

# 叶艺春兰组培苗遗传稳定性的 ISSR 研究

高 丽, 杨 波, 李洪林

(中国科学院 武汉植物园, 湖北 武汉 430074)

**摘 要:** 采用简单重复序列间扩增(ISSR)分子标记技术, 对来自叶艺春兰同一母株并经多次无性繁殖获得的组培苗进行基因组 DNA 分析。研究结果表明, 在多次继代培养过程中, 组培苗遗传物质稳定, 在 DNA 水平上未见明显差异, 保持了母株的特性。

**关键词:** 春兰; 组培苗; ISSR; 遗传稳定性

中图分类号: Q945.51

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2007)02-0013-02

## Study on Genetic Stability of *Cymbidium goeringii* Seedlings *in Vitro* by ISSR Markers

GAO Li, YANG Bo, LI Hong-lin

(Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, Hubei China)

**Abstract:** Inter-simple sequence repeats (ISSR) markers were used to investigate genetic stability for clonal plants of *Cymbidium goeringii* with verge line pattern leaves. The results showed that the culture clonal plants appeared without variations as compared with their original plants in substance of heredity and had no difference on the level of DNA.

**Key words:** *Cymbidium goeringii*; seedling *in vitro*; ISSR; genetic stability

春兰(*Cymbidium goeringii*)又称草兰、山兰、朵朵香。古代称兰, 为兰科兰属多年生地生兰, 我国栽培历史悠久, 是我国分布最广、资源最丰富、选育园艺品种最多的兰属种类之一, 具有很高的观赏价值和经济价值。叶艺是指兰花叶片上的白色、黄色条纹或斑点, 比一般兰花更具观赏价值<sup>[1]</sup>。

春兰传统的分株繁殖方法繁殖系数低, 一般每年只能繁殖1~3倍, 远远不能满足市场需求。目前多运用生物技术手段快速繁殖名优兰花品种, 这在一定程度上可缓解兰花市场的需求压力, 并减缓野生兰科植物资源的过度采挖。但是通过组织培养的一些艺兰名优品种能否保持其“艺”的稳定性, 也成为兰花爱好者关注的问题。为此, 本文采用基于检测整个基因组DNA变异的简单重复序列间扩增(ISSR)分子标记技术, 对叶艺春兰组培苗的遗传稳定性进行分析, 旨在为艺兰的产业化开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试材料为具有叶艺的春兰母株克隆繁殖的第9代到第20代(初代2003年3月起, 继代周期40d)的组培苗, 由中国科学院武汉植物园组培实验室培育。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取 按照改良的CTAB法<sup>[2]</sup>提取基因组DNA, 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 并在紫外分光光度计下测量浓度, 最后稀释标定至10ng/μl, 放入-20℃冰箱备用。

1.2.2 引物筛选与PCR扩增 所用引物参照加拿大哥伦比亚大学UBC公司公布的第9套ISSR引物序列, 由上海博亚生物技术有限公司合成。随机选取6份DNA模板在15μl反应体系中进行扩增筛选, 从70个ISSR引物中选取8条扩增条带清晰、重复性好的引物(表1)用于PCR扩增。经比较和优化确定最佳ISSR

收稿日期: 2006-11-16

基金项目: 湖北省自然科学基金(2004ABA119)资助项目

作者简介: 高丽(1979-), 女, 河南南阳人, 硕士, 从事植物生物技术和分子生物学研究。

注: 杨波为通讯作者。

扩增条件为15 $\mu$ l反应体系中含1 $\times$ Buffer, 0.2mmol/L dNTPs, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.3 $\mu$ mol/L引物, 0.375U Taq DNA聚合酶, 20ng模板DNA。PCR扩增程序为94 $^{\circ}$ C预变性2.5min, 接着进行35个循环: 94 $^{\circ}$ C变性45s, 47.7~53.4 $^{\circ}$ C退火(退火温度随引物而定, 表1)45s, 72 $^{\circ}$ C延伸2min; 循环结束后于72 $^{\circ}$ C延伸5min。

1.2.3 PCR产物检测 1.5%琼脂糖凝胶中电泳分离PCR扩增产物, 溴化乙锭染色。电泳结束后在凝胶成像系统中观察、记录、保存图像。

引物	引物序列(5'-3')	退火温度( $^{\circ}$ C)	记录的条带数(条)
807	(AG) <sub>8</sub> T	52	5
815	(CT) <sub>8</sub> G	50.8	4
817	(CA) <sub>8</sub> A	52	7
825	(AC) <sub>8</sub> T	53.4	9
827	(AC) <sub>8</sub> G	50.3	5
836	(AG) <sub>8</sub> (CT)A	47.7	11
840	(GA) <sub>8</sub> (CT)T	48.8	7
855	(AC) <sub>8</sub> (CT)T	50.3	5

## 2 结果与分析

利用 8 个扩增效果较好的引物对叶艺春兰基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 53 条清晰可辨的谱带。各个引物扩增出的谱带数为 4~11, 平均每个引物扩增 6.6 条; 8 个引物中扩增效率最高的是 836, 共扩增出 11 条带, 扩增效率最低的是引物 815, 仅扩增出 4 条带(图 1)。依片段大小, 显带 DNA 长度在 200~1 400bp 之间, 其中 53 条带全部为单态带, 多态位点百分率为 0。

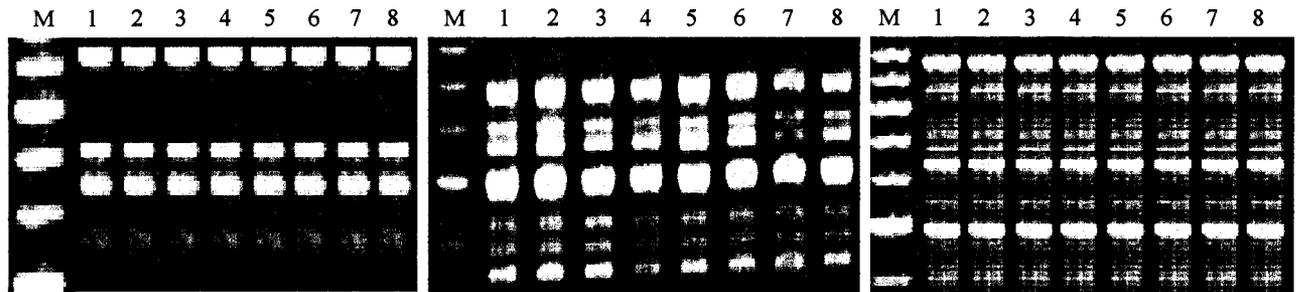


图 1 ISSR 引物 815(左)、840(中)、836(右)扩增产物的电泳图谱

## 3 讨论

兰科植物具有极高的观赏价值和经济价值, 市场需求量也越来越大。但自然状态下兰科植物自我繁殖能力较低<sup>[3]</sup>, 难以满足市场需求。20 世纪 60 年代, Morel 采用兰花的茎尖进行组织培养, 首次获得兰花无病毒小植株<sup>[4]</sup>。此后, 组织培养技术在兰花生产上得到广泛应用, 目前大约已有数百种兰花可以组培繁殖。将组培技术应用于快繁, 关键在于保持其品性, 这对于一些具有极高观赏价值的艺兰来说更为重要。采用 ISSR 分子标记对一定数量的随机引物进行分析, 可以给出覆盖整个基因组 DNA 的多态性信息, 并直接从 DNA 水平检测碱基序列的变化, 因此, 可从分子水平上阐明组培苗遗传稳定性的分子机理。本研究应用 ISSR 分子标记技术对叶艺春兰组培苗基因组 DNA 进行分析, 得到的 DNA 片段无论是带型还是带的强弱均为一致, 证明该组培苗在 DNA 水平上未发生变异, 其遗传物质是稳定的, 不同继代次数的样本之间具有高度的遗传一致性, 继代组培苗保持了母株的遗传特性, 这与前人关于芥蓝<sup>[5]</sup>、枇杷<sup>[6]</sup>等组培苗遗传稳定性的研究报道一致。由此可见, 以组培快繁技术快速扩大兰花原种生产量是可行的。

### 参考文献:

- [1] 吴应祥. 中国兰花[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 17.
- [2] Doyle J J, et al. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull., 1987, 19: 11-15.
- [3] 郭保香, 等. 神农架野生兰科植物资源及其保护发展必要性的探讨[J]. 湖北林业科技, 2003(1): 24-27.
- [4] Morel G. Producing virus-free *Cymbidiums*[J]. Am Orchid Soc Bull., 1960, 29: 495-497.
- [5] 庄东红, 等. 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.
- [6] 杨永青, 等. 枇杷茎尖组培苗的遗传稳定性及生产性能[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 107-114.