

中国石蒜组培苗体细胞无性系变异的 ISSR 和 SRAP 检测

巩 樵¹, 杨亚璐², 周 坚¹

(1. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 南京润亚生物科技发展有限公司, 江苏 南京 210037)

摘 要:以中国石蒜离体培养再生的幼苗为试材,首次采用 ISSR 和 SRAP 分子标记对再生苗的遗传稳定性进行了检测,以探讨体细胞无性系变异情况及成因。结果表明:所选用的 14 条 ISSR 引物共产生 191 条带,其中只有 1 条为多态性条带,并且该条带表现为新增条带;SRAP 标记所选用的 15 对引物共扩增出 219 条带,其中 3 条为多态性条带,表现为共有条带缺失。综合 2 种分子标记检测结果来看,再生植株表现出的体细胞变异率极低(0.97%)。现有数据同时也表明,已建立的离体培养体系在保存中国石蒜种质资源和遗传改良上是稳定、可行的。

关键词:中国石蒜;离体培养;ISSR;SRAP;体细胞无性系变异

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)22-0108-05

石蒜属(*Lycoris*)植物是一类具鳞茎的多年生草本植物,全世界有 20 多种,中国有 16 种,是其主要分布地区^[1]。该属植物观赏和药用价值俱佳。与普通地被花卉相比,它的特点鲜明:花和叶不会同时出现在同一个生长季节;叶有春出型和秋出型 2 种,花只在夏季开放,且形、色变异多样,可弥补夏季花卉品种相对单一的缺点;因此,在西方又称为“魔术花”。其球茎中富含的加兰他敏等药用有效成分,对早期和中期阿尔茨海默症(AD)有较好的疗效,已作为对抗 AD 的批准药物在欧盟和美国等多国上市^[2]。营养体中除了加兰他敏等药用有效成分,淀粉占据了很大比重(40%左右),可以作为工业酒精和糊料的前体。

组织培养在保存种质资源、大规模扩繁有经济价值的植物上应用广泛;但长期培养同一无性系或亚克隆潜藏着体细胞无性系变异的可能^[3],这对保存具有优良性状的植株有一定影响。已有学者应用形态学特征、生理生化指标和 DNA 分子标记等手段在此方面进行了研究^[4-6]。3 种方法中,DNA 分子标记(由于其前瞻性和简便性、有效性)是目前应用最为广泛、有效的评价体系。RAPD^[6]、ISSR^[7]、SSR^[8]、AFLP^[9]等分子

标记均有助于检测组培苗体细胞无性系变异的报道,ISSR 标记以其共显性、DNA 的起始量低、引物通用、得到的位点信息丰富而广为使用^[7,10-11]。SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) 标记是一种基于 PCR 技术的新的分子标记^[12],其上、下游引物分别针对阅读框(ORFs)中的外显子和内含子扩增,具有共显性、多态性高、在基因组中分布均匀和重复性好等优点;在种质资源鉴定、遗传图谱构建、标记和克隆重要性状基因等方面广泛应用;Budak 等^[13]的研究结果表明,SRAP 标记是唯一能将 15 种不同基因型的野牛草(*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Englem.)区分开来的标记。因此,SRAP 更适合于检测亲缘关系比较近或无性系内的差异;目前,还未见有用 SRAP 标记检测体细胞无性系变异的报道。

离体培养过程中,无论是减少体细胞无性系变异,以获得具有优良性状、遗传上稳定的再生植株,还是利用体细胞无性系变异以获取新的遗传性状,快速有效鉴定扩繁后代中是否发生体细胞无性系变异对于大规模扩繁至关重要;而且良好的遗传转化体系也需要稳定的组织培养体系。石蒜属植物中,多个种的组培体系已建立^[14-16],而体细胞无性系变异这个组培过程中的潜藏问题却一直未有探索。该研究对已建立的中国石蒜离体腋芽再生体系,应用 2 种分子标记(ISSR 和 SRAP),对连续培养 27 个月的子代再生植株的遗传稳定性做了深入分析,以期对检测已确立的培养体系的稳定性提供理论依据,同时希望可以为石蒜属植物种质资源保存和遗传改良等操作提供参考。

第一作者简介:巩樵(1981-),男,在读博士,现主要从事石蒜属植物发育生物学研究工作。E-mail:tea_gl@126.com。

责任作者:周坚(1961-),男,博士,教授,现主要从事植物发育生物学研究工作。E-mail:zhiwu@njfu.edu.cn。

基金项目:南京林业大学 2009 年优秀博士学位论文创新基金资助项目(163010079);江苏省教育厅推广资助项目(JH 07-012);镇江市科技局资助项目(NY2008034)。

收稿日期:2011-08-03

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国石蒜种球采自江苏宝华山,取回后移栽至试验田备用。

1.2 试验方法

1.2.1 离体培养 参照林纯瑛等^[16]的培养方法并修改。将带基盘的鳞叶接种在 MS 培养基中,附加 BA 3 mg/L、NAA 0.1 mg/L、30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂,以诱导芽产生。增殖培养基:MS 培养基附加 BA 3 mg/L、NAA 0.5 mg/L、45 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂。生根培养基:MS 培养基附加 NAA 0.2 mg/L、30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂。以上培养基调 pH 5.7。121℃ 高压灭菌 20 min。培养环境:(25±2)℃;40 W 白色荧光灯 16 h 光照;光密度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2.2 取材 上述组培苗每 3 周继代 1 次,至取材前已培养 27 个月。从来源于同一供体中国石蒜母球诱导产生的 42 棵再生植株中随机抽取 16 棵,作为体细胞无性系变异分析的材料。样本编号:C1~C16。

1.2.3 基因组 DNA 提取 参照 Doyle 等^[17]方法,从组培苗的幼嫩叶片中提取基因组 DNA,并用 RNase-A (Takara 公司)去除基因组中的 RNA。基因组 DNA 的完整性用 0.8% 琼脂糖胶检测,浓度经紫外分光光度计测定,最终稀释至 10 ng/ μL , -30℃ 储存备用。将各材料的 DNA 抽取少量混合在一起,分别建立 2 种分子标记的 PCR 体系。从 40 条 ISSR 引物和 72 对 SRAP 引物中筛选到稳定性和重复性较好的 14 条 ISSR 引物和 15 对 SRAP 引物进行后续试验分析。

1.2.4 ISSR 和 SRAP 体系的建立 优化后的 ISSR-PCR 条件,20 μL 反应体系中包含:10 ng 模板 DNA, 0.5 U *Taq* 酶(Promega 公司),1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Primer, 1×buffer, 用无菌水补齐至 20 μL 。扩增在 Eppendorf mastercycler gradient PCR 仪上进行,程序如下:95℃ 预变性 5 min;变性、复性、延伸反应;其中 95℃ 变性 45 s, 54.5℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 循环;72℃ 延伸 5 min。4℃ 保存。优化后的 SRAP-PCR 条件,20 μL 反应体系中包含:10 ng 模板 DNA, 0.5 U *Taq* 酶(Promega 公司), 2 mmol/L Mg^{2+} , 0.25 mmol/L dNTPs, 上游引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 1×buffer, 用无菌水补齐至 20 μL 。扩增在 Eppendorf mastercycler gradient PCR 仪上按如下程序进行:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min, 35℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 5 个循环;之后 35 个循环, 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 5 min;4℃ 保存。

1.2.5 扩增产物的检测 ISSR 反应扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺胶检测, SRAP 反应产物用 8% 变性聚丙烯酰胺胶检测。电泳过程在 BIO-RAD Mini Protean 3 Cell 垂直电泳槽中进行, 1×TAE 电极液中恒压

150 V 电泳约 1.5 h;以 100 bp DNA Ladder Marker (Takara 公司)作为分子量标记。经固定、染色、显色、终止反应后,在 UMAX Powerlook 2100XL 型彩色扫描仪上扫描成像记录。

1.2.6 数据统计及分析 分别统计 2 种标记的电泳条带,对分子量大小在 100~1 500 bp 内的清晰、稳定的条带进行统计。同一迁移率的扩增条带按有带记为 1, 无带记为 0, 建立原始二元数据矩阵。然后,基于 Jaccard's 相似系数^[18]及遗传距离绘制遗传多样性的 UPGMA 聚类图。制图在 NTSYS-PC(2.10e)软件中进行。综合 ISSR 和 SRAP 2 种分子标记的结果,对组培再生苗中体细胞无性系变异情况做全面分析。

2 结果与分析

2.1 离体培养的形态学过程

结合目测和体式解剖镜的观测结果,中国石蒜的离体再生过程可以分为 5 个典型发育阶段(图 1),依次是:双鳞叶外植体、腋芽原基突起、再生鳞叶形成、多层鳞叶小球茎和有根小球茎。

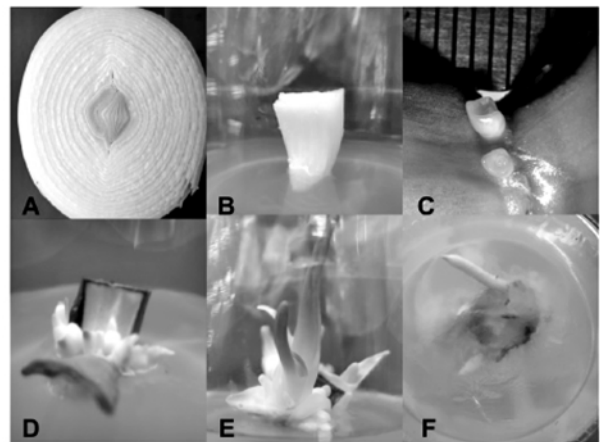


图 1 中国石蒜离体培养的形态学发生过程

注:A:野生球茎;B:双鳞叶外植体;C:腋芽原基突起;D:形成再生鳞叶;E:多层鳞叶小球茎;F:有根小球茎。

Fig. 1 *In vitro* morphogenesis of *L. chinensis*

Note: A: Wild bulb of *L. chinensis*; B: Twin-scale explant; C: Axillary bud primordium bulged out the surface of the scale; D: Regenerated scale formed; E: Multi-scales coated bulb; F: Regenerated bulb with root.

2.2 再生植株的 ISSR 标记分析

从 40 条 ISSR 引物中选取了 14 条引物对供试样本进行了扩增,引物及扩增片段信息见表 1。由表 1 可知,中国石蒜产生 191 个可计分子条带,平均每个引物产生 13.6 条带。扩增片段的分子量集中在 0.2~1.5 kb 之间。综合来看,9# (ISSR-33) 引物产生的条带数最多。8# (ISSR-62) 引物扩增的条带最少,只产生 6 条带。14 条引物中,只有 1# (ISSR-4) 引物产生 1 条多态性条带,表现在凝胶上为新扩增条带;多态条带比例是 0.52%。

表 1
Table 1
再生植株体细胞无性系变异的 ISSR 标记检测
ISSR primers used to analysis the micropropagated plantlets

序号 No.	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence 5' to 3'	扩增总条带数 Number of amplified bands	单态性条带 Number of monomorphic bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	条带所在分子量区间 Fragments size range/kb
1	ISSR-4	(AC)8AG	17	16	1	
2	ISSR-22	(AC)8AA	21	21	-	
3	ISSR-24	(AC)8TC	17	17	-	
4	ISSR-44	(AC)8GA	13	13	-	
5	ISSR-46	(AC)8GG	14	14	-	
6	ISSR-47	(AC)8GT	12	12	-	
7	ISSR-61	(AG)8GT	9	9	-	
8	ISSR-62	(AG)8CA	7	7	-	0.2~1.5
9	ISSR-33	(AG)8AT	21	21	-	
10	ISSR-35	(AG)8TA	17	17	-	
11	ISSR-36	(AG)8TC	12	12	-	
12	ISSR-31	(TG)8TT	7	7	-	
13	ISSR-8	(ATG)6	11	11	-	
14	ISSR-39	(ACG)6	13	13	-	
总计 Total			191	190	1	
多态条带比例 Percentage of polymorphic bands					0.52%	

2.3 再生植株的 SRAP 标记分析

15 对 SRAP 引物共计扩增出 219 条条带,平均每对引物产生 14.6 条带。5 对 (me4+em4) 和 13 对 (me6+em4) 引物组对材料扩增产生的条带最多,平均在 20 条;2 对 (me2+em8) 和 10 对 (me5+em5) 引物产生的条带最少。扩增片段的分子量主要集中在 0.2~1.5 kb。从带型上看,只有 15 对 (me8+em5) 引物检测出 3 条多态性带;多态比例为 1.36%(表 2),属于共有条带缺失(图 4,B),且多态性条带发生在同一个再生植株上。

表 2
Table 2
再生植株体细胞无性系变异的 SRAP 标记检测
SRAP primers used to analysis the micropropagated plantlets

序号 No.	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence 5' to 3'	扩增总条带数 Number of amplified bands	单态性条带数 Number of monomorphic bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	条带所在分子量区间 Fragments size range/kb
1	me2+em4	TGAGTCCAAACCGAGCGACTGCGTACGAATTGTA	15	15	-	
2	me2+em8	TGAGTCCAAACCGAGCGACTGCGTACGAATTCTG	6	6	-	
3	me3+em8	TGAGTCCAAACCGAATGACTGCGTACGAATTCTG	13	13	-	
4	me4+em3	TGAGTCCAAACCGACCGACTGCGTACGAATTGAC	17	17	-	
5	me4+em4	TGAGTCCAAACCGACCGACTGCGTACGAATTGTA	20	20	-	
6	me4+em5	TGAGTCCAAACCGACCGACTGCGTACGAATTAAC	16	16	-	
7	me5+em1	TGAGTCCAAACCGAAGGACTGCGTACGAATTAAT	17	17	-	
8	me5+em3	TGAGTCCAAACCGAAGGACTGCGTACGAATTGAC	11	11	-	
9	me5+em4	TGAGTCCAAACCGAAGGACTGCGTACGAATTGTA	14	14	-	0.2~1.5
10	me5+em5	TGAGTCCAAACCGAAGGACTGCGTACGAATTAAC	6	6	-	
11	me5+em8	TGAGTCCAAACCGAAGGACTGCGTACGAATTCTG	14	14	-	
12	me6+em1	TGAGTCCAAACCGTAAGACTGCGTACGAATTAAT	17	17	-	
13	me6+em4	TGAGTCCAAACCGTAAGACTGCGTACGAATTGTA	18	18	-	
14	me7+em6	TGAGTCCAAACCGTCCGACTGCGTACGAATTGCA	15	15	-	
15	me8+em5	TGAGTCCAAACCGGTGCGACTGCGTACGAATTAAC	20	17	3	
总计 Total			219	216	3	
多态条带比例 Percentage of polymorphic bands					1.37%	

2.4 基于 2 种分子标记的遗传相似性和聚类分析

整体来看,2 种标记的结果都将供试材料聚为 2 支,只在 1 个单株上的少数位点上发生了微小的变异。基于 ISSR 标记的 UPGMA 聚类图(图 2),16 棵组培苗内的遗传相似性高达 99%;而基于 SRAP 标记的 UPGMA 图(图 3),材料的遗传稳定性都在 98%以上。

基于该二点,一方面说明所选的 16 棵再生苗经过 27 个月的连续培养后依然保持了较高的遗传稳定性,基本未发生体细胞无性系变异;另一方面可以间接说明已建立的离体培养体系对于长期、大规模培养中国石蒜是可行的。

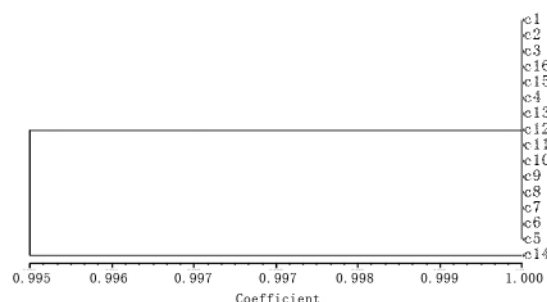


图2 16棵再生植株基于ISSR分子标记结果的相似系数的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of the genetic relationship of 16 regenerated plantlets of *L. chinensis* using similarity coefficients based on ISSR analysis

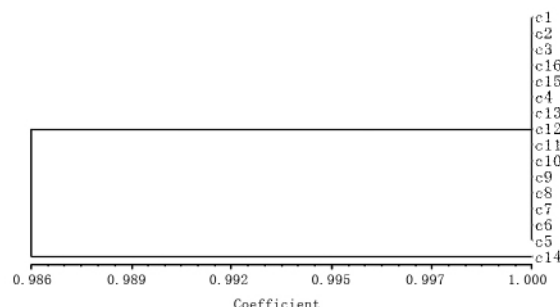


图3 16棵再生植株基于SRAP分子标记结果的相似系数的聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of the genetic relationship of 16 regenerated plantlets of *L. chinensis* using similarity coefficients based on SRAP analysis

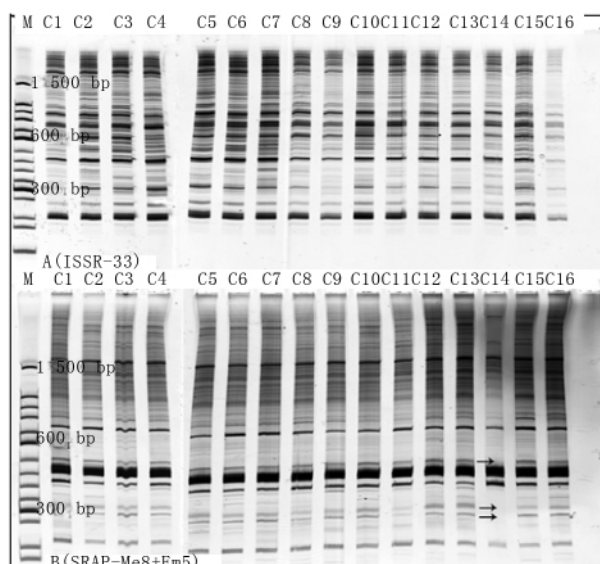


图4 2种标记的代表性引物(ISSR-33, SRAP-Me8+Em5)对16棵再生植株的体细胞无性系变异的电泳检测

注: C1~C16代表16棵中国石蒜再生植株。M代表50 bp分子量marker。箭头所示为缺失共有条带。

Fig. 4 Electrophoretic gel separation of the amplification products by ISSR primers (ISSR-33) and SRAP primer (SRAP-Me8+Em5)

Note: C1 to C16, respectively, represent the 16 regenerated plantlets of *L. chinensis*. M shows the 50 bp molecular size marker. Arrow shows missing of the original band.

3 讨论与结论

石蒜属植物的染色体数目和核型多变,是研究发育生物学、细胞遗传学的优秀试验材料,具有良好的理论研究价值^[19];而其药用价值和多变的花型、花色又表现出巨大的经济开发潜力。该试验选取的中国石蒜是石蒜属植物中适应性最广、营养体最大、淀粉含量较高的一个种,糊料、生物农药的开发是其潜在的应用方向。合理开发利用这个中国特有的植物种质资源,积极改良该种属植物使其尽快品种化、商业化是目前育种工作的重要任务,而稳定的组培体系是育种工作的基础。

该试验选取了14条ISSR引物和15对SRAP引物,在基因组的不同位点上对供试材料进行了遗传稳定性检测。结果表明,2种分子标记检测出的多态位点数(变异率)都低于1%;极低的变异率说明已建立的培养体系在保存该种种质资源和后续遗传改良上是稳定、可行的。这与Shu Q Y等^[20]对黑桤(*Robinia pseudoacacia* L.)离体培养中遗传稳定性的研究结果相似。现有文献表明,诱导顶芽或腋芽形成离体再生植株中发生体细胞变异的几率较低^[9-10, 20-21];而先经过愈伤组织培养,再从中发生器官建成的体细胞变异率较高^[11]。相对于细胞培养^[22-23]、愈伤组织培养^[11]或体胚发生^[24],诱导顶芽或腋芽形成再生植株的扩繁技术是目前最稳定的、保持优良性状的离体培养方式。

从凝胶上看,共有条带缺失或产生新增条带是主要的变异类型。共有条带缺失可能是因为在供体植株中已发生亲本杂合性状分离(Segregation of parental heterozygosity)^[25];另外,基因组不同位点中,有些位点容易发生变异而有些位点相对保守也可能导致条带缺失。这在对水稻^[26]等其它栽培作物的体细胞无性系变异研究中也得到了证实。新增条带可能是因为在培养过程中发生了基因扩增或基因迁移(De novo genomic changes)^[25]。此外,2种分子标记所检测出的总位点数也有差异,SRAP标记的检测位点数(219)多于ISSR标记(191),这表明SRAP标记对变异检测的区分度和有效性好于ISSR标记。相对于ISSR,SRAP只对ORFs内的序列扩增,在表型没有明显变异的情况下,理论上也应获得较低的变异率。

综上所述,该研究在建立中国石蒜的离体培养体系的基础上,首次用ISSR和SRAP 2种分子标记对培养了27个月的组培再生苗的体细胞无性系变异情况进行了检测。结果表明,以腋芽分枝再生方式形成的子代组培苗表现出极低的变异率。该试验的组培体系可以稳定地保存该种的种质资源,同时也为遗传改良等其它操作积累经验。

参考文献

- [1] Tae K, Ko S. A taxonomic study on the genus *Lycoris* (*Amaryllidaceae*) [J]. Korean Journal of Plant Taxonomy (Korea Republic), 1996, 26(1): 19-35.

- [2] 马振英, 赵文丽. 氢溴酸加兰他敏获得美国批准[J]. 国外医学(药学分册), 2001, 28(6): 378.
- [3] Larkin P, Scowcroft W. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 1981, 60(4): 197-214.
- [4] Mangolin C, Prioli A, Machado M. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) [J]. Biochem. Genet., 1997, 35(5): 189-204.
- [5] Bouman H, De Klerk G. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(1): 111-117.
- [6] Palombi M, Lombardo B, Caboni E. In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers[J]. Plant Cell Rep., 2007, 26(4): 489-496.
- [7] Joshi P, Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(1): 22-26.
- [8] Palombi M, Damiano C. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev)[J]. Plant Cell Rep., 2002, 20(11): 1061-1066.
- [9] Sharma S, Bryan G, Winfield M, et al. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds; a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment[J]. Planta, 2007, 226(6): 1449-1458.
- [10] Martins M, Sarmiento D, Oliveira M M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers[J]. Plant Cell Rep., 2004, 23(7): 492-496.
- [11] Yuan X, Dai Z, Wang X, et al. Assessment of genetic stability in tissue-cultured products and seedlings of *Saussurea involucrata* by RAPD and ISSR markers[J]. Biotechnol Lett., 2009, 31(8): 1279-1287.
- [12] Li G, Quiros C. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2): 455-461.
- [13] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(2): 280-288.
- [14] 王光萍, 陈英, 周坚, 等. 长筒石蒜鳞片诱导和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(4): 457-460.
- [15] Huang L C, Liu D M. Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture[J]. Scientia Horticulture, 1989, 40(2): 145-152.
- [16] 林纯瑛, 马溯轩. 金花石蒜之鳞片组织培养繁殖[J]. 中国园艺(台湾), 1987, 33(4): 255-264.
- [17] Doyle J, Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemistry, 1987, 19: 11-15.
- [18] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale[J]. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 1908, 44(163): 223-269.
- [19] He Q, Cui S, Gu J, et al. An analysis of floral transcription factors from *Lycoris longituba*[J]. Genomics, 2010, 96(2): 119-127.
- [20] Shu Q Y, Liu G S, Qi D M, et al. An effective method for axillary bud culture and RAPD analysis of cloned plants in tetraploid black locust[J]. Plant Cell Rep., 2003, 22(3): 175-180.
- [21] Renau-Morata B, Nebauer S G, Arrillaga I, et al. Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*; consequences of axillary bud breaking[J]. Tree Genetics and Genomes, 2005, 1(1): 3-10.
- [22] Brown P T H, Lange F D, Kranz E, et al. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1993, 237(3): 311-317.
- [23] Plader W, Malepszy S, Burza W, et al. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. Euphytica, 1998, 103(1): 9-15.
- [24] Leroy X, Leon K, Charles G, et al. Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs[J]. Plant Cell Rep., 2000, 19(11): 1102-1107.
- [25] Guo W, Gong L, Ding Z, et al. Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers[J]. Plant Cell Rep., 2006, 25(9): 896-906.
- [26] Xie Q, Oard J, Rush M. Genetic analysis of an unstable, purple-red hull rice mutation derived from tissue culture[J]. J. Hered., 1995, 86(2): 154-156.

Detection of Somaclonal Variation in Micropropagated Plants of *Lycoris chinensis* by ISSR and SRAP Markers

GONG Lei¹, YANG Ya-jun², ZHOU Jian¹

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037; 2. Nanjing Rare Bio-tech Development Limited Company, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract: Taking *Lycoris chinensis* which was regenerated from axillary bud *in vitro* culture seedling as test material, genetic stability of micropropagated plantlets that had been cultured for 27 months was assessed by two different PCR-based markers, ISSRs (Inter-simple sequence repeats) and SRAPs (Sequence-related amplified polymorphisms) markers. The 14 ISSR primers yielded a total of 191 bands (1 novel band) in *L. chinensis*. SRAP markers were more discriminating than ISSR markers, whereas 15 SRAP primers gave a total of 219 bands (3 polymorphic bands) in micropropagated plants of *L. chinensis*. The extremely low mutation rate (0.97%) suggested that the established system was appropriate for clonal propagation and preservation of germplasm of *Lycoris*.

Key words: *Lycoris chinensis*; axillary bud *in vitro* culture system; ISSR; SRAP; somaclonal variation