

红掌组培再生植株中表型突变体的 ISSR 分析

张运峰¹, 胡芬²

(1. 唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学 生命科学院, 河北 唐山 063000)

摘要:以红掌组培再生植株中发生表型突变的植株为试材, 采用 PCR 多态性分析的方法, 研究组织培养再生植株中产生的表型变异株的基因变化。结果表明: 利用筛选的 8 条 ISSR 引物进行 PCR 多态性分析, 共获得 73 条扩增产物, 其中多态性条带 22 条, 多态性程度为 30.2%。聚类树状图表明, “亚丽桑娜”品种及其组织培养再生植株的遗传距离在 0.0274~0.3636 之间, 它们之间具有非常相似的遗传背景。其中变异株 V1 与亲本相比, 在基因型上的变化不显著, 而变异株 V2、V3、V4 的基因型与亲本显著不同, 有些条带消失, 并产生了一些新的条带; 在组织培养再生植株中产生的表型变异株可能是组织培养过程中通过遗传重组产生的新基因型, 它们将为花卉育种提供一种新的种质资源来源。

关键词:红掌; ISSR; 突变体; 组织培养

中图分类号:S 682.1⁺4; Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0101-04

红掌 (*Anthurium andraeanum* Linden) 也被称为火鹤、安祖花、花烛等, 是仅次于热带兰的世界第二大宗热带花卉商品^[1]。目前, 红掌植株通过组织培养进行繁殖, 研究组织快繁过程中出现的表型变异株是否由于基因型发生改变而产生对于红掌的遗传育种具有重要的意义。自 1975 年, Ahloowalia^[2]发现黑麦组织培养过程中会出现变异的现象以来, 又陆续发现矮牵牛、香果树和大岩桐等在连续的组织培养过程中出现了遗传变异^[3-5]。近年来, 在国内外植物细胞工程上出现了利用分子生物技术检测再生植株的遗传稳定性的报道^[6-10], 但多数研究集中在以 RAPD 为基础。通过比较红掌组培再生植株的形态、生理特征, 筛选差异株型, 并利用 ISSR 技术分析红掌再生植株中表型突变体的遗传变异, 国内外尚鲜见研究报道。该研究建立了红掌的 ISSR 分析体系, 明确了表型变异植株和亲本的基因型差异, 以期为组织培养方式作为红掌育种技术提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为红掌品种“亚丽桑娜”及其气生根段再

生植株, 由唐山师范学院细胞工程实验室栽培和管理。

供试试剂有无水乙醇、氯仿、异丙醇、十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB) 均为国产分析纯, Taq DNA 聚合酶、dNTP mixture、DNA marker、凝胶回收试剂盒等购于上海生物工程有限公司。用于 ISSR-PCR 分析的 8 条 ISSR 引物是根据植物基因组 DNA 重复序列的特征, 从加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 提供的 100 条 ISSR 引物 (<http://www.michael.smith.ubc.ca>) 中选出, 由上海生物工程有限公司合成。

供试仪器有多用途台式冷冻离心机 (Thermo 公司)、梯度 PCR 仪 (德国 Biometra 公司)、数码照像机 (日本索尼)、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad) 等。

1.2 试验方法

1.2.1 表型差异植株筛选 对组培再生植株进行叶形、花期和花色调查, 并利用方格法测定处于相同生育期和相同生长部位叶片的叶长、叶宽、叶厚和叶开口比, 每株选取 3 片成熟叶片, 每年测定 3 次, 连续测定 5 年以上。

1.2.2 红掌 ISSR-PCR 扩增体系及优化 采用改良 CTAB 法^[11]提取红掌基因组 DNA。以“亚丽桑娜”DNA 为试验材料, 摸索 ISSR 反应体系中最适退火温度、dNTPs、Mg²⁺ 和引物浓度。在 25 μL ISSR 反应体系中, dNTPs 浓度设为 50、100、150、200、250 μmol/L, 引物浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L, Mg²⁺ 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L; 温度为 45、47、49、51、53℃。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 在 Bio-Rad 凝胶成像系统、Quantity One 软件辅助下分析检测结果。根据分析结果, 建立适宜红掌 ISSR 分析的优化体系。

第一作者简介:张运峰 (1982-), 男, 硕士研究生, 实验师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: yunfengzhang1982@126.com.

责任作者:胡芬 (1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: ihufen@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81302323); 河北省自然科学基金资助项目 (C2014209140)。

收稿日期:2014-05-27

1.2.3 红掌组织培养再生植株的 ISSR-PCR 分析 利用优化的 ISSR-PCR 反应体系从 ISSR 引物中筛选多态性较强、条带稳定清晰的引物,用于红掌组织培养再生植株的 ISSR-PCR 分析。

1.3 数据分析

对电泳谱带进行统计,有条带记为 1,无条带记为 0。计算多态性条带所占有的比例,并利用 DPS 7.05 数据处理系统进行遗传相似系数测定和 DPS 聚类分析,建立聚类树状图,分析亲本和组织培养再生植株中表型变异株和非表型变异株之间的遗传差异。

2 结果与分析

2.1 红掌亲本和表型变异植株形态

通过多年的筛选,发现 4 株与亲本“亚丽桑娜”品种具有显著表现型差异的植株(图 1)。由表 1 可知,V1 的叶片显著增厚,厚度增加 50%,花期显著增长,增加了 45 d,且整株粗壮;V2、V3 和 V4 叶片的形态都发生了变化,V2 和 V3 为卵形叶,V4 为披针形叶;V3 和 V4 的叶片开口则明显变宽。在近 5 年的培育过程中,这 4 株变异株的表型稳定。

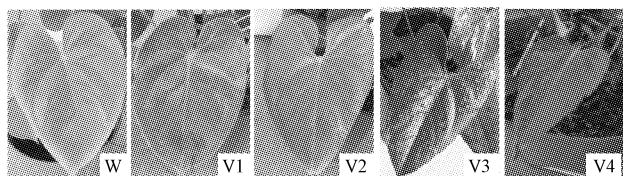


图 1 “亚丽桑娜”(W)与其组培再生植株表型变异株(V1~V4)的叶形态

Fig. 1 The leaf shape of Arizona (W) and its phenotypic variants (V1-V4) among tissue culturing regeneration plants

表 1 “亚丽桑娜”(W)与其组培再生植株表型变异株(V1~V4)的差异比较

Table 1 Variance of phenotype between Arizona (W) and its tissue culturing regeneration plants (V1-V4)					
样品	叶长/叶宽 比值	叶的开口比值	叶厚 /mm	叶形态	花期/d
W	1.41ab	3.15c	0.40a	盾形	105a
V1	1.25bc	3.21c	0.60b	盾形	150b
V2	1.35bc	3.12c	0.47a	卵形	110a
V3	1.30c	3.60b	0.45a	卵形	115a
V4	1.53a	6.00a	0.37a	披针形	110a

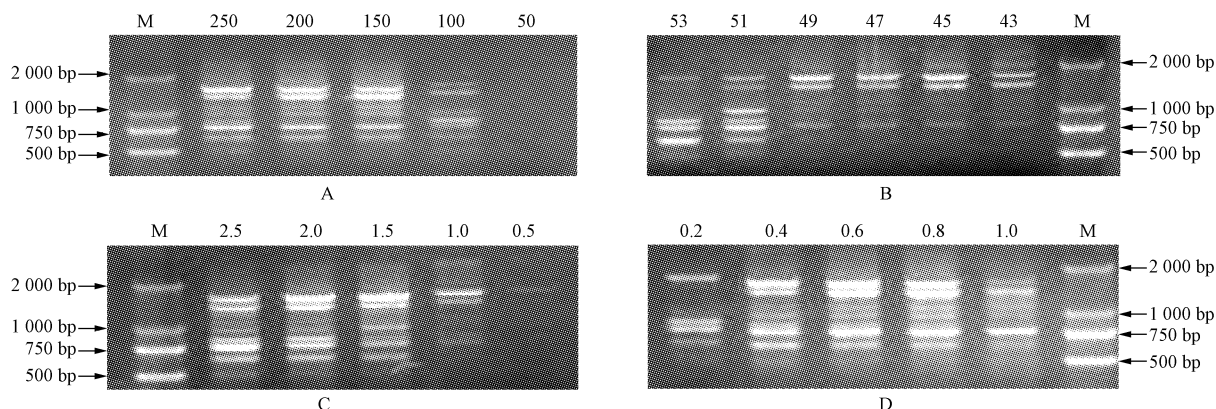
注:不同小写字母表示显著性分析 $\alpha=0.05$ 。

Note: Different lowercase letter shows significant analysis at $\alpha=0.05$.

2.2 红掌 ISSR-PCR 反应体系的优化

从图 2A 可以看出,dNTP 的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时条带最多而清晰,107 引物比较适合的退火温度约在 51 $^{\circ}\text{C}$ (图 2B);*Taq* DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶,选择合适的 Mg^{2+} 浓度,对 PCR 反应至关重要;在试验中发现,2.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 离子浓度下扩增条带清晰(图 2C);而引物浓度梯度扩增结果表明引物浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 较适宜(图 2D)。

综合以上试验结果,最终确定了 ISSR 引物 107 引物的适宜反应体系,即 25 μL 反应体系中含 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs,0.8 $\mu\text{mol/L}$ 引物,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶(上海生工),1 \times PCR 反应缓冲液,2.5 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 ,20 ng DNA 为模板;扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,51 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。利用建立的红掌 ISSR-PCR 优化反应体系,从 37 条引物中筛选出 8 条能够产生清晰、稳定谱带的 ISSR 引物,并摸索出了这些引物的适宜退火温度(表 2)。



注:A: dNTPs 浓度($\mu\text{mol/L}$): 50、100、150、200、250;B: 温度($^{\circ}\text{C}$): 43、45、47、49、51、53; C: Mg^{2+} 浓度(mmol/L): 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5;D: 引物浓度($\mu\text{mol/L}$): 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0;M: DL 2 000,DNA 标准分子量。下同。

Note: A: dNTPs ($\mu\text{mol/L}$): 50,100,150,200,250;B: Temperature ($^{\circ}\text{C}$): 43,45,47,49,51,53; C: Mg^{2+} (mmol/L): 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5;D: primer ($\mu\text{mol/L}$): 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0;M: DL 2 000,DNA standard molecular weight marker. The same below.

图 2 红掌 ISSR-PCR 扩增体系的优化

Fig. 2 Optimization of ISSR-PCR reaction system for *Anthurium andraeanum*

表 2

适宜红掌 ISSR-PCR 分析的引物

Table 2

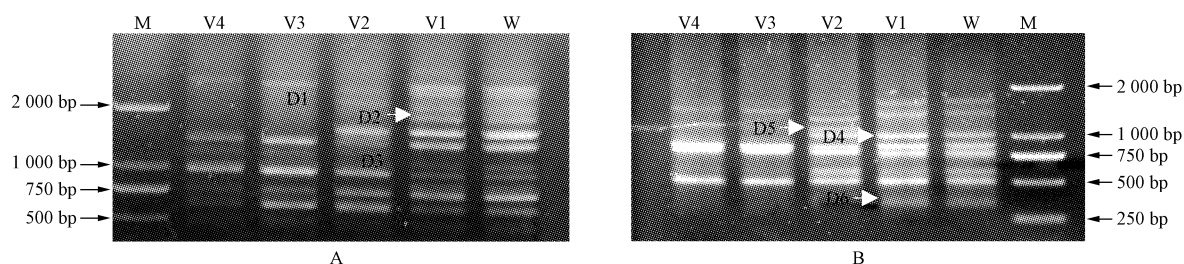
Suitable primers for ISSR analysis of *Anthurium andraeanum*

引物编号 Primer No.	引物序列 5'~3' Sequence of primer 5'~3'	退火温度 Annealing temperature/°C	总条带数	多态带数	多态性几率/%
102	CTCTCTCTCTCTCTT	45.9	6	1	16.7
103	GAGAGAGAGAGAGAAAC	52.8	7	2	28.6
104	ATGATGATGATGATG	48.0	8	3	37.5
107	GACAGACAGACAGACA	54.0	10	3	30.0
108	CACACACACACAAC	60.0	13	4	27.3
117	AGAAGAAGAAGAAGAAGA	53.0	8	3	37.5
121	GTGCGTGCGTGCGTGC	59.5	9	2	22.2
841	GAGAGAGAGAGAGAAGG	59.4	12	4	33.3
总数			73	22	30.1

2.3 红掌组培再生植株中表现型变异株的 ISSR-PCR 分析

通过对红掌“亚丽桑娜”品种及其组织培养再生植株中 4 个表型变异株进行 ISSR-PCR, 由图 3 可知, 扩增条带分子量均在 500~2 000 bp, 8 条 ISSR 引物共扩增出 73 条谱带, 平均每条引物扩增出 9.1 条带, 其中存在多态性的条带数为 22 条, 多态性条带比例为 $P=30.2\%$ (表 2)。多态性条带是样本中的非共有条带, 如在引物

108 和 841 的扩增产物中, D1 和 D5 为表型变异株 V2 所特有; D2 和 D3 仅在亲本“亚丽桑娜”和表型变异株 V1 中出现; D4 和 D6 则同时出现在了亲本“亚丽桑娜”和表型变异株 V1 和 V2 中, 在 V3 和 V4 中消失(图 3)。以上结果反映出红掌“亚丽桑娜”品种及其组织培养再生植株中的表型变异株间存在丰富的遗传多样性, ISSR 标记可以很好地揭示出它们之间遗传差异。



注: A: 引物 108; B: 引物 841; D: 差异条带。

Note: A: primer 108; B: primer 841; D: different band.

图 3 红掌“亚丽桑娜”品种(W)及其组织培养再生植株中表型变异株(V1~V4)的 ISSR-PCR 分析。

Fig. 3 ISSR-PCR analyses of *Anthurium andraeanum* Arizona (W) and phenotypic variants (V1-V4) among its tissue culturing regeneration plants.

2.4 基于 ISSR 的红掌组织培养再生植株中表型变异株的遗传多态性分析

由图 4 可知, 试验材料间的遗传距离在 0.0274~0.3636 之间, 说明试验材料间的遗传背景基本相同。根据聚类分析结果, 当遗传距离的阈值为 0.14 时, 可分为 3 类: 第 1 类包括 W、V1; 第 2 类包括 V2; 第 3 类包括 V3、V4; 遗传系数为 0.30 时可分为 2 类, 第 1 类为 W、V1 和 V2, 第 2 类为 V3、V4。以上结果表明, 与 W 相比, V4 的遗传分化最大, 其次为 V3, 而 V2 和 V1 与 W 的遗传差异较小。推测 V3 和 V4 可能是组培后产生的新型基因型, 已经开始出现了分化。V1 和 W 的遗传距离差距极小, 仅有 0.0274, 由此推断 V1 的基因型与亲本基因型基本相同。

3 结论与讨论

该试验通过摸索确定了 ISSR-PCR 的最优体系。但

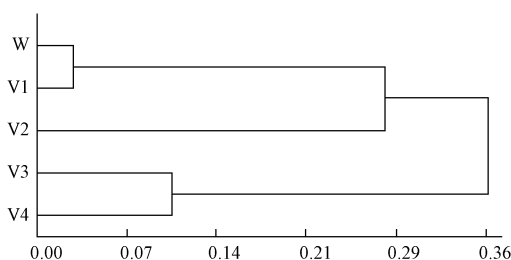


图 4 “亚丽桑娜”品种(W)与其组培表型变异株(V1~V4)聚类分析结果

Fig. 4 Cluster analysis of Arizona (W) and phenotypic variants (V1-V4) among its tissue culturing regeneration plants

在一般的 PCR 反应中, Mg^{2+} 浓度在 1.5~2.0 mmol/L 是比较合适的, 而在该优化体系中 Mg^{2+} 浓度达到了 2.5 mmol/L, 表明较高浓度的 Mg^{2+} 可能竞争性的降低了其它因素对 *Taq* 酶活性的影响, 保证了 *Taq* 酶扩增效

率,使有效片段得到最大扩增。 Mg^{2+} 浓度为 1.5、2.0、2.5 mmol/L 时扩增的条带数量相同也说明了这一点。

通过形态比较筛选了 4 株表型突变体植株;建立了红掌的 ISSR 分析技术,并对 4 个表型变异株的基因型差异进行了分析,确定了它们与亲本的亲缘关系:V1 与亲本基因型差异极小,但在表型上却差异明显,具有染色体加倍体的一些特征^[12],V1 可能是亲本的加倍体,但仍需进一步的鉴定;V2、V3、V4 和亲本差异较大,亲缘关系较远,可以确定它们为具有新基因型的变异植株。

植物的组织培养技术是一种被广泛应用的快速繁殖方式,其远高于自然突变频率,对植物品种改良和选育新品种具有重要的指导意义^[13]。该试验通过 ISSR 分子标记将表现型有明显差异的红掌组培苗和亲本进行分析比较,其结果与形态比较结果相比基本相符。

ISSR 技术可以实现基因型分析,用于品种间遗传多态性的比较^[14-16],在该试验中,不仅建立了适于红掌的 ISSR-PCR 优化体系,而且成功实现了红掌组织培养再生植株与亲本植株间基因型的分析比较,从理论上证明组织培养也可以产生极少量的遗传变异,确定了利用组织培养技术进行花卉新品种培育的可行性,为探讨组织培养引起红掌基因变异的机理奠定了基础。

参考文献

- [1] Isabelle R S, Philippe L, Lionel G, et al. Specific detection of xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae in Anthurium (*Anthurium andraeanum*) tissues by nested PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1072-1078.
- [2] Ahloowalia B S. Regeneration of ryegrass plants in tissue culture[J]. Crop Sci, 1975, 15: 449-452.
- [3] Yesodi V, Izhar S, Hauschner H, et al. Homologous recombination involving cox2 is responsible for a mutation in the CMS-specific mitochondrial locus of Petunia[J]. Molecular General Genetic, 1997, 255: 106-114.
- [4] 熊丹, 谢伟, 陈发菊, 等. 香果树组织培养过程中遗传变异的 RAPD 分析[J]. 植物生理学通讯, 2008, 1(48): 37-41.
- [5] 胡鑫, 徐全乐. 连续组织培养引起大岩桐再生植株的表型变化[J]. 西北农业学报, 2010, 19(5): 167-170.
- [6] Tang W. *In vitro* regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 163-168.
- [7] Martins M, Sarmento D, Oliveira M M. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers[J]. Plant Cell Reports, 2004, 23: 492-496.
- [8] Valladares S, Sánchez C, Martínez M T, et al. Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23: 492-496.
- [9] Amzad H M, Konisho K, Minami M, et al. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Euphytica, 2003, 130: 233-239.
- [10] 王桂兰, 陈超, 李朝霞, 等. 红掌气生根根段再生快繁体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 297-301.
- [11] 范永山, 刘海英, 李卫国, 等. 利用 CTAB 法提取红掌不同部位基因组 DNA[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(3): 36-38.
- [12] 张志胜, 黎扬辉, 姜蕾, 等. 红掌四倍体的离体诱导及其鉴定[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 729-734.
- [13] Jain S M. Tissue culture-derived variation in crop improvement[J]. Euphytica, 2001, 118: 153-166.
- [14] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波, 等. 应用 ISSR 对 25 个小菊品种进行遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3735-3740.
- [15] 吴振兴, 王慧中, 施农农, 等. 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析[J]. 遗传, 2008, 30(5): 627-632.
- [16] 谷守芹, 范永山, 李坡, 等. 玉米大斑病菌 ISSR 反应体系的优化和遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2008(5): 427-432.

ISSR Analysis of Phenotypic Variants in Tissue Culturing Regeneration Plants of *Anthurium andraeanum*

ZHANG Yun-feng¹, HU Fen²

(1. Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 063000; 2. College of Life Science, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: Taking the phenotypic variants of *Anthurium andraeanum* as material, using method of PCR, the gene changes of phenotypic variants in tissue culture was researched. The results showed that total 73 ISSR markers were acquired with 8 polymorphic ISSR primers which were screened from the 37 ISSR primers, and averagely 9.1 products for each ISSR primer. 22 polymorphic ISSR markers (taking 30.2%) were observed during the research, showing that the genetic changes certainly existed between the tested plants. The genetic distance was 0.0274—0.3636, showing their similar genetic background between them. The clusters analyses showed with UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages) method revealed that V1 had little genotype changes comparing to there parent cultivar Arizona, but V2, V3 and V4 exhibited significant genotype changes. The results showed that new genotype could be generated as new genetic recombination occurs in the tissue culturing.

Keywords: *Anthurium andraeanum*; ISSR; mutagenesis; tissue culture