

组培获得大花蕙兰叶色突变体的 RAPD 分析

马华升¹ 姚艳玲² 钱丽华¹ 忻雅¹ 赵杭革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,杭州 310024;2.浙江大学原子核农业科学研究所,杭州 310029)

摘要 从大花蕙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 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 995bp 或 1320bp 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 1120bp 或 1315bp 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,但发生突变的位点不同。

关键词 大花蕙兰;组织培养;叶色突变体;RAPD

大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)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。由于大花蕙兰多为杂交品种,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。有关大花蕙兰的组培快繁,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 使用随机引物,操作方便,实验相对简单,能在很短的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 and 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

实验所用材料为大花蕙兰“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 1500 lux,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 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 0.08% NP-40, pH=9.0)、2.5 mM MgCl₂、1 单位 Taq 聚合酶、200 μM

项目来源:杭州市科研院所基金,编号:“120503”

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:hzhzsm@163.com

dNTP、引物 2 μ L、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:预变性 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、36 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 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 μ g/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 50bp 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 45d 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 5161 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

年份	苗数	叶色突变苗	
		数目	频率/%
2003	297	1(WS)	0.34
2004	2161	3(WS)	0.14
2005	2703	1(WS) + 1(Y)	0.07
合计	5161	6	0.12

注:括号内 WS 表示白色条纹,YS 表示黄色条纹

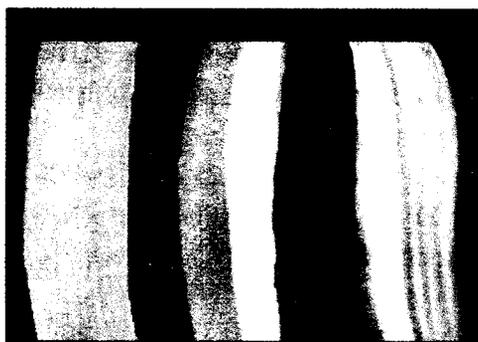


图 1 大花蕙兰及其白、黄条纹叶色突变体的叶片

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。

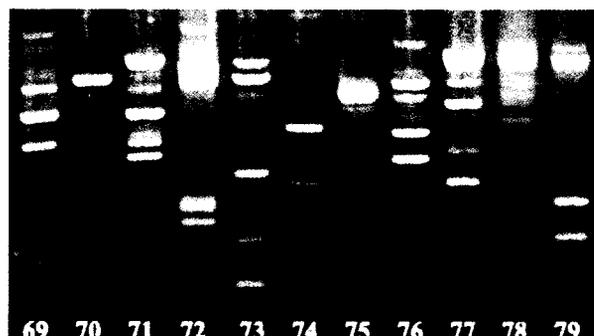


图 2 不同随机引物对大花蕙兰 DNA 的扩增

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)。

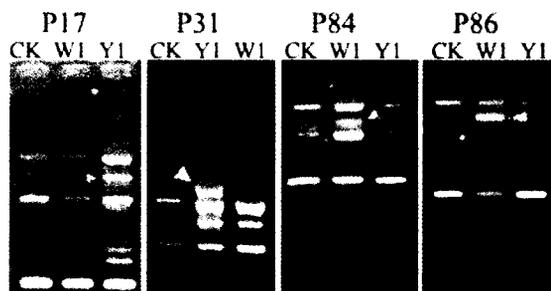


图 3 随机引物 P17、P31、P84 和 P86 扩增产物的电泳图

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 995bp 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 1320bp 的多态性片段。

引物 P84 和 P86 在白色条纹突变体 W1 与对照

马华升等:组培获得大花蕙兰叶色突变体的 RAPD 分析

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 1120bp 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 1315 bp 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蕙兰突变体,其基因组 DNA 都发生了变化,尽管都是跟叶色突变有关,但突变发生的位点却不同。

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良的种质资源,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 2 种叶色突变类型,对于丰富大花蕙兰的多样性和选育特殊观赏品种具有重要的利用价值。

本研究以大花蕙兰色叶片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。

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.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.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.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.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.

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.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.北方园艺.2005,(4):77-78.
 [8] 李浚明.体细胞无性系及其变异.遗传.1983,5(1)41-44.
 [9] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, & Tingey S V, 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucl Acids Res, 18:6531-6535.
 [10] 李梅、赵前程、孙德岭,等.花椰菜叶色突变的 RAPD 分析.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.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.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.核农学报.1997,11(2):89-92.
 [14] 管泽强、沈毓渭、蒋琳,等.一个 CMS 水稻育性回复突变体的 RAPD 分析.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.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 雌性不育突变体的 RAPD 分析.核农学报.2005,19(1):29-32.
 [17] Wolf K, RAPD analysis of sporting and chimerism in Chrysanthemum. 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. Euphytica, 2002, 127(2):247-253.
 [19] Rani V, Paroda A, & Rama S N, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for genetic analysis in micro-propagated plants of Populus deltoides Marsh. Plant Cell Report, 1995, 14:459-462.
 [20] Vilordon A Q & LaBonte D R, Genetic variation among sweet potatoes propagated through nodal and adventitious sports. J Amer Soc Holt Sci, 1996, 121(20):170-174.
 [21] Doyle J J, Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12: 13-15.