

香果树组织培养过程中遗传变异的 RAPD 分析

熊丹², 谢伟², 陈发菊^{1,2,*}, 梁宏伟², 王玉兵²

¹湖北民族学院, 湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北恩施 445000; ²三峡大学生物技术研究中心, 湖北省植物天然产物重点实验室, 湖北宜昌 443002

摘要: 用 RAPD 分子标记方法, 从 DNA 水平上分析野生型香果树以及通过器官发生途径和体细胞胚胎发生途径得到的香果树再生植株以及体细胞胚胎发生过程中不同继代次数的培养物之间的遗传变异。筛选了 100 个随机引物, 其中有 75 条随机引物能够扩增出条带, 从中选取 11 个引物进行 PCR 扩增的结果显示: 香果树体细胞胚胎无性系中有 RAPD 多态性位点, 在胚性愈伤组织中也检测到少数 RAPD 变异位点。表明 RAPD 分子标记方法可以鉴定香果树组织培养过程中的遗传变异。

关键词: 香果树; RAPD 分析; 体细胞胚胎发生; 遗传变异

Analysis of Genetic Variation in *Emmenopterys henryi* Oliv. *in vitro* by RAPD Fingerprinting Method

XIONG Dan², XIE Wei², CHEN Fa-Ju^{1,2,*}, LIANG Hong-Wei², WANG Yu-Bing²

¹Key Laboratory Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Hubei College for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; ²Key Laboratory of Plant Natural Products of Hubei, Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

Abstract: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was used as a tool to assess the genetic variation of organogenesis and somatic embryogenesis-derived plants and embryonic callus of subcultures of *Emmenopterys henryi*. Eleven random decamer primers were successfully used to analyze genomic DNA from the parental field-grown plants, organogenesis and somatic embryogenesis-derived plants material and embryonic callus of subcultures. A total of 89 scoreable fragments were amplified with an average of 8.09 bands per primer per lane. The results indicated that RAPD markers could be applied successfully as a rapid, simple and cheap tool for the establishment of genetic variation between donor parental field grown plants and micropropagated material.

Key words: *Emmenopterys henryi*; RAPD analysis; somatic embryogenesis; genetic variation

香果树为茜草科(Rubiaceae)香果树属的高大乔木, 是我国特有单种属植物和第四纪冰川幸存的古老孑遗树种。香果树材质洁白细密, 纹理通直, 是一种优良用材; 树姿优美, 花色艳丽, 也是很好的观赏植物(傅立国和金鉴明 1992)。

植物组织培养过程中普遍存在体细胞无性系变异现象(冯霞等 2006)。已有报道表明, 经过组织培养的植株比常规繁殖方法产生的植株常表现出更多的变异, 体细胞无性系的变异率达 30%~40%, 有时甚至高达 100% (李莉等 2004)。因此鉴定再生培养物的遗传背景, 以确保在生产应用中优良性状的遗传稳定性是很重要的。随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术可在 DNA 水平上检测和分析物种的遗传多样性及遗传变异。RAPD 分子标记应用于鉴定组织培养再生植株体细胞无性系变

异在云杉组织培养体细胞胚胎发生(Fourre 等 1997; Isabel 等 1993)、茴香愈伤组织及其组织培养再生植株(Bennici 等 2004)、苹果叶片直接体胚发生再生植株(达克东等 2001)以及水稻成熟胚诱导获得的再生植株(Godwin 等 1997)的 RAPD 分析都有过报道。

本实验是在我们实验室已建立的香果树再生体系的基础上, 用 RAPD 标记技术对经多次继代培养后的胚性愈伤组织及器官发生途径和体细胞胚

收稿 2007-09-27 修定 2007-12-26

资助 湖北省生物资源保护与利用重点实验室开放基金(2007010)、三峡大学重大项目(2002C03)和宜昌市科技重点攻关项目(A06209)。

* 通讯作者(E-mail: chenjf616@163.com; Tel: 0717-6397188)。

发生途径分别获得的再生植株与野生型香果树的遗传稳定性作了分析, 有助于了解通过体细胞胚胎发生途径和器官发生途径获得的再生植株的遗传变异程度, 从而明确哪种途径更适合香果树的快速繁殖。

材料与方 法

香果树(*Emmenopterys henryi* Oliv.)的未成熟果实(果龄 30 d 左右)和 14 株野生型香果树的新鲜幼叶均于 2005 年采自神农架自然保护区关门山。取 14 株野生植株幼叶用硅胶干燥后带回实验室, 置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用; 试验时从幼果中取出幼嫩种子用于胚性愈伤组织的诱导和植株再生。

将香果树幼嫩种子接种到附加不同浓度的 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 6-BA (0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MS 培养基上培养, 10 d 后将产生的浅绿色愈伤组织转入含 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中培养 30 d, 此时大部分浅绿色愈伤组织逐渐变为黑色, 再将黑色的愈伤组织转入新鲜的含 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中继续培养 40 d, 得到大量的浅黄色胚性愈伤组织。然后将胚性愈伤组织转移到添加不同浓度 6-BA (0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 NAA (0, 0.01, 0.05, 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MS 培养基上诱导体细胞胚胎发生, 将体胚转接到不含任何生长调节物质的 MS 培养基上, 获得完整植株。

香果树胚性愈伤组织每隔 20~30 d 转接到新鲜的含 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基中进行增殖培养, 每次继代时, 称取 1.0 g 胚性愈伤组织放在 1.5 mL Eppendorf 管中, 于液氮中冷冻 2 h, 然后保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中备用, 共保存 6 次继代的胚性愈伤组织。采用 RAPD 标记检测培养过程中培养物体细胞无性系的变异。

取无菌苗的叶片作外植体, 分别采用悬浮培养和固体培养诱导直接芽再生获得再生植株(熊丹等 2007)。将灭菌后的香果树成熟种子接种到 MS 固体培养基中诱导发芽, 然后将发芽 40 d 后的无菌苗的叶片切成 0.5 cm^2 作外植体, 分别接种在添加 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的 MS 固体培养基(0.8% 琼脂)和添加 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的 MS 悬浮培养基中, 诱导

芽的直接再生, 然后将通过固体培养和悬浮培养途径诱导产生的再生芽转入添加 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 培养基上培养, 得到再生植株。

DNA 提取与 RAPD 分析时, 取 14 株野生型香果树的嫩叶混合后提取总 DNA; 取不同继代次数的胚性愈伤组织各 1.0 g; 取通过体细胞胚胎途径获得的再生植株、悬浮培养获得的再生植株以及通过固体培养获得的再生植株各 20 株的叶片, 各自混合后参考邹喻莘等(2001)书中的 CTAB 法(稍作修改)提取基因组 DNA。具体步骤为: 取 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存的样品约 1 g 放在研钵中加液氮研磨后, 加入 10 mL $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取液, 分装到 1.5 mL Eppendorf 管中, 置于 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中 50 min, 每 10 min 摇动混匀数次; 再加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)进行抽提, 以 $8\ 228\times g$ 离心 10 min, 取上清液, 如此再重复一次后, 加入等体积的于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中冷却过的异丙醇, 小心摇动 Eppendorf 管数次, 出现絮状沉淀后用吸管小心取出沉淀, 再用 70% 乙醇冲洗沉淀, 以 $8\ 228\times g$ 离心 10 min, 弃去上清液, 放到通风橱中风干 1~2 h, 沉淀用 100 μL 双蒸水溶解, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存备用。用紫外可见分光光度计(HITACHI U-2800), 测定波长 260 nm 处光吸收值, 计算 DNA 浓度; 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, 用自动凝胶成像系统(BIO-RAD)观察拍照。

用于 RAPD 分析的 25 μL 反应体系含有 2.6 μL 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 2.2 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 2.5 μL 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, 1 μL 模板 DNA, 约 20 ng, 2.5 μL 10 \times Taq 缓冲液(200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl; 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl; 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 8.0), 2.0 U Taq DNA 聚合酶, 13.8 μL 双蒸水。反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进行 40 个扩增循环, 每个循环中, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存。每个引物均设一个空白对照, 即将反应体系中的模板换成双蒸水, 以排除系统误差。扩增反应在 MJ PTC-220 基因扩增仪上进行, 所用 Taq DNA 聚合酶、dNTP 均为华美公司产品。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 3 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 恒定电压下电泳约 1.5 h, 溴化乙锭染色后拍照记录。采用上海博亚生物有限公

司的博亚 BA0001~BA0100 共 100 个随机引物, 其中有 75 条随机引物能够扩增出条带, 从中选择扩增条带整齐清晰、重复性好和多态性丰富的 11 个随机引物(表 1), 用于分析野生型香果树植株以及通过不同途径获得的再生植株和 6 次继代的胚性愈伤组织的 DNA 指纹多态性, 试验重复 3 次。

电泳图谱中每一条带均为一个分子标记, 有带的计为 1, 无带的记为 0, 形成 0/1 矩阵图输入计算机, 用 POPGENE (Yeh 等 1996) 软件计算各样品间的 Nei's 遗传距离(Nei 1972)。

实验结果

1 引物的扩增

用筛选出的 11 条引物, 对通过不同途径得到的香果树再生植株、胚性愈伤组织和野生型香果树进行 RAPD 扩增的结果(图 1)表明, 每条引物扩增的带数从 6 条到 14 条(表 1)。11 条 RAPD 引物共扩增出 89 条扩增谱带, 其中多态性位点 15 个, 整体多态率为 16.8%, 说明香果树再生植株群体中在分子水平上也存在体细胞无性系变异。

2 体细胞无性系的变异

用筛选得到的 11 条引物对通过不同途径得到

表 1 用于分析的 11 个随机引物和序列以及每条引物扩增的条带数

Table 1 Sequences of the selected primers used in the RAPD analysis and the number of scoreable bands for each primer

随机引物编号	碱基序列 (5' → 3')	条带数	多态性位点
BA0021	CAGGCCCTTC	6	1
BA0022	TGCCGAGCTG	10	1
BA0030	GTGATCGCAG	8	1
BA0038	AGGTGACCGT	6	1
BA0055	CATCCGTGCT	8	2
BA0079	GTTGCCAGCC	8	1
BA0080	ACTTCGCCAC	8	2
BA0085	CTGAGACGGA	14	2
BA0091	TGCCCGTCGT	8	1
BA0095	ACTGGGACTC	7	2
BA0097	ACGACCGACA	6	1

的香果树再生植株叶片的 DNA 和不同继代次数的胚性愈伤组织的 DNA 进行体细胞无性系变异的检测, 以野生型香果树叶片的 DNA 为对照, 结果显示, 不同途径得到的香果树再生植株以及不同继代次数的胚性愈伤组织与野生型的香果树植株的遗传距离在 0.0300~0.1048 之间, 相似系数在 0.9005~0.9704 之间(表 2), 这表明再生植株和胚

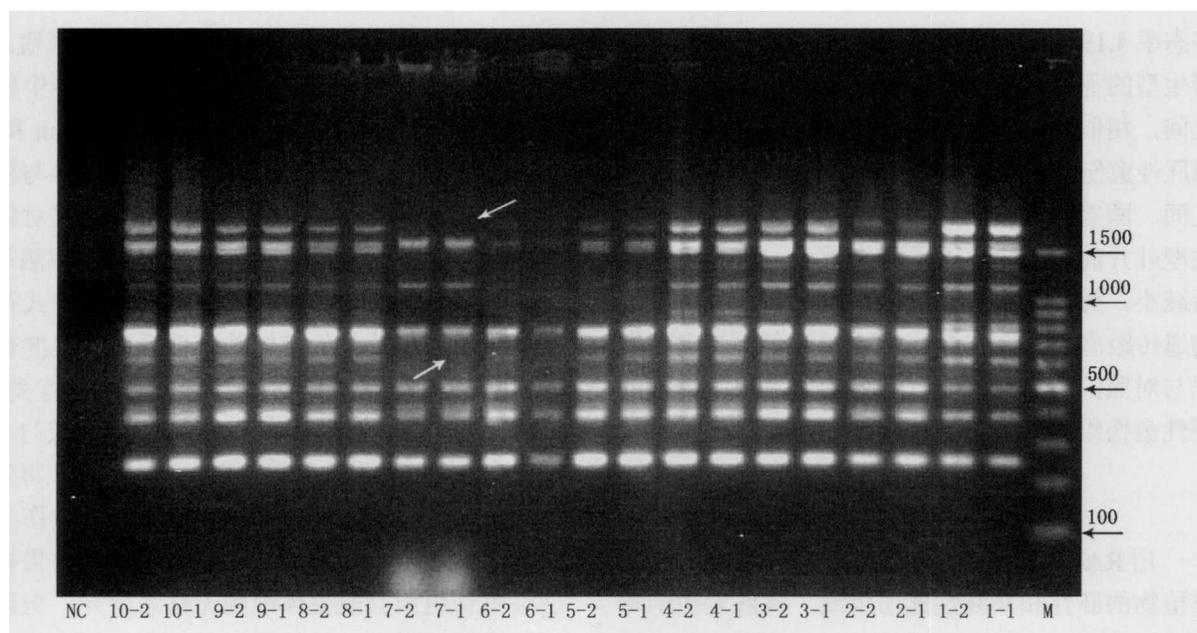


图 1 引物 BA0055 对全部样品的 RAPD 扩增

Fig.1 RAPD bands of *Emmenopterys henryi* Oliv. samples amplified with primer BA0055

标准分子量(M): DL1500; NC: 空白对照。1-1~10-2: BA0055 引物的扩增, 模板分别来自: 1-1~1-2, 野生型香果树植株; 2-1~2-2, 胚状体再生植株; 3-1~3-2, 固体培养获得的再生植株; 4-1~4-2, 悬浮培养获得的再生植株; 5-1~5-2, 继代 1 次的胚性愈伤组织; 6-1~6-2, 继代 2 次的胚性愈伤组织; 7-1~7-2, 继代 3 次的胚性愈伤组织; 8-1~8-2, 继代 4 次的胚性愈伤组织; 9-1~9-2, 继代 5 次的胚性愈伤组织; 10-1~10-2, 继代 6 次的胚性愈伤组织。图中白色箭头指示差异条带。

表2 微繁香果树与野生型香果树之间的遗传距离和相似系数

Table 2 Nei's genetic identity and genetic distance between donor parental field grown plants and micropropagated material of *Emmenopterys henryi* Oliv.

pop ID	pop 1	pop 2	pop 3	pop 4	pop 5	pop 6	pop 7	pop 8	pop 9	pop 10
pop 1	****	0.9699	0.9704	0.9592	0.9468	0.9142	0.9005	0.9149	0.9519	0.9643
pop 2	0.0306	****	0.9762	0.9411	0.9641	0.9058	0.9041	0.9068	0.9448	0.9456
pop 3	0.0300	0.0241	****	0.9652	0.9647	0.9088	0.9078	0.9216	0.9582	0.9704
pop 4	0.0416	0.0607	0.0354	****	0.9652	0.9469	0.9223	0.9469	0.9590	0.9709
pop 5	0.0547	0.0365	0.0359	0.0354	****	0.9334	0.9078	0.9459	0.9582	0.9468
pop 6	0.0897	0.0989	0.0956	0.0546	0.0689	****	0.9740	0.9621	0.9378	0.9266
pop 7	0.1048	0.1008	0.0967	0.0809	0.0967	0.0263	****	0.9618	0.9371	0.9259
pop 8	0.0889	0.0978	0.0816	0.0545	0.0556	0.0386	0.0390	****	0.9630	0.9393
pop 9	0.0493	0.0568	0.0427	0.0419	0.0427	0.0642	0.0649	0.0377	****	0.9760
pop 10	0.0364	0.0559	0.0300	0.0295	0.0547	0.0763	0.0770	0.0626	0.0243	****

左下角数字为遗传距离, 右上角数字为相似系数。pop 1~pop 10 数据代表: pop 1, 野生型的香果树植株; pop 2, 胚状体再生植株; pop 3, 固体培养获得的再生植株; pop 4, 悬浮培养获得的再生植株; pop 5, 继代1次的胚性愈伤组织; pop 6, 继代2次的胚性愈伤组织; pop 7, 继代3次的胚性愈伤组织; pop 8, 继代4次的胚性愈伤组织; pop 9, 继代5次的胚性愈伤组织; pop 10, 继代6次的胚性愈伤组织。

性愈伤组织与野生型叶片的多态率在3.0%至10.0%之间。不同途径得到的再生植株与野生型的香果树植株的遗传距离在0.0300~0.0416之间, 相似系数在0.9592~0.9704之间(表2), 体细胞发生途径产生的再生植株和器官发生途径固体培养产生的再生植株与野生型叶片的多态率都为3.0%, 比器官发生途径液体培养产生的再生植株与野生型叶片的多态率4.1%低。不同继代次数的胚性愈伤组织与野生型的香果树植株的遗传距离在0.0364~0.1048之间, 相似系数在0.9005~0.9643之间(表2), 表明胚性愈伤组织与对照的多态率在3.57%至10.0%之间。随着继代次数的增多, 胚性愈伤组织与野生型叶片的遗传距离不是越来越大, 而是先增大后减小, 继代3次的胚性愈伤组织与野生型叶片的遗传距离最大(0.1048), 继代3次的胚性愈伤组织与对照的多态率为10.0%, 而经过6次继代的胚性愈伤组织的多态率仅为3.57%。

讨 论

用RAPD标记技术在玉米、黑麦草和白云杉等植物的胚性和非胚性愈伤组织、体胚发生的再生植株以及体细胞胚胎中都检测到不同程度的多态性变异(Isabel等1996; Hashmi等1997; 黄璐和卫志明1999; 冯霞等2006)。本文用RAPD分子标记研究香果树组织培养过程中胚性愈伤组织和再生植株以及野生型植株的遗传稳定性, 发现其再

生植株和胚性愈伤组织与野生型叶片的多态率在3.0%至10.0%之间, 说明再生植株和胚性愈伤组织都产生遗传变异; 体细胞胚胎发生途径产生的再生植株和固体培养的器官发生途径产生的再生植株与野生型叶片的多态率都为3.0%, 液体培养的器官发生途径产生的再生植株与野生型叶片的多态率为4.1%, 说明香果树体细胞胚胎发生途径和固体培养的器官发生途径较适用于香果树的快速繁殖。

植物生长调节剂也引起植物组织培养中体细胞胚的无性系变异(Bogani等1996; Bouman和De Klerk 1996), 香果树的体细胞无性系变异与植物生长调节剂可能有关。而不同的培养方式对体细胞无性系的变异也有影响(曹静等1995; 郑泗军等1993), 本文结果表明, 通过不同培养方式得到的香果树再生植株的体细胞无性系变异程度有不同。另外, 继代培养与体细胞无性系也有关系, Kunitake等(1998)和薛美凤等(2002)研究天门冬属植株体细胞胚胎发生和棉花愈伤组织的体胚再生的结果表明, 体细胞胚变异频率随着胚性愈伤组织继代时间的延长而增加。本文结果表明香果树的胚性愈伤组织会发生体细胞无性系变异, 但随着继代次数的增多, 体细胞胚的变异率不是逐渐升高, 而是先升高后下降, 从而佐证了Kunitake等(1998)和薛美凤等(2002)的结果。

体细胞无性系变异对用组织培养技术快速繁殖优良基因型、种质资源离体保存、体细胞杂交

和基因工程育种有不利影响, 如要保存香果树种质资源或是筛选突变体, 则应在研究香果树组织培养过程中变异机制的基础上, 寻找控制变异频率的方法, 以扩大或缩小变异频率。这些问题尚需深入探讨。

参考文献

- 曹静, 周丽依, 邝哲师, 陈俊秋, 马雪筠(1995). 白鹤芋花序体细胞胚胎发生及植株再生的研究. 农业生物技术学报, 3 (3): 81~85
- 达克东, 金德敏, 伏建民, 王斌, 束怀瑞, 李雅志(2001). 苹果体细胞无性系变异的RAPD评估. 核农学报, 15 (2): 81~85
- 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 彭镇华(2006). 多年生黑麦草体细胞无性系变异分析. 核农学报, 20 (1): 49~50
- 傅立国, 金鉴明(1992). 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第一册). 北京: 科学出版社, 568~569
- 黄璐, 卫志明(1999). 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA的差异. 植物生理学报, 25 (4): 332~338
- 李莉, 官春云, 刘忠松(2004). 植物体细胞无性系变异及其突变体的RAPD鉴定分析. 作物研究, S1 (5): 376~379
- 薛美凤, 郭余龙, 裴炎, 李名扬(2002). 长期继代对棉花胚性愈伤组织体胚发生能力及再生植株变异的影响. 西南农业学报, 15 (4): 19~21
- 熊丹, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵, 李凤兰(2007). 珍稀植物香果树植株再生体系的建立. 北京林业大学学报, 29 (5): 44~49
- 郑泗军, 吴吉祥, 洪彩霞(1993). 棉花组织培养中畸形胚产生原因的分析. 浙江农业大学学报, 19 (2): 193~197
- 邹喻苹, 葛颂, 王晓东(2001). 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 27~28, 37
- Bennici A, Anzidei M, Vendramin GG (2004). Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Sci, 166: 221~227
- Bogani P, Simoni A, Lio P, Scialpi A, Buiatti M (1996). Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. Genome, 39: 846~853
- Bouman H, De Klerk GJ (1996). Somaclonal variation in biotechnology of ornamental plants. Wallingford: CABI Publishing, 165~183
- Fourre JL, Berger P, Niquet L, Andre P (1997). Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. Theor Appl Genet, 94: 159~169
- Godwin ID, Sangduen N, Kunanuvatchaidach R, Piperidis G, Adkins SW (1997). RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies. Plant Cell Rep, 16: 320~324
- Hashmi G, Huettel R, Meyer R, Krusberg L (1997). RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. Plant Cell Rep, 16: 624~627
- Isabel N, Boivin R, Levasseur C, Charest PM, Bousquet J, Tremblay FM (1996). Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). Am J Bot, 83: 1121~1130
- Isabel N, Tremblay L, Michaud M, Tremblay FM, Bousquet J (1993). RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-driven population of *Picra mariana* (Mill.) B. SP. Theor Appl Genet, 86: 81~87
- Kunitake H, Nakashima T, Mori K, Tanaka M (1998). Somaclonal and chromosomal effect of genotype ploidy and culture duration in *Asparagus officinalis* L. Euphytica, 102: 309~316
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. Am Natl, 106: 283~292
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999). POPGENE. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis Release 1.31. Edmonton: University of Alberta