

# 刺梨四倍体诱导及其 ISSR 分析

王小平<sup>1</sup>, 雍洪俊<sup>1</sup>, 杜晋城<sup>1</sup>, 梁国鲁<sup>2</sup>, 李丛英<sup>1</sup>, 王明霞<sup>1</sup>

(1. 南充市高坪区农业局 果树站, 四川 南充 637100; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 北碚 400716)

**摘 要:**以刺梨为试材, 利用组织培养结合秋水仙素溶液浸泡法诱导刺梨多倍体, 并对四倍体与二倍体进行 ISSR 分析。结果表明: 刺梨诱导芽分化增殖的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L, 诱导率达到 100%, 增殖系数 4.4 以上。用 0.2% 的秋水仙素溶液处理 48 h 诱导率最高, 纯合体诱导率为 24.5%。四倍体与二倍体 ISSR 结果显示扩增条带差异明显, 表明诱导加倍过程中四倍体发生了基因组变异。

**关键词:**刺梨; ISSR; 四倍体

**中图分类号:**S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0158-03

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt.) 系蔷薇科蔷薇属落叶小灌木, 又名刺梨子、木梨子、送春归。刺梨营养价值和药用价值极高, 其果肉中 VC 含量居各类水果之冠, 每 100 g 果肉中含 VC 2 500 mg<sup>[1]</sup>。刺梨被誉为“长寿防癌”的绿色珍果, 含有抗癌物质及 SOD 抗衰老物质, 同时还具有排铅的作用<sup>[2]</sup>。刺梨广泛分布于温带及亚热带地区, 我国野生刺梨主要分布在贵州、云南、四川、湖北、陕西等省, 其中以贵州品种最多。

由于其二倍体植株形态复杂, 果实小, 籽多, 可食部分少。现拟利用秋水仙素溶液诱导多倍体, 以期获得性状优良的材料, 为更好的开发刺梨相关产品打下坚实的基础。同时采用 ISSR 分析刺梨多倍体基因组较二倍体是否发生变异, 为刺梨的多倍体育种提供参考。

**第一作者简介:**王小平(1983-), 男, 四川江安人, 硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail: wxphang@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**梁国鲁(1960-), 男, 重庆酉阳人, 博士, 研究员, 现主要从事果树遗传与育种研究工作。E-mail: Lianggl@swu.edu.cn。

**收稿日期:**2010-05-12

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的刺梨品种来自贵州大学, 为‘贵农 2 号’。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 刺梨离体快繁体系的建立** 外植体灭菌: 选择田间当年生、健壮枝条上带腋芽的茎段为外植体, 剪成 1~2 cm 长的小段, 保证每 1 小段至少有 1 个可萌发的腋芽, 用中性洗涤剂浸泡 10 min, 洗掉表面污渍, 再用自来水冲洗 0.5 h, 滤纸吸干水分后置于超净工作台进行灭菌。超净工作台内, 以 70% 乙醇处理 15 s 和 0.1% 升汞处理 10 min, 无菌水冲洗 4 次。然后接种于分化培养基中, 30 d 后观察统计。刺梨初代和继代培养: 将消毒后的刺梨芽、茎段以及组培苗接种于 MS 附加 6-BA(0、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 IAA(0、0.1、0.2、0.5 mg/L) 的培养基中, 进行最适激素配比的筛选, 共计 20 种处理, 每个处理接各种 10 个, 重复 3 次。

**1.2.2 刺梨四倍体诱导** 利用秋水仙素溶液浸泡法对丛生芽进行处理, 设定 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 等 6 个处理浓度。从刚长出来的 1 cm 的刺梨的丛生芽上取 0.3~0.5 cm 的茎尖, 每种组合处理 30

**Abstract:** Based on the Primer Premier 5.0 software, a pair of specific PCR primers was designed according to promoter sequence of CHS gene of *Petunia hybrida* reported in GenBank(EF199747). A DNA fragment about 0.5 kb was successfully amplified with the genome DNA of *Petunia hybrid* cultivar ‘Midnight’ as template and Taq polymerase as DNA polymerase. The purified fragment of PCR products was ligated with pMD18-T vector, and the sequencing result showed that the length of the promoter of CHS gene of *Petunia hybrid* was 550 bp. Bl2seq analysis revealed that the sequence similarity between the cloned promoter sequence and EF199747 was up to 100%. Online PLACE analysis indicated that it contained cis-elements such as TATA-box, CAAT-box, cap site, anther-box, box1, box2, G-box and TACPyAT-box. And plant expression vector of *pPhCHS::GUS* that fused the promoter of CHS gene of *Petunia hybrida* and marker gene *GUS* was successfully constructed.

**Key words:** *Petunia hybrid*; promoter of CHS gene; cloning; sequence analysis; plant expression vector

株,放于摇床上轻轻摇动使其与秋水仙素溶液充分接触,分别浸泡 24、48、72 h 后,用无菌水清洗 3~5 次,转入到不含有秋水仙素的继代培养基上继续培养,待长势恢复良好,得到完整植株后,用茎尖进行染色体倍性鉴定。确定为四倍体的株系予以保留并扩繁。

1.2.3 刺梨四倍体与二倍体 ISSR 标记 取刺梨四倍体与二倍体组培苗幼叶,改良 CTAB 法提取 DNA,建立 ISSR 优化体系。优化体系:20  $\mu$ L 反应体系中含 10 $\times$  buffer 2.0  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  1.875 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.0 U, dNTPs 0.1 mmol/L, Primer 2.0  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 20 ng。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素对比对刺梨芽诱导和继代增殖的影响

试验表明,当 6-BA 的浓度高于 1.0 mg/L 时,增殖倍数降低,且不定芽平均高度下降,部分苗叶子发黄并干枯。当 6-BA 的浓度为 0.2 mg/L 时,刺梨植株分裂不多,组培苗长势好。低浓度时,不通过愈伤组织可直接萌发新芽,萌芽更早,芽生长更快;高浓度时,愈伤程度加大,经过愈伤组织途径产生芽,萌芽较迟,芽生长缓慢,且变异多,15 d 左右才见明显生长;当 IAA 的浓度高

于 0.2 mg/L 时,组培苗基部多愈伤组织,当不加 IAA 时,刺梨长势不好。综上所述,MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L 最适合刺梨继代增殖的培养基(图 1)。

### 2.2 秋水仙素诱导四倍体

刺梨是一种对秋水仙素敏感的植物,经过秋水仙素处理的材料,都会不同程度的出现死亡的现象。处理时间越长,处理浓度越高,死亡率越高,死亡的大部分材料在秋水仙素溶液处理后起初生长正常,10 d 后,材料变成淡褐色,逐渐死亡,但有部分芽即使变褐后也能在培养 30 d 后分化出芽,那些变褐但受损较轻的材料,切除掉坏死部分,将剩下的组织接种到增殖培养基上也能分化成苗。诱导的时间对苗的成活率也有很大的影响,秋水仙素对刺梨的诱导时间在 48 h 最适宜。

总的来说,刺梨经秋水仙素处理后,生长速度明显减慢。在 0.1%~0.6%这几个浓度中,用 0.2%的秋水仙素溶液处理 48 h 诱导率最高,且得到了较多的纯合体,纯合体诱导率为 24.5%。秋水仙素诱导时常出现嵌合体现象,植株表现为混倍体(2~4 $\times$ ),为防止回复突变,应尽快地进行切割繁殖和筛选四倍体(图 2)。继续多次进行检测,直到四倍体植株逐渐趋于稳定,不再分化出二倍体植株。

### 2.3 四倍体的鉴定

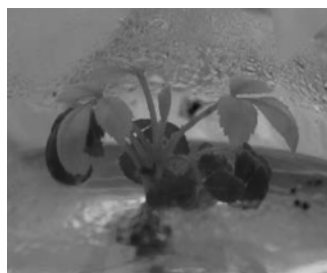


图 1 刺梨二倍体



图 2 刺梨四倍体

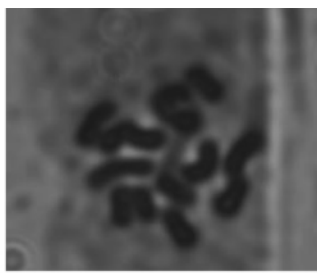


图 3 刺梨二倍体染色体(10 $\times$ 100 倍)

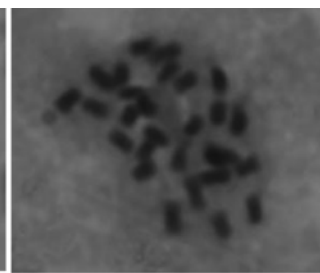


图 4 刺梨四倍体染色体(10 $\times$ 40 倍)

采用体细胞染色体计数法鉴定倍性,该法是鉴定四倍体最直接准确的途径。将自然条件下生长的供试刺梨和未经诱导的离体再生植株的根尖采用去壁低参火焰干燥法,进行染色体的检测,结果发现其染色体数目均为  $2n=2x=14$ (图 3)。经秋水仙素溶液处理后所获得的四倍性变异植株,虽嵌合体比例较高,但同时也获得了不少纯合的四倍体植株,所得四倍体的染色体数目为  $2n=4x=28$ (图 4)。

### 2.4 刺梨四倍体基因组与二倍体比较分析

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 18 条多态性好、条带清晰的引物进行选扩,共扩增出 168 个位点。与二倍体基因组比较,

四倍体缺失位点数为 12 个,占 7.14%,新增位点

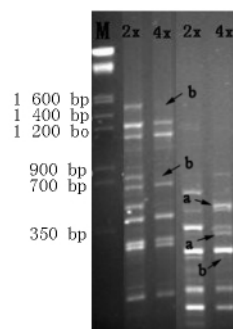


图 5 刺梨四倍体与二倍体 ISSR 比较

注:株:2X:二倍体,4X:四倍体;a:四倍体新增位点,b:四倍体缺失位点。

数为 5 个,占 3%(图 5)。表明刺梨基因组在加倍过程中

进行了部分调整,以适应生存环境的需要。

### 3 结论与讨论

该试验建立了刺梨快繁体系和最佳诱导四倍的秋水仙素浓度,植物生长调节物质是培养基中的关键物质,用量虽小,但在组培中起着重要和明显的作用,生长调节物质的种类和用量对刺梨快繁影响显著。用量过高刺梨叶片发黄干枯长势弱,过低芽分裂少,生长慢。在组织培养中,继代培养是快速繁殖的关键,直接影响着试验进程。诱导刺梨芽分化和继代增殖的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L,诱导率达到了 100%,增殖系数为 4.4 以上。

浸泡处理是秋水仙素对材料作用最直接的方法。研究表明,无菌苗浸泡在秋水仙素溶液中处理后,能产生一定比例的变异,同时,材料的生长也受到不同程度的抑制,甚至死亡。在用不同浓度秋水仙素溶液浸泡刺梨芽的试验中,处理时间和处理浓度对刺梨芽的加倍有决定性的影响,并且处理时间和浓度也影响着处理后刺梨芽的成活。结果表明,用 0.2% 的秋水仙素溶液处理 48 h 诱导率最高,纯合体诱导率为 24.5%。通过试验建立了诱导刺梨四倍体的秋水仙素浓度和时间的组合,为刺梨四倍体的繁殖研究奠定了一定的技术基础。

ISSR 分析结果表明,刺梨多倍体基因组较二倍体发生了一定程度的变异,推测其原因:一是组织培养过程中会导致基因组发生变异;二是多倍体诱导过程中秋水仙素导致基因组发生变异;三是基因组的加倍导致染色体重组<sup>[7]</sup>、反转录转座子的激活<sup>[10]</sup>、甲基化模式的改

变<sup>[8]</sup>,导致基因组发生变异;四是环境选择压力导致其基因组发生变异<sup>[9]</sup>。刺梨二倍体及其同源四倍体刺梨间大部分遗传结构是相同的,甚至无变化,这说明性状差异可能主要是由基因的累加效应产生的,DNA 序列的变化可能也有一定影响<sup>[6]</sup>。

### 参考文献

- [1] 姜静,杨传平,刘桂丰,等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志,2003,22(3):91-93.
- [2] 文晓鹏,邓秀新,樊卫国. 刺梨主要基因型的 RAPD 鉴别[J]. 山地农业生物学报,2003,22(4):317.
- [3] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传学报,2002,24(5):613-614.
- [4] 樊卫国,刘进平,向灵,等. 不同形态氮素对刺梨生长发育的影响[J]. 园艺学报,1998,25(1):27-32.
- [5] 陈红,张绿萍. 刺梨花药愈伤组织的增殖培养[J]. 安徽农业科学,2008,36(11):4413-4414.
- [6] 赵卫国,苗雪霞,黄勇平,等. 桑树二倍体及其同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析[J]. 蚕业科学,2005,31(4):396-397.
- [7] Shaked H, K. Kashkush H, Ozkan M, et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat [J]. Plant Cell,2001,13:1749-1759.
- [8] Salmon N A, Ainouche M L and Wendel J F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina*(Poaceae)[J]. Mol. Ecol,2005,14:1163-1175.
- [9] Gross B L, Rieseberg L H R. The Ecological Genetics of Homoploid Hybrid Speciation [J]. Journal of Heredity 2005,96(3):241-252.
- [10] Shan X, Liu Z, Dong Z, et al. Mobilization of the active MITE transposons mPing and Pong in rice by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.) [J]. Mol. Biol. Evol,2005,22:976-990.

## Tetraploid Induction and ISSR Analysis in *Rosa roxburghii* Tratt

WANG Xiao-ping<sup>1</sup>, YONG Hong-jun<sup>1</sup>, DU Jin-cheng<sup>1</sup>, LIANG Guo-lu<sup>2</sup>, LI Cong-ying<sup>1</sup>, WANG Ming-xia<sup>1</sup>

(1. Gaoping District Agriculture Bureau Fruit Stand of Nanchong City, Nanchong Sichuan 637100; 2. College of Horticulture and Landscape, Southwest Agricultural University, Beibei Chongqing 400716)

**Abstract:** Using *Rosa roxburghii* Tratt. as the experimental material, carried on the culture in vitro and using the colchicin solution induced polyploidy, and analyzed genomic differences of tetraploid and diploid by ISSR. The results indicated that the most suitable culture medium which the *Roxburghii* induction differentiation multiplies was MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L, the inductivity had achieved 100%, the k-factor was above 4.4. And the highest inductivity with 0.2% colchicin solution treatment 48 h, the pure synthesis inductivity was 24.5%. The tetraploid and diploid ISSR result showed that expands banding was obvious difference, indicated that tetraploid has had the genome team variation in the induction of double process.

**Key words:** *Rosa roxburghii*; ISSR; tetraploid