG CAG GTACTTTCA CAA TTATT-3' 5'-GTTGTAAGG GTTTTCTAGAAGGT-3'	GCTA	5	293
DY 529810	5'-CTCTG CAA CA CTCCGTG CATT-3' 5'-G CGTCCGAGGTACTTTCA CAA T-3'	GCTA	5	289
DY 529785	5'-GAGACAA GGAGCAAA CACCAT-3' 5'-CACCCCTCATCA TCATTACA T-3'	GAAAA	4	162
BF145120	5'-CACAAAATGATGATCGGAGAAA CT-3' 5'-GATAACGACGGAGGG AGGCTAA-3'	CAA	7	206
BE 240888	5'-GTTATGATTTTGAGAGACCGA-3' 5'-CAGAAGA ATTA TTAA CCGCCA-3'	AAC	7	174
AW 991146	5'-CACAAAATGATGATCGGAGAAA-3' 5'-GAGGAGATAACGACGAGGGA-3'	CAA	7	213

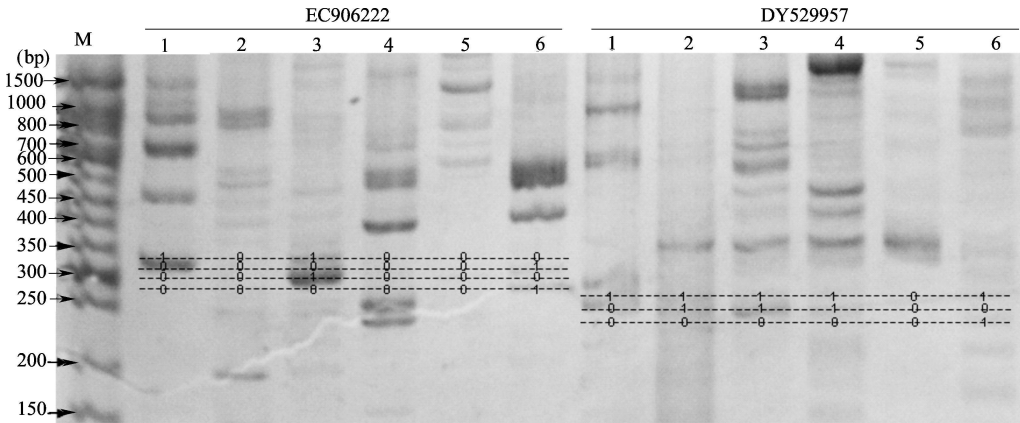


图 1 2对引物 (EC906222, DY529957)对 6种植物的扩增结果

Fig. 1 The PCR results of two pairs of primers (EC906222, DY529957) with six plant species

1 碱蓬; 2 甜菜; 3 灰绿藜; 4 海蓬子; 5 三角叶滨藜; 6 菠菜

1: *Suaeda glauca*; 2 *Beta vulgaris* L.; 3 *Chenopodium glaucum* L.;

4 *Salicornia bigelovii* Torr.; 5 *Atriplex triangularis* L.; 6 *Spinacia oleracea* L.

31对引物中有 16对在 6种植物间扩增出多态性
性位点基因, 多态性微卫星片段长度如表 2。其中
EC906222、DY52995Q、DY529883、DY529810 和
AW 881146 5对引物分别能检测到 4个等位基因, 而
EB485012、EB484626、DY529785 和 BF145120 4对
引物仅能检测到 2个等位基因 (表 3)。等位基因数

表 2 藜科 6种盐生植物在 18个位点多态性片段长度

Table 2 Allele size of eighteen microsatellites loci from six species in Chenopodiaceae family (bp)						
位点 Locus	碱蓬 <i>Sua. glauca</i>	甜菜 <i>Be vulgaris</i>	灰绿蓬 <i>Ch. glaucum</i>	海蓬子 <i>Sa. bigelovii</i>	三角叶滨藜 <i>At. triangularis</i>	菠菜 <i>Sp. oleracea</i>
EC906222_2	330: 330	NA	300: 330	NA	NA	290: 310
EC906203_1	NA	405: 405	405: 405	405: 405	405: 405	408: 395
EC906203_2	290: 310	280: 290	280: 280	280: 290	NA	280: 280
EB485012	NA	NA	NA	550: 550	560: 560	560: 550
EB484761	NA	400: 400	410: 410	410: 400	410: 390	400: 400
EB484626	380: 380	NA	NA	NA	380: 360	380: 380
DY530070	NA	610: 610	590: 590	590: 590	590: 590	580: 580
DY529957	190: 180	190: 170	190: 170	170: 170	190: 190	190: 190
DY529950	310: 300	310: 290	310: 280	310: 300	310: 280	310: 280
DY529903	301: 280	291: 291	291: 280	NA	NA	280: 280
DY529885	NA	NA	530: 530	520: 520	520: 520	520: 510
DY529883	230: 225	235: 230	230: 220	NA	235: 235	230: 230
DY529810	310: 305	300: 300	296: 296	300: 300	300: 300	305: 305
DY529785	NA	260: 260	265: 260	265: 265	NA	NA
BF145120	165: 165	NA	NA	165: 160	NA	160: 160
BE240888	210: 190	220: 210	210: 210	210: 210	NA	210: 210
AW991146	230: 210	220: 220	222: 220	NA	210: 210	220: 220

NA: 无扩展产物。NA: represents no amplification

表 3 藜科 6种植物的杂合度期望值 (H_e) 和观察值 (H_o)、等位位点数 (n) 和有效等位位点数 (n_e)、多态性信息量 (PIC)、一致性概率 (PI) 和鉴别力 (DP)

Table 3 Expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o), number of alleles (n), number of effective alleles (n_e), polymorphism information content (PIC), probability of identity (PI), discrimination power (DP) of sixteen SSR loci from six species in Chenopodiaceae

位点 Locus	H_e	H_o	n	n_e	PIC	PI	DP
EC906222_1	0.625	0.500	3	2.667	0.555	0.352	0.722
EC906222_2	0.667	0.667	4	3.000	0.627	0.250	0.667
EC906203_1	0.340	0.200	3	1.515	0.314	0.513	0.500
EC906203_2	0.540	0.600	3	2.174	0.466	0.433	0.695
EB485012	0.500	0.500	2	2.000	0.375	0.625	0.667
EB484761	0.580	0.400	3	2.381	0.492	0.441	0.778
EB484626	0.278	0.333	2	1.385	0.239	0.637	0.611
DY530070	0.560	0.000	3	2.273	0.499	0.376	0.667
DY529957	0.542	0.500	3	2.182	0.460	0.456	0.722
DY529950	0.653	1.000	4	2.880	0.606	0.281	0.611
DY529903	0.594	0.500	3	2.462	0.511	0.413	0.778
DY529885	0.531	0.250	3	2.133	0.468	0.409	0.722
DY529883	0.640	0.600	4	2.778	0.604	0.306	0.833
DY529810	0.653	0.167	4	2.880	0.600	0.281	0.667
DY529785	0.500	0.333	2	2.000	0.375	0.625	0.667
BF145120	0.500	0.333	2	2.000	0.375	0.625	0.667
BE240888	0.340	0.400	3	1.515	0.314	0.513	0.667
AW991146	0.640	0.400	4	2.778	0.581	0.306	0.778

是反映群体遗传变异大小的指标之一, 表 3 中平均每对引物可检测到 3.06 个等位基因, 平均有效等位基因数 (n_e) 则为 2.28 两者差异较大, 表明等位基因在群体中分布不均匀, 具有较大的遗传变异。

期望杂合度 (H_e) 由 Nei (1978) 首先提出, 其值的范围从 0 (说明无多态性) 到 1 (说明无限多个等位形式具有相同的频率), 而观测杂合度是随机抽取的两个样本的等位基因不相同的概率。前者在藜科 6 种植物间变化幅度从 0.278 到 0.667 (平均 0.535), 而后者则从 0.000 到 1.000 (平均 0.433), 平均观测杂合度低于配子随机结合的平均期望杂合度, 表明群体内存在等位基因分布频率不均匀, 遗传多样性丰富。

表 4 藜科 6 种盐生植物在 18 个位点多态性片段长度 (L)、等位基因频率 (Fa) 和基因型 (G) 分布及其发生频率 (Fg)

Table 4 Polymorphic fragment length (L), frequency of allele (Fa), genotype (G) and frequency of genotype (Fg) at eighteen microsatellites loci in six species of Chenopodiaceae

位点 Locus	SSR 等位点 SSR alleles								基因型及其分布频率 Genotype and frequency of genotype															
	A		B		C		D																	
	$L(bp)$	Fa	$L(bp)$	Fa	$L(bp)$	Fa	$L(bp)$	Fa	G	Fg	G	Fg	G	Fg	G	Fg	G	Fg	G	Fg	G	Fg	G	Fg
EC906222_1	480	0.500	490	0.250	510	0.250			AA	0.333	AB	0.333	BC	0.167	CC	0.167								
EC906222_2	290	0.167	300	0.167	310	0.167	330	0.500	AC	0.167	BD	0.167	DD	0.167	NA	0.500								
EC906203_1	395	0.100	405	0.800	408	0.100			AC	0.167	BB	0.667	NA	0.167										
EC906203_2	280	0.600	290	0.300	310	0.100			AA	0.333	AB	0.333	AB	0.167	BC	0.167	NA	0.167						
EB485012	550	0.500	560	0.500					AA	0.167	AB	0.167	BB	0.167	NA	0.500								
EB484761	390	0.100	400	0.500	410	0.400			AC	0.167	BB	0.333	BC	0.167	CC	0.167	NA	0.167						
EB484626	360	0.167	380	0.833					AB	0.167	BB	0.333	NA	0.500										
DY530070	580	0.200	590	0.600	610	0.200			AA	0.167	BB	0.500	CC	0.167	NA	0.167								
DY529957	170	0.333	180	0.083	190	0.583			AA	0.167	AC	0.333	BC	0.167	CC	0.333								
DY529950	280	0.250	290	0.083	300	0.167	310	0.500	AD	0.500	BD	0.167	CD	0.333										
DY529903	280	0.500	291	0.375	301	0.125			AA	0.167	AC	0.167	BB	0.167	BC	0.167	NA	0.333						
DY529885	510	0.125	520	0.625	530	0.250			AB	0.167	BB	0.333	CC	0.167	NA	0.333								
DY529883	220	0.100	225	0.100	230	0.500	235	0.300	AC	0.167	BC	0.167	CC	0.167	CD	0.167	DD	0.167	NA	0.167				
DY529810	296	0.167	300	0.500	305	0.250	310	0.083	AA	0.167	BB	0.500	CC	0.167	CD	0.167								
DY529785	260	0.500	265	0.500					AA	0.167	AB	0.167	BB	0.167	NA	0.500								
BF145120	160	0.500	165	0.500					AA	0.167	AB	0.167	BB	0.167	NA	0.500								
BE240888	190	0.100	210	0.800	220	0.100			AB	0.167	BB	0.500	BC	0.167	NA	0.167								
AW991146	210	0.300	220	0.500	222	0.100	230	0.100	AA	0.167	AD	0.167	BB	0.333	BC	0.167	NA	0.167						

A, B, C, D 表示指定的 SSR 等位点代码; NA 代表无扩增产物
A, B, C, D are arbitrary codes given to the SSR alleles NA represents no amplification

2.2 聚类分析揭示了藜科 6 种植物之间存在广泛的遗传多样性

基于 Jaccard 相似系数, 6 种植物内, 菠菜与甜菜之间的遗传距离最短, 为 0.511; 而海蓬子与碱蓬之间最远, 为 0.900。采用 PROC CLUSTER /SAS 程序, 按照 WARD 过程可将 6 种植物分为 3 组 (图

多态信息含量 (PI) 是反映 DNA 多态性的指标。如表 3 中所示, PI 变化幅度较大, 从 0.239 到 0.627, 其中 EC906222_2 (0.627)、DY529950 (0.606)、DY529883 (0.604) 和 DY529810 (0.600) 等 4 对引物的 $PI > 0.6$ 属于高信息含量标记, 由对应的与随机个体相同的概率 (PI) 低于 0.306 可以得出同样结论。

在不同位点上各等位基因出现频率各不相同, 从 0.083 (DY529950 的 220bp 和 DY529957 的 180bp 片段) 至 0.833 (EB484626 扩增出的 405bp 片段), 如表 4。因此, 在各位点上观测到的基因型频率也就各不相同, 从 0.167 到 0.667。

2): 第 I 组仅包括碱蓬, 第 II 组包括甜菜、菠菜和灰绿藜等 3 种植物, 第 III 组则包括海蓬子及三角叶滨藜 2 种植物。有意思的是, 甜菜、灰绿藜和菠菜等 3 种植物都有较大叶片, 耐盐能力都为较强, 聚为一类; 海蓬子和碱蓬则明显不同, 前者叶片退化、茎肉质化, 耐盐能力极强, 可耐受海水直接浇灌; 而后者

保存叶片但呈针状且肉质化,耐盐能力较强,同时能够耐受强碱,因而分别聚为一类。三角叶滨藜虽有

较大叶片,但耐盐能力与海蓬子相当,因而和海蓬子聚为一类。

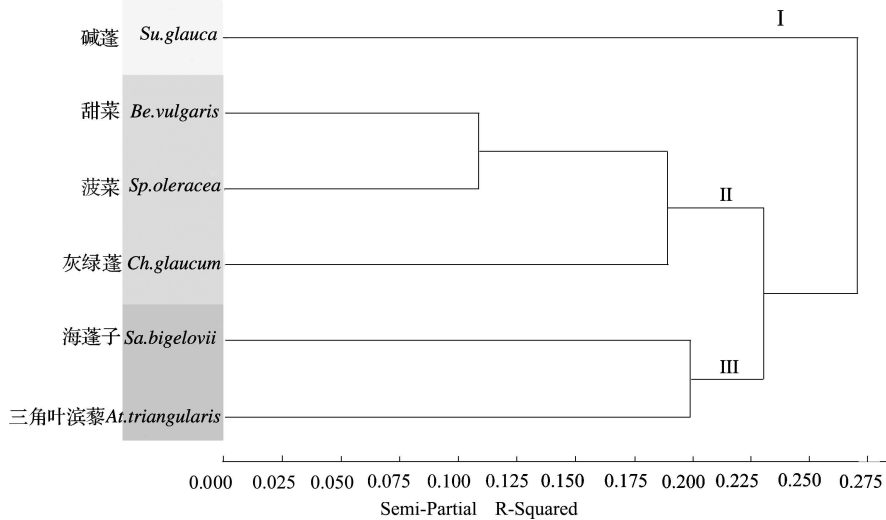


图 2 基于 Jaccard 的藜科 6 种植物聚类分析树状图

Fig 2 Dendrogram of clustering of six species in Chenopodiaceae family based on Jaccard's similarity coefficient

2.3 主成分分析揭示了评价藜科 6 种之间遗传多样性的关键位点

用 PROC PRINCOM /SAS 软件进行了主成分分析。结果表明,前 4 个主成分贡献率分别为 29.7%、22.4%、19.4% 和 15.2%, 累计贡献率达到 86.7%, 所以前 4 个主成分可以表示藜科 6 种植物遗传多样性的大部分信息。第一主成分的计算系数基本为正值,所以它是藜科 6 种植物遗传多样性的一个加权平均,代表此研究群体总的遗传多样性变化情况,其中 DY 529957 (0.106)、DY 529903 (0.102) 和 DY 529885 (0.102) 有最大的正计算系数值,暗示了上述 3 个位点对决定本研究群体划分具有重要作用。第二主成分在 DY 529903 上有最大的正系数 0.156 而在 EC906222 上有最大的负系数 (-0.156), 代表了这两个位点相互之间对遗传多样性变化贡献的对比。第三主成分为 DY 529885 (0.137) 与 DY 529957 (-0.126) 位点的对比。第四主成分为 DY 529957 (0.107) 与 DY 529903 (-0.149) 位点的对比。

为了显示 DY 529957、DY 529903 和 DY 529885 对遗传多样性变化的贡献,第一主成分分别和第二、第三、第四主成分由低到高排列,再用 SORT /SAS 过程排序。在按第一主成分排序中,3 个位点共同将藜科 6 种植物划分为碱蓬、海蓬子及三角叶滨藜和甜菜、菠菜、灰绿藜共 3 个组。按第二、第三和第四主成分排序中,依次揭示了 DY 529903、DY 529885 和 DY 529957 位点对区分 6 种植物的贡献。按第一和第二主成分排列的示例以及由此将 6 种植物划分为

3 组 (图 3)。

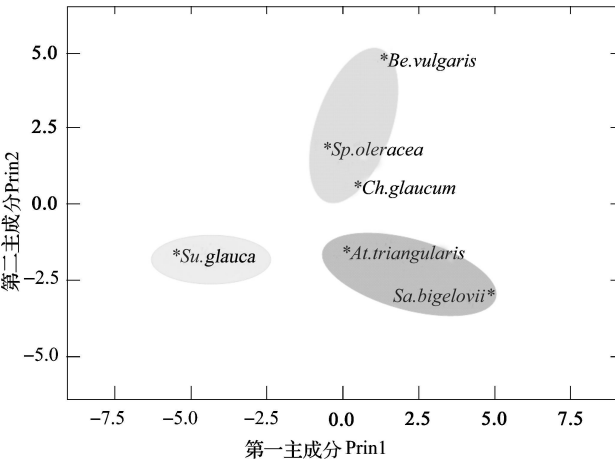


图 3 藜科 6 种植物主成分分析

Fig 3 Principal component analysis (PCA) of six species in Chenopodiaceae family

3 讨论

近年来,利用分子标记开展藜科植物属内遗传多样性的研究较多,例如张萍等^[14]、高天鹏等^[15]、徐莉等^[16]运用 RAPD、ISSR 和 mtDNA ITS 等类型分子标记研究了藜科梭梭属、猪毛菜属和藜属等属内遗传多样性;丁岩等^[17]、王小芬等^[18]、张林静等^[19]用 RAPD、ISSR、SSR 和 AFLP 等分子标记分析了盐地碱蓬的遗传多样性。本研究中共检测到多态性位点 16 个,占检测位点总数的 51.6%。16 个位点中仅有 5 个位点扩增片段大小与预测大小一致,其原因可能是 6 种植物来自于 6 个属,遗传距离较大,引

物通用性较低所致,这一结果同时也揭示了 6种植物之间的遗传多样性十分广泛;此外,根据已有文献报道,16个位点对应的 EST 全部与盐胁迫响应有关^[20-22],这一出乎意料的结果暗示了这 6种植物可能存在不同的盐胁迫响应机制。

利用 EST-SSR 标记可以将本研究涉及的藜科 6种植物分为 3个组,第 I组仅包含碱蓬;第 II组包括甜菜、菠菜和灰绿藜等 3种植物;第 III组则包括海蓬子和三角叶滨藜 2种植物。第 I组中的碱蓬是真盐生植物,叶片变形为针状并肉质化,既可以在含盐量高达 500mmol/L 的土壤中生存^[23],又可以耐受 pH9.0 以上的强碱环境^[24]。与其他藜科植物相比,兼耐盐和碱是碱蓬的最大特点,EST-SSR 标记的分类与形态学分类一致,在研究的藜科 6种植物中,仅碱蓬属于螺胚亚科 (*Spirolobeae* C. A. Mey),其余的均属于环胚亚科 (*Cyclolobeae* C. A. Mey)。在环胚亚科的藜科 5种植物中,又聚类成了第 II 和第 III 2 个组。第 II 组包括甜菜、菠菜和灰绿藜 3 个种,第 III 组包括海蓬子和三角叶滨藜。从形态和耐盐的生理机制上看,三角叶滨藜和菠菜、甜菜及灰绿藜一样在盐胁迫下可以观察到叶片上有盐颗粒结晶,属于典型的泌盐植物,而海蓬子则为真盐生植物,叶片完全退化,幼茎肉质化,可以耐受海水直接浇灌,但不耐高 pH 值环境。三角叶滨藜却与海蓬子聚为一类,可能是其耐盐性远远优于菠菜、甜菜及灰绿藜而与海蓬子相近的缘故。

本研究中采用的 EST-SSR,其序列信息是已知的,因此通过序列比对,可以在基因水平上讨论遗传多样性。在主成分分析中发现 DY529903、DY529885 和 DY529957 3 个 EST 在藜科 6种植物上贡献了主要的遗传变异。这 3 个 EST 在盐胁迫情况下,表达明显上调^[25]。经在 GenBank 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, DY529903 为植物防御素 (Def) 类似基因、DY529885 是未知基因,而 DY529957 是生长素抑制蛋白基因 (auxin-repressed protein, ARP)。植物防御素是广泛分布于植物界的富含半胱氨酸的阳离子内源性抗微生物肽家族,具有广泛的生物学活性,可以直接作用并杀死病原微生物。除此之外,防御素还具有免疫调节以及创伤修复等多种生物学活性。石英等^[26]报导,用 NaCl 处理苗期的番茄,可以激活乙烯信号转导途径,而 Bahranejad 等^[27]进一步发现,乙烯信号可以诱导烟草 (*N. benthamiana*) 防御素基因 *Def2.2* 强烈表达。据此,本文推测植物防御素响应

盐胁迫的可能机理是:植物在盐胁迫情况下,激活乙烯信号转导途径,进一步并诱导防御素表达,参与盐胁迫造成的损伤修复。ARP 基因通过调节细胞壁的松散程度负向控制特定组织或器官的伸长或扩展生长^[28]。张大栋等^[25]发现,海蓬子在高盐胁迫下,ARP 基因表达水平大幅度提高,意味着强烈抑制某些器官的生长,而海蓬子、碱蓬等强盐生植物的叶片全部退化,这可能也是植物适应高盐环境的一种保护机制。藜科 6种植物在这些关键基因位点出现多态性,反映出藜科植物虽然普遍比较耐盐,但存在不同的耐盐机制;不同的耐盐机制可能是各种植物耐盐性强弱不同的原因;有些植物种类可能组合数种耐盐机制,例如碱蓬和三角叶滨藜。

参考文献

- [1] 高海波, 张富春. 藜科盐生植物的形态特征与耐盐分子机理研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008(4): 22-26
- [2] Wang H X, Li F H, Xiang J H. Polymorphic EST-SSR markers and their mode of inheritance in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Aquaculture* 2005 249: 107-114
- [3] Li W, Dong P, Wei Y M, et al Genetic variation in *Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* landraces from China assessed by EST-SSR markers [J]. *AgriSci in China* 2008 7(9): 1029-1036
- [4] 庄丽芳, 宋立晓, 冯祎高, 等. 小麦 EST-SSR 标记的开发和染色体定位及其在追踪黑麦染色体中的应用 [J]. 作物学报, 2008, 34(6): 926-933
- [5] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull* 1987 19: 11-15
- [6] Goldman D, Merrill C R. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size [J]. *Electrophoresis* 1982 (3): 24-26
- [7] Martinez L E, Cavnagaro P F, Masuelli R W, et al SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties [J]. *Plant Sci* 2006 170: 1036-1044
- [8] Nei M. Genetic distance and molecular phylogeny // N. Ryman, F. Utter Population Genetics and Fishery Management University of Washington Press Seattle, Washington 1987: 193-223
- [9] Morgante M, Rafalski A, Biddle P, et al Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci [J]. *Genome* 1994 37: 763-769
- [10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *Amer J Human Genet* 1980 32: 314-331
- [11] Paetkau D, Calvert W, Stirling I, et al Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears [J]. *Mole Ecol* 1995 4: 347-354
- [12] Jones D A. Blood samples: probability of discrimination [J]. *J Forens Sci Soc* 1972 12: 355-359
- [13] Lamboy W F, Alpha C G. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species [J]. *J Am Soc Hort Sci*, 1998 123: 182-188
- [14] 张萍, 董玉芝, 魏岩, 等. 利用 ISSR 标记对新疆白梭梭居群的遗传多样性分析 [J]. 云南植物研究, 2006 28(4): 359-362
- [15] 高天鹏, 高海宁, 张勇, 等. 基于 ISSR 西北地区珍珠猪毛菜 (*Salsola passerina*) 的遗传多样性 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009 45(2): 66-74
- [16] 徐莉, 王祎玲, 张林静, 等. 新疆阜康绿洲荒漠过渡带重要盐

生植物无叶假木贼与角果藜遗传多样性的比较 [D]. 北京: 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编 (1933-2003), 2003

[17] 丁岩. 不同盐浓度下盐地碱蓬 SSR 和 AFLP 分子标记研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2008

[18] 王小芬. 盐地碱蓬遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析 [D]. 济南: 山东师范大学, 2007

[19] 张林静, 岳明, 赵桂仿, 等. 新疆阜康地区植物群落物种多样性及其测度指标的比较 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(2): 350-358

[20] Jha B, Aganwal P K, Reddy P S, et al Identification of salt induced genes from *Salicornia brachiata* an extreme halophyte through expressed sequence tags analysis[J]. Genes Genet Syst, 2009, 84(2): 111-120

[21] 张大栋, 马鸿翔, 吉晓佳, 等. 海蓬子盐胁迫初期抑制消减杂交文库的构建 [J]. 江苏农业学报, 2006, 23(2): 113-116

[22] Zhang L, Ma X L, Zhang Q, et al Expressed sequence tags from a NaCl treated *Suaeda salsa* cDNA library [J]. Gene, 2001, 267(2): 193-200

[23] 史功伟, 宋杰, 高奔, 等. 不同生境盐地碱蓬出苗及幼苗抗盐性比较 [J]. 生态学报, 2009, 29(1): 138-143

[24] 曲元刚, 赵可夫. NaCl 和 Na₂CO₃ 对盐地碱蓬胁迫效应的比较 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 387-394

[25] 张大栋, 马鸿翔, 吉晓佳, 等. 海蓬子盐胁迫初期抑制消减杂交 cDNA 文库的构建 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 113-116

[26] 石英, 徐晶宇, 蔚变云, 等. 盐胁迫对番茄幼苗中乙烯信号转导途径一些基因表达的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 30-33

[27] Bahramnejad B, Erickson L R, Chutham A, et al Differential expression of eight defense genes of *N. benthamiana* following biotic stress wounding ethylene and benzothiadiazole treatment [J]. Plant cell report, 2009, 28: 703-717

[28] Park S, Han K H. An auxin repressed gene (*RpARP*) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation [J]. Tree physiology, 2003, 23: 815-823



编号: CST-JIFR 2010 ZWYC

中国学术期刊影响因子年报 (自然科学与工程技术 • 2010 版)

期刊名称: 植物遗传资源学报
主办单位: 中国农业科学院作物科学研究所
学科类目: 农艺学
研究层次: 基础研究
CN/ ISSN: CN11-4996/S ISSN1672-1810

计量指标统计表

一、载文量、可被引文献量（篇）								
2009年			2008年			2007年		
载文量	可被引文献量	可被引文献比	载文量	可被引文献量	可被引文献比	载文量	可被引文献量	可被引文献比
123	113	0.92	123	110	0.89	106	101	0.95
二、被引频次（本刊发表的可被引文献在2009年度的被引频次）								
本刊发表文献 被各种来源文献引用频次		2009年发表文献		2008年发表文献		2007年发表文献		历年发表文献
		被引频次	他引频次	被引频次	他引频次	被引频次	他引频次	总被引频次
复合引用		11	11	117	100	204	183	1548
1、综合统计源期刊引用		8	8	89	72	127	106	823
2、博士学位论文统计源文献引用		1	1	10	10	15	15	189
3、硕士学位论文统计源文献引用		2	2	17	17	59	59	521
4、会议论文统计源文献引用				1	1	3	3	15
基础研究型统计源期刊引用		6	6	79	62	121	100	773
三、影响因子（JIF）								
影响因子种类		即年指标	影响因子		他引影响因子		影响因子学科排序	
复合JIF		0.097	1.521		1.341		9/48	
期刊综合JIF		0.071	1.024		0.844		9/48	
基础研究类JIF		0.053	0.948		0.768		8/20	
四、其他参考指标								
基金论文比	引用半衰期	引用期刊数	被引半衰期	被引期刊数	他引总引比	互引指数	WEB即年下载率	WEB下载量/万次
0.98	7.5	228	4.5	193	0.87	11/9	38	2.78

注: 各项指标定义参见《〈中国学术期刊影响因子年报〉数据统计规范汇编》(自然科学与工程技术)。

