维普资讯 http://www.cqvip.com

浙江农业学报 *Acta Agriculturae Zhejiangensis* 20(3):149~153,2008

大花惠兰组培苗中叶色突变体的获得与DNA鉴定

马华升[1],姚艳玲[2],忻　雅[1],陈文岳[1],童建新[1],崔海瑞[2,*]
([1]杭州市农业科学研究院 生物技术研究所,浙江 杭州 310024;[2]浙江大学 原子核农业科学研究所,浙江 杭州 310029)

摘　要:从大花惠兰的组培苗中获得了白色条纹和黄色条纹两种叶色突变体,突变发生的总频率约为0.12%。利用100条UBC随机引物将它们与对照进行了RAPD分析和对比。引物P17或P31可在对照和黄色条纹突变体间检测出多态性,黄色条纹突变体具有大小分别约为995 bp或1 320 bp的多态性片段;而引物P84或P86则可在对照和白色条纹突变体间揭示出多态性,白色条纹突变体具有大小分别约为1 120 bp或1 315 bp的特异性条带。RAPD分析结果表明这两种突变体的基因组DNA都发生了变化。

关键词:大花惠兰;组织培养;叶色突变体;RAPD
中图分类号:Q343.1+3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004-1524(2008)03-0149-05

Gain and DNA identification of leaf color mutant derived from tissue culture of *Cymbidium hyhridum*

MA Hua-sheng[1], YAO Yan-ling[2], XIN Ya[1], CHEN Wen-yue[1], TONG Jian-xin[1], CUI Hai-rui[2,*]
([1]*Biotechnology Research Institute, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China*;[2]*Institute of Nuclear and Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract: Two kinds of leaf color mutants with white stripes and yellow stripes were obtained in regenerated seedlings of *Cymbidium hyhridum* and total mutation frequency was about 0.12%. The mutants were compared and analyzed with the control(their parents)by RAPD using 100 UBC arbitrary primers. The polymorphism between the yellow stripe mutant and the control was detected by using primer P17 or P31 and the former mutant showed the polymorphic fragment with size of 995 bp or 1 320 bp respectively, while the polymorphism between the white stripe mutant and the control was indicated by using primer P84 or P86 and the former indicated a specific band with size of 1 120 bp or 1 315 bp, respectively. Results of RAPD analysis suggest that the genomic DNA of two kinds of mutants has changed.

Key words: *Cymbidium hyhridum*; tissue culture; leaf color mutant; RAPD

大花惠兰(*Cymbidium hyhridum*)属兰科兰属植物,是近几年在我国花卉市场上走俏的高档盆栽花卉。由于大花惠兰多为杂交品种,种子繁殖无法保持其品种特性,结实率也相当低,且分株能力弱,因而繁殖速度慢,远远不能满足商品化生产的要求。利用组织培养进行离体快速繁殖,可以大大提高繁殖系数,降低种苗成本。有关大花惠兰的组培快繁,已有不少报道[1~7]。

植物体细胞经过组织培养出现无性系变异是一种常见的现象[8],采用这种方法诱导和获得突变体也是进行植物品种改良的手段之一。由于突变体是植物基因组少数位点发生突变的结果,因而其检测相对困难。RAPD使用随机引

收稿日期:2007-07-28
基金项目:杭州市科研院所基金(I20503)
作者简介:马华升(1962-),男,浙江东阳人,研究员,从事植物生物技术研究。Tel:0571-87313241;E-mail:hzhsma@163.com
* 通讯作者,崔海瑞,Tel:0571-86971405;E-mail:hrcui@zju.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

物,操作方便,实验相对简单,能在很短时间内使用较多引物探测到大量的DNA位点[9],这为区分突变体提供了可能。通过RAPD技术,人们分析和鉴定了自发或辐射获得的花椰菜[10]、烟草[11]、水稻[12~14]、小麦[15]、亚洲百合[16]等植物突变体便是很好的例证。此外,用RAPD技术也验证了组培产生的菊花[17,18]、美洲黑杨[19]、白薯[20]等植物变异体的DNA变化。但利用组培获得大花蕙兰叶色突变体和对其进行RAPD分析还没见相关报道。本文报道我们对大花蕙兰及其两种叶色突变体的RAPD分析结果。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料为大花惠兰黄金小神童及其通过组织培养获得的叶色突变体W1和Y1,其中,W1为白色条纹叶,Y1为黄色条纹叶。

1.2 方法

1.2.1 组织培养

取杂交兰'黄金小神童'植株的基部新芽,用洗衣粉浸泡,洗净后再用自来水冲洗30 min。剥去外层叶片,并剪去芽的上半段,先在70%的酒精中处理30 s,然后用0.1%氯化汞溶液消毒10 min,无菌水洗2~3次,剥去外片叶,再放入0.1%氯化汞溶液2 min,用无菌水洗4~5次,在无菌条件下剥出约5 mm长的茎尖,并以生长点为中心,把茎尖切成小方块,接种于MS附加有NAA 0.2 mg/L和活性炭(AC)1 g/L的培养基上诱导原球茎,用含有4%蔗糖、0.3%活性炭、1.0%琼脂和0.05 mg/L的1/2 MS培养基进行原球茎的继代增殖、分化和生根。培养基的pH值为5.5~5.8,培养温度为24~26℃,光照强度约1 500 lx,每日光照12 h。将获得的试管苗进行炼苗,洗去根部培养基,用800倍液的多菌灵消毒20 min并清洗后移栽、定植。

1.2.2 DNA提取

取对照和叶色突变体的幼叶少许,洗净、晾干,液氮中碾磨,采用改良的CTAB法少量提取DNA[21]。

1.2.3 RAPD

反应体系(25 μl)包括PCR缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L KCl, 0.08% NP-40, pH = 9.0)、2.5 mmol/L $MgCl_2$、1单位Taq聚合酶、200 μmol/L dNTP、引物2 μL、50~70 ng模板DNA。所用的引物为UBC随机引物(编号为UBC Primer Set RAPD #01-100),其它试剂均购自上海生工生物技术公司。在PCR Express-96(HYBAID)上按如下程序设定和扩增:在94℃预变性4 min;然后按94℃变性45 s,36℃ 1 min,72℃ 2 min进行35个循环,最后72℃延伸7 min。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳分离

扩增产物加入上样缓冲液并混匀,用含有0.5 μg/mL溴化乙锭的1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离,所用的电泳缓冲液为TBE,在5 V/cm电场强度下电泳分离2~3 h,用Gis-2008凝胶图像系统(上海天能公司)对凝胶进行观察、拍照,发现多态性扩增后进一步重复2~3次,并以50 bp DNA Ladder(上海生工生物技术公司)为参照来标定扩增条带的分子量大小。

2 结果与分析

2.1 大花蕙兰组培苗的叶色突变

切割好的外植体接种到MS初始培养基上,经过45 d的培养,一部分外植体长出原球茎(PLB),进一步将其继代增殖、分化和生根,得到了大批试管苗。在所移栽的3批幼苗中,都观察到了叶色突变的出现,包括白色条纹和浅黄色条纹2种类型,它们的叶片见图1。在总计5 161株试管苗中,共获得了6株白色条纹叶突变体和1株黄色条纹叶突变体,叶色突变发生的频率约为0.12%(表1)。

表1 大花蕙兰组织培养过程中叶色突变的发生频率

Table 1 Frequency of leaf color mutation occurred during tissue culture of *Cymbidium hyhridum*

年份	苗数	叶色突变苗	
		数目	频率/%
2003	297	1(WS)	0.34
2004	2 161	3(WS)	0.14
2005	2 703	1(WS) + 1(YS)	0.07
合计	5 161	6	0.12

注:括号内WS表示白色条纹,YS表示黄色条纹

维普资讯 http://www.cqvip.com

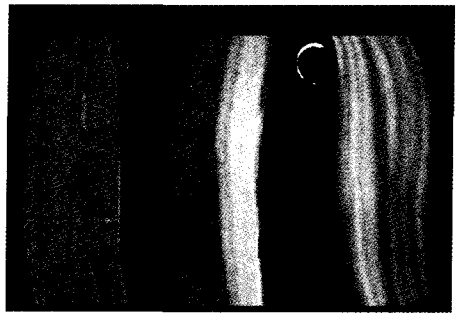

图 1 大花蕙兰及其白、黄条纹叶色突变体的叶片

Fig.1 Leaf fragments of *Cymbidium hyhridum* and its mutants with white and yellow stripes

2.2 RAPD 引物筛选

以正常叶色大花蕙兰黄金小神童的 DNA 为模板,对 100 条 UBC 随机引物进行了筛选,其中,80 条引物具有扩增产物,可扩增引物占 80%。这 80 条引物共扩增出 369 个 DNA 片段,大小约为 200 bp ~ 2.5 kb,每条引物可扩增的片段数目变化于 1 ~ 11 条之间,平均每条引物可扩增约 4.6 个片段。图 2 是不同引物对大花蕙兰 DNA 的扩增结果。

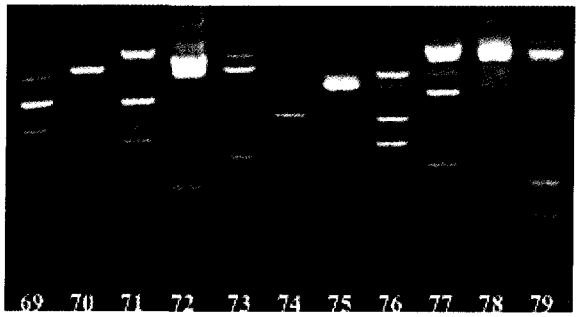

图 2 不同随机引物对大花蕙兰 DNA 的扩增

Fig.2 Profile of PCR products amplified by different random primers (UBC Primer # 69-79) from *Cymbidium hyhridum* DNA

2.3 正常株与突变株之间 RAPD 扩增差异

利用上述试验获得的具有扩增产物的 80 个引物,进一步对 2 种突变体及其亲本进行了分析。通过用这 80 个引物进行扩增,有 76 个引物在正常株与突变株之间表现很高的同源性,无多态性,另外 4 条引物对正常株与突变体的扩增具有明显的不同(图 3,白色箭头所指为多态性条带)。

引物 P17 和 P31 在黄色条纹突变体 Y1 与对照间有扩增条带的差异。P17 在对照和白色条纹突变体 W1 中均扩增出 5 条带,但在黄色条纹突变体 Y1 中扩增出 6 条带,比前二者多出一分子量约为 995 bp 的产物;而引物 P31 在对照和白色条纹突变体 W1 中均扩增出 3 条带,但在黄色条纹突变体 Y1 中多扩增 1 个大小约为 1 320 bp 的多态性片段。

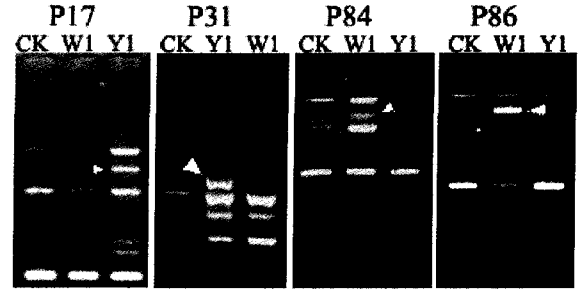

图 3 随机引物 P17,P31,P84 和 P86 扩增产物的电泳图

Fig.3 Electrophoresis of amplified products with arbitrary primers P17, P31, P84 and P86

引物 P84 和 P86 在白色条纹突变体 W1 与对照间呈现多态性扩增。利用引物 P84 扩增时,白色条纹突变体 W1 比对照多扩增出一条大小约为 1 120 bp 的特异性条带;利用引物 P86 扩增时,白色条纹突变体则比对照多扩增出一个大小约为 1 315 的多态性片段。

RAPD 分析的结果表明,经过组培获得的这两种大花惠兰突变体,其基因组 DNA 都发生了变化。

3 讨论

叶色突变体在植物品种改良上具有重要的应用价值,一方面通过基因突变可以创造出优异的种质资源,增加物种的遗传多样性,进而选育出优良的新品种和新类型;另一方面叶色突变体作为标记性状在杂种一代制种工作中可准确辨别亲本和杂交一代的杂株,大大提高种子纯度和质量。通过组培,我们获得了白色条纹和黄色条纹两种叶色突变类型,对于丰富大花惠兰的多样性和选育特殊观赏品种具有重要的利用价值。

从表 1 中可以看出不同年份组培苗的叶色突变频率变化较大,尤其在 2003 年叶色突变频

维普资讯 http://www.cqvip.com

率为其余年份的2~5倍。一般来说,在具有相同组培苗群体中不同年份之间叶色突变频率变化不大。根据本试验结果,每年统计组培苗的样本量不同是造成不同年份突变频率差异的主要原因。其实,在表1中可以明显看出2003年组培苗的样本量297株,而其余年份在2000株以上,为2003年组培苗样本量的7~9倍。研究还发现2004和2005年份的突变频率与平均突变频率(0.12%)接近,但与2003年份差异较大。因此,若三年的统计组培苗的样本量相当,且足够大(至少在5 000株以上),可以推测其突变频率变化不大。当然,培养基和组培环境条件也会影响大花蕙兰叶色突变频率。本试验虽在不同年份进行的,但是大花蕙兰组培培养基和环境条件基本保持一致,因此,这些条件不足以产生较大差异。

本研究以大花蕙兰叶色正常植株和条纹突变植株为研究对象,利用RAPD分子标记技术分析了正常植株和突变植株叶片基因组DNA间的多态性和差异,筛选出与白色条纹和浅黄色条纹叶片颜色相关的RAPD标记,为探测大花蕙兰组织培养过程中DNA分子水平上的变异和进一步研究叶色基因调控奠定了初步基础。本试验应用RAPD标记操作简单、节省时间,且成本低。但RAPD标记是显性标记,揭示多态性能力相对较低,如果采用其它分子标记技术,将更易获得与叶色性状连锁的标记,在分子标记辅助育种中有更大的应用价值。此外,一般认为RAPD标记重复性较差,在试验中需要采用不同个体进行重复度的比较,以此确定试验结果的可靠性。本试验采用6个大花蕙兰叶色突变体,其中包括5个白色条纹和1个黄色条纹突变体。对5个白色条纹突变体进行RAPD标记重复度比较分析,结果发现RAPD标记重复度达到80%以上,仅1个突变体在少数条带上略有变化,但是95%以上的条带基本一致,因此,可以认为在本试验中RAPD标记重复性较好,获得结果可靠且具有可比性。

本研究结果发现与正常大花蕙兰幼苗相比,组培获得的大花蕙兰叶色突变体基因组发生了变化。类似的结果在转绿型白化水稻突变系W25和花椰菜叶色突变体上有报道[10,13],但是对其基因组的突变位点定位和突变基因序列均未作进一步分析。由于诱变条件和材料不同,各自基因组中检测到的多态性不尽相同。已有研究结果表明叶色突变主要是由核基因发生突变引起的。如水稻"斑马叶"叶色突变是由核基因的改变引起的,直接或间接导致叶绿素代谢异常,呈现出叶片间断失绿[22]。目前国内外已报道水稻斑马叶突变体有14个,白化苗基因12个,不同时间表现为黄叶或黄绿叶的突变体10个,黄绿叶突变体2个,这些基因在染色体上的位置大部分已经确定[23]。因此,有必要对组培获得的大花蕙兰叶色突变体进行遗传分析,确定突变基因在染色体上的位置,在此基础上克隆相关基因,鉴定基因功能,以期进一步阐明大花蕙兰叶色突变的分子机制。

参考文献:

[1] 谷祝平,颜廷进.大花蕙兰茎尖组织培养及其形态建成的研究[J].实验生物学报,1989,22(2):149-151.

[2] 徐宏英,王芳,谢海军,等.大花蕙兰的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2001,37(6):534-535.

[3] 徐宏英,赵玉明,谢海军,等.大花蕙兰组培快繁影响因素分析[J].园艺学报,2002,29(2):183-185.

[4] 秘彩莉,霍晨敏,冯全义,等.大花蕙兰快速繁殖技术初报[J].河北师范大学学报,2002,26(2):190-192.

[5] 朱艳,胡军,秦民坚,等.大花蕙兰的快速繁殖技术研究[J].中国野生植物资源,2000,19(6):57-59.

[6] 杨玉珍,孙天洲.大花蕙兰组织培养和快速繁殖技术研究[J].北京林业大学学报,2002,24(2):86-89.

[7] 赵九洲.洋兰生物技术研究及其应用[J].北方园艺,2005,(4):77-78.

[8] 李浚明.体细胞无性系及其变异[J].遗传,1983,5(1):41-44.

[9] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker[J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18:6531-6535.

[10] 李梅,赵前程,孙德岭,等.花椰菜叶色突变的RAPD分析[J].天津农业科学,2004,10(4):10-12.

[11] 唐永红,贾敬芬,陈刚.烟草K346品种叶数、株高变异株的RAPD分析[J].农业生物技术学报,2004,12(6):735-736.

[12] 易继财,庄楚雄,姚涓,等.空间搭载诱导水稻种子突变的分子标记多态性分析[J].生物物理学报,2002,18(4):478-483.

[13] 吴殿星,夏英武,舒庆尧,等.利用RAPD技术检测转绿型白化突变系W25基因组的变化[J].核农学报,1997,11(2):89-92.

[14] 管泽强,沈毓渭,蒋琳,等.一个CMS水稻育性回复突变

维普资讯 http://www.cqvip.com

体的 RAPD 分析[J].遗传学报,1997,24(6):501-506.

[15] 孙光祖,李忠杰,李希臣,等.小麦抗赤霉病突变体的选育及 RAPD 分子验证[J].核农学报,1999,13(4):202-205.

[16] 贾月慧,张克中,赵祥云,等.辐射亚洲百合 pollyanna 雄性不育突变体的 RAPD 分析[J].核农学报,2005,19(1):29-32.

[17] Wolf K. RAPD analysis of sporting and chimerism in *Chrysanthemum* [J]. *Euphytica*, 1996,88:159-164.

[18] Carmen M, Elizabeth, César P. Application of RAPD markers in the characterization of *Chrysanthemum* varieties and the assessment of somaclonal variation[J]. *Euphytica*, 2002,127(2):247-253.

[19] Rani V, Paroda A, Rama SN. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for genetic analysis in micro-propagated plants of *Populus deltoides* Marsh [J]. *Plant Cell Report*, 1995,14:459-462.

[20] Vilordon AQ, LaBonte DR. Genetic variation among sweet potatoes propagated through nodal and adventitious sports [J]. *J Amer Soc Holt Sci*, 1996,121(20):170-174.

[21] Doyle JJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990,12:13-15.

[22] 何瑞锋,丁毅,余金洪,等.水稻"斑马叶"叶绿素含量及几种酶活性的变化[J].武汉大学学报(自然科学版),2000,46 (6):761-765.

[23] 王军,王宝和,周丽慧,等. 一个水稻新黄绿叶突变体基因的分子定位[J].中国水稻科,2006,20(5):455-459.

(**责任编辑** 陈华平)

《浙江农业学报》参考文献著录规则

本刊参考文献采用"顺序编码制",按正文中引用的文献出现的先后顺序连续排序著录,并将序号置于方括号内,视情况作为右上角标标注于引用文献的结论处,或作为语句的组成部分。本刊参考文献只列最主要的、在文稿中实际引用的文献,未实际引用的和非公开出版的文献(学位论文例外)请勿著录。如属个人通讯中取得的引用资料可在正文中加括号注明。

文后参考文献表的序号左顶格,加方括号,如[1],[2],…,与正文中的指示序号格式一致。

文献作者 3 人以内,全列出;超过 3 人时,只列前 3 位,后面加",等"或",et al.";作者姓名之间不用"和"或"and"相连,而用","分开;中国人和外国人的姓名一律采用姓前名后著录。主要责任者后不加"著"、"编"、"合编"等责任说明,但"译者"应在书名或题名后注明,西文作者的名字部分缩写,并省略缩写点"."。根据 GB 3469 规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"。

参考文献的内容和著录格式:

a.专著

[序号] 主要责任者.书名[M].其他责任者.版本(第 1 版不标注).出版地:出版者,出版年.起止页码.

示例:[1] 竺可桢.物候学[M].北京:科学出版社,1973.1-3.

[7] Kramer PJ. Water relations of plants[M]. New York: Academic Press, 1983.

b.期刊文章

[序号] 作者(3 人以内全列出;超过 3 人,只列前 3 位,后加",等"或",et al.").文献题名[J].刊名,年,卷(期):起止页码.

示例:[6] 郑滔,陈炯,陈剑平.杭州郊区菜豆花叶病病原的分子鉴定[J].浙江农业学报,2002,14(3):178-181.

[7] Leclerc D, Stavolone L, Meier E, et al. The product of ORF Ⅲ in cauliflower mosaic virus interacts with the ciral coat protein through its C-terminal proline rich domain[J]. *Virus Genes*, 2001,22(2):159-165.

c.专著中析出的文献

[序号] 析出责任者.析出题名[A].析出其他责任者.原文献责任者.原文献题名[M].版本.出版地:出版者,出版年.起止页码.

示例:[3] 黄蕴慧.国际矿物学研究的动向[A].程裕洪.世界地质科技发展动向[M].北京:地质出版社,1982.38-39.

(下转第 167 页)