大丽菊杂合花色突变体的发现及 RAPD 鉴定

阚雪芹,方向明,贾俊丽,郑必平,谈建中

(苏州大学 城市建设学院,江苏 苏州 215123)

摘 要:以新发现的大丽菊花色突变体为材料;选取 10 个具有 10 个碱基长度的随机引物,对 5 种突变个体的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析。结果表明:10 个随机引物共扩增出 152 条 DNA 条带,分子量大小在 250~1 600 bp 之间,其中有 4 个引物的扩增结果中检测到了差异性条带,在 DNA 水平上初步证实了 5 种花色突变体是由于遗传因素导致的稳定变异。

关键词:大丽菊;花色突变体;随机扩增多态性 DNA

中图分类号:S 682.1+9;Q 944.58 文献标识码:A 文章编号:1001—0009(2009)03—0075—03

大丽菊(*Dahlia pinnata* Cav)为菊科大丽菊属多年生草本植物,花朵硕大,色泽鲜艳,花期长,具有很高的观赏价值,是世界名花之一。大丽菊园艺品种多达 3000 多种,其植株高矮、花色、花型、花径都有很多变化,这与菊科植物的生物学特性有关。菊属植物(*Dendranthema*)是天然异花授粉植物,在自然界常有种间杂交现象发生[1]。并且,菊花易发生芽变,由芽变育成的新品种基本都属于花色变异[2]。另一方面,随着植物分子生物学研究技术的进步,随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA,RAPD)技术[3]在植物突变体鉴定及基因组 DNA 分析上的应用受到了广泛重视,迄今为止在兰科等多种植物上已有一系列的相关报导[4-9]。

试验以新发现的大丽菊杂合花色突变体为材料,应用 RAPD 技术对几种突变体基因组 DNA 进行了分析,以便在 DNA 分子水平上鉴定大丽菊花色突变体,筛选与花色变异相关的 RAPD 分子标记,为研究大丽菊花色变异机理、花色相关基因克隆及分子标记辅助育种等提供新的试验依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

大丽菊原始材料购于苏州市木渎花卉市场,从其侧枝上选取 5 种不同花色变异的花瓣和叶片为试验材料,分别记为 D01、D02、D03、D04 和 D05。

1.2 突变体基因组 DNA 的提取

参照文献[10]的 CTAB 法提取大丽菊基因组 DNA,从 5 种花色突变体的侧枝上采取鲜叶 0.1~0.2 g,洗净晾干后加液氮研磨,加入预热的 2%CTAB 提取缓冲液振荡混匀,65℃水浴 30~40 min(期间振荡 4~5 次),冷却至室温后加等体积的氯仿∶异戊醇(24∶1),置水平摇床处理 15 min,3 000 r/min 离心 10 min,吸取水相再加 2/3 倍体积的异丙醇,沉淀并钩取絮状 DNA,风干后 TE 溶解,于—20℃保存备用。

1.3 RAPD 分析

1.3.1 随机引物 随机引物购自上海生工生物工程有限公司,均为 10 个碱基的寡聚核苷酸,供试引物编号及其序列见表 1。

表 1 RAPD 扩增的随机引物及序列

Table 1 Random primers and the DNA sequences for RAPD

引物编号 Primer No.	碱基序列 Base sequence	引物编号 Primer No.	碱基序列 Base sequence
S91	TGCCCGTCGT	S115	AATGGCGCAG
S92	CAGCTCACGA	S118	GAATCGGCCA
S93	CTCTCCGCCA	S176	TCTCCGCCCT
S94	GGATGAGACC	S178	TGCCCAGCCT
S95	ACTGCGACTC	S179	AATGCGGGAG

1.3.2 RAPD 反应与电泳检测 RAPD 扩增采用 25 μL 反应体系:10×PCR buffer 2.5 μL,dNTP 2.5 μL,10 碱基随机引物(10 μmol/L)1 μL,DNA 模板(50 ng/μL)1.5 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.125 μL,其余用 ddH_2O 补充至 25 μL。RAPD 反应参数按照文献[10]的方法:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,34℃ 2 min,72℃ 1 min,40 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 仪为德国 biometra 公司 050-811。RAPD 产物的检测:用 1.6%琼脂糖凝胶在 TAE 缓冲液中,50 V 电压下电泳约 60 min。电泳结束后,采用凝胶成像系统(GIS-2007,上海天能科技有限公司)检测分析。

2 结果与分析

第一作者简介:阚雪芹(1982-),女,江苏人,硕士研究生,研究方向为园林植物与生物技术。

通讯作者:谈建中(1957-),男,江苏省苏州市人,博士,教授,现从事园林植物资源与生物技术方面研究工作。E-mail:szutjz@hotmail.com。

收稿日期:2008—11—10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1　大丽菊杂合花色突变体的特征

该试验所用的大丽菊原始材料购于苏州市木渎花卉市场,在盆栽植株生长与开花过程中,先后在不同侧枝上发现了5种不同杂合花色的突变体,这些花色各异的花朵是同一植株上经过多次摘心处理后由不同腋芽发育而形成的,其花瓣基色调为紫色—紫红色,但花瓣上部产生不同程度的白色变异,外观上花瓣颜色表现出很大差异(图1)。

图1　大丽菊突变体植株上的杂合花色变异

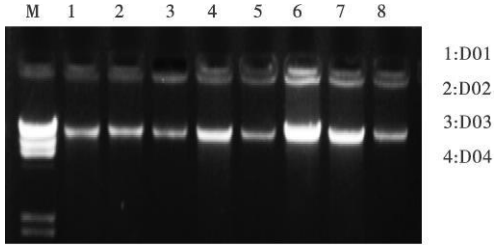
Fig.1　The versicolor flowers of dahlia mutant

注:D01:花瓣紫红色,少数花瓣白边;D02:花瓣下部紫色,上部白色;D03:多数花瓣下部紫色,上部白色;D04:花瓣紫红色,花瓣下部有浅条纹;D05:花瓣紫色,少数花瓣上部白边。

Note:D01:Patals are amaranthine,and a few of them have white border;D02:The under parts of the petals are purple,the upper parts are white;D03:Many under parts of the petals are purple,the upside are white;D04:Petals are amaranthine,and the parts have light stripes;D05:Petals are purple,and a few of them have white border on the upper side.

2.2　突变体基因组DNA的提取

从大丽菊叶片中提取的5种基因组DNA,其OD_{260}/OD_{280}值都在1.6~1.8之间,纯度较高。琼脂糖凝胶电泳(图2)也显示,提取的DNA具有较好的完整性,片段较大,降解少,质量较好,符合RAPD分析的条件。



M:DNA分子量标记(λ/Hind Ⅲ)

图2　大丽菊基因组DNA的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2　Electrophoresis of the genomic DNA samples of the dahlia leaves

2.3　RAPD扩增结果

用10个随机引物对5种大丽菊花色突变株基因组DNA进行多态性分析,结果检测到了152条DNA片段,片段大小多在250~1 600 bp范围内,平均每个引物每种材料产生3.04条,其中最多的产生了8条,最少的仅1条。图3显示了RAPD分析的部分结果,在所用的10个随机引物中,引物S93、S94、S95、S115的扩增结果中检测到了差异性条带,5种突变体材料各有1~2条带明显缺失,显示这些花色突变体的基因组DNA发生了某些变化,推测这种变化可能与花色变异有关。

3　讨论

植物花的颜色主要由类黄酮、类胡萝卜素及甜菜色素类等三大色素决定,其中类黄酮色素中的花色素苷是花瓣的主要色素,与花色素苷代谢相关酶类的编码基因或调节基因的突变都将导致花瓣颜色发生变化,而利用DNA分子标记技术可以在基因组DNA水平上鉴别这种花色突变体是属于遗传变异抑或非遗传变异[5,7,9]。该研究用RAPD技术对新发现的大丽菊杂合花色突变株的基因组DNA进行了初步研究,结果在突变体之间检测到了差异性条带,说明5种突变个体的基因组DNA的确发生了某些变化,可能是属于遗传因素导致的稳定变异。

RAPD扩增的DNA多态性是基于序列变化的分子表型,从某种意义上反映基因组序列的多态性,在突变体的分子鉴定方面具有快速灵敏的优点,但也存在着稳定性差、可能产生非基因组DNA扩增的假带等不足[7],因此,今后仍有必要选择更多的随机引物进行RAPD分析,并分离和测序获得的特异性条带,以便对花色变异相关的功能基因与分子标记等方面进行深入研究。

参考文献

[1]　林容.中国植物志[M].北京:科学出版社,1983,76(1):129-142.

[2]　卢钰,刘军,丰震.菊花育种研究现状及今后的研究方向[J].山东农业大学学报(自然科学版),2004,35(1):145-149.

[3]　Williams J G K,Kubelik A V,Levak K J,et al.DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J].Nucleic Acids Research,1990,18(22):6531-6535.

[4]　谢伟,乐超银,林直,等.兰属品种的RAPD鉴定和亲缘关系分析

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4):369-373.
[5] 贾月慧, 张克中, 赵祥云, 等. 辐射亚洲百合 Pollyanna 雄性不育突变体的 RAPD 分析[J]. 核农学报, 2005, 19(1):29-32.
[6] 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊属植物 RAPD 反应体系的建立[J]. 北京林业大学学报, 1996, 18(1):46-51.
[7] 董喜存, 李文建, 余丽霞. 用随机扩增多态性 DNA 技术对重离子辐照大丽花花色突变体的初步研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2007, 25(1):62-64.
[8] 洪亚辉, 朱兆海, 张学文, 等. 运用 RAPD 分析菊花辐射变异后代遗传差异[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2003, 29(6):462-467.
[9] Carmen M, Elizabeth, César P. Application of RAPD markers in the characterization of Chrysanthemum varieties and the assessment of somaclonal variation[J]. Euphytica, 2002, 127(2):247-253.
[10] 李新梅. 桑树甜菜碱代谢生理及抗盐反应的分子生物学研究[D]. 苏州大学, 2006.

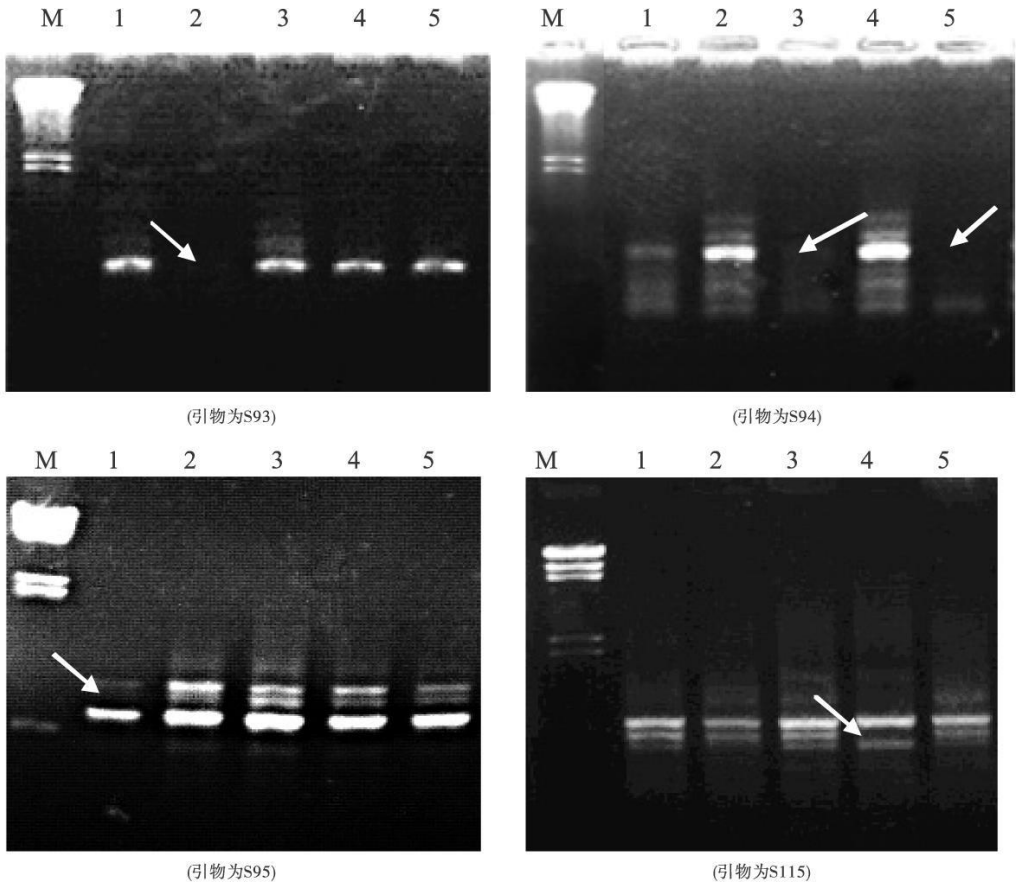


图 3 大丽菊花色突变体 RAPD扩增的差异性条带

Fig. 3 The differential band patterns amplified by RAPD of the dahlia flower color mutants

1: D01; 2: D02; 3: D03; 4: D04; 5: D05; M: DNA 分子量标记(λ/ Hind Ⅲ)

The Molecular Identification of a Novel Versicolor Mutant in *Dahlia pinnata* Cav Using RAPD Technique

KAN Xue-qin, FANG Xiang-ming, JIA Jun-li, ZHENG Bi-ping, TAN Jian-zhong
(School of Urban Construction, Soochow University, Soochow, Jiangsu 215123, China)

Abstract: The RAPD analysis of genomic DNA, generated by 10 random primers, 10 nt in every one, discriminated 5 flower color mutants of novel versicolor mutants in *Dahlia pinnata* Cav. The results showed that 152 bands were amplified in 10 primers, and each molecular weights range from 250~1 600 bp. Among them particular bands were produced in 4 primers, which suggested primarily in the DNA level that 5 flower color mutants varied due to the genetic factors.

Key words: *Dahlia pinnata* Cav; Versicolor mutant; Random amplified polymorphic DNA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net