

饲料型四倍体刺槐组培苗的遗传学鉴定

王疆江¹, 刘建新², 王秋玉¹, 孟凡娟¹

(1. 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 东北林业大学, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:以饲料型四倍体刺槐的自然繁殖苗木为对照, 对组培苗进行 RAPD 技术分析, 结果表明, 经 NAA 处理的组培苗未发生遗传变异, 而经 IBA 培养的组培苗发生了遗传变异。

关键词: 四倍体刺槐; 组培苗; 遗传变异

中图分类号: S792.27 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)02-0007-02

The Genetic Evaluation of Plantlets on Fodder-type *Tetraploid Robinia pseudoacacia*

WANG Jiang-jiang¹, LIU Jian-xin², WANG Qiu-yu¹, MENG Fan-juan¹

(1. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Biotechnological Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Taking the seedling propagated in the nature as the control, plantlets material analyzed by RAPD technique was conducted. The results showed that genetic variation didn't appear to plantlets treated by NAA but appear to plantlets treated by IBA.

Key words: *Tetraploid Robinia pseudoacacia*; plantlets; genetic variation

四倍体刺槐(*Tetraploid Robinia pseudoacacia*)也称多倍体刺槐, 原产韩国。1997 年由北京林业大学引进。根据生物学特点可分为饲料型和速生型两种, 其中饲料型四倍体刺槐无刺、灌木状, 生长迅速, 叶宽且肥厚, 叶片含多种维生素与矿物质元素, 是很好的牲畜饲料, 为解决实施退耕还林、封山育林、天然林资源保护工程后出现的林牧矛盾, 特别是为上述地区畜牧业饲料发展找到了良好的途径^[1]。本研究利用 RAPD 技术检测其组培苗的遗传变异程度, 为加强使用组培苗的安全性提供了可靠的理论依据。

1 材料与 方法

1.1 试验材料

利用组培苗叶片作为提取 DNA 的材料。随机选取 10 株(1~5 号株采用 NAA 培养, 6~10 号采用 IBA

培养)为分析材料, 以自然繁殖的苗木作为对照, 编号为 11 号。试验中所选用的 10 条 RAPD 随机引物, 由上海生物工程公司合成。

1.2 DNA 提取方法及扩增条件

DNA 的提取方法采用王关林和方宏筠^[2]的方法, 稍加改动。在 20 μ L 反应体系中 DNA 浓度为 20 ng, Mg^{2+} 浓度为 0.5 mmol \cdot L⁻¹, 引物浓度为 0.25 μ mol \cdot L⁻¹, 循环次数为 35 次。热循环条件: 94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 37 $^{\circ}$ C, 2 min; 72 $^{\circ}$ C, 4 min; 35 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 1 h。

为了增强 RAPD 稳定性和重复性, 并提高试验数据的可靠性, 每次 PCR 反应重复 3 次, 取可重复和清晰的条带进行记录, 每一个 RAPD 扩增的条带记录为一个遗传位点, 扩增条带的有无分别记录为“1”和“0”。用 NTSYS-pc2.1 软件中的 DICE 法计算植株之间的相似系数, 用 UPGMA 法进行聚类分析, 绘制树状聚类图。

2 遗传学鉴定

利用 10 条扩增效果较好的引物对四倍体刺槐组培苗基因组 DNA 进行扩增, 扩增片段 DNA 长度在

收稿日期: 2008-12-04

基金项目: 东北林业大学优秀青年教师创新项目; 黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z06146); 黑龙江省教育厅资助项目(11533016)

第一作者: 王疆江(1984-), 女, 黑龙江省通河县人, 硕士, 从事植物遗传学研究。

通讯作者简介: 王秋玉(1948-), 女, 哈尔滨人, 博士, 教授, 从事植物育种研究。Tel: 0451-82191755; E-mail: mfj19751@163.com。

200~2 000 bp(见图 1), 共扩增出 49 条清晰可辨的谱带, 各引物扩增出的谱带数为 3~7 条, 平均每个引物扩增 4.9 条; 共扩增出多态性谱带数为 12 条, 平均每个引物为 1.2 条。10 个引物中扩增谱带数最多的是 S34, 共扩增出 7 条谱带, 扩增谱带数最少的是引物 S131, 仅扩增出 3 条带, 多态性最高的引物为 S130, 多态性比例 75%, 多态性最低的引物为 S33、S29、S100 多态性比例为 0, 所有引物的平均多态性比例为 26.3%(见表 1)。

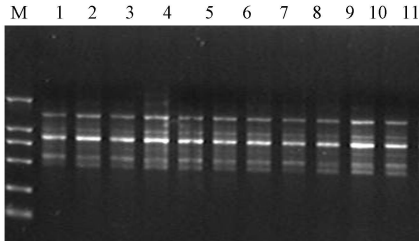


图 1 引物 S100 扩增产物的电泳图谱

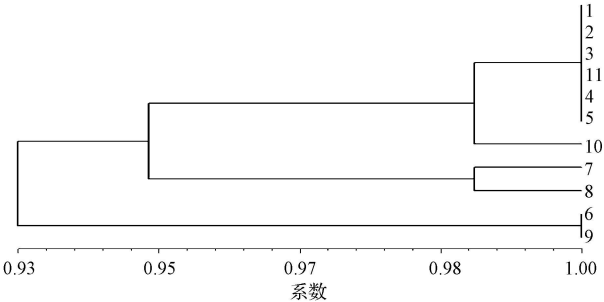
随机选取的 10 株组培苗的相似系数变化范围从 0.93~1.00, 平均相似系数为 0.96, 其中 1~5 号之间的相似系数为 1.00, 7 号植株和 9 号植株、6 号植株和 7 号植株、6 号植株和 10 号植株、9 号植株和 10 号植株的遗传相似系数最小, 为 0.93(见表 2)。

利用 UPGMA 方法进行聚类分析(见图 2), 在相似系数 1.00 处, 利用激素 NAA 培养所获得的 1~5 号株与对照株 11 号被聚为一类未发生遗传变异。利用激

素 IBA 培养所获得的 6~10 号株未与对照株聚为一类

表 1 10 个引物的扩增图谱结果

引物	扩增带数	单态带数	多态带数	多态性比例/%
S34	7	6	1	14
S33	4	4	0	0
S8	5	5	2	40
S32	6	5	1	16
S29	6	6	0	0
S130	4	1	3	75
S131	3	2	1	33
S132	5	5	3	60
S100	5	5	0	0
S75	4	3	1	25
和(平均值)	49(4.9)	42(4.2)	12(1.2)	263(26.3)



M 为 marker DL200, 1~5 为 NAA 培养的组培苗, 6~10 为 IBA 培养的组培苗; 11 为对照

图 2 UPGMA 聚类图

表 2 遗传相似系数

植株代号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.00										
2	1.00	1.00									
3	1.00	1.00	1.00								
4	1.00	1.00	1.00	1.00							
5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
6	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	1.00					
7	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.93	1.00				
8	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.94	0.98	1.00			
9	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	1.00	0.93	0.94	1.00		
10	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.93	0.94	0.96	0.93	1.00	
11	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	0.96	0.97	0.94	0.98	1.00

类, 其中 6 号株和 9 号株被聚为一类, 其余植株均发生了一定程度的遗传变异, 但与对照株的遗传相似系数均在 90%以上, 变异幅度不大(见表 2), 总之, 从总体聚类结果来看, 经 NAA 和 IBA 培养的植株之间存在一定的遗传差异, 但是经 NAA 培养的全部植株与对照株相比未发生变异, 保证了母株的遗传稳定性, 经 IBA 诱导的全部植株与对照株相比均存在一定程度的变异。

3 讨论

饲料型四倍体刺槐作为一种生态型和经济型树

种, 具有极高的生态价值和经济价值, 市场需求量也越来越大, 但自然状态下饲料型四倍体刺槐自我繁殖能力较低^[3], 难以满足市场需求。采用组织培养方法获得四倍体刺槐组培苗, 为其大规模的种植开发提供了可能。将饲料型四倍体刺槐组培技术应用于快繁, 关键在于保持其遗传稳定性。采用 RAPD 分子标记技术对大量的组培苗进行遗传稳定性分析, 方法简单、快速, 可以直接从 DNA 水平检测遗传性状的变化, 即从

(下转第 11 页)

二酮类的作用目标。Gampe 等^[9]报道了 RXR α 与配体 9-cis-retinoic acid 配体结合区的晶体结构,这个结构在分子水平上说明了 RXRs 为什么能够与很多核受体形成异二聚体和可以通过 9-cis-retinoic acid 激活 PPAR γ /RAR α 异源二聚体的原因。

由于 RXRs 不能单独行使其生物功能,而必须与其他转录因子结合形成二聚体后,才能发挥作用,因此单独关于 RXRs 基因的研究报道较少。本研究结果表明 RXR α 基因在刚出生的仔猪组织内广泛表达,并且表达水平较高。但是随着时间的增加, RXR α mRNA 的表达变化并没有表现出明显的规律。尽管如此,但仍可以看出, RXR α mRNA 的表达,存在着明显的时间和空间差异。推测产生这种结果的原因,一方面是因为该基因的表达受到机体自身生理状态的调节,即随着机体的增长,对视黄酸的需求也在不断变化,所以 RXR α 的转录与表达也随之发生变化,另一方面也可能是因为体内的 RARs、激素以及其它转录因子也会对 RXR α 的转录产生影响,因而造成了该基因的表达发生持续的变化。

(上接第 8 页)

分子水平上阐明组培苗遗传稳定性的分子机理。目前,用于检测组培苗遗传稳定性的分子标记技术已在水稻、春兰、果桑等植物上广泛应用^[4-6]。周克夫等利用 SSR 标记技术,根据康耐尔大学的资料设计了 311 对 SSR 引物对早籼稻品种佳禾早占种植材料和组培材料进行分析,对两种材料进行 PCR 多态性扩增,结果发现两者间存在多态性的引物有 88 对,多态性比例达到 30.3%。并证明,佳禾早占水稻组培苗后代所表现出的矮秆性状与亲本在遗传物质上确有明显差别^[4]。除用来鉴定组培苗的遗传稳定性分子标记技术的方法以外,还有细胞学方法、同工酶法、形态学鉴定法等均有报道^[7-9]。

本研究应用 RAPD 分子标记技术对四倍体刺槐组培苗基因组 DNA 进行分析,应用 NAA 的组培苗之间出现了一定程度的变异,这也进一步证明了经某些激素(浓度)处理的组培苗在 DNA 水平上已经发生变异,其遗传物质不稳定,不能有效保证母株的遗传特性,这与前人关于芥蓝^[10]、苹果^[11]等组培苗遗传稳定性的研究报道不一致。由此可见,以组培快繁技术快速扩大饲料型四倍体刺槐的生产量,还应该从分子水平进行进一步的鉴定,从而有效保证组培苗的纯度。

参考文献:

[1] Burrage P S, Huntington J T, Spom M B, et al. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression by a retinoid X receptor-specific ligand[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(3): 892-904.

[2] Mangelsdorf D J, Umesono K, Kliewer S A, et al. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR[J]. *Cell*, 1991, 66: 555-561.

[3] Willy P J, Umesono K, Ong E S, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway[J]. *Genes*, 1995, 9: 1033-1045.

[4] Almasan A, Mangelsdorf D J, Ong E S, et al. Chromosomal localization of the human retinoid X receptors[J]. *Genomics*, 1994, 20(3): 397-403.

[5] Tontonoz P, Graves R A, Budavari A I, et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(25): 5628-5634.

[6] Gampe R T, Jr, Montana V G, Lambert M H, et al. Asymmetry in the PPAR-gamma/RXR-alpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors[J]. *Molec. Cell*, 2000, 5: 545-555.

参考文献:

[1] 任满田. 四倍体刺槐生物学特性及经济价值[J]. *山西林业*, 2003 (5): 29.

[2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 345-346.

[3] 王侠礼, 钟士传, 曹帮华. 饲料型刺槐微体快繁技术的研究[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(3): 51-53.

[4] 周克夫, 张凯, 戎文婷. 应用 SSR 分子标记比较佳禾早占水稻组培苗与种植苗的性状差异[J]. *植物研究*, 2006, 26(6): 703-707.

[5] 高丽, 杨波, 李洪林, 叶艺春. 兰组培苗遗传稳定性的 ISSR 研究[J]. *亚热带植物科学*, 2007, 36(2): 13-14.

[6] 刘健, 于元杰. 果桑组培继代过程中的 RAPD 分析[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(5): 1310-1311.

[7] 李卫东, 王冬梅, 黎小瑛. 用细胞学方法研究番木瓜组培苗的遗传稳定性[J]. *云南植物研究*, 2006, 28(6): 645-648.

[8] Kongkiatnam P, Waterway M J, Fortin M G. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.); comparisons of morphological isozyme and RAPD markers[J]. *Euphytica*, 1995, 84: 237-246.

[9] 詹亚光, 杨传平, 王玉成. 白桦组培离体再生的解剖学研究[J]. *林业科学*, 2002, 38(6): 143-147.

[10] 庄东红, 黄文华, 郑汉藩. 芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 组培苗遗传稳定性的研究[J]. *汕头大学学报(自然科学版)*, 1999, 14(1): 54-58.

[11] 杜国强, 师校欣, 张庆良. 苹果不同继代次数的茎尖组培苗同工酶酶谱及 RAPD 分析[J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 33-37.