

利用 RAPD 技术对满天星试管苗玻璃化发生原因的初步探讨

曹天旭, 朴炫春, 廉美兰*, 吴松全, 修景润 (延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400)

摘要 用200条随机引物对满天星试管正常苗和玻璃苗进行了RAPD分析研究, 结果表明:200条随机引物中, 有23条引物的扩增产物DNA片段表现出明显的多态性, 其中每个引物对不同供试样品扩增出现的DNA谱带数少则5条, 多达13条, 分布在200~2000 bp。不同引物扩增出的DNA片段谱带不同, 差异较大, 选出的23条引物对14个供试样品共扩增出206条DNA谱带, 经聚类分析, 14个供试样品可分为2类或4类, 可直观准确地区分满天星试管正常苗和玻璃苗之间的差异。

关键词 满天星; 玻璃苗; RAPD; 聚类分析

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00658-02

Analysis of the Formal Shoot and Vitrification Shoot from *Gypsophila Paniculata* L Tissue Culture with the RAPD

CAO Tian Xu et al (Department of Horticulture, Agriculture College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract In this paper, the random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was conducted with 200 random primers in the formal shoot and vitrification shoot from *Gypsophila Paniculata* L tissue culture. The results showed that twenty-three of the two hundreds random primers were scorable polymorphic ones. Scorable DNA fragments derived from each primer amplifying in various strains were found in the range from five to thirteen with an average of seven. The size of the amplified DNA fragments ranged from 200 to 2000 base pairs. Different DNA bands were amplified by different primer, and the difference was big. Twenty-three primers were screened and a total of 206 DNA fragments were amplified. After cluster analysis, 14 samples were clustered 2 or 4 groups, these can distinguish the difference of the formal shoot and vitrification shoot from *Gypsophila Paniculata* L tissue culture.

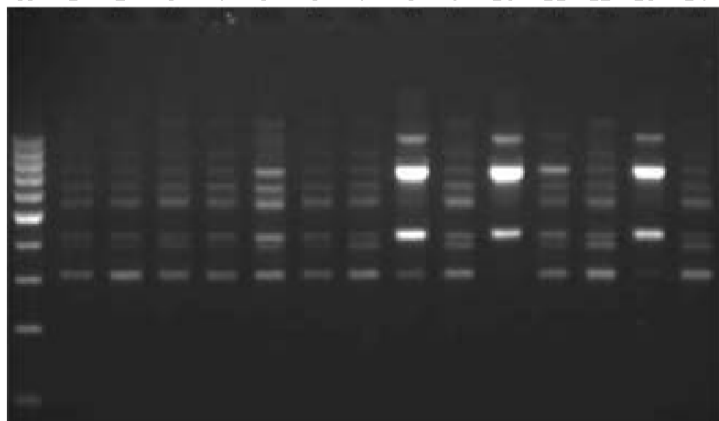
Key words *Gypsophila Paniculata* L; Vitrification; RAPD; Cluster analysis

试管苗玻璃化现象在植物组织培养中极为普遍, 已报道的植物达70多种^[1], 是试管苗生产中急待解决的问题之一^[2]。满天星试管苗在培养容器小环境的相对湿度等与水势有关的许多外源因素的影响下, 易产生玻璃化现象, 但玻璃化程度不同, 表型变化和生理功能也不同。目前关于玻璃化植株的解剖学特点^[3-4]、生理生化变化^[5-6]、形成原因及控制方法等方面的研究很多^[7], 但是对于玻璃化发生规律和机理尚无确定的结论, 尤其从分子水平尚无对其进行研究的先例。笔者应用RAPD技术对玻璃化程度不同的满天星植株进行了DNA水平的分析, 为进一步探明组培过程中的玻璃化机理打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验材料为7株满天星(*Gypsophila Paniculata* L.) 试管生长一致的正常苗(Ns1, Ns2, Ns3, Ns4, Ns5, Ns6, Ns7) 和7株玻璃苗(As1, As2, As3, As4, As5, As6, As7), 其中选用的玻璃苗部分叶片开始肥大、已经肥大、半透明, 其玻璃化程度不同。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



F06

1.2 方 法

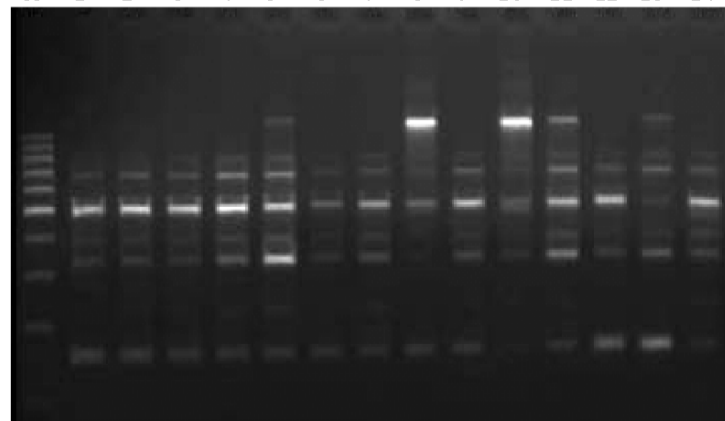
1.2.1 基因组DNA的提取。采用CTAB法^[8], 提取DNA后, 采用DYY-12型稳压稳流电泳仪, 缓冲液为TBE的琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳时电压50 V(5 V/cm), 时间2 h。电泳结束后在凝胶成像仪下照相, 并记录结果。

1.2.2 基因池的建立。应用McMurrer R W等^[9]的分离群体分组分析法(BSA法)。分别将7株正常苗和7株玻璃苗的DNA样品等量混合, 组成满天星正常苗和玻璃苗的基因池。

1.2.3 DNA扩增反应程序。反应程序设置:94 预变性5 min, 94 变性1 min, 36 退火1 min, 72 延伸1.5 min, 45 个循环, 最后72 延伸7 min。反应体系为(25 μl):14.17 μl ddH₂O, 150 μmol/L dNTP, 1.5 μmol/L MgCl₂, 2.5 μl 10×Buffer, 0.3 μmol/L引物, 10 ng DNA模板, 1 U TaqDNA聚合酶。

1.2.4 电泳检测。PCR扩增反应结束后, 采用0.5×TBE电泳缓冲液, 1.4%的琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml EB)电泳, 电泳产物在GDS 8000型凝胶成像仪下观察, 拍照。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



J10

注:1~7 正常苗, 8~14 玻璃苗。

图1 引物F06、J10的RAPD电泳图谱

1.2.5 数据处理。用MEGA2.1数据处理软件计算距离系数, 用UPGMA^[9]程序对14株满天星试管苗进行聚类分析。

作者简介 曹天旭(1980-), 男, 吉林农安人, 硕士研究生, 研究方向: 组织培养及生物技术。* 通讯作者, 教授, Email: mlilian@ybu.edu.cn。

收稿日期 2006-10-26

2 结果与分析

2.1 引物的筛选 为了选择不仅能扩增出清晰、重复性好, 且能扩增出玻璃苗或正常苗的特征性条带的引物, 采用BSA法, 共筛选了OP系列的200条随机引物, 其中获得指纹条带明显的引物有23条, 分别为C15、C16、C18、D15、E02、F01、F02、F06、G06、G10、G11、G14、G15、G17、H15、H19、I04、I13、J08、J10、

J17、J18、J20。此23条引物可扩增出所有供试样品的DNA条带,且条带清晰、稳定,分布合理、重复性好。

2.2 RAPD 扩增图谱分析 23条引物对14株满天星试管苗均能扩增出清晰的谱带,每个引物对每样品扩增出的DNA条带数不等,少则5条,多则13条,表明反应体系和反应扩增程序均能对满天星正常苗和玻璃苗进行有效的RAPD扩增,每个引物经3次重复,都可得到稳定的结果,所有引物扩增的DNA多态性片段的长度在200~2000bp(图1)。

由表1可见,共扩增出206条DNA谱带,其中125条为共有DNA谱带,占61%,81条为多态性带,占39%,说明供试样品虽然具有较大的相似性,但也有一定的差异。

2.3 聚类分析 由表2可见,14株满天星正常和玻璃苗个体间的遗传距离系数在0.086~0.558,变化较大。其中7株正常苗(Ns1~Ns7)间的遗传距离较小,均小于0.28,说明其相似性大于72%,而出现的遗传差异可能是个体间差异。7株玻璃苗(As1~As7)中,As7和As1间的遗传距离大,为0.506,相比之下,As7与7株正常苗的遗传距离较小(平均0.337),As1较大(平均0.522),说明As1玻璃化程度高,As7较低,这与As7为叶片开始肥大的苗,As1为半透明苗的表型特征一致。

由图2可见,在0.2距离水平上可将满天星正常和玻璃苗分为2类:Ns1,Ns2,Ns3,Ns4,Ns5,Ns6,Ns7,As2,As5,As6,As7为第1类;As1,As3,As4为第2类。在0.15的距离水平上可分为4类:Ns1,Ns2,Ns3,Ns4,Ns5,Ns6,Ns7为第1类,为正常苗;As2和As7为第2类,玻璃化程度较轻;As4和As5为第

3类;玻璃化程度较重的As1,As3和As6为第4类。

表1 RAPD 分析所用引物及其扩增的谱带数

引物编号	扩增条带数	多态性条带数	共同拥有条带数	多态性的频率 %
C15	8	4	4	50
C16	8	4	4	50
C18	8	4	4	50
D15	7	3	4	43
E02	11	2	9	18
F01	11	3	8	27
F02	9	3	6	33
F06	8	6	2	75
G06	9	3	6	33
G10	7	1	6	14
G11	10	2	8	20
G14	12	3	9	25
G15	13	3	10	23
G17	11	4	7	36
H15	7	2	5	29
H19	7	2	5	29
I04	11	5	6	45
I13	8	6	2	75
J08	5	4	1	80
J10	9	2	7	22
J17	9	4	5	44
J18	6	3	3	50
J20	12	8	4	67
汇总	206	81	125	39

表2 满天星试管苗的遗传距离系数矩阵

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
N1	0.000													
N2	0.210	0.000												
N3	0.148	0.111	0.000											
N4	0.185	0.099	0.086	0.000										
N5	0.247	0.210	0.173	0.185	0.000									
N6	0.198	0.210	0.173	0.185	0.198	0.000								
N7	0.247	0.235	0.222	0.235	0.247	0.272	0.000							
A1	0.568	0.531	0.519	0.531	0.420	0.543	0.543	0.000						
A2	0.309	0.296	0.284	0.272	0.284	0.284	0.309	0.457	0.000					
A3	0.494	0.407	0.469	0.432	0.395	0.494	0.543	0.272	0.383	0.000				
A4	0.420	0.383	0.395	0.407	0.370	0.370	0.444	0.469	0.333	0.370	0.000			
A5	0.333	0.346	0.309	0.321	0.284	0.358	0.407	0.481	0.296	0.358	0.284	0.000		
A6	0.395	0.457	0.444	0.432	0.444	0.444	0.543	0.321	0.432	0.247	0.370	0.358	0.000	
A7	0.284	0.370	0.358	0.321	0.358	0.309	0.358	0.506	0.247	0.432	0.407	0.296	0.383	0.000

注:N~N7为正常苗,A1~A7为玻璃苗。

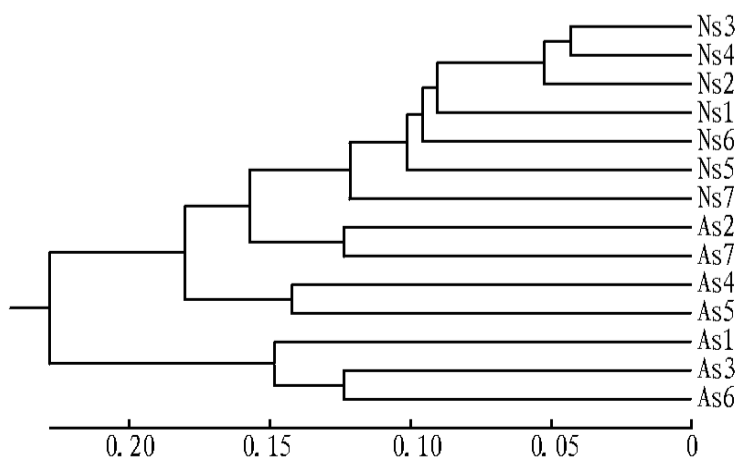


图2 满天星试管苗的RAPD 聚类分析树状图

3 讨论

组培快繁中玻璃化现象是比较突出和严重的问题,郭达

初等^[12]曾提出重瓣丝石竹试管玻璃苗再生的可行性,但从该试验结果可知,半透明状或透明状的玻璃苗可能发生DNA水平上的碱基变化,没有再生的可能性。该研究结果表明,不同程度的玻璃苗与正常苗的遗传距离不同,As1、As3、As6样品的玻璃化程度较大,与正常苗有较大差异;而As2、As4、As5、As7号样品(叶片有些肥大)变异程度较低,与表型上变异程度相符,这类玻璃苗具有再生的可能性。所以在组培规模化生产和继代材料稀少的状态下,选留再生性玻璃苗和去除变异玻璃苗显得非常重要,该研究对快速准确地鉴定再生性玻璃苗和变异玻璃苗供了新方法。

(下转第674页)

(上接第659 页)

参考文献

- [1] 陶铭. 组织培养中畸形胚状体及超度含水态苗的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 1048 - 1058.
- [2] 卜学贤, 陈维伦. 试管植物的玻璃化现象[J]. 植物生理学通讯, 1987, 23(5): 13 - 19.
- [3] 周菊花, 陈秀玲, 钟华鑫, 等. 麝香石竹玻璃苗与正常苗的生理特性差异[J]. 广西植物, 1993, 13(2): 164 - 169.
- [4] LESHEMB. Growth of carnation *nastens* in vitro: Anatomical in the medium on their formation[J]. *Ann Bot*, 1983, 52: 413 - 415.
- [5] 刘恩颖, 王泰哲. 香石竹玻璃苗的研究[J]. 园艺学报, 1988(4): 272 - 276.
- [6] KEVERS C. Physiological and biochemical events leading to vitification of plants cultured in vitro[J]. *Physiol Hart*, 1994, 61: 69 - 74.
- [7] HAKARRT F A, J MA VERSLUJS. Some factors affecting glassiness in carnation *nastens* in vitro culture. *Neth J J PL Path*, 1983, (89): 47 - 53.
- [8] 林加涵, 魏文玲, 彭宣宪. 现代生物学实验: 下册 M. 北京: 高等教育出版社, 2003: 100 - 102.
- [9] MICHEMOR R W, PARANI, KESSEI R V. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828 - 9832.
- [10] 黎中宝. 应用 RAPD 技术研究 4 种鲍的亲缘关系[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(4): 60 - 63.
- [11] 张洪胜, 牟云官, 辛培刚. 苹果离体培养中试管苗玻璃化现象发生机理的探讨[J]. 果树科学, 1991, 8(2): 71 - 74.
- [12] 郭达初, 刘克斌, 刘非厌, 等. 重瓣丝石竹试管快速繁殖和玻璃化现象探讨[J]. 科技通报, 1991, 7(1): 50 - 55.