

满天星试管苗与其玻璃化苗的 RAPD 指纹图谱分析

曹天旭, 朴炫春, 吴松全, 王守明, 廉美兰*

延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400

摘要: 采用分离群体分组分析法(BSA), 用100个随机引物对满天星的正常苗和玻璃化苗进行RAPD分析的结果表明, 7个随机引物扩增出多态性差异条带。再用上述7个引物分别对试管苗及其玻璃化苗个体进行DNA的PCR扩增的结果显示, 引物J20在2种苗中出现差异条带。

关键词: 满天星; 玻璃化苗; RAPD; 指纹图谱

Analysis of RAPD Fingerprint of Shoots and Its Vitrification Shoots *in vitro* of *Gypsophila paniculata* L.

CAO Tian-Xu, PIAO Xuan-Chun, WU Song-Quan, WANG Shou-Ming, LIAN Mei-Lan*

Department of Horticulture, College of Agriculture, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400, China

Abstract: In order to identify vitrification shoots at molecular level, analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting method was performed on the normal and vitrification shoots *in vitro* of *Gypsophila paniculata*. One hundred random primers were amplified products by bulked segregation analysis (BSA), and seven primers which produced polymorphic bands were screened among them. The seven primers were used on normal and vitrification shoots for PCR amplification, and the result indicated that different bands were amplified by primer J20 in the two shoots.

Key words: *Gypsophila paniculata*; vitrification; RAPD; fingerprinting

满天星别名霞草, 属石竹科丝石竹属植物, 为多年生宿根草本花卉, 是切花用的植物之一, 常用作其他切花的背景花, 以构成优雅的花境。近些年, 在满天星试管苗快繁方面已有大量的研究报道(李黎等 2004; 张春华等 2005), 在大规模生产中满天星组培快繁相对于其它花卉比较容易获得成功, 但普遍存在玻璃化现象, 且比较突出和严重。玻璃化苗极易死亡, 不能移栽成活, 对植株离体快繁的成活率造成负面影响, 深受人们的关注(卜学贤和陈维伦 1987)。试管玻璃化植株的解剖学特点、生理生化变化、形成原因和控制方法上的研究多有报道, 但对玻璃化发生的规律和机制尚无定论, 尤其是分子水平上研究更少。本文采用随机扩增多态DNA标记(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)技术, 对满天星试管苗的玻璃化苗和正常苗从DNA水平上作了分析, 为进一步探讨满天星玻璃化苗发生机制建立基础。

材料与amp;方法

茎尖培养得到的满天星(*Gypsophila paniculata*

L.)试管苗分别接种于2MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂和2MS+5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+7 g·L⁻¹ 琼脂的培养基中。在温度为25℃、湿度为75%、光照强度为30 μmol·m⁻²·s⁻¹和每天光照16 h的条件下培养30 d, 得到的正常苗和玻璃化苗各7株用作实验材料。

DNA提取采用CTAB法(Doyle和Doyle 1990), 根据所加TE的量, 在小离心管中分别加入2~3 μL的RNase, 放到37℃水浴锅中过夜。DNA样品用RNase酶解后, 采用DYY-12型稳压稳流电泳仪, 缓冲液为0.5×TBE, 0.7%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量, 电泳时电压50 V (5 V·cm⁻¹), 时间2 h。电泳结束后在凝胶成像仪下(GDS-8000, 美国Ultraviolet公司)照相, 并记录结果, 符合要

收稿 2006-10-11 修定 2007-03-09

资助 国家自然科学基金(30560094)和国家教育部重点项目(205035)。

* 通讯作者(E-mail: mllian@ybu.edu.cn; Tel: 0433-3263389)。

求后放入 -20 °C 冰箱中备用。采用 Michelmore 等 (1991) 的分离群体分组分析法 (bulked segregation analysis, BSA) 将 7 株正常苗和 7 株玻璃化苗的 DNA 样品分别等量混合, 组成满天星正常苗和玻璃化苗的基因池。

选取 10 碱基的 100 个随机引物 (美国 Operon Technologies 公司), 以 2 个基因池的 DNA, 用 System-9700 PCR 仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 进行 PCR 扩增。DNA 扩增反应程序设置为: 94

预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 45 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。反应体系 (25 μ L) 为: 14.17 μ L ddH₂O、150 μ mol·L⁻¹ dNTP、1.5 μ mol·L⁻¹ MgCl₂、2.5 μ L 10×Buffer、0.3 μ mol·L⁻¹ 引物、10 ng DNA 模板和 1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增反应结束后, 取 10 μ L 扩增产物与 2 μ L 电泳载体缓冲液混匀, 采用 0.5×TBE 电泳缓冲液、1.4% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5% EB) 电泳。电压为 80 V, 电泳结果在凝胶成像仪下观察, 拍照, 实验重复 3 次。

实验结果

1 引物筛选

针对本文研究目的, 选择不仅能扩增出清晰、重复性好的条带, 且能扩增出玻璃化苗或正常苗的特征性条带的引物。采用 BSA, 总共筛选 Operon 系类 (F01~20、G01~20、H01~20、I01~20 和 J01~20) 100 个随机引物, 初步获得指纹条带明显的引物有 28 个, 其中重复性好、条带清晰稳定、有差异的引物只有 7 个 (表 1)。7 个引物在 2 个基因池间扩增出的多态性条带的数目、位置以及强弱均有明显差异 (图 1)。

2 满天星正常苗和玻璃化苗的 RAPD 分析

用上述 7 个引物分别对 7 株正常苗和 7 株玻璃化苗进行 DNA 的 PCR 扩增后, 引物 J20 在正常苗和玻璃化苗中出现明显的差异带, 而其它引物的扩增效果不佳 (资料未列出)。正常苗在 1 700、1 400、900 和 700 bp 处各有 1 条带, 而玻璃化苗除了上述 4 条带外, 分别在 1 000 和 500 bp 出现了 2 条特有的差异带, 且 1 000 bp 的条带特别亮 (图 2)。说明玻璃化苗的部分碱基已发生变异, 这可能是导致玻璃化苗形态畸变和各种生理生化水平异常的原因。

表 1 随机引物序号及其碱基序列

Table 1 Random primers and their nucleotide sequence

引物序号	序列(5' 3')
F06	gggaattcgg
F16	ggagtactgg
G17	acgaccgaca
H17	cactctctc
J10	aagcccgagg
J17	acgccagttc
J20	aagcggcctc

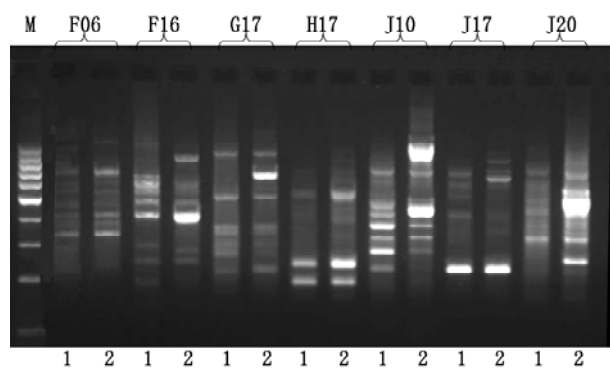


图 1 采用 BSA 筛选出不同引物的 RAPD 产物

Fig.1 RAPD products of different primers screened by BSA
M: 200 bp DNA 分子量标记; F06、F16、G17、H17、J10、J17 和 J20: 引物; 1: 正常苗; 2: 玻璃化苗。

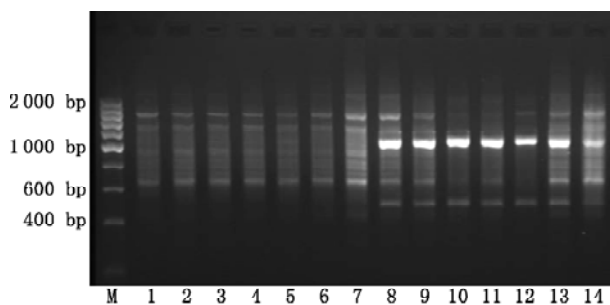


图 2 引物 J20 在满天星正常苗与玻璃化苗中的 RAPD 指纹图谱

Fig.2 RAPD fingerprint of normal and vitrification shoots *in vitro* of *G. paniculata* generated with primer J20
M: 200 bp DNA 分子量标记; 1~7: 正常苗; 8~14: 玻璃化苗。

讨 论

关于满天星试管苗玻璃化现象的研究已有很多报道, 王纪方等 (1997) 认为, 玻璃化现象可能

与环境胁迫直接或间接地引起体内自由基的增加以及体内防御活性氧毒害的保护性酶的失常有关。张淑改等(1999)根据满天星玻璃化苗的酯酶和过氧化物酶分析的结果,提出外部形态上的玻璃化现象与分子水平上酶的变化密切相关的观点。沈宁东(2003)比较满天星试管正常苗与玻璃化苗叶片解剖结构的结果认为,玻璃化苗的形态畸变是因某些生理生化指标发生变化引起。郭达初等(1991)认为,具有局部正常顶端分生组织结构的重瓣丝石竹玻璃化苗通过茎尖培养可使其恢复为正常苗。本文用RAPD技术从分子角度对满天星试管苗的玻璃化现象进行了分析,从正常苗和玻璃化苗的指纹图谱(图2)中可以看出,玻璃化苗在1 000和500 bp处比正常苗多出2条带,可以确认其遗传物质DNA发生了变化,因此培养过程中满天星试管苗一旦产生一定程度的玻璃化现象,即很难恢复正常,但这些碱基的变化是否是造成试管苗玻璃化的真正原因仍需进一步研究。

参考文献

- 卜学贤, 陈维伦(1987). 试管植物的玻璃化现象. 植物生理学通讯, 23 (5): 13~19
- 郭达初, 刘克斌, 刘非仄, 柴明良(1991). 重瓣丝石竹试管快速繁殖和玻璃化现象探讨. 科技通报, 7 (1): 50~55
- 李黎, 陈菲, 曲彦婷(2004). 重瓣丝石竹的组织培养与快速繁殖. 国土与自然资源研究, (2): 96
- 沈宁东(2003). 满天星试管正常苗与玻璃化苗叶片解剖结构的比较. 青海师范大学学报(自然科学版), (3): 45~47
- 王纪方, 李锡香, 贾春兰, 沈镛(1997). 丝石竹玻璃苗生理特性和形成机理初探. 农业生物技术学报, 5 (1): 72~78
- 张春华, 朴炫春, 廉美兰, 赵长新, 金花(2005). 培养基组成对满天星试管苗增殖的影响. 延边大学农学学报, 27 (1): 35~39
- 张淑改, 齐力旺, 时宝凌, 张芸香(1999). 满天星玻璃苗的酯酶和过氧化物酶研究. 山西农业科学, 27 (2): 68~70
- Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12 (1): 13~15
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc Nat Acad Sci USA, 88: 9828~9832