

红掌组培变异株的特异 DNA 片段分析

张淑红, 陈 超, 杜宏薇, 范永山

(唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000)

摘 要: 利用 ISSR 引物对红掌亲本及其组织培养后代的形态变异株进行 2 次 PCR 扩增分析, 回收特异 DNA 片段, 测定其扩增产物的基因序列, 并用 BLAST 方法进行同源性分析。结果表明: 变异株的基因组特异 DNA 片段为 680 bp, 在核酸和蛋白质水平均没有发现同源性较高的基因或蛋白质, 说明红掌在组织培养过程中可能产生新的遗传重组, 出现新的基因型。

关键词: 红掌; 组织培养; 变异株; ISSR

中图分类号: S 628.1⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)08-0134-03

利用体细胞无性系变异产生新的作物品种, 是目前育种界正在开拓的新领域^[1-3]。从现有的研究结果中可以看出, 细胞的组织培养产生的无性系变异具有变异频率高、变异谱广、显性突变多、变异快等许多优点^[3-4]。红掌是世界名贵花卉, 现阶段常采用组织培养方式进行繁殖^[5]。利用组织培养技术可以快速培育优质红掌种苗, 进行扩大生产, 但是组织培养过程中常会由于一些原因导致植株表现型发生变化。该研究利用 ISSR 引物对红掌亲本及其组织培养后代中表现型差异较大的形态变异株进行 2 次 PCR 扩增分析, 回收特异条带的 DNA 片段, 确定红掌在组织培养过程中是否会发生基因型突变, 为红掌新品种的选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取自唐山师范学院现代化温室培养的红掌及其组培后代中表现型变化较大的变异株。

ISSR 所用引物、*Taq* DNA 聚合酶及 PCR 反应试剂购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 试验方法

参照 Guillemat^[6] 基因组 DNA 的提取方法, 提取红掌叶片基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。红掌基因组 DNA 扩增体系为: 反应溶液体积为 25 μ L, 其中 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 μ mol/L 引物 2 μ L, (10~

40) ng 模板 DNA 1 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 最后用 ddH₂O 补至 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50~54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 扩增 35~45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

在凝胶成像系统紫外光照射下区分并切下上述扩增 DNA 差异条带, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜。取过夜后离心管底部凝集液做模板进行第 2 次 ISSR 扩增, 扩增体系同上, PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50~54 $^{\circ}$ C 退火 30 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。最后 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收、纯化 PCR 扩增产物, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测回收效果, 并进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 红掌基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

提取红掌亲本株及变异株(图 1)的基因组 DNA, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可看到整齐、完整、无拖尾、质量较高的 DNA 亮带(图 2)。

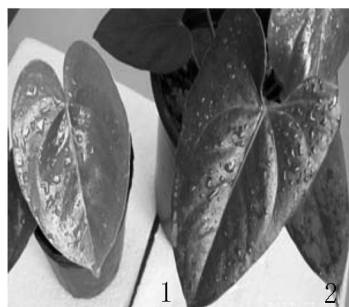


图 1 红掌亲本株与变异株的外观对比

第一作者简介: 张淑红(1978-), 女, 河北省石家庄人, 硕士, 讲师, 现主要从事生物化学与分子生物学方向研究工作。E-mail: zsh3535@yahoo.com.cn

通讯作者: 范永山(1971-), 男, 河北省唐山市人, 博士, 副教授, 现主要从事植物病理学研究工作。

基金项目: 唐山师范学院博士基金资助项目(05D01)。

收稿日期: 2009-12-09

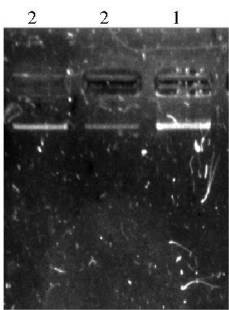


图2 红掌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

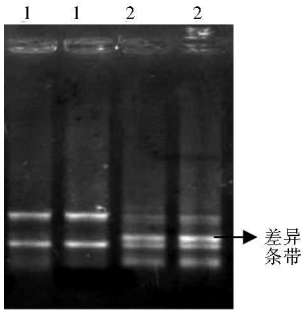


图3 亲本株和变异株基因组 DNA 的 ISSR 扩增结果

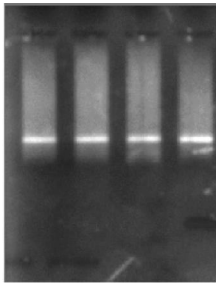


图4 差异 DNA 片段的 ISSR 扩增结果

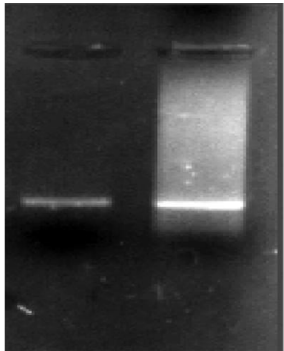


图5 试剂盒回收的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
注 1: 回收产物; 2: 差异 DNA 片段的 ISSR 扩增产物

2.2 引物筛选

对 14 种 ISSR 引物用亲本基因组 DNA 进行扩增筛选, 引物 102 扩增的条带较多且清晰。因此试验采用了 102 引物(序列: CACACACACACACAG)对亲本和变异株进行扩增。

2.3 红掌亲本株和变异株及差异 DNA 片段的 ISSR 扩增结果

琼脂糖凝胶电泳图谱结果显示变异株和亲本株 DNA 的差异谱带明显(图 3), 以上述差异 DNA 谱带为模板进行第 2 次 ISSR 扩增, 结果显示只得到仅有 1 条

电泳谱带的扩增产物(图 4)。

2.4 差异 DNA 片段的回收及测序分析

试剂盒回收差异 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 回收的 DNA 产物可用于测序分析(图 5)。由上海生工北京测序部测序得到 1 条 680 bp 的序列, 测序结果如下:

用 BLASTN 2.2.18+ 软件和 BLASTX 2.2.18+ 软件分别对上述 DNA 序列及可能的编码蛋白序列与 GenBank 中已知基因和蛋白进行同源性比较, 在核酸水平

和蛋白水平都没有发现同源性较高的基因或蛋白质。

```
1 GGGAAATTTC ATCGCTTTCC TACTCCTTCG CCCCTTCTTA TTTACCTATC GCAGGACTTA
61 TCTCCAGTTT GTCGACCCTG TTCTCTCCCC CTTACCCTTT GTTTGTGTGA AGTTCGTCCA
121 AGGGGAATGA ATGTCACAGG CTGGTATAAG ACACGACGCT ACTACCCCAA TAGGACCCTG
181 TGGTTCCCAA CTAATCCAG CCCACCGGT TCCCCTACT TCCCATTTC TCTGTTCTGG
241 ACCGCTCACG TGA CTAGCGA TATCCCCTAC CTGCATCCTC GGGGCCTGAC CTTGTGCACA
301 GTCCGCGCGC CAGCCGCCAC CGCATATGCG TGTGCCCAA TCCAACCAAG CCAATCCCC
361 CACGCGCTAG CACCGTCTCC TACGCCAGCA CCCGCTCTAT GCACCCATCA GACTCGGTGC
421 CCCGTCTCAC GAACGACAAG GCCTTCGAGC CCCACGACAA GTCTCTGCCT ATAGTCCCGG
481 GCCATCCACG CTGAGCACGC CTGCACTAGT GGAGACCCGT TGGCCTAGTT CCTCCTCATC
541 TGTGTGGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GGTGTGTGTG TGTGTGTGT GTGTGTGTGA
601 GTGAGTGCGA GGAGCTCTAA TATGTGTCTG TATTTGAGTG TTTTCTGTGT GTGGAGTGTA
661 ATTTATGGAG GTGTTGTAAG
```

3 结论与讨论

由于植物在组培过程中会产生新的变异类型, 且其变异频率远远高于自然突变频率, 经过选择后, 可以将具有优良性状的品种保留下来并进行繁殖, 因此组织培养发生的体细胞无性系变异对红掌品种改良和选育新品种具有重要的指导意义。试验通过 ISSR 分子标记将红掌亲本株与表现型有较大差异的组培苗进行分析比较。结果表明, 变异株基因型确实发生了分子水平上的变化, 其表现型的改变很可能是由于遗传因素所致。来自红掌变异株差异条带的 DNA 序列, 可能是红掌基因组或染色体所特有的序列, 其对应蛋白的具体功能还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 李晓玲, 丛娟, 于晓明, 等. 植物体细胞无性系变异研究进展[J]. 植物学通报, 2008(1): 121- 128.
[2] 黄亚红, 方显出, 梁婉琪, 等. 体细胞培养获得的水稻农艺性状突变种及其 DNA RAPD 分析[J]. 植物生理学通讯, 2002 38(1): 30-32.
[3] 吕博, 刘玲, 吴晶, 等. 茛苕变异植株组织培养及无性系建立的研究[J]. 现代农业科技, 200724: 5-6.
[4] 刘立岩, 王关林. 细叶百日草变异植株的组织培养及无性系建立[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2009(2): 239- 242.
[5] 李枝林, 郑丽. 红掌研究综述[J]. 云南农业大学学报, 1997 12(2): 143- 146.
[6] Guillemaut P, Drouard L M. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive and reliable method [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1992, 10(1): 60-65.

观赏植物‘孩儿莲’及其近缘植物差异蛋白组的电泳分析

刘文倩, 阚雪芹, 方向明, 王海玲, 谈建中

(苏州大学 建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 为探讨八角属植物结实性差异的分子机理, 以‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’及披针叶八角的幼叶为材料, 在优化蛋白质双向电泳技术的基础上, 就3种供试植物叶片蛋白质组的差异表达进行了分析。结果表明: 在采用改良酚提取法、蛋白溶解液含0.25% IPG 缓冲液、等点聚焦条件为50 000 V · Hr 时, 可以得到分离效果良好的双向电泳图谱。经2 DE Image Master 软件分析, 结果从‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’和披针叶八角的电泳图谱上分别检测到662、644和684个蛋白质斑点, 说明在蛋白质分子水平上, ‘杭州红茴香’与披针叶八角的亲缘关系较近, 而与‘孩儿莲’的遗传差异较大。

关键词: 孩儿莲; 披针叶八角; 差异蛋白组; 双向电泳

中图分类号: S 685.99 **文献标识码** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0136-04

‘孩儿莲’(*Illicium laceolatum*. cv. ‘Haierlian’)为八角科八角属植物, 树姿优美, 常年叶色翠绿, 春季花期最长可达1个月左右, 盛花时红绿相映, 似倒挂小莲花, 极具观赏价值, 因其栽种极少而被视为珍贵树种。并且, ‘孩儿莲’在苏州地区只开花不结果^[1], 从而可以避免果实毒性成分的不良影响, 有望成为观赏植物的实用新品种。但与‘孩儿莲’同为披针叶八角种的其它近缘植物, 大多结实且含有毒性成分, 对于这种结实性差异的

形成机理目前还缺乏了解。

蛋白质是基因表达的产物, 是基因型和表型的联系纽带。随着蛋白质组学研究技术的不断进步, 植物蛋白质组学已被广泛应用于植物发育、环境信号应答、遗传变异等领域的研究^[2], 但在植物亲缘关系的分析方面尚少研究报道。该试验以八角属植物披针叶八角的同种植物‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’和披针叶八角的叶片为材料, 在优化叶片蛋白质制备及双向电泳技术的基础上, 对三者蛋白质组的差异表达及种内亲缘关系进行了研究, 旨在为八角属植物种间或种内亲缘关系的鉴定提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3种供试植物材料分别为‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’、披针叶八角, 均为八角属植物披针叶八角种(*Illicium*

第一作者简介: 刘文倩(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。

通讯作者: 谈建中(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为园林植物生物技术。E-mail: szutjz@hotmail.com.

基金项目: 苏州市农业科技攻关资助项目(SNG0704)。

收稿日期: 2009-12-05

Analysis of Specific DNA Fragment in Virants from Tissue Culturing of Anthurium

ZHANG Shu-hong, CHEN Chao, DU Hong-wei, FAN Yong-shan

(Department of Life Science, Tangshan Teachers College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: PCR amplifications were studied twice using ISSR primer between Anthurium variety and the tissue-culturing plant with distinctly different phenotypes. The specific DNA fragment was recovered and the sequence of PCR product was homologously analyzed with BLAST software. The results indicated that the specific DNA fragment was 680 bp and there was no higher homology with other gene or protein. New genotype would appear as new genetic recombination occurs in the tissue culturing of Anthurium.

Key words: Anthurium; tissue culture; virants; ISSR