

红地球葡萄的秋水仙素诱变及鉴定研究

宗 桦, 王永清, 周 晔

(西南交通大学旅游学院, 四川峨眉 614202)

摘要: 以红地球葡萄(*Vitis vinifera* L. “redglobe”)的带芽茎段为外植体, 用不同浓度的秋水仙素对其进行诱变, 并采用 RAPD 技术鉴定诱变株系。结果表明: (1) 秋水仙素诱变红地球葡萄带芽茎段采用浸泡法的效果好于混培法。浸泡 6 h, 红地球葡萄均未产生变异; 浸泡 12 h, 只有 0.1% 和 0.2% 的秋水仙素处理才能诱导红地球葡萄产生变异; 浸泡 24 h, 除了 0.005% 秋水仙素处理外均有变异产生, 变异率最高的是 0.05% 秋水仙素处理, 达 13.79%。(2) 混培处理后发现, 秋水仙素浓度高于 50 mg/L 以后变异开始出现, 并随着秋水仙素浓度的增大, 红地球葡萄变异的几率随之增大; 诱变率最高的是 300 mg/L 秋水仙素处理, 变异率可达 13.51%。

关键词: 红地球葡萄; 组织培养; 秋水仙素; RAPD

中图分类号: S663.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2008)03-0177-04

红地球葡萄是当今世界葡萄中品质极佳的品种之一, 据 2001 年统计, 我国红地球葡萄栽培总面积已达 3.0 万 hm^2 。但红地球葡萄在生产中, 尤其在四川盆地这样的湿热地区仍然存在病虫害严重、抗逆性差、果粒小、核多等问题。本试验旨在通过用秋

水仙素诱变红地球葡萄带芽茎段, 摸索出适宜的诱变方式和相应的秋水仙素浓度及处理时间, 并采用 RAPD 技术检测诱变后的植株, 为红地球葡萄的诱变育种和品种改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自四川农业大学脱毒中心培育的母

收稿日期: 2008-01-08

作者简介: 宗 桦(1981—), 女, 江苏宜兴人, 硕士, 主要从事植物生物技术方面的研究。Tel: (0833)2968483。

(上接第 176 页)

灰树花菌丝生长。而碳源为稻草、麦秸, 生长因子来源为灰树花多糖提取液废渣的培养料上菌丝生长缓慢, 且不均匀, 还发黄, 说明这些材料不很适合灰树花菌丝生长。试验表明碳源与生长因子对灰树花菌丝生长影响较大, 氮源与填料对其生长影响较小。适宜灰树花菌丝生长的固态培养料配方为: 棉籽壳或甜高粱秆或玉米芯 680 g/L、麸皮或豆秆粉或牛粪 100 g/L、玉米面或板栗壳 100 g/L、麦糠或稻壳或高粱壳 50 g/L、林地土 50 g/L、葡萄糖 10 g/L、石膏 10 g/L、多菌灵 2.0 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L, pH 值 6.0。优化后的配方在碳源、氮源、生长因子与填料上均有多种原料可供选择, 适合不同地区采用不同原料栽培灰树花, 可明显降低灰树花固态栽培成本, 有利于灰树花大面积生产与应用推广。

参考文献:

[1] 劳华均, 闵三弟, 臧珍锦, 等. 灰树花多糖的抗肿瘤作用及对巨噬细胞、自然杀伤细胞的影响[J]. 上海农业学报, 1997, 13(1): 25-30.

- [2] 沈玲玲, 黄幸纤. 贝叶多孔菌提取物对小鼠移植肉瘤 M1 抑制作用的研究[J]. 现代应用药学, 1994, 11(4): 9-10.
- [3] 张劲松, 樊 华, 李玉祥, 等. 几种药用真菌粗提物对多种人体肿瘤细胞株增殖的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 27-31.
- [4] 邢增涛, 周吕艳, 潘迎捷, 等. 灰树花多糖研究进展[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 54-58.
- [5] 赵 铭. 莲花菌的抗艾滋病功效[J]. 中国食用菌, 1994, 13(6): 40.
- [6] 项 哨, 朱圣禾, 朱永平, 等. 莲花菌多糖在小鼠体内抗病毒作用的研究[J]. 浙江医科大学学报, 1995, 24(5): 203-205.
- [7] 项 哨, 朱圣禾, 朱永平, 等. 莲花菌多糖促进干扰素诱生作用的研究[J]. 浙江医科大学学报, 1995, 24(6): 257-259.
- [8] Ooi V E C. Hepatoprotective effect of some edible mushrooms[J]. Phytotherapy Research, 1996, 10(6): 536-538.
- [9] 卜庆梅, 倪艳波, 黄清荣, 等. 灰树花液体发酵培养基的筛选试验[J]. 江苏农业科学, 2003(6): 103-105.
- [10] 孙 克, 许正宏, 敖宗华, 等. 灰树花发酵条件的研究[J]. 药物生物技术, 2002, 9(2): 91-93.
- [11] 杜 巍, 李元瑞, 袁 静, 等. 灰树花液体深层培养条件的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(1): 110-114.
- [12] 徐志祥, 赫 然, 程 度, 等. 灰树花发酵工艺及培养基研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 9-11.

本相同的一批红地球葡萄试管苗。

1.2 方法

1.2.1 秋水仙素对红地球葡萄试管苗的诱变

(1) 浸泡法: 首先配制浓度分别为 0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.2% 的秋水仙素溶液, 加入浓度为 1% 的 DMSO (二甲基亚砷) 后过滤灭菌。于超净工作台上将无菌红地球葡萄带单芽茎段浸泡在各浓度的秋水仙素中, 包好瓶口, 避免强烈光照。处理过程中随时轻轻摇动以使材料与药液充分接触, 对照用无菌水浸泡, 分别处理 6、12、24 h。每个处理约 30 个茎段, 重复 2 次, 处理完后用无菌水冲洗材料 3 次, 灭菌滤纸吸干表面水分后接种到最适增殖培养基 (B5 + 0.05 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA) 上继续培养, 观察记录植株的生长情况。(2) 混培法: 配制秋水仙素溶液, 过滤灭菌后加入经高压灭菌的增殖培养基中, 使秋水仙素最终浓度分别为 10、50、100、200、300 mg/L, 其他成分配比与最适增殖培养基相同。将红地球葡萄单芽茎段插入各浓度的秋水仙素培养基中, 处理 30 d 后转入不含秋水仙素的增殖培养基 (B5 + 0.05 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA) 中继续培养, 观察记录植株的生长情况。待茎段的腋芽长至 2~3 cm 时, 再转入新的增殖培养基中继代增殖。

1.2.2 红地球葡萄诱变效果的 RAPD 鉴定 参照罗明明等^[1]方法提取红地球葡萄 DNA。随机引物、Taq 聚合酶、dNTP 均购自成都博瑞克生物技术公司。琼脂糖购自 Gasebase 公司, 其他试剂均为国产分析纯, 所有试剂均用双蒸水配制。PCR 反应体系参照罗明明等^[1]方法, 扩增程序参照王跃进等^[2]方法, 用未诱变的无性系材料为模板, 用优化的反应体系对赛百盛公司的 3 组引物 (SBS-K, SBS-S, SBS-V) 共 30 个进行筛选。用优选的 RAPD 反应体系在 PCR 仪 (PCR-100 型, 美国 MJ 公司生产) 上进行 PCR 扩增。PCR 产物在 4 V/cm、1.4% 琼脂糖凝胶上电泳, Syngene 凝胶成像仪上检测, 观察拍照。

1.2.3 数据采集与处理 秋水仙素浸泡或混培诱变后, 3 d 观察 1 次并记录。电泳图谱中的每一条带代表了模板 DNA 上与引物互补的 1 对结合位点, 可以记为 1 个分子标记。谱带记录仅选择清晰、稳定、重复性好的带, 与未诱变的植株进行对比, 找出位点不同的谱带, 进行统计分析。诱变率在 RAPD 检测试验结束后采用 SPSS 11.5 软件进行 LSD 和 Duncan 氏统计分析。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素对红地球葡萄试管苗的诱变效果

2.1.1 浸泡法对红地球葡萄试管苗的诱变效果 经过试验发现, 在秋水仙素中添加 2% 的 DMSO 后, 芽苗在 12 h 内全部死亡, 即使缩短处理时间, 芽苗的褐化率也很高, 成活率很低。若不加入 DMSO, 即使浸泡 72 h 植株的成活率也能达到 95% 以上, 因此选用 1% 的 DMSO 较为适宜。秋水仙素中添加 1% DMSO 后不同浓度和浸泡时间处理对葡萄试管苗的诱变效果见表 1。

表 1 秋水仙素浸泡对红地球葡萄带芽茎段诱变的效果

浸泡时间(h)	秋水仙素浓度(%)	浸泡数(株)	成苗数(株)	成苗率(%)	褐化数(株)	褐化率(%)
6	0.005	30	26	86.67aA	7	23.33kK
	0.01	31	26	83.87bB	8	25.81lL
	0.05	30	23	76.67cC	7	23.33kK
	0.1	32	17	53.13fF	12	37.50iI
	0.2	28	14	50.00gG	11	39.29hH
12	0.005	29	20	68.97dD	9	31.03jJ
	0.01	30	17	54.84eE	9	30.00lL
	0.05	31	11	35.48iI	16	51.61gG
	0.1	31	9	29.03jJ	21	67.74eE
	0.2	30	7	23.33lL	22	73.33dD
24	0.005	31	17	54.84eE	16	51.61gG
	0.01	32	13	40.63hH	21	65.63fF
	0.05	29	8	27.86kK	23	79.31cC
	0.1	30	5	16.67mM	28	93.33bB
	0.2	31	5	16.13nN	31	100aA

由表 1 可得出: (1) 随着秋水仙素浓度的提高, 红地球葡萄的成苗率总体上呈现下降的趋势, 褐化率呈上升趋势; 并随着处理时间的延长, 成苗率降低, 褐化率迅速升高。(2) 0.2% 秋水仙素处理, 在试验的 6~24 h 内成苗率始终最低, 褐化率始终最高。(3) 本试验中成苗率、褐化率与处理时间的关系表现不明显; 秋水仙素长时间低浓度的处理成苗率一直较高, 而短时间高浓度的处理, 成苗率明显下降。

2.1.2 混培法对红地球葡萄试管苗的诱变效果 将秋水仙素加入培养基诱变红地球葡萄试管苗, 试验结果见表 2。可以看出, 随着秋水仙素处理浓度的增大, 红地球葡萄萌发从生芽的能力在不断增强, 萌芽率则先高后低, 培养基中秋水仙素浓度为 100 mg/L 时萌芽率最高, 生根率总体上逐渐降低, 褐化率总体上不断增高, 死亡率明显上升。秋水仙素浓度为 50 mg/L 的增殖效果最好, 其次是 100 mg/L 处理, 300 mg/L 处理的效果最差。随着秋水仙素浓度

表2 秋水仙素加入培养基中对红地球葡萄单芽茎段诱变的效果

秋水仙素 混培浓度 (mg/L)	接种数 (株)	萌芽率 (%)	生根率 (%)	褐化率 (%)	死亡率 (%)	增殖 系数	愈伤 组织量
10	26	73.00cC	42.33bB	19.20dD	0eE	3	+
50	27	81.48bB	51.85aA	22.22cC	11.11dD	5	+
100	26	84.61aA	26.09cC	23.08bB	11.50cC	4	+
200	25	64.00dD	13.33dD	22.22cC	28.00bB	2	++
300	28	57.14eE	3.571eE	35.71aA	32.14aA	1.5	++

注: + 表示极少量愈伤组织; ++ 表示少量愈伤组织。

的提高,愈伤组织量也呈现出一个缓慢的递增趋势,但愈伤组织量普遍较少。整体而言,随着混培中秋水仙素浓度的提高,红地球葡萄生根率下降的幅度最大,萌芽率其次,褐化率变化最缓慢;高浓度的秋水仙素严重抑制植株生根,适当浓度的秋水仙素促进植株萌发丛生芽。

2.2 秋水仙素不同浓度和时间处理后植株 RAPD 谱带的差异

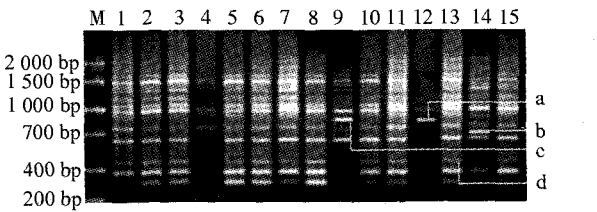
本研究从 30 个(10 个碱基)引物中筛选出了 10 个特异性引物对红地球葡萄品种进行了 RAPD 分析,都能得到比较稳定的 RAPD 图谱,扩增结果见表 3。

表3 筛选出的引物及 RAPD 谱带扩增结果

引 物	扩增谱带总数 (条)	特异性谱带 总数(条)	特异性谱带 百分率(%)
SBS - S4	375	4	1.07
SBS - S10	130	3	2.31
SBS - S11	315	21	6.67
SBS - S12	180	12	6.67
SBS - V10	143	2	1.39
SBS - V18	247	25	10.12
SBS - V19	210	6	2.86
SBS - K1	195	2	1.03
SBS - K6	120	3	2.50
SBS - K16	187	14	7.49
总计	2 102	92	4.38

筛选出的 10 个引物共扩增出了 2 102 条 DNA 带,平均每个引物 210 条,其中共有 92 条具有特异性,占条带总数的 4.38%,平均为每个引物可扩增 9 条特异性带。其中扩增带数较多的引物是 SBS - S4、SBS - S11 和 SBS - V18,分别为 375、315、247 条;最少的为引物 SBS - K6,仅扩增出了 120 条。扩增出特异性带最多的引物是 SBS - V18,为 25 条。平均每个引物的扩增带中 15 条为共有谱带,部分引物扩增特异性明显,如图 1、图 2 所示。

从图 1 可以看出:以 SBS - S4 为引物扩增出的谱带中出现了 4 条特异性带(3 条为增加带,1 条为减少带),3 株试管苗的谱带数目发生了变化。其

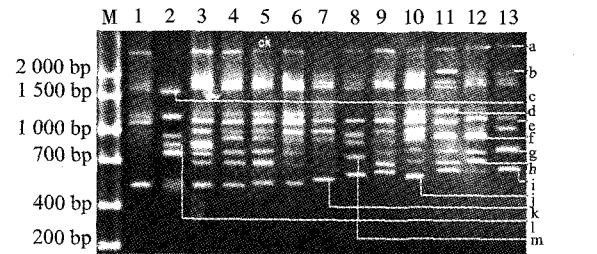


1~5泳道表示浓度分别为0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.2%的秋水仙素浸泡6 h后的单株; 6~10泳道表示浓度分别为0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.2%的秋水仙素浸泡12 h后的单株; 11~15泳道表示浓度分别为0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.2%的秋水仙素浸泡24 h后的单株; M: Marker; SBS-S4引物序列: CACCCCTTG

图1 SBS-S4引物扩增电泳图谱

中,秋水仙素浸泡 6 h 的 5 个浓度梯度中都没有出现特异性带;在 12 h 浸泡处理中,浓度为 0.1% 处理(9 泳道)增加了 1 条清晰明亮的特异性带 c;在 24 h 浸泡处理中,浓度为 0.01% 处理(12 泳道)和浓度为 0.1% 处理(14 泳道)各增加了 1 条清晰明亮的特异性带 a 和 b,同时泳道 14 与其他处理相比少了 1 条谱带 d。

从图 2 可以看出:引物 SBS - V18 扩增出的谱带中共出现了 25 条特异性谱带(8 条为增加带,17 条为减少带),共有 8 株试管苗的扩增谱带发生了变化。与对照相比,10 mg/L 和 50 mg/L 秋水仙素混培的单株均没有特异性谱带出现;300 mg/L 秋水仙素混培的单株中,1 泳道有 3 条谱带消失,分别为 b 带、g 带和 h 带;2 泳道增加了 2 条特异带 c 带和 k 带,减少了 a 带、b 带和 h 带;100 mg/L 秋水仙素混培处理的单株中,8 泳道增加了 2 条清晰明亮的特异性带 m 带和 j 带,减少了 d 带、g 带、h 带和 k 带;9 泳道增加了 1 条清晰的 i 带,减少了 k 带;10 泳道增加了 1 条清晰的 j 带,减少了 k 带;200 mg/L 秋水仙素混培处理的单株中,11 和 12 泳道均增加了 1 条 i 带,减少了 k 带;13 泳道减少了 d 带和 h 带,增加了



1~2泳道表示 300 mg/L的秋水仙素混培处理后的单株; 3~4泳道表示10 mg/L的秋水仙素混培处理后的单株; 5泳道为对照; 6~7泳道表示50 mg/L的秋水仙素混培处理后的单株; 8~10泳道表示100 mg/L的秋水仙素混培处理后的单株; 11~13泳道表示200 mg/L的秋水仙素混培处理后的单株; M: Marker; SBS-V18引物序列: TGGTGGCGTT

图2 SBS-V18引物扩增电泳图谱

i 带。

2.3 浸泡法和混培法的诱变效果比较

通过 10 个引物的 RAPD 检测,发现采用秋水仙素浸泡法和混培法处理的红地球葡萄试管苗的扩增谱带都有变化发生,对具有特异性带的单株进行统计,结果见表 4 和表 5。

表 4 秋水仙素浸泡处理后红地球葡萄试管苗的变异率

浸泡时间 (h)	秋水仙素 浓度(%)	处理株数 (株)	RAPD 变异 株数(株)	变异率 (%)
6	0.005	30	0	0
	0.01	31	0	0
	0.05	30	0	0
	0.1	32	0	0
	0.2	28	0	0
12	0.005	29	0	0
	0.01	30	0	0
	0.05	31	0	0
	0.1	31	3	9.67
	0.2	30	3	10.00
24	0.005	31	0	0
	0.01	32	4	12.50
	0.05	29	4	13.79
	0.1	30	3	10.00
	0.2	31	4	12.90

表 5 秋水仙素加入培养基中对红地球葡萄试管苗变异率的影响

混培浓度 (mg/L)	处理株数 (株)	RAPD 变异株数 (株)	变异率 (%)
10	38	0	0
50	40	1	2.50
100	41	5	12.19
200	38	5	13.15
300	37	5	13.51

由表 4 和表 5 可以看出:(1)浸泡处理中,455 株试管苗中共有 21 株的 RAPD 扩增谱带与对照相比发生了数量或位置上的变化,占总数的 4.62%。5 个浓度梯度 6 h 浸泡均没有诱导出变异;0.1% 和 0.2% 秋水仙素浸泡 12 h 红地球葡萄试管苗发生了变异。所有处理中,诱变效果最好的是用 0.05% 秋水仙素浸泡 24 h,变异率可达 13.79%。随着秋水仙素浓度的增大以及处理时间的延长,变异率也上升。然而,浓度最高的两个秋水仙素(0.1% 和 0.2%)处理 24 h,变异率并不是最大,原因是浸泡浓度过高,严重降低了植株的成活率。同时,0.2% 浓度 6 h 处理和 12 h 处理的诱变效果都不如 0.01% 浓度 24 h 处理,说明短时间高浓度处理的效果不如长时间低浓度处理的效果,但长于 24 h 红地球葡萄的成活率会降低,因此处理时间不宜长于 24 h。(2)混培处理的 194 株试管苗中有 16 株的扩增谱

带与对照相比在分布位置和数量上表现了特异性,占总数的 8.25%。随着秋水仙素浓度的增大,红地球葡萄变异率随之上升,说明秋水仙素混培处理中,红地球葡萄试管苗的诱变率与处理时间和浓度呈正相关。秋水仙素浓度高于或等于 50 mg/L 以后变异开始出现,但浓度大于 300 mg/L 时,混培 1 个月后芽苗全部黄化死亡。

比较秋水仙素的浸泡诱变和混培诱变效果得出:带芽茎段浸泡处理的诱变效果好于混培处理,最佳处理浓度和时间是 0.05% 秋水仙素浸泡 24 h。

3 讨论与小结

本试验结果表明,采用秋水仙素对红地球葡萄进行诱变育种是完全可行的。将用秋水仙素浸泡处理后的红地球葡萄单株和混培处理后的单株进行了 RAPD 检测,发现以 0.05% 秋水仙素浸泡 24 h 的试管苗中出现特异扩增谱带的植株数最多,占总数的 13.79%,其次是浓度为 300 mg/L 的混培试管苗,占总数的 13.51%,这与杨晓明等^[3]和马爱红等^[4]的结果相差甚远,同时发现培养基中添加较低浓度的秋水仙素会诱导出一定数量的丛生芽,有利于红地球葡萄的增殖培养。浓度大于或等于 0.1% 的秋水仙素浸泡处理超过 24 h 后,几乎全部黄化死亡,可能是与加入的二甲基亚砷(DMSO)有关。但不少研究表明,在秋水仙素溶液中加入 1%~3% 的二甲基亚砷溶液,可提高组织的渗透性,使药物容易进入细胞,可显著提高诱变效果^[5]。浸泡处理的诱变效果好于混培处理,但混培处理的褐化率以及对材料的伤害程度都低于浸泡,这可能是由试验所使用的秋水仙素的批次、纯度不同或者是灭菌方式不同造成的。

参考文献:

- [1] 罗明明,王永清,陈红,等. 葡萄品种亲缘关系及分类的 RAPD 分析[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [2] 王跃进, Lamikanra, 卢江,等. 葡萄无核基因 RAPD 标记的序列分析[J]. 西北农业大学学报,1997,25(4):1-5.
- [3] 杨晓明,王翠玲. 葡萄多倍体诱导及其特征特性研究[J]. 甘肃农业大学学报,2005,40(6):741-744.
- [4] 马爱红,范培格,孙建设,等. 四倍体葡萄诱导技术的研究[J]. 中国农业科学,2005,38(8):1645-1651.
- [5] 纪凤高,邓景扬. 秋水仙素与二甲基亚砷混合水溶液处理小麦×黑麦杂交一代苗进行染色体加倍的试验[J]. 遗传,1987,9(3):1-4.