

基于 AFLP 技术对桢楠实生白化苗与正常苗的比较研究

张 炜¹ 陈 忠² 龙汉利¹ 庄国庆¹ 李晓清¹

(1. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081 2. 内江市东兴区双才林业工作站, 四川 内江 641100)

摘 要: 对桢楠白化苗与正常苗的 AFLP 谱带进行了比较分析, 结果发现有两对引物 (P6 和 P11) 能在正常苗和白化苗中产生差异条带。其中引物 P6 在白化苗样品中扩增的条带比在正常绿苗少一条, 即白化苗缺失一条带, 缺失的这条带大小为 230 bp 左右。而引物 P11 在白化苗样品中扩出的条带比正常绿苗多一条, 多出的这条带的大小为 200 bp 左右。差异条带的出现说明白化苗与正常苗在 DNA 序列上是有差异的, 发生这种差异的原因是碱基突变, 缺失还是插入, 还需进一步的测序比较分析。

关键词: 桢楠白化苗; DNA 多样性 AFLP 技术

中图分类号: S722 文献标识码: A 文章编号: 1003-5508(2014)04-0009-04

Comparison between Albесcent and Normal Seedlings of *Phoebe zhennan* by AFLP

ZHANG Wei¹ CHEN Zhong² LONG Han-li¹ ZHUANG Guo-qing¹ LI Xiao-qing¹

(1. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China; 2. Neijiang Forestry Bureau, Neijiang 641100, China)

Abstract: Using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique to study polymorphism between the genomic DNA of albescent seedlings and normal seedlings of *Phoebe zhennan*, it was found that bands amplified by P6 and P11 were between albescent seedlings and normal seedlings. The number of bands of albescent seedlings amplified by P6 was one less than that of normal seedlings and the size of the lacking stripe was about 230 bp. The number of bands of albescent seedlings amplified by P11 was one more than that of normal seedlings and the size of the extra stripe was around 200 bp. The differences of bands indicated that the DNA sequence of albescent seedlings was different from that of normal seedlings. It was needed to conduct sequence and comparative analysis to confirm whether the differences were caused by base mutation, deletion or insertion.

Key words: Albescent seedlings of *Phoebe zhennan*, DNA polymorphism, AFLP technique

白化苗是叶片中含叶绿素较少或不含叶绿素的植物幼苗。叶绿素的缺失导致植物不能进行正常的光合作用和生长发育。光合作用对植物来说是必不可少的, 光合作用正常与否, 对植物生长有重要影响。研究白化苗的成因进而控制其形成是当前作物育种中亟待解决的一个问题。很多研究发现在多种农作物的实生苗或组培苗中存在白化苗, 如水稻

(*Oryza sativa* L.)^[1]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[2]、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)^[3]、高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)^[4]、玉米 (*Zea mays* L.)^[5]、烟草 (*Nicotiana glauca* L.)^[6]、棉花 (*Gossypium hirsutum* L.)^[7]、甘蔗 (*Saccharum sinense* Roxb.)^[8]、薏苡 (*Coix lacrym-jobi* L.)^[9]、雷竹 (*Phyllostachys praecox* C. D. Chu et C. S. Chao)^[10]。白化苗不但在农作物

收稿日期: 2014-04-09

基金项目: 国家林业局公益性行业“重要珍贵阔叶用材树种楠木培育与利用技术研究”(20110400104)、四川省突破性林(竹)新品种选育(2011YZGG-10)。

作者简介: 张炜(1980-)男, 博士, 助理研究员, 从事森林培育专业研究。E-mail: 46833686@qq.com

中较为普遍 在树木中也有发现 如苏铁 (*Cycasrevoluta* Thunb.)^[11]、蓝桉 (*Eucalyptus globulus* Labill.)^[12]、版纳省藤 (*Calamus nambariensis* Becc. var. *xishuangbannaensis* S. J. Pei et S. Y. Chen)^[13]、椰子树 (*Cocos nucifera*)^[14]。白化苗产生的原因有两种,一种是由于生理上的变化引起的;另一种是 DNA 序列产生了突变。生理上的变化是白化苗形成的外因,包括抗生素^[15]、磷和锌^[5]、预处理^[16]、低温^[17]、脉动磁场^[18]、不同杂交材料^[19]和不同倍性^[20]等因素对植物产生白化苗的影响。DNA 序列的变异可导致白化苗与正常绿苗叶片的超微结构^[11 21]、过氧化物同工酶^[22 23 9]、脂酶同工酶^[9 22]、可溶性蛋白质^[22 24]和质体亚显微结构^[25]等方面具有明显的差异,这些差异可能与白化苗的形成有关。遗传学上的研究表明,白化苗遵从单基因分离规律,认为白化苗可以作为评估树木远亲繁殖率的指标^[12],但也有相反的研究结果^[26]。桢楠 (*Phoebe zhennan* S. Lee & F. N. Wei) 是我国重要的经济树种,但目前有关桢楠的研究较少,有关桢楠白化苗的研究迄今还未见有报道。基于此,本文对桢楠白化苗与正常苗的 AFLP 谱带进行了比较分析。

1 材料

本研究的试验材料为桢楠实生苗。2011年10月份由四川省林业科学研究院在四川、云南、重庆、贵州、湖北和湖南6个省采集苗木种子。按棵采集,每一棵上采到的种子作为一个家系,共采集92个家系,每个家系50棵。2012年3月份将种子播于装有土壤的塑料花盆中,采用相同的营养土质栽培、相同的营养液浇灌,以及相同的光照、温度与湿度管护。



图1 桢楠正常苗(左)和白化苗(右)

实验所用的试剂有购自 Biolabs 的限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI*; 购自天根生物科技有限公司 (Tiangen, 北京) 的 T4 连接酶、TaqDNA 聚合酶、dNTPs 和甲酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、琼脂糖、Tris 饱和酚等有机试剂; 购自 Solarbio 公司的亲和硅烷、剥离硅烷; 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成引物。

实验所用到的仪器有电子天平 (Sartorius)、高速冷冻台式离心机 (Thermo)、蒸汽灭菌器、Bio-Rad (MC013208) PCR 扩增仪、水平电泳仪 (BIO-RAD) 和 Gene Genius Bio-imaging System 凝胶成像凝胶成像系统、北京六一仪器厂生产的 DYCZ-20C 型垂直电泳系统、UV-VIS Spectrophotometer (Tu-4901 型) 紫外分光光度仪、摇床以及其它一些常用的实验设备。

2 研究方法

2.1 测定白化苗发生率

2012年7月统计每个家系白化苗的株数和该家系的总株数。

白化苗发生率 = 每个家系白化苗的株数 / 该家系的总株数 · 100%。

2.2 基因组 DNA 的提取

供试材料种子发芽后,分别取白化苗和正常苗的新鲜嫩叶,基因组 DNA 提取参照 Zhang 等的实验方法^[21],所得的白化苗基因组 DNA 和正常苗基因组 DNA 分别用 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测,用 Gene Genius Biolmaging Sysetm 凝胶成像系统在紫外光下拍照,可以粗略估算出各样品的 DNA 浓度,同时还检测总 DNA 分子的大小以及是否降解。最后统一将 DNA 浓度调整为 $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$,均保存于 -20°C 冰箱备用。

2.3 AFLP 扩增

利用实生苗、白化苗的 DNA 样品对 56 个引物组合进行了筛选,根据最终聚丙烯酰胺凝胶上反映出的条带数目、清晰度、多态性以及重复性情况来筛选适用的 AFLP 引物。

PCR 反应体系: 体积为 $25 \mu\text{l}$, $3 \mu\text{l}$ 模板 DNA, 扩增引物 ($50 \text{ pm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 各 $1.0 \mu\text{l}$, $2 \mu\text{l}$ dNTPs ($10 \text{ mM} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), $0.2 \mu\text{l}$ Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), $1.5 \mu\text{l}$ MgCl_2 (25 mM), 补充超纯水至 $25 \mu\text{l}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min ; 94°C 变性 30 s , 65°C 退火 (每个循环降低 0.7°C) 30 s , 72°C 延伸 1 min , 12 个循环; 94°C 变性 30 s , 56°C 退火 30 s , 72°C 延

伸 1 min 23 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min; 置于 4 °C 保存备用。

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

反应结束后, 选择性扩增产物与上样缓冲液 (98% 甲酰胺; 10 retool/L EFrA, pH8.0; 0.250k 溴酚蓝; 0.25% 二甲苯青 FF) 等体积混合, 95 °C 变性 6 min. 立刻将 PCR 管放到冰上待用。本实验中采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染的方法进行检测。银染后的板晾干后在胶片观察灯下观察, 选择那些具有清晰、电泳带易计数的引物作为 AFLP 反应的最佳引物。

3 结果与分析

3.1 白化苗发生率

在收集的 92 个家系中有 5 个家系出现 1 株 ~ 2 株白化苗, 其白化苗发生率在 2% ~ 4% 之间, 这与高粱和玉米实生苗的 5% 以下的白化苗发生率相

近^[4, 5]。

3.2 引物筛选结果

利用实生苗、白化苗的 DNA 样品对 56 个引物组合进行了筛选, 根据最终聚丙烯酰胺凝胶上反映出的条带数目、清晰度、多态性以及重复性情况, 选择出了 16 个引物组合, 利用这 16 对引物检测白化苗与正常绿色苗的 DNA 差异条带的筛选引物, 具体情况见表 1。

3.3 AFLP 谱带分析

16 对 AFLP 引物中, 发现有两对引物组合 (P6 和 P11) 能在正常苗和白化苗中产生差异条带。其中引物 P6 在白化苗样品中扩增的条带比在正常绿苗少一条, 即白化苗缺失一条带, 缺失的这条带大小为 950 bp 左右 (图 2 左)。而引物 P11 在白化苗样品中扩出的条带比正常绿苗多一条, 即白化苗多一条带, 多出的这条带的大小为 1 150 bp 左右 (图 2 右)。差异条带的出现说明白化苗与正常苗在 DNA 序列上是有差异的。

表 1 AFLP 引物筛选结果表

引物名	序列	引物名	序列
<i>EcoRI</i> -S	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	<i>Mse</i> I-S	5'-GACGATGAGTCTGAG-3'
<i>EcoRI</i> -A	5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'	<i>Mse</i> I-A	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
E0	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C A-3'	M0	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A C-3'
E1	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AAT-3'	M1	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CAA-3'
E2	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AAG-3'	M2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CAC-3'
E3	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3'	M3	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CAG-3'
E4	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ACT-3'	M4	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CAT-3'
E5	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ACC-3'	M5	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CTA-3'
E6	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ACG-3'	M6	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CCA-3'
E7	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3'	M7	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CTG-3'
E8	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AGG-3'	M8	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CTC-3'
E9	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AAA-3'	M9	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CTT-3'
E10	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ATG-3'	M10	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CCT-3'
E11	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ATT-3'	M11	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CCC-3'
E12	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ATC-3'	M12	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CCG-3'
E13	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C ATA-3'	M13	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGA-3'
E14	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AGA-3'	M14	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGT-3'
E15	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AGC-3'	M15	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGG-3'
E16	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C AGT-3'	M16	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CCG-3'

4 讨论

本研究中两对差异性筛选引物 P6 (EACG/MC-CG) 和 P11 (EATC/MCGT), 获得了两条差异性 DNA 片段, 重复验证实验证明这两条多态性条带能够稳定区分桉楠的白化苗与绿色苗。植物中白化苗性状成因主要有两个, 第一是跟 DNA 序列的突变相关, 另外还可能与植物所处的环境以及生理上的变化相关, 目前还缺乏两者相关的直接证据。根据本

单位关于桉楠种子萌发与幼苗栽培的实验, 我们使用采集的桉楠种子, 在四川省林业科学研究院繁殖花圃中萌发并管护, 实施相同的营养土质栽培、相同的营养液浇灌, 以及相同的光照、温度与湿度管护, 依然发现了部分白化苗性状的出现, 因此推测桉楠白化苗的产生可能与环境生理的差异性原因无太大关联, 而主要源于其体内 DNA 的突变。这也是我们采用 AFLP 方法, 从分子生物学的基因组学角度入手研究桉楠白化苗成因的理由。

DNA 序列发生差异可能是由碱基突变, 碱基或

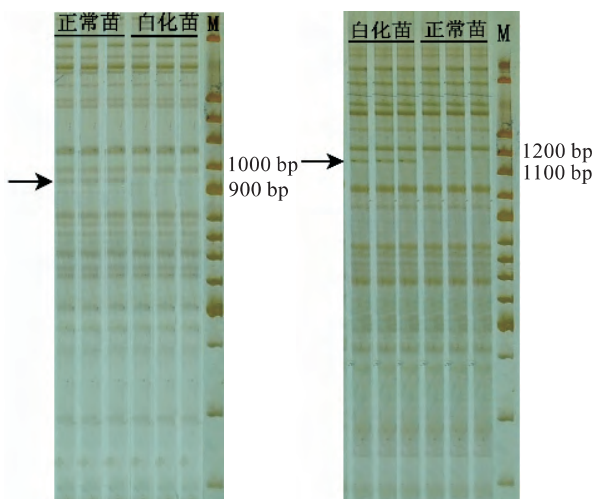


图2 引物 P6 在正常苗中扩出的特异性条带(左)、引物 P11 在白化苗中扩出的特异性条带(右)

片段的插入,碱基或片段的缺失等引起的。Ellis (1985) 研究发现小麦白化苗的质体 DNA 有大段缺失,不同的白化苗缺失片段及缺失量不同^[27]。杨莉等(1998) 利用 RFLP 技术研究了小麦返白系叶绿体 DNA 的多态性,发现亲缘关系较近的两个小麦品种的白化苗的 Hind III 酶切片段有差异,他们认为这种差异可能是由于 cDNA 发生点突变,小片段插入或缺失所造成的^[28]。张汉尧等(2005) 研究表明矮牵牛的白化可能是由于叶绿体 DNA 水平上的碱基变化所引起的^[29]。本研究中,究竟是碱基的突变,还是缺失或插入导致白化苗与正常绿苗的 AFLP 谱带发生差异,还需进一步的测序比较分析,从核苷酸序列水平真正揭开桉楠白化苗的基因组突变成因。

参考文献:

- [1] 李良材, 陈一明, 陈英. 水稻原生质体培养及植株再生的研究[J]. 遗传学报, 1988, 15(5): 321 ~ 328.
- [2] 朱祯, 孙宝林, 刘春明, 等. 转化脂介质小麦原生质体转化及转基因白化苗的再生[J]. 生物工程学报, 1993, 9(4): 320 ~ 323.
- [3] 代庆阳, 汤泽生, 王祖秀, 等. 大麦白化苗叶的组织学和超微结构[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1992, 13(4): 291 ~ 293.
- [4] 胡希远, 王国栋. 脉动磁场对高粱生长发育的影响[J]. 陕西农业科学, 1993(3): 7 ~ 8.
- [5] 肖桂秀, 李传俊, 王蕾, 等. 玉米减量施肥研究[J]. 土壤肥料, 2003(6): 37 ~ 40.
- [6] Bae C H, Abe T, Matsuyama T, et al. Regulation of chloroplast gene expression is affected in a novel tobacco albino mutant[J]. Annals of Botany, 2001, 88: 545 ~ 553.
- [7] 张宝红, 李秀兰, 李凤莲, 等. 棉花组织培养中异常苗的发生与转化[J]. 植物学报, 1996, 38(11): 845 ~ 852.

- [8] 林俊芳, 张银东, 陈如凯, 等. 基因枪法转化甘蔗胚性愈伤组织获得转基因甘蔗白化苗[J]. 福建农业大学学报, 1997, 26(1): 18 ~ 23.
- [9] 乔亚科, 李桂兰, 高书国, 等. 薏苡正常幼苗与白化苗的同工酶分析[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1992, 6(4): 1 ~ 3.
- [10] 付顺华, 吴家森, 余永清, 等. 雷竹种子特性及苗期生长观察[J]. 山东林业科技, 2002(1): 11 ~ 12.
- [11] 傅瑞树, 卢健. 苏铁白化苗叶片细胞的超微结构[J]. 亚热带植物通讯, 1997, 26(1): 29 ~ 31.
- [12] Patterson B, Wolbang CM, Vaillancourt R E, et al. Inheritance of two chlorophyll mutants in Eucalyptus globules [J]. Silvae Genetica, 2000, 49(6): 290 ~ 292.
- [13] 李荣生, 尹光天, 许煌灿, 等. 版纳省藤实生白化苗与正常苗的比较研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 819 ~ 823.
- [14] 曹红星, 陈良秋, 孙程旭, 等. 不同椰子品种正常绿苗与白化苗形态和生理生化指标的差异. 西南农业学报[J], 2009, 22(2): 304 ~ 307.
- [15] 刘志勇, 孙其信, 黄铁诚, 等. 抗生素诱变小麦雄性不育研究: I. 链霉素诱变小麦雄性不育的诱变效应[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5): 1 ~ 7.
- [16] 钟华鑫, 潘向群, 陈汉民, 等. BA 田间预处理对大麦花药若干生理性状和培养效率的影响[J]. 云南植物研究, 1992, 14(2): 179 ~ 186.
- [17] 许智宏, Sunderland N. 大麦花粉在低温预处理及培养中 DNA 含量的显微光度测定[J]. 植物生理学报, 1986, 12(1): 140 ~ 147.
- [18] 胡希远, 王国栋. 脉动磁场对高粱生长发育的影响[J]. 陕西农业科学, 1993(3): 7 ~ 8.
- [19] 凌定厚, 陈梅芳, 马镇荣, 等. 光敏感雄性不育水稻花药培养研究[J]. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1990(6): 152 ~ 158.
- [20] 舒理慧, 张廷璧, 周明杰. 水稻不同倍性的幼穗在离体培养中的反应[J]. 科学通报, 1985(3): 221 ~ 224.
- [21] 陈湘宁, 李玉湘, 李继耕. 水稻、小麦花药培养白化苗质体亚显微结构和蛋白质的研究[J]. 遗传学报, 1988, 15(2): 95 ~ 101.
- [22] 傅瑞树. 苏铁白、绿苗可溶性蛋白质及若干同工酶分析[J]. 福建林学院学报, 1999, 19(3): 235 ~ 237.
- [23] 赵亚华, 郭蔼光, 汪沛洪, 等. 小麦返白系与不同基因型小麦品种杂交后代 IPO 表达的研究[J]. 西北植物学报, 1996, 16(2): 142 ~ 148.
- [24] 代庆阳, 汤泽生, 王祖秀, 等. 大麦白化苗叶的组织学和超微结构[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1992, 13(4): 291 ~ 293.
- [25] 马闻师, 郭蔼光, 汪沛洪. 小麦返白系返白期间类囊体膜多肽的变化研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(增刊): 56 ~ 58.
- [26] 付秀林. 水稻花培中白化苗成因的探讨[J]. 农业与技术, 1996(4): 8 ~ 9, 12.
- [27] Ellis J R, Leech R M. Cell size and chloroplast size in relation to chloroplast replication in light-grown wheat leaves [J]. Planta, 1985, 165: 120 ~ 125.
- [28] 杨莉, 范三红, 郭蔼光. 小麦返白系叶绿体 DNA 多态性研究[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(6): 14 ~ 16.
- [29] 张汉尧, 刘小珍, 杨宇明. 矮牵牛组培白化苗与正常苗叶绿体 DNA 多态性研究[J]. 湖北农业科学, 2005(2): 15 ~ 16.