

体外培养刺五加变异的 RAPD 分析

邢朝斌, 王明艳, 马百成, 刘岩, 罗玲

(1. 华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院实验中心, 河北唐山 063000)

摘要 以刺五加的成熟种子为材料, 通过离体培养诱导产生愈伤组织, 利用 RAPD 分子标记方法, 在 DNA 水平上分析愈伤组织与其来源植株间的遗传差异。从 40 个引物 10 碱基的寡核苷酸中筛选出 6 个引物, 对它们的 PCR 扩增结果进行分析。结果表明, 刺五加愈伤组织与其来源植株相比出现了 DNA 水平的变异。

关键词 刺五加; 愈伤组织; RAPD

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5489-02

Analysis of the Variation of *Eleutherococcus senticosus* Cultured in Vitro with RAPD

XING Zhao-bin et al (Department of Biology, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract The callus of *Eleutherococcus senticosus* was induced. Genetic differences between callus and the original plant were analyzed at DNA level with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology. The fingerprints amplification by polymerase chain reaction (PCR) with 6 polymorphic 10-based random primers selected from 40 ones was analyzed. The results indicated that there was genetic variation between callus and the original plant.

Key words *Eleutherococcus senticosus*; Callus; Induction

近年来利用植物组织、细胞培养快速繁殖刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*) 和生产其药用成分的研究成为热点。邢朝斌等^[1]和 Choi 等^[2,3]分别用直接或间接经由愈伤组织的途径获得了刺五加体细胞胚胎。但在植物无性繁育过程中尤其是植物的组织培养过程中, 体细胞无性系变异是普遍存在的一种现象, 它会直接影响到培养组织的分化能力和再生植株的性状。这种现象有多种方法可以检测, 最简单的方法是表型鉴定, 但一般需要通过特殊的遗传设计来完成, 需时长、工作量大; 核型分析能够揭示显著的染色体结构变化, 但不能发现单个基因的变异; 同工酶分析检测生化变异是相对方便的方法, 但可利用标记数目较少而限制了它的应用^[4]。RAPD 分析可以利用不同引物, 同时快速检测基因组多个位点的变异, 该技术容易掌握运用, 可以大范围地检测多个基因组的变异。近年来, 国外一些学者利用 PCR 及其衍生技术对多种材料如小麦、水稻等^[4,5]进行了体细胞无性系变异的研究, 证明 RAPD 可以揭示体细胞无性系 DNA 的多态性。笔者以来自刺五加合子胚轴的愈伤组织和来自幼叶的愈伤组织为试材, 检测到 RAPD 谱带变异, 并对变异进行分析, 以期揭示愈伤组织细胞中变异的发生规律和特点提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 愈伤组织诱导 刺五加幼苗和种子采自东北林业大学帽儿山实验林场。种子经层积处理后, 将种子的胚剖出, 切取胚轴作为外植体, 进行离体培养, 诱导产生愈伤组织^[1]。以野生植株的幼叶作为外植体, 接种在包含 2,4-D 1.0 ng/L + NAA 1.0 或 2.0 ng/L MS 培养基上, 诱导产生愈伤组织。

1.2 取样 愈伤组织样品于暗培养 4 个月后取样。选取叶愈伤组织来源植株的叶片和另外 2 株同产地野生植株的叶片作为对照。

1.3 总 DNA 的提取 按照说明书提供的操作方法, 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司) 提取愈伤组织

和新鲜叶片的基因组 DNA, 将准备好的 DNA 溶于适量的 TE 缓冲液, 用分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度, 并将其调整为 20 μg/μl。

1.4 RAPD 产物及检测 从 40 个 RAPD 随机引物中选取了 6 个多态性高、重复性好的引物 (表 1), 对叶愈伤组织来源植株、野生对照植株、胚轴愈伤组织和叶愈伤组织进行 PCR 扩增。反应体系: 25 μl 体系中包含模板 DNA 100 ng, 引物 100 ng, Taq 酶 1U, 含 (NH₄)₂SO₄ 的 10 × buffer 2.5 μl (750 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.8, 200 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 2.5 μl, 在 PTC 100TMPCR 仪上进行, 程序: 94 预变性 2 min, 然后进行 40 个循环: 94 30 s, 40 30 s, 72 1 min, 最后 72 延伸 5 min。反应产物在 1.5% 琼脂糖胶上检测, 电压 4 V/cm, 电泳 50 min, 用 BIO RAD Gel Doc 2000 凝胶成像系统记录拍照。用 D2000 作分子量对照。

1.5 数据分析 利用 Cross Checker 软件, 按琼脂糖凝胶同一位置上 DNA 电泳条带的有无进行统计, 有带的标记为“1”, 无带的标记为“0”, 获得 1,0 数据矩阵。应用 POPGENE32 软件进行 UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) 聚类分析。

2 结果与分析

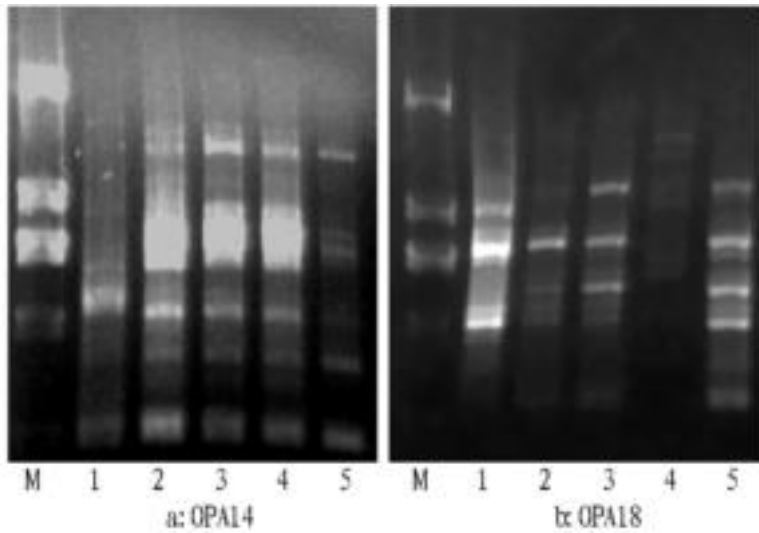
2.1 扩增条带分析 从 40 个随机引物 (10 碱基的寡核苷酸) 中筛选出的 6 个能得到清晰扩增谱带且产生多态性的随机引物进行 PCR 扩增。共扩增出 56 个可区分的位点, 主要集中在 200 ~ 2 000 bp, 其中 48 个表现出多态性, 多态性比例高达 85.71%。平均每个引物产生 9.3 个位点, 其中多态性位点 8.0 个 (表 1), 扩增结果如图 1-a, b 所示。相似系数与遗传距离矩阵如表 2 所示。

2.2 愈伤组织变异的 RAPD 分析 刺五加叶愈伤组织与其来源植株, 经过不同的引物扩增后, 两者在谱带强度和带型上出现变异 (图 1-a, b)。引物 OPA02 在愈伤组织中的扩增条带比其来源植株减少了 1 条, 而引物 OPA03、OPA08 分别增加了 2 条带, 且引物 OPA03 在愈伤组织中的 1 条带明显增强, 引物 OPA09 在来源植株中未能扩增出条带, 在愈伤组织中扩增出 4 条带, 引物 OPA14 带型相似, 但带的强度 1 增 1 降, 引物 OPA18 在愈伤组织中增加 1 条带, 但其他带在强度上均有

不同程度的降低。由此可以看出在诱导和培养过程中,愈伤组织已经发生了遗传学上的变化。同时对不同生长阶段无菌苗进行抽样检测,未观察到个体间的差异。

表1 所用引物及扩增结果

随机引物编号	随机引物序列	总条带数	多态性条带数	多态性位点比率 %
OPA02	TGCCGAGCTG	8	5	62.50
OPA03	AGTCAGCCAC	10	9	90.00
OPA08	GTGACGTAGG	13	11	84.62
OPA09	GGGTAACGCC	11	11	100.00
OPA14	TCTGTGCTGG	5	4	80.00
OPA18	AGGTGACCGT	9	8	88.89
合计		56	48	85.71



注:1 为叶片愈伤组织来源植株,2,3 为野生对象,4 为胚轴愈伤组织,5 为叶愈伤组织。

图1 引物 OPA14 和 OPA18 的扩增结果

表2 刺五加不同组织的遗传相似度和遗传距离

样品序号	样品序号				
	1	2	3	4	5
1	-	0.7634	0.8523	0.6494	0.9015
2	0.2700	-	0.7117	0.8828	0.7620
3	0.1599	0.3401	-	0.7502	0.8882
4	0.4317	0.1247	0.2874	-	0.7522
5	0.1037	0.2717	0.1185	0.2848	-

注:- 上方为遗传相似度,下方为遗传距离。1 为叶片愈伤组织来源植株,2,3 为野生对照,4 为胚轴愈伤组织,5 为叶愈伤组织。

3 讨论

(1) 试验共筛选了6 个随机引物,共检测了56 个位点,其中多态性位点48 个,平均每个引物产生8 个多态性位点。刺五加叶愈伤组织与其来源植株在谱带强度和带型上均出现了不同程度的差异,可见刺五加愈伤组织与其来源植株相比出现了 DNA 水平的变异。但能够检测出其 RAPD 差异的引

物较少,在一定程度上也反应出愈伤组织发生的可能只是 DNA 小片段的变异。

(2) 聚类分析的结果表明,尽管刺五加外植体(叶)在离体培养阶段,细胞在 DNA 水平上已发生了变异,但愈伤组织与其来源植株间的遗传相似度(0.9015)要大于其来源植株与其他同产地野生对照植株之间的平均遗传相似度(0.7758),这说明叶愈伤组织的变异程度要远远小于有性生殖过程中产生的变异。同时其也大于胚轴愈伤组织与包括叶愈伤组织来源植株在内的3 个野生植株间的平均遗传相似度(0.7608),即胚轴愈伤组织产生的变异幅度与有性生殖过程的变异相当。其原因主要有2 个方面,一是包括叶愈伤组织来源植株在内的3 个野生植株中没有胚轴外植体的来源植株,二是后期的继代培养结果表明由胚轴外植体产生的愈伤组织在未添加任何激素的培养基中都可产生体细胞胚胎,即此胚轴愈伤组织为胚性愈伤组织,而在体细胞胚胎发生诱导阶段是体细胞发生变异的关键时期^[7]。

(3) Fluminhan^[8] 等曾用细胞遗传学的方法观察到玉米愈伤组织在培养过程中有染色体断裂的现象。植物组织培养中,培养产物的变异受多种因素的影响,其中自发的体细胞突变可能与 DNA 的甲基化以及染色体重排有关。研究证明,体外培养的刺五加叶愈伤组织和胚轴愈伤组织均产生了 DNA 水平的变异。同时证明了 RAPD 分子标记技术不但可以用作科、属、种间遗传多样性的研究,而且是检测和分析刺五加离体培养过程中变异的可靠手段。有助于进一步探索植物组织培养和体细胞分化的分子机理。

参考文献

- [1] 邢朝斌,沈海龙,赵丽娜,等.刺五加的体细胞胚胎发生研究[J].中草药,2006,37(5):769-772.
- [2] CHO Y E, YANG D C, YOONE S. Rapid propagation of *Heutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 58:93-97.
- [3] CHO Y E, KIM J W, YOONE S. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Heutherococcus senticosus*[J]. Annals of Botany, 1999, 83:309-314.
- [4] BROWN P T H, LANG F D, KRANZ E. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology[J]. Mol Gen Genet, 1993, 237:211-317.
- [5] GUDWIN L D, SANGDUNE N K, UNANUATCH R, et al. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice somaclonal progenies[J]. Plant Cell Rep, 1997, 16:320-324.
- [6] 邢朝斌,沈海龙,王明艳,等.刺五加的无菌发芽研究[J].种子,2005,24(12):30-33.
- [7] 付杨,陈凤清,孙冬雪,等.大叶柴胡愈伤组织继代培养及其RAPD分析[J].东北师范大学学报:自然科学版,2005,37(2):90-92.
- [8] FLUMINHAN A, DE A, PEREIRA M R, et al. Evidence for heterochromatin involvement in chromosome breakage in maize callus culture[J]. Ann Bot, 1996, 78:73-82.