

月季‘金银岛’的红花芽变品系的分析鉴定

谢吉容^{1,2}, 梁国鲁², 李树发³, 程再全³, 唐开学³, 黄兴奇³

(1. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 402160; 2. 西南大学 园林园艺学院, 重庆 400715; 3. 云南省农科院, 云南 昆明 650223)

摘要: 芽变育种在月季新品种选育中至关重要。为了快速区分真正可遗传的芽变和环境因素引起的饰变, 采用 RAPD 和 ISSR 对月季‘金银岛’的疑似芽变株系‘往日情怀’进行了标记分析, RAPD 和 ISSR 引物都能扩增出差异多态性条带。结果表明: 该芽变是由基因组变异引起的可遗传的稳定变异, 是与花青素合成相关基因的突变。这为花色相关变异基因分离克隆以及‘往日情怀’芽变新品种申报奠定了基础。

关键词: 月季; 芽变; 饰变; 遗传鉴定

中图分类号: S 68.03.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0186-03

芽变选种是非常有效的育种手段, 观赏植物比果树等经济作物更容易选育芽变品系, 只要芽变具有一定观赏价值, 就可以通过无性繁殖使其优良性状得以长期保存, 成为一个新的优良品种。菊花中 400 多个品种都是从芽变选育成功的; 深黄色仙客来是来自二倍体的白花仙客来自交系的黄花突变; Hareing 所列的近 18 000 个月季栽培品种有 10% 是由芽变而来。另外, 芽变也是分析突变性状相关基因的好材料。芽变是植物体在受到局部机械损伤、病虫害危害、化学药剂处理、强度摘心修剪等多种外界因素的影响, 局部幼芽受到刺激而发生的遗传性变异。变异的芽萌发成枝条后, 表现出与原类型不同的性状。由于环境条件或栽培管理因素导致的植物外在性状的变异叫饰变, 属于不可遗传的变异。因此在芽变选种过程中, 要对芽变性状做全面深入分析, 区分是饰变还是真正的芽变。国内外有人证明 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 技术可以应用于月季种质鉴定和多样性分析^[1-3]。后来发展了更为稳定的 ISSR 标记 (Inter Simple Sequence Repeat, 简单序列重复区间扩增), 也可进行种质鉴定和多样性分析^[4]。月季‘金银岛’ (Gold island, 以下简称 GI) 是从法国引进的一个切花品种, 花色金黄, 在其切花生产中, 出现了粉红花的芽变类型‘往日情怀’ (Yesterday love, 以下简称 YL)。现运用 RAPD 和 ISSR 对月季 GI 和 YL 从基因组

水平上进行分析, 旨在探明遗传物质的变化, 为月季花色相关新基因研究提供具有除突变基因外的遗传背景一致的材料, 并早期鉴定是否是真正的芽变, 为品种申报奠定基础。

1 材料和方法

1.1 月季突变体材料

月季‘金银岛’ GI 是昆明杨月季公司从法国引进的品种, 花色为金黄色, 有较浓郁的香味; 其疑似芽变品种‘往日情怀’ YL 花粉色, 无香味, 植株偏高, 窄灌型, 枝条直立, 幼枝颜色浅, 无短刺, 长刺中, 长刺形状扁平, 叶片亮度中, 花重瓣。GI 和其芽变型 YL 被种植在同一温室大棚不同垄上。从 GI 和其芽变株系 YL 枝条上采取嫩叶和 3.4 期的花蕾 (花蕾已是粉红色或金黄, 花瓣紧裹未开), 立即用液氮保存。

1.2 花色素测定

1.2.1 脂溶性色素提取 分别称取 0.5 g GI 和 YL 花瓣, 用 2 mL 80% 丙酮水溶液冰上研磨, 4℃ 冰箱中避光放置 24 h, 期间轻微震荡 5 次。在 4℃, 10 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清备用。

1.2.2 水溶性色素提取 分别称取 0.5 g GI 和 YL 花瓣, 用 2 mL 盐酸-甲醇 (3M HCl : H₂O : MeOH (1 : 3 : 16, by vol.)) 提取液冰上研磨, 4℃ 冰箱中避光放置 24 h, 期间轻微震荡 5 次。在 4℃, 10 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清备用。

1.2.3 吸光值测定 使用 BECKMAN DU640 Nucleic Acid and Protein Analyzer 测定丙酮提取液在 470 nm、647 nm、663 nm 处的吸光值 A₄₇₀、A₆₄₇、A₆₆₃, 提取液稀释 100 倍后测定 A₄₇₀; 测定盐酸-甲醇提取液在 530 nm、553 nm 处的吸光值 A₅₃₀、A₅₅₃。

1.2.4 色素浓度计算 根据 Lichtenthaler HK^[7] 的方程式 $C_a (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 13.95A_{663} - 6.88A_{647}$ 和 C_b

第一作者简介: 谢吉容 (1966-), 女, 重庆永川人, 副教授, 西南大学在读博士, 从事花卉种质资源和育种研究。E-mail: xiejirong@tom.com。

通讯作者: 黄兴奇。

基金项目: 云南省农业科技攻关资助项目 (2003NG05); 云南省农业科技攻关资助计划 (2006NG34)。

收稿日期: 2007-06-25

($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) = $24.96A_{647} - 7.32A_{663}$ 计算提取液中叶绿素 a(Ca)、叶绿素 b(Cb)、总叶绿素(Ct)的浓度; 根据 $\text{Car} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \text{混合液体积} \times A_{470} \times 1/25$ 计算类胡萝卜素(Car)的浓度; 根据 $\text{Can} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = A_{530} - 0.24A_{553}$ (Murray and Hackett, 1991) 计算花青素的浓度; 最后求出植物组织中色素的含量: 色素的含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$) = [色素的浓度 \times 提取液体积 \times 稀释倍数 \times 1 000] / 样品鲜重。

1.3 月季叶片 DNA 提取

采用 CTAB 改良法提取月季 DNA: 取月季幼叶 1 g 左右, 加液氮快速研磨至粉末, 将样品转入 10 mL 离心管, 加入 4 mL 的 2% CTAB 提取液和 20 μL 巯基乙醇, 摇匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min。加入氯仿: 异戊醇(24:1) 3 mL 和 1 mL 的 Tris-饱和酚, 摇匀, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 再加入氯仿: 异戊醇(24:1) 4 mL 抽提一次, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 加入 2/3 体积的异丙醇, 用玻璃针挑出絮状沉淀, 用 1 mL 的 70% 乙醇清洗 2 次, 干燥后将沉淀用 500 μL ddH₂O 溶解, 加入 RNase(10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h; 用等体积氯仿: 异戊醇抽提 1 次, 上清液中加入 2.5 倍体积无水乙醇 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 用 1 mL 的 70% 乙醇清洗沉淀 2 次, 自然干燥后溶于 50 μL ddH₂O, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。其 DNA 质量的琼脂糖胶电泳检测和 DNA 浓度的测定按文献 [8] 说明进行。

1.4 RAPD 和 ISSR 引物筛选及其反应体系优化与循环参数确定

根据文献 [1, 6, 9] 在冰上建立 PCR 反应体系: 25 μL 10 \times buffer 2.5 μL , 2.5 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的 dNTP 3 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Primer 0.6 μL , Taqase (5U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.3 μL , 水 15.1 μL , 50 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的模板 DNA 1 μL 。PCR 循环参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, RAPD 反应 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, ISSR 反应 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 39 个循环 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在 25 μL 的 PCR 扩增产物中加入 2 μL 的 10 \times loading buffer, 混匀, 用 0.5 \times TAE 配制的含有溴化乙锭 (200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 以 Takara 公司的 DL2000 DNA marker 作为相对分子质量标准, 在 4V $\cdot \text{cm}^{-1}$ 恒压下电泳 3 h 左右。电泳结束后在凝胶成像系统中照相并保存图像。

2 结果与分析

2.1 月季样品花色素差异分析

根据样品光吸收值计算月季样品 GI、YL 叶绿素含量、类胡萝卜素、花青素含量(表 1)。结果表明, 月季红花突变体 YL 的叶绿素含量略低于其亲本 GI, 类胡萝卜素含量差异不显著, 而花青素含量 YL 明显高于 GI。说明突变体花色成分差异主要是花青素含量高低不同。虽然花色与花瓣细胞中的色素种类、色素含量、花瓣内

部或表面构造引起的物理性状等多种因素有关, 但色素起主要作用。与花色有关的色素包括叶绿素、类胡萝卜素、类黄酮、水溶性生物碱及其衍生物四大类群, 其中叶绿素的含量很少, 类胡萝卜素或水溶性类黄酮含量很高。

表 1 月季样品 GI、YL 叶绿素含量、类胡萝卜素花青素含量

样本	叶绿素含量	类胡萝卜素含量	花青素含量
	/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$	/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$	/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$
金银岛 GI	32.5944 \pm 0.19	0.1232 \pm 0.07	0.2584 \pm 0.21
往日情怀 YL	29.9980 \pm 0.02	0.1236 \pm 0.29	9.6956 \pm 0.16

水溶性的类黄酮类花色苷可产生从浅黄到蓝紫的全部颜色范围。对于金黄色月季品系出现的粉红花芽变枝条, 到底是环境因子引起的花青素含量的变化还是自发突变的结果, 需要进一步分析。

2.2 月季样品 GI、YL 的 RAPD 和 ISSR 标记分析

表 2 月季样品 GI、YL 的 RAPD 和 ISSR 标记的引物序列

标记类型	引物	碱基序列(5'-3')	扩增片段	多态性片段	
RAPD	OPW03	GTCCGGAGTG	5	4	
	OPF04	GGTGATCAGG	4	2	
	OPF05	CGAATTCCC	1	0	
	OPW06	AGGCCGATG	4	0	
	OPW07	CTGACGCTCA	6	0	
	OPF09	CCAAGCTTCC	5	3	
	OPW13	CACAGCGACA	3	0	
	OPW19	CAAAGCGCTG	4	0	
	OPF13	GCTCCAGAA	3	0	
	ISSR	UBC890	VHV(GT) ₇	4	0
		UBC848	(CA) ₈ RG	7	0
		UBC835	(AG) ₈ YC	5	0
		UBC807	(AG) ₈ T	8	0
UBC811		(GA) ₈ C	7	4	
UBC825		(AC) ₈ T	5	0	
UBC880		(GGAG) ₃	6	0	
UBC841		(GA) ₈ YC	4	0	
UBC844		(CT) ₈ RC	2	0	

注: H = not G; R = A or G; Y = C or G; V = not T。

从 23 个 RAPD 引物中筛出 9 个能扩增出清晰条带的引物(图 1), 扩增出 500~3 500 bp 的 DNA 片段, 其中引物 OPW03、OPF04、OPW09(表 1) 扩增出芽变枝的特异条带(箭头所示)。从 13 个 ISSR 引物中选出 9 个能扩增出清晰条带的引物, 但只有一个引物 UBC811 能扩增出芽变枝的特异条带(图 2 箭头所示)。RAPD 和 ISSR 都是建立在 PCR 技术基础上的, 利用一系列寡聚核苷酸为引物, 对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物通过 PAGE 或者琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色或放射自显影来检测 DNA 片段的多态性。RAPD 的生物学基础是在引物结合序列上发生单碱基点突变、缺失、易位、重复或插入, 从而改变了扩增片段的大小或者不能扩增, 形成多态性 DNA 片段; 研究在 YL 中 OPW03、OPF04、OPW09 3 个引物分别能扩增出

比亲本 GI 更大的特异片段, 推测这个变异是插入突变, 估计是反转录转座子转座引起的。ISSR 其基本原理是根据真核生物基因组中广泛存在的 SSR 设计 15~24 个碱基序列单一引物, 在 SSR 的 5' 或 3' 末端加锚 1~4 个碱基, 然后以此为引物对那些两侧具有反向排列 SSR 且长度合适的一段基因组 DNA 序列进行 PCR 扩增。而突变发生在 SSR 的 5' 或 3' 末端的概率相对较低, 所以试验只有 UBC811 能扩增出差异条带。RAPD 和 ISSR 标记分析表明芽变是真正的插入突变而不是环境因素引起的饰变。

传差异。后两类方法可避免形态描述的缺陷, 达到早期鉴定的目的。DNA 分子标记甚至可以检测出单基因的变异。肖旋等^[10]运用 RAPD '石硠' 龙眼大果型桂花味芽变系的 RAPD 分析鉴定; 宁允叶等^[11]对红阳猕猴桃全红芽变系的进行了 RAPD 分析; 金勇丰等^[12]对桃早熟芽变品种 '大观一号' 的 RAPD 分析及其特异片段的克隆。可见, RAPD 技术无论用于果树还是花卉芽变鉴定都是可行的; 本研究运用 ISSR 标记来鉴定芽变也是可行的, 只是引物筛选更多。总之可以建议 '往日情怀' 的芽变系作为新品种开发利用。

参考文献

- [1] 陈向明 郑国生, 孟丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 78-80.
- [2] Jan C H, Byrne D H, Manhart J. Rose gemplasm analysis with RAPD markers[J]. HortScience, 1999, 34(2): 341-345.
- [3] Kazan K, Manners J M, Cameron D F. Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA marker[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 882-888.
- [4] Reynders S, Bollereau P. Characterization of genetic diversity in genus *Rosa* by random Ly amplified polymorphic DNA[J]. Acta Hort, 1996, 424: 253-259.
- [5] Torres A M, Mill An T, Cubero J L. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers[J]. HortScience, 1993, 28(4): 333-334.
- [6] 郭立海, 金德敏, 王斌, 等. 月季种质鉴定和多样性分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 551-555.
- [7] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes[J]. Methods Enzymol, 1987, 48: 350-382.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation from small amount of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [9] 金凤, 陈崇顺, 邹爱兰, 等. 月季 ISSR 反应体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2006(1): 72-75.
- [10] 肖旋, 孙敏, 王心燕, 等. '石硠' 龙眼大果型桂花味芽变系的 RAPD 分析鉴定[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 684-687.
- [11] 宁允叶, 熊庆娥. 红阳猕猴桃全红芽变系的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 511-513.
- [12] 金勇丰, 张耀洲, 陈大明. 桃早熟芽变品种 '大观一号' 的 RAPD 分析及其特异片段的克隆[J]. 果树科学, 1998, 15(2): 103-106.

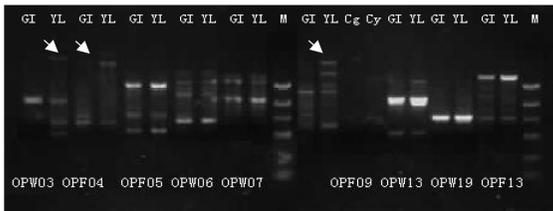


图1 月季GI和YL样本的RAPD分析

注: M; 100bp DNA Marker; C_g 未加GI模板的对照; C_y 未加引物OPF09

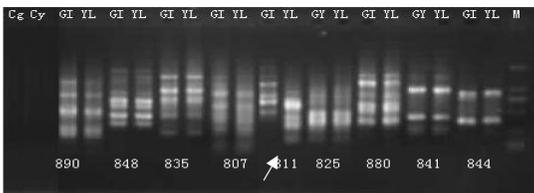


图2 月季样本GI和YL的ISSR分析

注: M; DL2000 DNA Marker; C_g 未加GI模板的对照; C_y 未加引物UBC890

3 讨论和结论

芽变遗传鉴定可以从不同层面进行: 一种是多年观察变异性状在不同环境中是否稳定; 二是进行生化鉴定, 利用同工酶谱进行分析鉴定; 三是染色体倍性、数量及结构检测; 四是利用各种分子标记技术直接分析其遗

Identification of Pink Sprout Mutation from 'Gold Island' Rose

XIE Ji-rong^{1,2}, LIANG Guo-lu², LI Shu-fa³, CHENG Zai-quan³, TANG Kai-xue³, HUANG Xing-q³

(1. Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402168, China; 2. College of Horticulture and Gardens Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: Bud mutation is very important for new variety selection. In order to fast distinguish heritable mutation from the decoration mutation caused by environmental factor, this article used RAPD and ISSR to analyze 'Gold Island' and its suspected bud mutation 'Yesterday Love' and polymorphic bands can be amplified with RAPD and ISSR primers. The result indicated this bud mutation is the stable variation which resulted from the genomic variation. This work had laid the foundation for separation of the genes related to flower color as well as declaration of the new variety 'Yesterday Love'.

Key words: *Rosa hybrida*; Bud mutation; Decoration mutation; Genomic identification