

河北杨不同再生途径组培苗遗传稳定性的 RAPD 检测^{*}

张 琼, 李周岐, 侯万伟, 周飞梅

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:运用 RAPD 标记对河北杨不同培养途径获得的再生植株遗传稳定性进行检测, 结果表明, 以试管苗幼嫩叶片为外植体, 通过直接不定芽发生途径获得的再生植株(20 株)与对照株间表现出相同的条带数, 说明此途径具有较高的遗传稳定性; 以试管苗幼嫩叶片为外植体诱导愈伤组织, 通过器官发生途径获得的再生植株(20 株)中有 2 株分别在引物 S268 和引物 S104 中各出现一条多态性带, 位点变异率为 2/288, 植株变异率为 2/20, 说明此培养途径过程中发生体细胞无性系变异, 遗传稳定性较前者低, 因此河北杨不同培养途径再生植株间存在遗传稳定性差异。

关键词:河北杨; 再生途径; 体细胞无性系变异; RAPD

中图分类号: S792. 11. 05

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2008)03-0260-03

RAPD Analysis of Genetic Stability of *Populus hopeiensis* Tissue Culture Seeding from Different Regeneration Methods

ZHANG Qiong, LI Zhouqi, HOU Wairui, ZHOU Feimei

(College of Forestry Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this study, RAPD markers were used to analyze genetic stability of regenerated plant from different ways of *Populus hopeiensis*. The results indicated that, using the young leaves of vitro plantlets as explants, the RAPD bands were same between the control and regenerated plant which was from the direct regenerating adventitious buds. The young leaves of vitro plantlets were as explants to induce the callus, and there was a polymorphic band respectively in the primer S268 and S104 on 2 regenerated plant which were from the way of organogenesis. The mutational rate of RAPD sites and plants were 2/288 and 2/20 respectively. It indicated that there was somaclonal variation during training by this way, and the genetic stability was lower than by the former way.

Key words: *Populus hopeiensis*; regeneration method; somaclonal variation; RAPD

植物离体培养物和再生植株会发生各种各样的变异^[1-2], Larkin 和 Scowcroft^[3]首次对有关再生植株变异的资料进行了评述, 并把这种现象称为体细胞无性系变异(somaclonal variation)。大量研究表明, 影响植物体细胞无性系变异频率的因素很多, 包括源植株的基因型、外植体来源、生长调节物质及附加物、离体培养时间及再生方式等^[4-5]。

由于杨树具有生长周期短、离体操作容易、基因组相对较小等特点, 被喻为木本植物生理学、分子生物学和基因工程研究的模式植物。目前, 杨树已成为林木组织培养及生物技术育种中研究最多的树种之一。自从 Lester^[6]于 1977 年首次报道杨树杂种无性系组培苗在苗高、分枝数及叶片性状上存在无性系变异以来, 有关杨树体细胞无性系变异的研究报道已有许多。GeJiao 等^[7]研究发现转基因杨树(*P. nigra* L.) 在叶形等性状上存在无性系变异, 并利用分子标记技术(RFLP, RAPD, SSR)进行了分析, 认为变异是由于组织培养过程引起的, 而与外源基因的插入无关。Son 等^[8]研究发现

杂种杨树(*Populus alba* L. × *P. grandidentata* Michx.) 愈伤组织再生植株在生长速度、染色体倍性及蛋白质水平上存在广泛变异。可见, 体细胞无性系变异在杨树中相当普遍, 但从现有资料看, 杨树体细胞无性系变异研究还不够深入, 多数研究只是发现了体细胞无性系变异现象, 有关体细胞无性系变异的影响因素虽有一些报道, 但对变异原因的分析尚存在不足。

河北杨(*P. hopeiensis* Hu et Chow) 又名串根杨, 属杨柳科杨属重要造林树种, 广泛分布于我国华北及西北地区, 其根系发达, 萌芽性强, 耐寒、耐旱、耐风沙、耐瘠薄, 适于高寒多风沙地区栽种, 为华北、西北黄土丘陵梁、沟坡及沙滩地的重要水土保持和造林优良树种^[9]。

本研究取河北杨幼嫩叶片为外植体, 运用组织培养的方法, 通过直接不定芽发生途径获得再生植株和经诱导愈伤组织通过器官发生途径获得再生植株。并对这些再生植株进行 RAPD 分子标记检测, 比较不同培养方式获得再生植株

* 收稿日期: 2007-12-13

基金项目: 西北农林科技大学校专项“杨树体细胞无性系变异影响因素与调控技术的研究”

作者简介: 张琼(1982-), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: extreme0082000@yahoo.com.cn

通信作者: 李周岐(1962-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事林木生物技术育种研究。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn

与对照株间遗传稳定性的差异并分析其原因。该研究为河北杨的良种选育与良种栽培将奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

以西北农林科技大学林木遗传育种试验室所保存的河北杨试管苗为起始材料。

1.2 方 法

1.2.1 组织培养

(1)取 1 株试管苗接进茎段培养基 1/2 MS+ 0.05 mg/L 6 BA+ 0.05 mg/L NAA 扩繁得到 6 株苗子, 将其中 1 株经练苗后盆栽作为对照系记为 CK;

(2)取剩余 5 株的叶片为外植体, 通过直接不定芽发生途径获得再生植株; 培养基为 1/2 MS+ 0.25 mg/L 6 BA+ 0.01 mg/L TDZ+ 0.25 mg/L IAA; 通过诱导愈伤组织培养途径获得再生植株。诱导愈伤组织培养基为 MS+ 0.3 mg/L 6 BA+ 0.07 mg/L NAA+ 0.2 mg/L 2, 4 D, 愈伤再生培养基为 1/2 MS+ 2 TDZ 1 mg/L+ 2% 糖。最后将不同方式

获得的再生苗接进生根培养基, 培养基为 1/2 MS+ 0.01 mg/L NAA+ 0.05 mg/L IBA。

1.2.2 变异分析

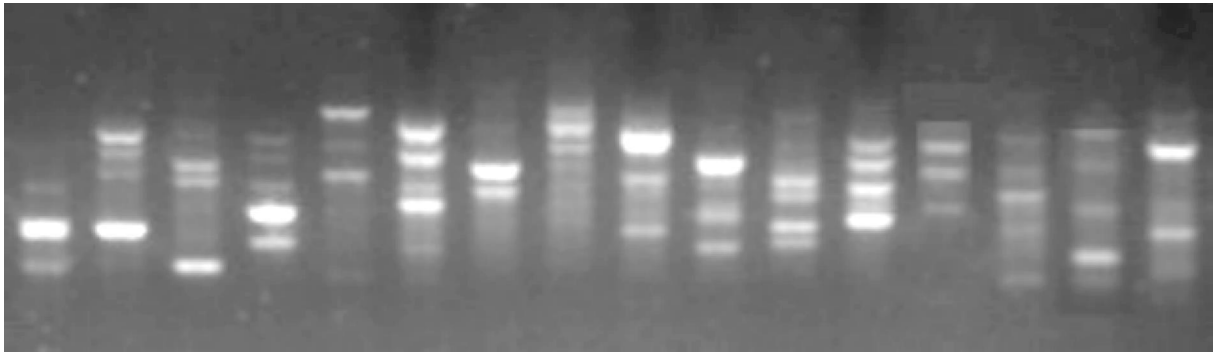
(1) DNA 提取。利用改良的 CTAB 法^[10], 分别对 1 株对照系 CK, 通过直接不定芽发生途径获得 20 个再生植株, 通过器官发生途径获得 20 个再生植株进行 DNA 提取。

(2) 检测方法。参考 Williams 等方法^[11], 以对照系 CK 的 DNA 为模板, 对 500 条(S1- S500) 引物进行扩增, 筛选出条带清晰且明亮的引物作为检测用引物, 用于对通过直接不定芽发生途径获得的 20 个再生植株和通过器官发生途径获得的 20 个再生植株做进一步检测。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

以对照系 DNA 为模板, 对 500(S1~ S500) 个引物进行扩增反应。从扩增结果看, 不同引物扩增出条带数及强度不同(图 1 为部分扩增结果), 根据 RAPD 扩增结果选出 72 条条带多而亮的引物, 共扩增出 288 条谱带。

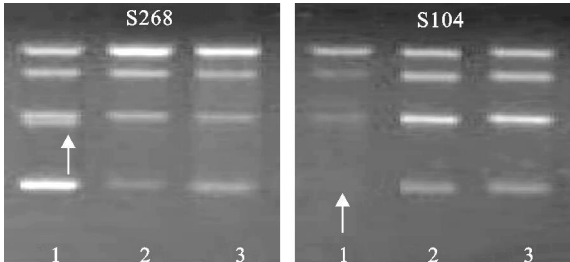


引物从左到右依次为 S85, S96, S103, S158, S185, S191, S199, S216, S230, S267, S289, S282, S259, S276, S174, S146

图 1 以对照 DNA 为模板部分引物的扩增结果

2.2 直接不定芽发生途径获得再生植株的体细胞无性系变异

用 72 条所选引物对通过直接不定芽发生途径获得的 20 个再生植株及对照株进行 RAPD 扩增反应。通过比较再生植株和对照株间 RAPD 标记带, 没有发现 DNA 多态性差异, 表明该再生途径具有较高的遗传性稳性。



泳道 1: 诱导愈伤组织发生途径获得再生植株的扩增结果;
泳道 2: 直接不定芽发生途径获得再生植株的扩增结果;
泳道 3: 对照株的扩增结果

图 2 出现变异位点的引物的扩增结果

2.3 器官发生途径获得再生植株的体细胞无性系变异

对以试管苗幼嫩叶片为外植体诱导愈伤组织, 通过器官发生途径获得再生植株进行变异分析时, 分别用所选择的 72 个 RAPD 引物对 20 株以试管苗幼嫩叶片为外植体诱导

愈伤组织, 通过器官发生途径获得的再生植株和直接不定芽发生途径获得再生植株以及对照株进行 RAPD 扩增反应。结果通过器官发生途径获得再生植株与引物 S268 多出 1 条多态性条带和与引物 S104 中少了 1 条多态性带, 重复 3 次多态稳定(图 2 为部分结果) 说明通过器官发生途径获得再生植株遗传稳定性较低, 发生了分子水平上的遗传差异, 植株变异率为 2/20, 位点变异率为 2/288。

3 结论与讨论

在本实验研究中, 用 RAPD 明显地能检测出河北杨不同再生方式获得再生植株间存在稳定性差异。通过直接不定芽发生途径获得再生植株和对照植株间没有发现 DNA 多态性差异, 说明此途径具有较高的遗传性稳定。而以试管苗幼嫩叶片为外植体诱导愈伤组织, 通过器官发生途径获得再生植株与对照株相比存在分子上的遗传差异, 遗传稳定性较前者低, 其中植株变异率为 2/20, 位点变异率为 2/288。初步推断新生器官由愈伤组织诱导产生间接器官再生(即由植物组织- 愈伤组织- 拟分生组织- 器官原基), 增加了细胞内染色体变异的机率, 从而导致无性系变异产生, 具有遗传不稳定性。而由植物组织- 拟分生组织- 器官原基的直

接器官再生过程, 未经愈伤组织而直接由体细胞分化成器官, 则可降低无性系变异机率。由于植物愈伤组织细胞处于多变、未定型的阶段, 可分化形成不同的器官原基, 因此分化形成的后代变异率不稳定, 极易出现无性系变异。产生这种变异的原因很多, 组织培养中的任何培养条件的改变以及激素水平的提高都可能诱导变异, 如离体条件本身、植物生长调节剂、渗透压、培养温度及培养时间等。

在组织培养中由于器官发生方式在经过愈伤组织分化阶段时, 其体细胞突变的可能性较大, 从而为育种工作者提供了新的变异来源, 但因其变异性大, 在快速繁殖中一般不采用这种方式。通过直接不定芽发生途径获得再生植株过程中, 不经过发生愈伤组织而再生, 可以直接从芽到芽, 这是最能使无性系后代保持原品种遗传特性的一种繁殖方式。

参考文献:

[1] 朱至清. 体细胞无性系变异与植物改良[J]. 植物学通报, 1991, 8(增刊): 1-8.

[2] 赵成章. 再论植物体细胞无性系变异与植物改良[J]. 生物工程进展, 1993, 13(4): 32-36.

[3] Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement[J]. Theor. Appl. Genet., 1981, 60(4): 197-214.

[4] 陈纯贤, 孙敬三. 植物体细胞无性系变异研究进展[J].

生物学杂志, 1994(3): 4-6.

[5] 刘进平, 郑成木, 胡新文. 体细胞无性系变异研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2001, 7(2): 22-29, 34.

[6] Lester D T, Berbee J G. Within clone variation among Black Poplar trees derived from callus culture[J]. Forest Science, 1977, 23(1): 122-131.

[7] GeJiao W, Castiglione S, Ying C, et al. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis[J]. Transgenic Research, 1996, 5(5): 289-301.

[8] Son S H, Moon H K, Hall R B. Somaclonal variation in plants regenerated from callus culture of hybrid aspen (*Populus alba* L. \times *P. grandidentata* Michx.) [J]. Plant Science Limerick, 1993, 90(1): 89-94.

[9] 王战. 中国植物志(20 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 14.

[10] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini-preparation: version II [J]. Plant Mol. Biol. Rep., 1983, 1(4): 19-21.

[11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acid Res., 1990, 18: 6531-6535.

(上接第 259 页)

染还将在较高速度上持续一定时间。因此, 今后在继续加大对废水的处理和利用的同时, 应着重加强对废气和固体废弃物的排放控制和污染治理, 努力降低工业“三废”EKC 的峰值和曲率。

总体看来, 山东省的环境质量状况不容乐观, 经济增长与保护环境压力仍较大。到目前为止, 山东省的经济增长并未对环境产生显著的改善作用。这主要是由于山东省正经历着工业化的增长阶段, 工业尤其是重工业, 如能源、化工、机械、电子等在经济中占的比重不断攀升, 势必对环境质量造成了一定的压力。随着人均 GDP 的增长, 山东省工业“三废”所造成的环境污染将呈扩大趋势, 在未来相当长的一段时期内仍继续肩负发展经济和保护环境的双重重任。

环境质量的改善不会随着经济的增长而自动发生。缓和工业经济发展与环境保护之间的矛盾, 促进山东省环境质量改善的根本途径是转变经济增长方式, 提高能源和资源利用率, 走环境质量与经济增长持续协调发展的新型工业化之路。以循环经济的生态理念为指导思想, 推动工业产业结构优化调整, 淘汰落后的技术工艺, 实现经济增长方式由高能耗、高污染向环保型经济转变。同时, 认真贯彻国家各项环境政策, 加大环境污染治理资金的投入, 加强实施环境综合整治, 努力减少工业“三废”污染物的排放。此外, 环境保护

的基本推动力量是公众, 因此, 加强环境教育和宣传的力度, 提高公众环境意识, 鼓励公众参与, 倡导绿色消费势在必行。

参考文献:

[1] Grossman G M, Krueger A B. Environmental impacts of a North America free trade agreement [M]. Princeton, NT: Woodrow Wilson School, 1992.

[2] Shafik N, Bandyopadhyay S. Economic Growth and Environmental Quality: Time Series and Cross-Country Evidence [C] // World Bank Background Paper for World Development Report 1992. Washington: D C, 1992.

[3] 朱智名. 库兹涅茨曲线在中国水环境分析中的应用[J]. 河海大学学报, 2004, 32(4): 387-390

[4] 谢贤政, 万静, 高毫洲. 经济增长与工业环境污染之间关系计量分析[J]. 安徽大学学报: 哲学社会科学版, 2003, 27(5): 144-153.

[5] 吴开亚, 陈晓剑. 安徽省经济增长与环境污染水平的关系研究[J]. 重庆环境科学, 2003, 25(6): 9-11.

[6] 张晓. 中国环境政策的总体评价[J]. 中国社会科学, 1999(3): 88-98.