

矮牵牛组织培养及变异苗的 RAPD 分析

张汉尧, 刘小珍, 周 健, 龚秀会, 杨宇明*

(西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 探索了矮牵牛组织培养的配方, 对组培过程中产生的表型变异植株进行了 DNA 水平的分析。并对矮牵牛叶片组织培养及产生变异的影响因素等进行探讨。

关键词: 矮牵牛; 组织培养; 变异苗; RAPD

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)01-0074-02

Study on tissue culture and RAPD analysis of variating seedling of *Petunie hybrida*

ZHANG Han-yao, LIU Xiao-zhen, ZHOU Jian,
GONG Xiu-hui, YANG Yu-ming*

(Department of Forestry, Southwest Forestry College, Kunming 650224, China)

Abstract: The prescription of the tissue culture of *Petunie hybrida* and the DNA level of phenotypic variation seedlings produced by tissue were discussed. We also studied factors effecting the variation of *P. hybrida* by tissue culture.

Key words: *Petunie hybrida*; tissue culture; variating seedling; RAPD

矮牵牛花大色艳且花色丰富, 为长势旺盛的装饰性花卉, 而且还能做到周年繁殖上市, 可以广泛用于花坛布置、花槽配置、景点摆设、窗台点缀、家庭装饰, 所以销售量大, 种植面广, 有着很大的发展空间。矮牵牛的常规育苗采用种子繁殖, 但种子繁殖的实生苗易产生变异, 无法将其性状固定持续下去。对于性状好的杂种 F₁ 代, 通过组织培养, 可以用很少的植物材料, 在短时期内生产出大量整齐、健壮、性状稳定的植株来(崔德才等, 2003)。本研究初步报道了矮牵牛组织培养的方法, 并对组培过程中产生的表型变异植株进行了 DNA 水平的分析, 也对矮牵牛组培产生变异的规律及原因作了初步的探索。

1 材料与方 法

1.1 材料

红花单瓣矮牵牛。组织培养药品购自各国内厂

家。PCR 扩增所用引物为加拿大 Sangon 公司生产的十聚体核苷酸, dNTPs、TaqDNA 聚合酶购自美国 MBI 公司, 琼脂糖从 Spanish 进口。

1.2 方法

在花盆内选取生长健壮无病虫害的幼嫩叶片和茎段, 用洗衣粉浸泡 3~5 min 后, 用自来水清洗, 细流水冲洗过夜; 将经过预处理的植株组织块置于白瓷缸内, 注入 0.1% 升汞溶液, 用量以盖过材料为宜, 再加 2 滴吐温, 盖上盖, 浸泡 10~15 min, 期间摇动 2~3 次; 消毒处理后, 将瓶盖打开, 将消毒液倒出, 注入适量的无菌蒸馏水, 再盖上盖, 摇动数次, 将水倒掉, 如此重复 3 次; 将材料取出, 置于一个已灭过菌的培养皿中, 用经过火焰灼烧并冷却的剪刀和镊子将叶片切成 1 cm² 大小, 带腋芽的茎段切割成 1 cm 长短, 接种到相应培养基上。

培养条件: 实验用基本培养基为 MS, 附加不同种类和浓度的激素, 增殖培养基为 MS+6-BA(1

收稿日期: 2004-10-26 修回日期: 2005-04-15

基金项目: 国家“973”项目经费资助(2003 CB 45102)[Supported by the National “973” Plan of China (2003 CB 45102)].

作者简介: 张汉尧(1975-), 男, 福建永定县人, 在职博士, 主要从事植物生物技术领域的教学科研工作。

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: <yymbamb@yahoo.com.cn>.

mg/L)+NAA(0.02 mg/L),生根培养基为+6-BA(0.5 mg/L)-NAA(0.02 mg/L),pH 调至 5.8,琼脂为 0.65%,培养过程中温度保持 20~24 °C,光照强度为 1 500 lx,光照时间每天 12~16 h。

基因组 DNA 提取:总 DNA 的提取用 CTAB 法(顾红雅等,1995)。

RAPD 反应:PCR 扩增反应体系的体积为 20 μ L,其中包括 10 mM Tris-HCl, pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2.0 mM MgCl₂, 0.15 mM dNTPs, 0.5 μ M 引物, 0.8 U Taq 酶(MBI), 1.5 ng/ μ L 模板 DNA。扩增反应在 PTC-100 96 孔热循环仪上进行,反应程序为先在 94 °C 下变性 6 min, 然后进行 40 个循环(每个循环包括 94 °C 下变性 30 s, 36 °C 下退火 30 s, 72 °C 下延伸 90 s), 最后在 72 °C 下继续延伸 6 min。

检测:扩增产物加 2 μ L 的上样缓冲液(40%蔗糖, 0.25%溴酚蓝), 在 1.0% 的琼脂糖凝胶(5 V/cm)中电泳, 0.5 μ g/mL 溴化乙锭中染色, 在紫外灯下观测结果并记录, 用 UV 凝胶成像系统成像。

2 结果与分析

2.1 无性繁殖体系的建立

将叶片接种到增殖培养基中 7 d 后, 切块开始萌动、弯曲, 20 d 后, 切块边缘开始出现淡绿色的愈伤组织, 30 d 后愈伤组织进一步增多, 继续培养开始分化出芽, 进而形成丛芽, 继续培养 25 d 左右可长出丛苗。

将茎段接种 7~10 d 后, 开始肿胀、膨大, 25~30 d 逐渐开始有芽的分化, 以后芽逐渐增多, 进而形成丛芽、丛苗。将茎尖接种在相应的增殖培养基上, 1 周后开始萌动, 茎尖开始膨大, 逐渐分化出 3~4 个小芽, 切下接种到新的增殖培养基上, 形成丛芽。

外植体产生小苗以后, 将其进行分割继代培养, 在同样的增殖培养基上培养, 20~30 d 后, 可长出大量丛苗, 增殖倍数约 5 倍, 生长周期为 28 d 左右, 材料应及时转移, 否则时间过久就会使试管苗细弱, 发黄老化或因过分拥挤导致形成无效苗。当继代培养的无根苗长到 2cm 左右时, 或经无激素培养基壮苗后, 从基部切下, 截取无根苗接种在生根培养基上, 10 d 后, 逐渐长出多条白色不定根, 形成茁壮的根系, 从而形成了完整的再生植株。

2.2 组培变异植株的 RAPD 分析

在继代培养过程中, 我们发现了一些表型变异株, 而且随着所继代数的增加, 表型变异率也有增加的趋势。表型的变异可能是由于生理原因引起, 也有可能是由于遗传物质改变所引起的。为进一步验证组培苗表型所产生的变异, 是否由 DNA 水平上变异所引起, 我们进一步用 RAPD 技术手段来检测。100 个 RAPD 随机引物中, 发现了有 6 个引物中能分别在源于同一外植体的正常苗和变异苗中产生差异条带。如引物 S87 所得的产物, 3 号样品就有一条(图 1)。在实验中我们也发现了在正常植株中, 有个别植株也有 DNA 条带上的变化。

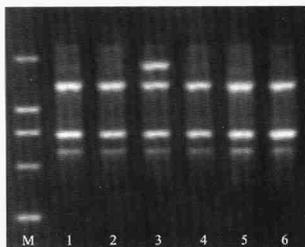


图 1 矮牵牛变异苗 RAPD 检测

Fig. 1 RAPD analysis of *Petunia hybrida* phenotypic variation seedlings by tissue culture(primer was S87)

3 讨论

矮牵牛一般采用种子繁殖, 多是从国外进口的杂交种, 其后代性状易分离退化。现今, 组织培养技术已广泛应用于植物的快速繁殖。我们以矮牵牛的茎尖, 茎段和叶片为外植体, 从多种培养基中筛选出了矮牵牛增殖和生根培养基, 形成完整植株, 为其快速繁殖、满足市场需求及保持品种优良性状提供了很好的途径。

矮牵牛在组织培养过程中, 受培养基和环境条件的影响有可能发生变异。组织培养苗发生变异可能与培养材料、培养温度、增殖芽的代数以及激素浓度等有关(黄学林等, 1995; 李俊明, 2002)。我们发现在正常情况下, 用茎尖作培养材料, 变异率较低, 而用花蕾、叶片诱导出愈伤组织, 再进行促细胞分化出丛芽的方法, 其变异率较高。还有增殖芽培养代(下转第 112 页 Continue on page 112)

续表 1

峰号 Peak No.	化合物 Name of compound	分子式 Molecular formular	保留时间 Retain time(min)	相对含量 Relative content(%)
16	长叶薄荷酮 Pulegone	C ₉ H ₁₆ O	19.72	2.36
17	樟脑 Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	20.05	2.32
18	2-甲基-3-亚乙基-1-己稀-4-炔 1-Hexen-4-yne,3-ethylidene-2-methyl-	C ₉ H ₁₂	22.78	0.44
19	庚醛 Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	23.09	0.17
20	3-甲基-2-环己烯-1-酮 2-Cyclohexene-1-one,3-methyl-	C ₇ H ₁₀ O	25.30	2.37
21	2-甲基-6-亚甲基-3,7-辛二烯-2-醇 2-Methyl-6-methylene-3,7-octadiene-2-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	25.62	0.33
22	α -金合欢烯 alpha-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	31.90	0.46
23	7,11-二甲基-3-亚甲基-1,6,10-十二碳三烯 1,6,10-Dodecatriene,7,11-dimethyl-3-methylene	C ₁₅ H ₂₄	34.11	1.46
24	十氢-1,1,7-三甲基-4-亚甲基-1H-环丙奥 1H-Cyclopropazulene,decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-	C ₁₅ H ₂₄	35.29	2.13
25	2,4,5,6,7,7a-六氢-4,7-亚甲基-1H-茛 4,7-Methano-1H-indene,2,4,5,6,7,7a-hexahydro-	C ₁₀ H ₁₄	36.80	0.39
26	3,4,5-三甲基-1-己烯 1-Hexene,3,4,5-trimethyl-	C ₉ H ₁₈	39.67	3.55

心作用,临床作局部抗感染剂,局部止痒和危重病病人的急救剂(国家医药管理局中草药情报中心站,1986);长叶薄荷酮有很强的抗炎作用(国家医药管理局中草药情报中心站,1986);桉油醇具有解热、抗炎、抗菌、平喘和镇痛作用,与樟脑等成分组成复方制剂治疗头疼(国家医药管理局中草药情报中心站,1986); α -水芹烯对支气管有温和的刺激作用,制成吸入剂用作祛痰剂(国家医药管理局中草药情报中心站,1986),这为进一步开发利用提供了依据。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1991. 中国植物志第七十六卷第二分册[M]. 北京:科学技术出版社,220.
尹庚明,孙宁,朱锦瞻,等. 1999. 艾叶挥发性成分的提取及其化学成分的气相色谱/质谱分析[J]. 分析化学,27(1):55

-58.

- 丛浦珠,苏克曼. 2000. 分析化学手册(第九分册)质谱分析[M]. 北京:化学工业出版社,115-300.
国家医药管理局中草药情报中心站. 1986. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,213,735,824,833.
姚发业,邱琴,刘廷礼,等. 2001. 艾叶挥发油的化学成分[J]. 分析测试学报,20(3):42-45.
崔乃然. 1994. 新疆主要饲用植物志第二册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,272-273.
新疆植物志编辑委员会. 1999. 新疆植物志第五卷[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,188.
Adams RP. 1989. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy[M]. New York:Academic Press,170-280.
Masada Y. 1976. Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry[M]. New York:John Wiley and Sons Inc,150-230.

(上接第 75 页 Continue from page 75)

数越多,变异率就越大。在增殖芽继代培育过程,如果激素使用浓度偏高,也会产生变异。因此,在商品化生产中增殖芽培育过程若发现有变异及不正常的芽体必须坚决剔除,把变异苗减少到最低限度。变异植株绝大多数失去商品价值。其变异表现症状主要有:(1)叶片变小,叶面不规则凹凸;(2)叶片扭曲,部分缺绿呈花叶状。

另外,我们的结果说明:表型的变化的确有一部分是由 DNA 水平上的碱基变化所引起的。我们甚至检测到了正常植株中,有个别植株也有 DNA 条带上的变化。也就是说即使表型未发生变化,但在一些位点的碱基也发生了变化。所以外植体的建立

和继代增殖培养的方式方法应严格控制,才能保证所培育的矮牵牛组培苗具有遗传的一致性,降低变异(劣变)机率,保证组培苗的质量。

参考文献:

- 李俊明. 2002. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,32-34.
顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 1995. 植物核基因基本技术. 植物基因与分子操作[M]. 北京:北京大学出版社:19-25.
黄学林,李菊. 1995. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京:科学出版社,53-56.
崔德才,徐培文. 2003. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,72-97.