

丰花月季体细胞无性系变异的研究

刘金萍, 车代弟, 龚束芳, 樊金萍, 王金刚*

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以丰花月季腋芽为外植体进行芽分化诱导, 将获得无菌苗用 NaN_3 进行化学诱变以获得变异植株, 用 ISSR 分子标记进行检测。结果表明, 腋芽是诱导芽分化的很好的外植体, 诱导率可达 80%, 分化率可达 90.6%, 诱导分化的苗强壮; 半致死剂量 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaN}_3$ 处理 2 h 可作丰花月季丛生芽的诱变处理; 从遗传相似系数和聚类图总的结果表明, 15 个亲本材料间相似系数很大(0.97), 说明本次参试材料的遗传差异性小, 亲缘关系近。另外, 在相应的材料之间, 仍存在一定的差异, 其相似性最高的为 0.99, 最低的为 0.87, 这表明运用 ISSR 技术可以灵敏地分析亲本材料的遗传背景, 在体细胞无性系变异研究中具应用价值。

关键词: 丰花月季; 体细胞无性系变异; 组织培养; NaN_3 ; ISSR

• 中图分类号: S685.12; S601

文献标识码: A

丰花月季(*Rosa chinensis* var. *floribunda*) 又称聚花月季(*Floribunda rosas*), 具有花色多、花期长、枝叶繁茂、抗寒、抗旱、适应性强、管理粗放等特点, 是切花和园林绿化的好材料, 市场需求量大^[1]。近年来组织培养技术被越来越多的用在丰花月季的研究和生产中, 用组织培养方法可大大提高丰花月季的繁殖速度, 且植株根系发达, 生长健壮, 苗木整齐, 是批量繁殖生产丰花月季商品苗的一种好方法^[2], 成为丰花月季快繁的一种主要手段。

在组织培养过程中常常伴随着体细胞无性系变异, 近年来的研究表明, 体细胞无性系变异是植物组织培养过程中出现的普遍现象, 植物组织、细胞培养过程普遍引起丰富的变异, 一个组织培养周期内可产生 1%~3% 的无性系变异, 有时甚至高达 90% 以上, 远远高于自然突变频率^[3-4]。对各种植物体细胞无性系变异株后代的分析证明, 其绝大多数变异是可遗传的^[5-6], 因而植物育种家认为组织细胞培养过程产生的体细胞无性系变异, 对植物品种改良和选育新品种具有重要的意义。

本文将组织培养与化学诱变育种相结合, 提高丰花月季体细胞无性系变异机率, 并将无性系

变异进行 ISSR 分子标记的试验, 以期获得有益变异, 用以选育新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料选用的是丰花月季 Pink1, 由东北农业大学园林育种实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得

取丰花月季嫩枝用清水冲洗干净, 剪成长 0.5~1.0 cm 的茎段, 先在 70% 的酒精中浸 30 s, 再在 0.1% 的升汞液中浸 5~10 min, 将消毒茎段用无菌水冲洗 5~6 次后切取腋芽接种于诱导分化培养基上。培养基以 MS 为基础培养基, 添加不同浓度的 6-BA、NAA, 共设 6 个处理(见表 1), 每种处理接种 10 瓶, 每瓶接 4 个腋芽, 20 d 后调查腋芽分化情况。当芽长至具有 5~7 片小叶时, 将其切成带 1~2 个叶片的茎段, 转入分化培养基中进行继代增殖。

1.2.2 NaN_3 诱变

用蒸馏水配制 0、50、100、150、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 种 NaN_3 浓度。将丰花月季无菌苗(约 0.5 cm)浸入 5 种不同浓度 NaN_3 溶液中处理 0、2、4、6 h, 处理后用无菌水漂洗 6 次, 接种于丛生芽诱导培养基上。

收稿日期: 2007-03-16

作者简介: 刘金萍(1980-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物。

* 通讯作者 E-mail: wangjingang99@yahoo.com.cn

1.2.3 ISSR 分子标记

采用改良的 SDS 法提取丰花月季的 DNA。

ISSR PCR 25 μL 反应体系, 其中包括 10 \times buffer 2.5 μL 、25 mmol MgCl_2 μL 、2 mmol dNTP 2 μL 、*Taq* 酶 1 U、10 μmol 引物 2 μL 、模板 DNA 2 μL 、剩余体积用双蒸水补充至 25 μL 。

PCR 反应程序为: 92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、92 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 90 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 120 s、35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中 120 V 电泳 1 h, 电泳结束后在紫外检测仪上观察并照相。每个样品重复 2 次, 记录每次都出现的条带。

根据电泳结果, 将每个产物的条带状况按 0 (无条带) 和 1 (有条带) 分别输入电脑, 利用 SPSS 10.0 (Statistical Package of Social Science) 软件分析包计算出丰花月季遗传相似性系数, 导入到 MEGA

软件, 按 Neighbor Joining 法建立系统分类树形图。

2 结果与分析

2.1 侧芽诱导分化结果

将丰花月季的茎段接种在 6 种不同的培养基上, 7 d 后侧芽开始膨大, 10 d 左右分化芽逐渐形成幼苗 (见表 1, 图 1)。从侧芽分化结果可以看出, 丰花月季茎段在所用的 6 种培养基上均能分化出侧芽, 分化率为 40%~80%, 其中以 MS+6-BA 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上的分化率较高, 说明 6-BA 浓度较高时易诱导侧芽分化。同时, 增加适量 NAA 有利于离体侧芽分化, 但当浓度达到 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时则仅诱导产生大量愈伤组织, 不利于侧芽的直接分化和生长。因此, 适宜丰花月季茎段侧芽分化的培养基为 MS+6-BA 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.1~0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 不同培养基诱导分化结果

Table 1 Differentiation results of different type of medium

培养基 Medium	接种茎段数 Explant number	诱导分化数 Differentiation number	诱导率 (%) Rate of induction	分化芽数 Bud number	分化率 (%) Differentiation rate	苗质量 Quality of bud
BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	16	40.0	9	56.3	细弱
BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	21	52.5	16	76.1	强壮
BA 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	19	47.5	13	68.4	细弱
BA 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	25	61.5	20	80.0	强壮
BA 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	32	80.0	29	90.6	强壮
BA 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	40	28	70.0	19	64.3	强壮

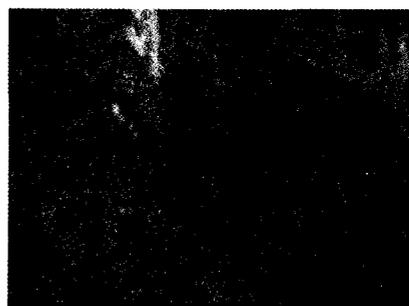


图 1 腋芽萌发

Fig. 1 Axillary bud bourgeon

2.2 NaN_3 诱变结果

不同浓度 NaN_3 对丛生芽诱导的影响见表 2。

由表 2 可知, 外植体未经 NaN_3 处理的, 丛生芽诱导率为 100%, 平均每个外植体有 3 个芽, 经 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 处理, 丛生芽诱导率仍为 100%, 平均

每个外植体 3 个芽。用 100、150、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 处理后, 丛生芽的诱导率分别为 79.2%、63.1%、51.9%, 平均每个外植体的芽数分别为 2、1、1 个。结果说明, 经不同浓度的 NaN_3 处理, 丰花月季丛生芽的诱导效果差异显著。丛生芽的诱导率随

着 NaN_3 浓度的增加明显下降，外植体诱导的芽数也随着 NaN_3 浓度的增加而减少，但不同浓度间差异不明显。

表 2 不同 NaN_3 浓度对丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different concentration of NaN_3 on the bud induction

浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Concentration	丛生芽诱导率(%) Rate of bud induction	外植体平均芽数(个) Average number of explant	丛生芽平均高度(cm) Average height of bud
0	100.0	3	0.73
50	100.0	3	0.57
100	79.2	2	0.48
150	63.1	1	0.40
200	51.9	1	0.32

不同处理时间对丛生芽诱导的影响见表 3。

由表 3 可知，随着处理时间的增加，丰花月季的丛生芽诱导率和外植体平均芽个数都明显下降。处理 2 h，丛生芽诱导率为 54.6%，外植体平均芽个数为 1 个。处理 4 h，丛生芽的诱导率为 13.5%，外植体平均芽个数 0.6 个，高于此处理时间，外植体全部死亡。本研究表明， $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaN}_3$ 处理 2 h 可作丰花月季丛生芽的诱变处理。

表 3 不同处理时间对丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different treating time of NaN_3 on the bud induction

处理时间(h) Time	丛生芽诱导率(%) Rate of bud induction	外植体平均芽数(个) Average number of explant	丛生芽平均高度(cm) Average height of bud
0	100.0	3.0	0.73
2	54.6	1.0	0.35
4	13.5	0.6	0.31
6	-	-	-

2.3 ISSR-PCR 结果

试验所用 24 个引物共扩增出 155 条 DNA 谱带，其中多态性条带为 47 个，占扩增条带的 30.3%，每个引物平均条带为 6.5 个，FI47 扩增条带最多，为 11 条，FI84 最少，为 4 条扩增带。此结果表明，试验的 15 个材料中具有较高的多态性。

从琼脂糖凝胶电泳中，得到 27 种特异性带型。其中，引物 FI1 对材料 5、10、14 有特异带型；引物 FI10 对材料 5 和 15 有特异带型；引物 FI16 对材料 5 和 13 有一种特异带型；引物 FI17 对材料 1 和 4 有特异带型；引物 FI19 对材料 1 和 15 有特异带型；引物 FI27 对材料 1 和 5 有特异带型；引物 FI28 对材料 1 和 15 有特异带型；引物 FI35 对材料 1 和 10 有特异带型；引物 FI37 对材料 15 有特异带型；引物 FI39 对材料 11 有特异带型；引物 FI41 对材料 10 有特异带型；引物 FI45 对材料 10 有特异带型；引物 FI46 对材料 1、5、15 有特异带型；引物 FI47 对材料 4、5 和 15 有特异带型；引物 FI48 对材料 1 有特异带型；引物 FI49 对材料 1、5、8 和 15 有特异带型；引物 FI61 对材料 5 和 15 有特异带型；引物 FI71 对材料 2 和 10 有特异带型；引物 FI82 对材料 5 有特异带型；引物 FI83 对材料 1 和 5 有特异带型；引物 FI84 对材料 1 和 15 有特异带型。

2.4 聚类分析

结果见图 2。由图 2 可见，15 个亲本材料可分为两大类：第一大类是 15 单独为一类和 1-14 亲缘关系较远，已发生变异；第二大类 5 和 1-4、6-14 聚为一类，其中第二类 5 和第一类关系较远，第一类又分为两类，1 和其它的材料关系较远。亲缘关系远近方面， $15>5>1>10>11>4>14>=3=6=7>3>2>9>8=12$ 。

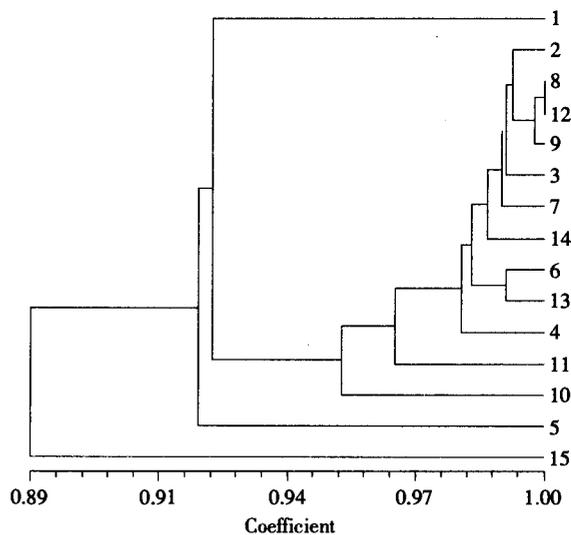


图 2 15 个材料的聚类分析

Fig. 2 Molecular tree of 15 materials

由图 2 结果表明, 15 个亲本材料间相似系数很大(0.97), 说明本次参试材料的遗传差异性小, 亲缘关系近。另外, 在相应的材料之间, 仍存在一定的差异, 其相似性最高的为 0.99, 最低的为 0.87, 这表明运用 ISSR 技术可以灵敏地分析亲本材料的遗传背景, 在体细胞无性系变异研究中具应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] 孙宪芝, 赵惠恩. 月季育种研究现状分析[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(4): 65-69.
- [2] 杨永花. 丰花月季组培快繁研究初报[J]. 甘肃农业科技, 2000 (5): 44-45.
- [3] 宋再华, 彭守华, 苟爱兰. 体细胞无性系变异及变异频率[J]. 莱阳农学院学报, 1997, 14(2): 126-129.
- [4] Smith M K, Drew R A. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement[J]. Austral J Plant Physiol, 1990, 17: 267-289.
- [5] Larkin P J, Skow Croft W P. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell culture for plant improvement[J]. Theor Appl Genet, 1981, 60: 197-214.
- [6] Skirvin R M, Mc Pheeters K D, Noton M. Sources and frequency of somaclonal variation[J]. Hort Science, 1989, 29: 1232-1237.

Study on somaclonal variation of *Floribunda rosas*

LIU Jinping, CHE Daidi, GONG Shufang, FAN Jinping, WANG Jingang

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Axillary buds as explants were used to conduct bud differentiation induction. Sterile young plants were treated with NaN_3 to produce mutated plants, which were analyzed by ISSR markers. This study showed that axillary buds were better explant for bud differentiation induction. Its induction rate could be up to 80% and differentiation rate could be up to 90.6%. Buds from differentiation were strong. Total $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of half-death dosage of NaN_3 with 2 h of treating time was confirmed to be fit for chemical mutation. Genetic similarity coefficients and tree diagram showed that similarity coefficients between the 15 materials were great, up to 0.97, which showed the genetic polymorphism between the species was small and genetic relationship was close. However, there was also some differences between them. The highest similarity coefficient was 0.99, and the lowest was 0.87. ISSR markers were confirmed to be good for the analysis of genetic background, which showed a great value in the study of somaclonal variation.

Key words: *Floribunda rosas*; somaclonal variation; tissue culture; NaN_3 ; ISSR