

不同倍性金鱼草基因组 DNA 随机扩增多态性研究

吴福川¹, 胡 秀², 郑思乡^{1,3*}

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 西南林学院, 云南 昆明 650224;

3. 云南玉溪雷森科技有限公司, 云南 玉溪 650031)

摘要: 利用 25 个 10 碱基的引物, 对金鱼草 3 个不同花色品系的二倍体及其同源四倍体基因组 DNA 进行随机扩增(RAPD)。结果表明: 二倍体与其同源四倍体金鱼草指纹图谱的差异, 随不同花色品系及不同引物而变化; 四倍体金鱼草在诱导过程中除了染色体数目加倍外, 基因组 DNA 的核苷酸碱基序列也可能改变, 这为培育四倍体金鱼草新品种提供了丰富的育种资源。指纹图谱的建立为金鱼草新品种的鉴定提供分子水平的依据, 为新品种保护奠定初步基础。

关键词: 金鱼草; RAPD; 多倍体; 指纹图谱

中图分类号: S 681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2005)04-0482-04

Study on Randomly Amplified Polymorphic Genome DNA of Diploid and Tetraploid *Antirrhinum majus*

WU Fu-chuan¹, HU Xiu², ZHENG Si-xiang^{1,3}

(1. College of Landscape and Horticulture, Y A U, Kunming 650201, China;

2. Southwest Forestry College, Kunming 650224, China;

3. Yunnan Yuxi Leisen Science and Technology Limited Company, Yuxi 650031, China)

Abstract: With 25 10-basic primers, the genomes DNA of three groups of diploid and tetraploid *Antirrhinum majus* were randomly amplified. The results showed the fingerprinting of diploid *Antirrhinum majus* and that of its autotetraploid were different with cultivars and primers; The DNA sequences were changed besides polyploidized during polyploidized inducement on *Antirrhinum majus*. So the abundant germresource was offered for breeding new cultivars. The fingerprinting can offer molecular evidence for identifying new cultivars of *Antirrhinum majus* and establish the basis for protecting new cultivars.

Key words: *Antirrhinum majus*; RAPD; polyploid; fingerprinting

金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 为玄参科 (Scrophulariaceae) 金鱼草属 (*Antirrhinum*) 植物又名龙头花、龙口花、洋彩雀、多年生草本, 常做一二年生栽培, 是重要的盆栽花卉和切花材料, 在国际花卉市场上占有重要地位。国外对金鱼草的应用和研究较早, 涉及遗传^[1~3]、栽培^[4,5]、病虫害防治、离体

培养^[6]、基因分离与转化^[7], 并成为分子生物学研究的良好模式材料, 对花发育生物学有重要贡献。而国内的研究与国外差距很大, 1990 年以前主要是关于一些栽培、组织培养方面的探索, 1995 年金波^[8]作了金鱼草群体的单株选择异交系的培育, 1991 年张效方^[9]作了金鱼草多倍体诱导的初步研究, 近年来一些学者开始用于进行分子生物学的研

收稿日期: 2005-01-10

* 通讯作者

作者简介: 吴福川(1979-), 男, 山东鄄城人, 在读硕士研究生, 主要从事花卉生物技术与育种研究。

究^[10-15]。当今,国内栽培的切花、盆花金鱼草都是二倍体,且优良品种均源于国外。为了培育具有自主知识产权的金鱼草新品种,本研究的前期工作是利用秋水仙素对3个不同花色(白色,黄红色,紫红色)的优良品系二倍体金鱼草进行染色体诱导处理,利用不定芽技术获得纯合的同源四倍体金鱼草^[16,17]。本文为首次对二倍体与其同源四倍体金鱼草进行分子标记的比较,有助于金鱼草新品种指纹图谱的建立及金鱼草不同倍数体之间性状变异与基因组 DNA 变化的关系,为新品种尽快商业化奠定品种权保护基础,同时也对金鱼草多倍体基因组进化研究奠定初步的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为花色为白色、黄红色、紫红色3个不同花色品系的二倍体及其同源四倍体金鱼草(以后简称白花二倍体为B2,其同源四倍体为B4;黄红色二倍体为H2,其同源四倍体为H4;紫红色二倍体Z2,其同源四倍体Z4)。二倍体金鱼草购于花卉市场,其同源四倍体为人工诱导而成。

1.2 方 法

用 SDS 法对3个不同花色品系的6个品种的组培苗分别进行基因组 DNA 提取,提取的 DNA 经电泳及紫外光光度分析仪检测合格后,稀释到浓度为10 ng/ μ L,置于4 $^{\circ}$ C 保存待用。经过优化后的 RAPD 反应体系为总体积为25 μ L,其中含2.5 μ L

10 \times PCR buffer, 2.5 mmol Mg²⁺, 0.2 mmol dNTPs, 2.5 U 的 Taq 酶(以上试剂为上海申能博彩生物科技有限公司生产), 10 pmol 10 个碱基随机引物(北京赛百盛生产), 约 60 ng 模板 DNA, 其余为 ddH₂O。反应循环为先 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 然后 45 个以下循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。电泳检测: 1 μ L 10 \times 溴酚蓝加 10 μ L 扩增产物, 混匀后在 2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭)进行电泳, 缓冲液为 1 \times TAB, 电压为 4 V/cm。电泳 2 h 后, 将凝胶置于凝胶成像分析系统中观察照相, 然后进一步分析。

2 结果与分析

2.1 不同引物对基因组 DNA 多态性扩增的影响

试验所用 25 个随机引物(见表 1)分别对 6 个品种的基因组 DNA 进行扩增。结果显示, 所用引物不同, 扩增的 DNA 的指纹图谱差异很大, 例如以 Z2 的基因组 DNA 为模板, 对应于不同引物扩增出的图谱, 最多的有 16 条带如 T7, 最少的 3 条如 T3, 见图 1。所用引物均能够与基因组 DNA 形成杂交位点, 所扩增出的图谱能够反映出一定的多态性, 所以这些适宜的引物扩增出的图谱可以作为新品种鉴定的分子依据, 也适宜不同倍数体之间, 不同品系之间的差异比较。

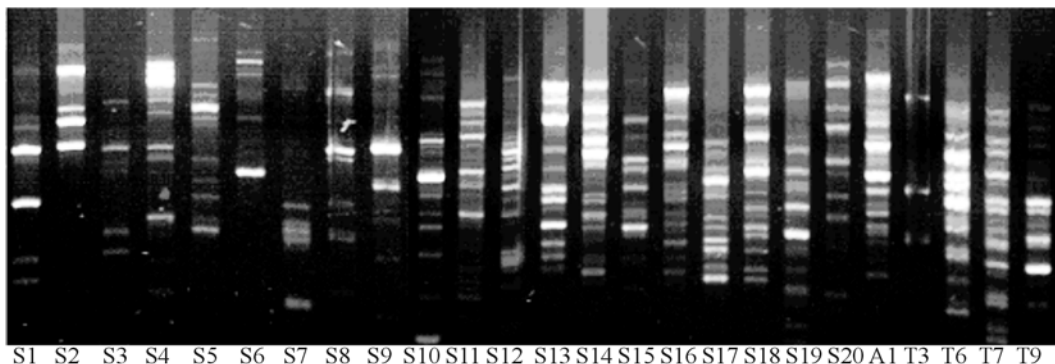


图 1 Z2 的 DNA 为模板对应于不同引物的扩增图谱

Fig. 1 The fingerprinting of Z2 from different primers

2.2 不同品系间的指纹图谱差异

不同品系间指纹图谱的差异表现在品系的特异带上, 该特异带的 DNA 序列可能与有关花色的基因相关, 有待进一步的测序, 比较。例如引物

S10 能扩增出白色花品系的特异带(图 2), 引物 S12 能扩增出紫红色花系的特异带(图 3), 引物 T3 能扩增出黄红色花系的特异带(图 4), 箭头所示为特异带。金鱼草同一品系的特异带, 在二倍体、四

倍体之间无差异,从而可以表明花色基因具有一定程度上地稳定性,进化上保守性。

2.3 不同倍性之间的 DNA 指纹图谱比较

不同引物能扩增出倍性之间不同的差异, T3 能扩增出这 3 个不同品系倍性之间的差异(见图 4), B4 比 B2 减少一条带, Z4 比 Z2 增加一条带, 而 H4 与 H2 之间无差异, S10 只能扩增出 B2 与 B4 之间的差异, B4 比 B2 减少一条带(图 2), 能扩增出 B4 与 B2 之间的差异的引物为 S10, S20, T3,

S15, S16, S14, 均表明 B4 比 B2 的图谱减少 1 或 2 条。而对于 H2 和 H4 及 Z2 和 Z4, 不同引物扩增出的不同倍性的差异表现在图谱的消失或增加上。金鱼草二倍体通过秋水仙素诱导成同源四倍体过程中, 可能引起基因组 DNA 的核苷酸碱基序列的改变, 或同源四倍体的等位基因发生漂移, 形成引物杂交位点的增减, 而表现出多倍体染色体的进化及 DNA 的多态性。

表 1 金鱼草 RAPD 多态性引物及其序列

Tab. 1 The RAPD polymorphic primers of *Antirrhinum majus* and their sequences

编号	序列	编号	序列	编号	序列	编号	序列
S1	CTACTGCGCT	S2	CCTCTGACTG	S3	CAGAGGTCCC	S4	CACCCCTTG
S5	TTTGGGGCCT	S6	GATACCTCGG	S7	TCCGATGCTG	S8	TTCAGGCTGG
S9	TCCTGGTCCC	S10	ACCGTTCCAG	S11	AGTCGGGTGG	S12	CTGGGTGAGT
S13	GTCGTTCTCTG	S14	AAAGGGGTCC	S15	CAGTTCACGG	S16	AGGGGGTTCC
S17	TGGGGACCAC	S18	CTGGCGAACT	S19	GAGTCAGCAG	S20	TCTGGACGGA
A1	CAGGCCCTTC	T3	TCCACTCCTG	T6	CAAGGGCAGA	T7	GGCAGGCTGT
T9	CACCCCTGAG						

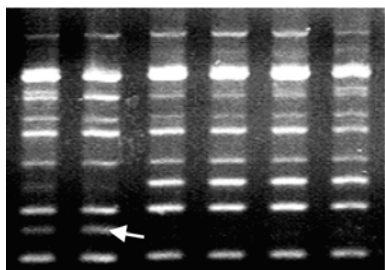


图 2 引物 S10 扩增出的图谱

Fig. 2 The fingerprinting from primer S10

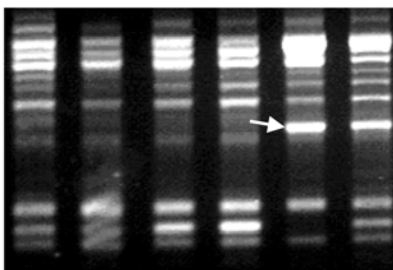


图 3 引物 S12 扩增出的图谱

Fig. 3 The fingerprinting from primer S12

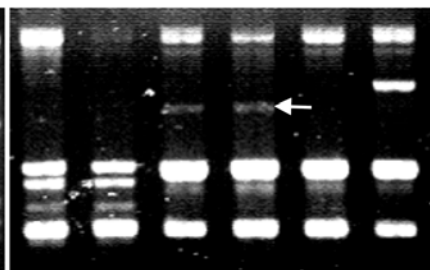


图 4 引物 T3 扩增出的图谱

Fig. 4 The fingerprinting from primer T3

2.4 指纹图谱差异对品种性状分析的影响

前期工作四倍体与二倍体的快速繁殖研究发现同一花色品系不同倍性金鱼草的最适培养条件不同^[16]。在同样的组织培养条件下, H4 较 H2 褐化严重, 这可能因为四倍体金鱼草的染色体数量较二倍体的染色体数量多一倍, 有多套基因, 新陈代谢旺盛, 有机物合成速率增加, 能够产生较多的酚类物质, 酚类物质氧化成醌, 出现褐化现象; 总体看来, H4 与 H2 之间图谱差异不如 B4 与 B2, Z4 与 Z2 之间差异明显, H4 的 DNA 序列改变相对较小, 这也可能为褐化严重的原因之一。B2 基部的愈伤组织化严重影响不定芽的增殖, 而 B4 基部并未出现愈伤组织, 这可能为 B4 的核苷酸碱基序列改变

的结果。从同一品系不同倍性之间的指纹图谱差异表现上, 可以判定褐化、愈伤组织化受基因型的影响。同源四倍体金鱼草观赏性状除了具有叶大、叶厚、叶色深及花大、花瓣厚、质感厚重、不易萎蔫、有乳突等多倍体优良性状外, 并未因与优良二倍体金鱼草图谱存在差异即分子水平的差异而明显表现出不良变异, 避免了进一步地选择育种, 可以快速形成品系进入市场。

3 讨论

从分子水平上, 比较二倍体与同源四倍体植株之间的差异, 本研究同前人在桑树^[18,19], 西瓜^[20,21]上的研究相似, 大部分引物扩增出的图谱在不同倍

性之间差异不明显,仅有少数引物扩增出的图谱在不同倍性之间有所差异,从而表明秋水仙素在诱导染色体加倍过程中,引起了 DNA 分子遗传结构上一定程度的改变。这种改变可能会使加倍的核遗传物质与未加倍的细胞质物质之间趋向于更加平衡,协调。DNA 分子遗传结构上的改变,可能会使植株的观赏性状有所改变,从而丰富了育种资源,为进一步培育新奇花卉奠定初步基础。

通过比较金鱼草不同花色品系、不同倍数体之间的指纹图谱,可以看出在诱导染色体加倍过程中,所引起的 DNA 分子遗传结构上的改变位点是不相同的,这些位点是不是属于易变基因、还是随机发生、还是取决于什么,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] GILBER R I, RICHARDS D B. Dominance relationships between alleles at the Pallida locus in *Antirrhinum majus*. i. the alleles +, car, tub and tin[J]. *Genetica*, 1976, 46(2): 211 - 215.
- [2] SCHWARZ SOMMER Z, SILVA E BE A, BERNDT-GEN R, et al. . A linkage map of an F2 hybrid population of *Antirrhinum majus* and *A. molle*[J]. *Genetics Society of America*, 2003, 163(2): 699 - 702.
- [3] KECK E, MCSTEEN P, CARPENTER, et al. . Separation of genetic function controlling organ identity in flowers [J]. *EMBO-j. Oxford, U. K. : oxford university press*, 2003, 22(5): 1058 - 1066.
- [4] SAGROMSKY H. The influence of light intensity on the pigment composition in the plastids of *Antirrhinum majus*, tribe 50, and two of its mutants [J]. *Kulturpflanze*. 1973, 21: 111 - 118.
- [5] RUNKLE E S, HEINS R D. Stem extension and subsequent flowering of seedling grown under a film creating a far-red deficient environment[J]. *Sci-hortic*, 2002, 96: 257 - 265.
- [6] GONZALEZ BENITO. Micropropagation of commercial and wild genotypes snapdragon (*Antirrhinum* spp.) [J]. *Journal of Horticultural science*, 1996, 71: 11 - 15.
- [7] CUI M, TAKAYANAGI K, KAMADA H, et al. . Efficient shoot regeneration from hairy root of *Antirrhinum majus* L. transformed by the rol type MAT vector system [J]. *Plant-cell-rep*, 2001, 20(1): 55 - 59.
- [8] 金波,王月新,刘春. 三色堇、金盏菊、雏菊、金鱼草新品种选育[J]. *园艺学报*, 1995, 22(1): 97 - 98.
- [9] 张方. 诱导金鱼草多倍体的初步研究[J]. *园艺学报*, 1990, 17(1): 76 - 80.
- [10] 余迪求,邓庆丽. 金鱼草基因转化和转基因植株再生[J]. *热带亚热带植物学报*, 1996, 4(4): 86 - 90.
- [11] 杨慧君,薛勇彪. 金鱼草 S 核酸酶在大肠杆菌中的表达[J]. *科学通报*, 1999, 44(13): 1419 - 1421.
- [12] 薛勇彪. 金鱼草 S 位点选择性转座子标定体系的建立[J]. *Acta Botanica Sinica (植物学报:英文版)*, 2002, 42(4): 408 - 415.
- [13] 李宪利,袁志友,高东升. 高等植物成花分子机理研究状况及展望[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(1): 173 - 183.
- [14] 冯献忠,杨素欣,郭蔼光. 高等植物花发育研究进展[J]. *西北农业大学学报*, 1998, 26(3): 94 - 99.
- [15] 王彬,吴先军,谢兆辉,等. 花器官发育的 ABC 模型研究进展[J]. *农业生物技术科学*, 2003, 19(5): 78 - 83.
- [16] 郑思乡,雷小云,董志渊,等. 离体培养条件下金鱼草多倍体诱导研究[J]. *云南林业科技*, 2003, 32(4): 80 - 83.
- [17] 胡秀,郑思乡,龚洵. 离体培养条件下金鱼草四倍体切花的诱导及培育[J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(5): 524 - 527.
- [18] 王卓伟,余茂德,鲁成. 桑树二倍体及人工诱导的同源四倍体遗传差异的 AFLP 分析[J]. *植物学通报*, 2002, 19(2): 194 - 200.
- [19] 张有做,楼程富,周金妹,等. 不同倍性桑树品种基因组 DNA 多态性比较[J]. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(1): 79 - 81.
- [20] 刘文革,王鸣,阎志红. 西瓜二倍体及同源多倍体遗传差异的 AFLP 分析[J]. *果树学报*, 2004, 21(1): 46 - 49.
- [21] 马国斌. 西瓜甜瓜体细胞无性系的发生、变异与遗传转化研究[D]. 西北农业大学博士学位论文, 1997.