

苹果不同继代次数的茎尖组培苗同工酶酶谱及 RAPD 分析

杜国强¹ 师校欣¹ 张庆良² 马宝焜¹(¹ 河北农业大学园艺学院, 保定 071001; ² 河北省农林科学院棉花研究所, 石家庄 050051)

摘要: 分别对不同继代次数 (3~90 代) ‘富士’、‘金冠’、‘乔纳金’ 苹果组培苗进行 POX、EST、AMY 同工酶分析。结果表明, 同一品种不同继代次数处理间均有一致的酶带谱型。利用超薄层等电聚焦电泳根据 POX 酶蛋白 pI 的差异可区分金冠和乔纳金两品种, 同一品种不同继代次数的组培苗之间 pI 相同, 组培过程未对 POX 酶蛋白 pI 产生影响。利用 25 个随机引物对不同继代次数的苹果组培苗进行了 RAPD 分析, 其特征带型表现一致, 未发现变异。说明苹果茎尖离体继代培养 90 次以内具有较高的遗传稳定性。

关键词: 苹果; 组织培养苗; 遗传变异; 同工酶酶谱; RAPD

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0033-05

Isozyme Patterns and RAPD Analysis of Apple Plantlets Repeatedly Subcultured in Vitro

Du Guoqiang¹, Shi Xiaoxin¹, Zhang Qingliang², and Ma Baokun¹(¹ College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; ² Cotton Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The genetic stability of apple plantlets repeatedly subcultured in vitro for three to ninety times was examined by analysis of isozyme patterns of POX, EST and AMY, as well as RAPD. The results showed that there were clear difference in POX, EST, and AMY isozyme patterns among varieties, but there was no detectable difference in the same varieties with different times of subculturing. The POX isozyme was further analyzed by using IEF electrophoresis. It was easy to distinguish between genotypes (i. e. ‘Golden Delicious’ vs. ‘Jonagold’) according to the pI of POX isozyme. However, no difference was found in the same varieties with different times of subculturing. RAPD analysis with twenty-five 10-mer arbitrary primers revealed identical bands for plantlets with different times of subculturing within a variety. Our results indicated that genetic stability of apple plantlets was maintained even after repeatedly subcultured in vitro for up to ninety times.

Key words: Apple; Tissue culture seedling; Genetic variation; Isozyme patterns; RAPD

苹果茎尖离体培养是快速繁殖无性系的有效方法, 比传统的嫁接、扦插、压条等繁殖方法快万倍到数十万倍。但由于茎尖在离体条件下长期使用生长调节剂, 使生长点分生组织一直处于不断分化的活跃状态, 是否会增加变异机率, 经过多代繁殖的组培苗是否仍然保持原有品种的遗传性状, 这关系到组培快繁技术的实用化问题。前人的研究表明果树组培苗遗传稳定性受基因型、继代培养次数、培养条件 (如生长调节剂的应用) 等因素的影响^[1-3], 如香蕉茎尖快繁后代存在一定比例的表现型变异, 变异率随继代次数的增加而增加^[2,3]。从生长与结果习性及孢粉学特征方面已有报道证实苹果茎尖组培苗保持了原有品种的特性^[4]。本文对苹果不同代数茎尖组培苗进行同工酶酶谱及 RAPD 分析, 对其遗传稳定性进行评价, 以期苹果无病毒工厂化育苗提供理论基础。

收稿日期: 2005-05-12; 修回日期: 2005-09-13

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2004000368); 河北农业大学博士、引进人才启动基金资助项目

1 材料与方法

1.1 试材

试材为苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 脱病毒茎尖组培试管苗, 富士品种继代次数分别为 3、9、60、90 代; 金冠品种为 3、9、40、78 代; 乔纳金品种为 3、9、45、78 代。每代选取培养 25~30 d 的组培苗 30 株作为样品。

1.2 同工酶分析

垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳: 采用不连续系统凝胶电泳, 浓缩胶浓度 3.5% (pH 6.7); 分离胶浓度 7.5% (pH 8.9)。电极液选用 pH 8.3 Tris/甘氨酸缓冲液。取组培苗幼叶 0.2 g, 加入 1 mL 提取液 (Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mmol · L⁻¹ 蔗糖, 1% PVP), 冰浴研磨, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液点样。采用稳流电泳, 起始电泳每样孔电流 1 mA, 当前沿指示剂 (0.2% 百里溴酚蓝数滴电泳前加入电极缓冲液) 走出分离胶时, 每样孔电流加大到 2 mA, 溴酚蓝走到距胶板底部 1 cm 处时停止电泳, 立即剥胶、染色^[5,6]。检测 POX、EST 和 AMY。

水平板超薄等电聚焦电泳: 凝胶液中含 Acr + Bis 2.0 mL, Ampholine 0.6 mL, ddH₂O 5.4 mL, TEMED 10 μL、过硫酸铵 (10%) 60 μL, 凝胶厚度为 0.5 mm。取组培苗幼叶 0.2 g, 加入 1 mL 重蒸馏水, 冰浴研磨, 8 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液点样。阴极为 NaOH 1 mol · L⁻¹、阳极为 0.5 mol · L⁻¹ 磷酸。先预电泳 30 min (稳压 60 V), 点样后, 稳压 100 V 15 min, 然后稳流 15 mA (每样点 1 mA), 当电压升至 500 V 时, 去掉点样纸, 调电压至 650 V, 稳压电泳直至电流降到 0.2 mA, 停止电泳。醋酸联苯胺法染色。

1.3 RAPD 分析

采用改良 CTAB 法提取组培苗幼叶 DNA^[7]。PCR 反应物体积为 20 μL, 内含缓冲液 (Tris-HCl 10 mmol · L⁻¹, KCl 50 mmol · L⁻¹, 0.1% Triton X-100), MgCl₂ 2.2 mmol · L⁻¹, dNTP 0.2 mmol · L⁻¹, 1.5 unit Taq 酶, 0.2 μmol · L⁻¹ 随机引物, 50 ng 样品 DNA。PCR 反应条件: 先 94℃ 5 min, 冰浴 1 min, 再 94℃ 50 s, 40℃ 90 s, 72℃ 60 s, 进行 35 个循环, 最后 72℃ 10 min。产物于 0.9% 琼脂糖凝胶、1 倍 TAE 电极缓冲液条件下电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外观察并照像分析。

随机引物为 Operon 公司生产的 A 组系列中筛选出的 12 个引物 (A01、A02、A03、A04、A05、A06、A07、A08、A09、A11、A18 和 A20) 和上海生工生物工程公司生产的 48 个随机引物中筛选出的 13 个引物 (S12、S25、S48、S114、S301、S303、S304、S329、S368、S376、S379、S380、S445)。

2 结果与分析

2.1 组培微繁后代同工酶谱带差异

2.1.1 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 对金冠、富士、乔纳金 3 个品种不同继代次数组培苗的 POX、EST 和 AMY 进行了垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明, POX 酶谱可分为两个区, 即快速区 (Rf > 0.40) 和慢速区 (Rf < 0.40)。金冠品种共有 13 条酶带, 其中慢速区 6 条, 快速区 7 条; 富士在慢速区多出 1 条 Rf = 0.3921 的酶带, 共 14 条; 乔纳金慢速区也有 7 条酶带, 在快速区多出两条, Rf 值分别为 0.5018 和 0.6071, 共 16 条酶带 (图 1)。依此可以将这 3 个苹果品种区分开来。

EST 谱带 Rf 值在 0.20~0.40 之间, 分布较集中。其中金冠有 4 条酶带, 而富士有 3 条酶带, 少了 1 条 Rf = 0.2675 的慢速酶带, 乔纳金则少了两条快速酶带, Rf 分别为 0.3465 和 0.3860, 共两条酶带 (图略)。依此亦可将这 3 个苹果品种区分开。

AMY 酶谱亦分为快速区 (Rf > 0.50) 和慢速区 (Rf < 0.50)。在快速区, 金冠、富士、乔纳金都只有 1 条酶带; 在慢速区, 金冠、乔纳金有两条酶带, 而富士有 4 条酶带 (图略)。依此同工酶酶谱只能将富士与金冠、乔纳金区分开, 不能区分金冠和乔纳金。

这 3 种同工酶谱在同一品种、不同继代次数的组培苗中均具有相同的酶谱, 说明组培快繁未引起其变化。

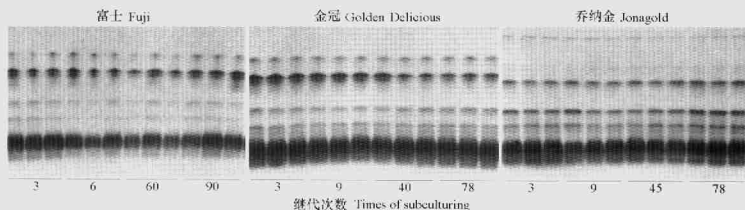


图 1 不同继代次数组培后代 POX 电泳图谱

Fig. 1 Isozyme patterns of POX with different subculture stages of micropropagation

2.1.2 水平板超薄等电聚焦电泳分析 等电聚焦电泳是在 1 个连续线性稳定的 pH 梯度场内根据蛋白质的等电点 (pI 值) 的不同而将其分离的方法, 其分辨率较高。本试验采用超薄层水平板等电聚焦电泳研究了苹果茎尖组培后代的 POX 酶谱特征 (图 2), 结果表明, 供试乔纳金和金冠两个品种具有不同 pI 值的 POX 酶蛋白组成, 其中乔纳金表现出较多的谱带, 分析与其为三倍体、遗传背景更复杂有关。依据 pI 值为 4.62 酶带的有无可以准确地区分这两个苹果品种。在同一品种中不同继代次数组培苗的酶谱表现一致, 表明组培过程并未引起此种酶蛋白等电点发生变化, 即酶蛋白结构稳定。

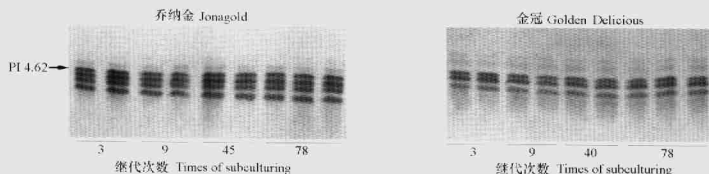


图 2 不同继代次数组培后代 POX 等电聚焦电泳分析

Fig. 2 The IEF electrophoresis analysis of POX isozyme with different subculture stages of micropropagation

2.2 组培微繁后代 RAPD 分析

本试验利用经过筛选的 25 个随机引物对不同继代次数的苹果组培苗进行了 RAPD 分析 (表 1), 每种引物都产生了清晰的扩增谱带。用 A01、S25、S301、S376 引物可以将这 3 个品种区分 (图 3), 其余的引物品种间则表现相同的谱带。相同引物在同一品种、不同继代次数处理中具有相同的带型。

表 1 不同继代次数的苹果继代苗 RAPD 反应所产生的扩增带数

Table 1 Number of bands created by RAPD reaction in subcultured plantlets in apple

引物 Primers	扩增带数 Number of bands			引物 Primers	扩增带数 Number of bands			引物 Primers	扩增带数 Number of bands		
	富士 Fuji	金冠 Golden Delicious	乔纳金 Jonagold		富士 Fuji	金冠 Golden Delicious	乔纳金 Jonagold		富士 Fuji	金冠 Golden Delicious	乔纳金 Jonagold
A01	6	7	8	A11	7	7	7	S304	2	2	2
A02	5	5	5	A18	9	9	9	S329	2	2	2
A03	4	4	4	A20	6	6	6	S368	2	2	4
A04	5	5	5	S12	1	1	2	S376	3	1	2
A05	5	5	5	S25	2	2	1	S379	3	3	3
A06	4	4	4	S48	3	3	3	S380	1	1	1
A07	3	3	3	S114	2	2	2	S445	2	2	2
A08	3	3	3	S301	3	1	2				
A09	5	5	5	S303	4	3	4				

表明在所检测的范围内多代增殖培养未对苹果碱基序列产生影响。

3 讨论

酶蛋白多肽链的结构差异,取决于 DNA 分子核苷酸的排列顺序,基因结构的差异是产生同工酶的主要原因,而同工酶酶谱则是基因在代谢水平上的表现。因此,利用同工酶分析可以比较直接地判断基因的存在及其突变。薛其清等研究发现,甘蔗亚无性系形态性状的变异与同工酶的变异有一定关系,在供试的亚无性系群体中,POX 的变异一般表现为酶带数的增加,且与茎径和茎数/丛的变异呈正相关^[8]。Kongkiatnang 等利用同工酶标记分析了红花三叶草 (*Trifolium pratense* L.)

品种内部的变异情况,认为相对于形态指标来说,同工酶是更有用的植物遗传基因标记^[9]。许多学者认为同工酶是在分子水平上研究遗传变异及居群遗传结构最经济有效的方法。本研究对不同继代次数的苹果微繁殖进行了 POX、EST 和 AMY 同工酶酶谱分析及 POX 酶蛋白 pI 的比较,结果未发现微繁殖过程对上述性状产生影响,一定程度上说明苹果茎尖微繁殖后代保持了原有品种的特性。

Deng 等对柠檬的 14 个田间品种和 1 个离体培养变异品种进行了 RAPD 分析,可依其特征带将它们区分开来^[10]。Kongkiatnang 利用 RAPD 分析对红花三叶草品种内变异情况进行了估计,发现较高的变异率^[9]。Angel 等通过对离体保存 10 年的木薯 (*Cassava*) 继代苗和田间保存材料进行 RAPD 分析,认为木薯茎尖离体培养保持了原有种质特性^[11]。果树组织与细胞培养中常有体细胞无性系变异发生,多与树种种类、外植体材料类型、培养基植物生长调节剂种类与浓度、继代次数等因素有关^[2]。苹果叶片离体再生植株出现变异类型^[12,13],但有关苹果茎尖组培后代无性系变异分子标记情况尚未见报道。本试验对不同继代次数的苹果组培苗的 RAPD 反应结果表明,不同继代处理间具有一致的特征带型,进一步支持了关于苹果茎尖组培苗后代遗传稳定性的观点。

参考文献:

- 1 伊华林. 果树体细胞无性系变异与品种改良. 植物生理学通讯, 2002, 38 (4): 412~416
Yi H L. Somaclonal variation of fruit crops and cultivar improvement. Plant Physiology Communications, 2002, 38 (4): 412~416 (in Chinese)
- 2 朱靖杰. 香蕉组织培养中变异的发生与控制途径. 果树科学, 1995, 12 (2): 120~122
Zhu J J. Variation and its controlling during tissue culture in vitro in banana. Journal of Fruit Science, 1995, 12 (2): 120~122 (in Chinese)
- 3 张海保, 朱西儒, 张云开, 刘 卫. 香蕉试管苗变异因素的初步研究. 广西植物, 1996, 16 (2): 175~178
Zhang H B, Zhu X R, Zhang Y K, Liu W. Preliminary studies on the variable factors of the tube seedling of banana. Guangxi Botany, 1996, 16 (2): 175~178 (in Chinese)
- 4 Du G Q, Zhang Q L, Ma B K, Shi X X, Gao Y, Zhang W C. Field performance and phenotypic stability in micropropagated trees of apple. Journal of Shandong Agricultural University, 2002, 33 (Supplement): 169~174
- 5 Valjejos C E. Enzyme activity staining. In: Tanksley S D, Orton T J ed. Isozymes in plant genetics and breeding. Amsterdam: Part A. Elsevier Science Publishers B. V. Netherlands, 1983. 469~515
- 6 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985. 70~85
Hu N S, Wan X G. Isozymes technology and its application. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1985. 70~85 (in Chinese)
- 7 杜国强, 师校欣, 马宝魁, 章文才. 一种适宜苹果组培苗的 DNA 提取方法. 河北农业大学学报, 1999, 22 (3): 42~43
Du G Q, Shi X X, Ma B K, Zhang W C. A suitable procedure for extracting genomic DNA from plantlet of apple in vitro. Journal of Agricultural University of Hebei, 1999, 22 (3): 42~43 (in Chinese)

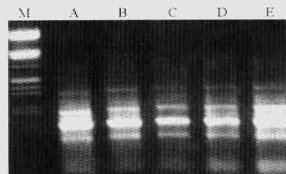


图3 苹果组培继代苗 RAPD 反应

引物: A01; M: *Hind*III + *Eco*RI; A: 金冠78代; B: 金冠9代; C: 富士90代; D: 金冠3代; E: 乔纳金9代。

Fig. 3 RAPD analysis of subcultured plantlets in apple
Primer: A01; M: *Hind*III + *Eco*RI; A: Golden Delicious subcultured for 78 times; B: Golden Delicious subcultured for 9 times; C: Fuji subcultured for 90 times; D: Golden Delicious subcultured for 3 times; E: Jonagold subcultured for 9 times.

- 8 薛其清, 郑德森, 潘大仁. 甘蔗组培亚无性系农艺性状及同工酶变异的分析. 福建农学院学报, 1991, 21 (3): 241 ~ 246
Xue Q Q, Zheng D S, Pan D R. Analysis of agronomic features and isozyme variation in subcultured sugarcane. Journal of Agricultural College of Fujian, 1991, 21 (3): 241 ~ 246 (in Chinese)
- 9 Kongkiatngam P, Waterway M J, Fortin M G. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. Euphytica, 1995, 84: 237 ~ 246
- 10 Deng Z N, Gentile A, Nicolosi E. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. Journal of Horticulture Science, 1995, 70 (1): 117 ~ 125
- 11 Angel F, Barney V E, Tohme J, Roca W. Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of in vitro storage. Euphytica, 1996, 90 (3): 307 ~ 313
- 12 达克东, 金德敏, 伏建民, 王 斌, 束怀瑞, 李雅志. 苹果体细胞无性系变异的 RAPD 评估. 核农学报, 2001, 15 (2): 81 ~ 85
Da K D, Jin D M, Fu J M, Wang B, Shu H R, Li Y Z. RAPD as an aid to evaluate somaclonal variation of apple. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2001, 15 (2): 81 ~ 85 (in Chinese)
- 13 Virscek M M, Javornik B, Stampar F. Assessment of genetic variation among regenerants from in vitro apple leaves using molecular markers. Acta Horticulturae, 1999, 484: 299 ~ 303

超临界 CO₂ 萃取技术提取刺葡萄籽油的工艺研究

欧阳建文¹ 王仁才¹ 王辉宪² 熊兴耀^{1*} (¹ 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; ² 湖南农业大学理学院, 长沙 410128)

Study on the Extract Process of Grape (*Vitis davidii* Foëx.) Seed Oil with Supercritical CO₂ Extraction

Ouyang Jianwen¹, Wang Rencai¹, Wang Huixian², and Xiong Xingyao^{1*} (¹ Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ² College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

关键词: 超临界 CO₂; 萃取; 刺葡萄籽油

中图分类号: S 663.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 01-0037-01

近年来, 葡萄籽中不饱和脂肪酸和原花青素等生物活性物质的开发利用已受到国内外广泛重视, 葡萄籽提取物等功能性保健食品受到普遍欢迎。刺葡萄产量高, 抗性强, 但果粒小, 果皮厚, 种籽多, 种籽占整粒葡萄的 4% ~ 6%, 特别适合于加工制汁及天然生物活性物质的开发, 但是至今尚未见到有关的研究报道。

超临界 CO₂ 萃取技术是近年来迅速兴起的化工分离新技术, 在食品、香料、医药、化工等领域得到了广泛应用 (欧阳建文, 2004)。萃取猕猴桃籽油 (杨柏崇, 2003)、葡萄籽油 (唐韶坤, 2004)、玉米胚芽油 (葛保胜, 2002) 等已有较多报道, 但在萃取刺葡萄籽油方面尚未见报道。本文对此简要报道。

试验用的刺葡萄为湖南农业大学等单位从野生资源中选育出的刺葡萄新品种——紫秋, 种植在湖南省怀化市芷江山区。果实榨汁后的残渣去除果皮等杂质后得到种籽; 于 40 ~ 45℃ 烘箱中将种籽烘干, 粉碎至 30 ~ 40 目, 用超临界 CO₂ 萃取装置 (江苏南通华安超临界萃取有限公司生产, HA221-50-06 型) 研究刺葡萄籽油的提取工艺。以萃取温度 (35、40、45、50℃), 萃取压力 (15、20、25、30MPa), 分离温度 (35、40、45、50℃), 分离压力 (6、8、10、12MPa), 萃取时间 (40、50、60、70 min) 为变量, 进行 L₁₆ (4⁵) 的正交试验, 每次装料 200 g, 以萃取率和油质为考察指标, 探讨超临界 CO₂ 萃取技术萃取刺葡萄籽油的工艺参数。

正交试验极差分析表明, 萃取压力和分离压力是影响萃取的两个关键因素。最佳萃取组合为萃取压力 30 MPa, 萃取温度 50℃, 分离温度 35℃, 分离压力 10 MPa, 萃取时间 60 min, 在此条件下萃取率为 13.3%。刺葡萄籽油颜色为淡黄色, 澄清透明, 无杂质, 无溶剂残留, 气味芳香。经湖南省疾病预防控制中心检验, 刺葡萄籽油各理化指标、微生物指标、急性经口毒性试验均符合有关标准要求。

收稿日期: 2005-09-01; 修回日期: 2005-12-13

基金项目: 湖南省科学技术厅资助项目 (04JT2001)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xiongxingyao@126.com)