

童巧珍,高 昱,刘平安,等. 基于 SRAP 标记的湘产百合核心种质库构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):56-60.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.014

基于 SRAP 标记的湘产百合核心种质库构建

童巧珍,高 昱,刘平安,蔡嘉洛,张亚利,樊 悦,易刚强

(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

摘要:利用相关序列扩增多态性(SRAP)标记技术,以 45 份初级种质代表的 87 份湘产百合种质为材料,通过 Pop-Gene32、NTSYS-PC (Version 2.1) 等软件筛选湘产百合核心种质。结果表明:共获得多态位点 218 个,物种水平上多态性比例 78.42%;通过对 SRAP 信息进行遗传多样性分析,使用逐步聚类取样法和分层抽样法筛选出 15 份核心种质,占收集资源总数的 17.2%;*t* 检验表明,核心种质的有效等位基因数、Nei's 遗传多样性指数、Shannon's 信息指数在 0.05 水平上与初始种质差异不显著,说明核心种质能很好地代替初始种质。

关键词:湖南省;百合;核心种质;遗传多样性;SRAP;种质资源

中图分类号: S682.2⁺90.24 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-056-04

湖南省为我国百合主要产区之一,百合在湖南省各地均有分布,以湘西自治州龙山县的龙山百合、邵阳市隆回县的龙牙百合种植区域最广^[1]。百合集药用、食用、观赏用途为一体,具有很高的经济价值。面对日益增长的百合需求,保护和利用百合种质资源极为重要。近年来,种质资源研究在国内外兴起,核心种质作为种质资源群体研究和利用的切入点,开展相关研究可以避免遗传上的重复,从而保存丰富的遗传变异,是提高种质资源利用率的有效途径^[2],但是核心种质研究大多集中在牡丹^[3]、烟草^[4]、水稻^[5]等作物上,湘产百合核心种质研究尚未见报道。依靠基因型信息处理获得的核心种质,主要通过简单重复序列(SSR)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、ISSR、扩增片段长度多态性(AFLP)等分子标记方法来实现,这些方法具有准确、高效、不受外界环境以及基因间互作影响等特点,能被很好地用来构建核心种质^[6]。相关序列扩增多态性(sequence related amplified polymorphism, SRAP)是在 RAPD 基础上的升级,引物高度通用,比 AFLP 更能反映形态学变异和进化历史^[7-8],同时该技术还被认为是在分子标记辅助育种中最可能被大规模应用的一种技术^[9]。本研究利用 SRAP 标记技术筛选湘产百合核心种质,以期为有效利用其优秀基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

87 份百合种质采自湖南省各地区,根据地方品种来源进行分组,按约 50% 的总体取样比例抽取 45 份样本建立初级核心种质(primary core collection),采用 SRAP 分子标记信息

数据。45 份初级种质来源及分组信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 分子标记方法 根据改良 CTAB 法^[10-11]提取湘产百合种质 DNA,参照 Li 等的原则^[12],并作适当改进获得反应体系。SRAP-PCR 扩增反应体系为 20 μ L,其中 Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.2 μ mol/L,引物浓度 0.2 μ mol/L, *Taq* 酶 1 U,模板 DNA 50 ng。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 37 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存;扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离(0.5 \times TBE, 80 V, 100 min),凝胶成像系统观察、照相。

1.2.2 核心种质构建方法

1.2.2.1 逐步聚类取样法 采用逐步聚类随机取样法^[13],根据 45 份样本建立的初级核心种质 SRAP 信息的不加权类平均法(UPGMA)聚类结果,删除遗传相似系数最大的 2 份种质中的 1 份(如组内只有 1 份遗传材料,则选取该遗传材料),将剩余种质再聚类;再从遗传相似系数最大的成对种质中删除 1 份。以此类推,直到代表性或核心种质数量达到要求。利用上述方法分别设定 50%、35%、20% 的取样比例,分别获得样本群 P_1 、 P_2 、 P_3 。样本群 P_1 (23 个样本)编号:1、4、5、6、8、11、14、15、16、20、27、31、34、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45;样本群 P_2 (15 个样本)编号:1、4、8、11、20、27、34、36、37、39、40、41、42、43、45;样本群 P_3 (9 个样本)编号:1、4、11、20、27、34、37、40、43。

1.2.2.2 分层抽样法 采用分组取样策略,参考黎毛毛等的方法^[14]并适当改进,组内及亚组内取样方法采用聚类、随机方法相结合。根据主产区将 45 份样本建立的初级核心种质分为湘北、湘西北、湘西南、湘中南等 4 个区域组。

抽样方法 1:按 50% 比例在各区域组抽取一定数量的种质构成取样组;在取样组内对 SRAP 信息进行遗传多样性和聚类分析,依据遗传相似性阈值划分为不同的亚组,在各亚组内随机抽取一定数量的种质构成样本群 P_4 。

抽样方法 2:根据各区域组的种质规模,抽取一定数额的

收稿日期:2015-01-05

基金项目:湖南省科技项目(编号:2013RS4040);湖南省中医药管理局项目(编号:2012164)。

作者简介:童巧珍(1971—),女,湖南平江人,博士,教授,主要从事中药质量与资源研究。E-mail: qztong88@126.com。

通信作者:易刚强,副教授,主要从事中药质量及新药研究。

E-mail: 471287265@qq.com。

表 1 45 份初级种质来源及分组信息

编号	来源	所属区域	类型	编号	来源	所属区域	类型
1	湖南省衡山县 *	湘中南	百合	24	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
2	湖南省隆回县	湘西南	百合	25	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
3	湖南省隆回县	湘西南	百合	26	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
4	湖南省隆回县	湘西南	百合	27	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
5	湖南省隆回县	湘西南	百合	28	湖南省娄底市	湘西南	百合
6	湖南省隆回县	湘西南	百合	29	湖南省永顺县	湘西北	卷丹
7	湖南省怀化市	湘西南	百合	30	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
8	湖南省浏阳县	湘中南	百合	31	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
9	湖南省益阳市	湘东北	卷丹	32	湖南省吉首市	湘西北	卷丹
10	湖南省平江县	湘西北	卷丹	33	湖南省长沙市	湘中南	百合
11	湖南省平江县	湘西北	卷丹	34	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
12	湖南省平江县	湘西北	卷丹	35	湖南省浏阳县	湘中南	百合
13	湖南省平江县	湘西北	卷丹	36	湖南省郴州市	湘中南	百合
14	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	37	湖南省衡阳市	湘中南	卷丹
15	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	38	湖南省龙山县	湘西北	卷丹
16	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	39	湖南省永州市	湘西南	卷丹
17	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	40	湖南省桃源县	湘东北	百合
18	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	41	湖南省慈利县 *	湘西北	百合
19	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	42	湖南省祁阳县	湘西南	百合
20	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	43	湖南省耒阳市	湘中南	百合
21	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	44	湖南省岳阳市	湘东北	百合
22	湖南省龙山县	湘西北	卷丹	45	湖南省湘乡市	湘中南	百合
23	湖南省龙山县	湘西北	卷丹				

注:标有“*”为野生种,其他均为栽培品种。

种质构成取样组(对百合种质数量多的,抽取比例可适当小一些;对百合种质数量少的,抽取比例可相对大一些);在取样组内对 SRAP 信息进行遗传多样性和聚类分析,依据遗传相似性阈值划分为不同的亚组,在各亚组内按 50% 比例随机抽取一定数量的种质构成样本群 P_5 。

抽样方法 3:对各区域组内的种质进行遗传多样性和聚类分析,将各组按遗传相似性阈值分为不同的亚组,在各亚组内抽取一定数量的种质构成样本群 P_6 (对遗传多样性小的种质,在样本群所占比例可小一些;对遗传多样性大的种质,所占比例可大一些);通过上述方法确保每个亚组至少有 1 份种质入选。

样本群 P_4 (15 个样本)编号:5、8、12、13、15、18、25、27、28、31、34、36、39、41、45;样本群 P_5 (15 个样本)编号:1、2、7、8、10、13、19、27、28、34、35、36、39、40、43;样本群 P_6 (14 个样本)编号:1、3、8、12、13、23、27、28、33、35、38、39、41、44。

将 45 份样本建立的初级核心种质根据鳞茎表型分为卷丹组、百合组,在组内对 SRAP 信息进行聚类,根据遗传相似性阈值在各组内抽取一定数量的种质构成样本群 P_7 。样本群 P_7 (14 个样本)编号:1、3、8、10、14、20、28、34、37、38、40、41、42、43。

1.2.3 核心种质的数据分析 对从 SRAP 标记中得到的原始数据,在相同迁移位置,清晰条带记为 1,模糊或无条带记为 0,建立样品 SRAP 标记的二元矩阵。通过 PopGene32 软件计算筛选出的核心种质样本群的多态性位点数(NPL)、多态性位点百分比(PPL)、平均观测等位基因数(N_A)、平均有效等位基因数(N_E)、Nei's 基因多样性指数(H)、Shannon's 信息指数(I)、Nei's 基因遗传距离(GD)等指数。采用 NTSYS-PC

(Version 2.1) 软件计算供试居群间 Dice 遗传相似系数,进行非加权(UPGMA)聚类,并用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行 t 检验,根据检验结果评价核心种质。

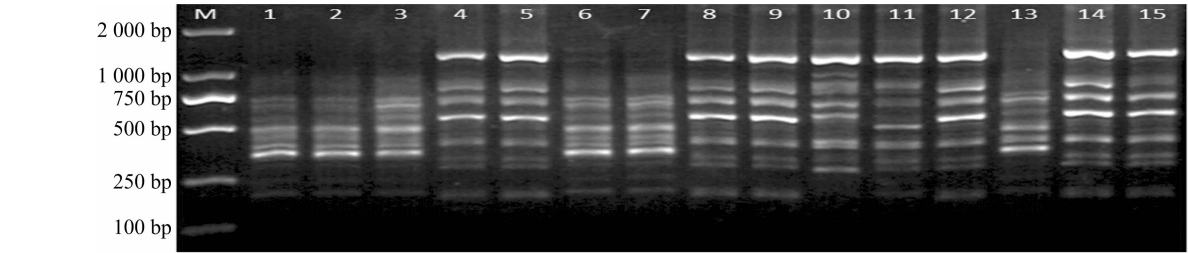
2 结果与分析

2.1 SRAP 遗传多样性分析

部分 SRAP 扩增结果见图 1、图 2。利用筛选的 26 对引物对 45 份百合初级种质的基因组 DNA 共扩增出 278 个位点,多态位点为 218 个,物种水平上多态性比例 78.42%,Nei's 基因多样性指数 H 为 0.307 9,遗传多样性为 0.307 9,Shannon's 信息指数 I 为 0.446 9,遗传距离变化范围为 0.010 9~0.791 3。4 个区域组多态位点百分比低于种水平的范围是 65.47%~72.66%,Nei's 基因多样性指数 H 为 0.205 7~0.277 3,Shannon's 信息指数 I 为 0.312 9~0.408 9,遗传距离变化范围为 0.056 3~0.222 9,区域间的遗传分化指数为 0.236 3,表明 76.37% 的遗传变异存在于地域内。可以认为湖南地区百合种质有一定程度基因交流,各种质遗传距离与地理距离具有一定的相关性,百合、卷丹在湖南省各区域均有生长、种植,且存在杂交情况,由于各地区相互引种和品种推广,各区域组内存在很大的遗传变异。

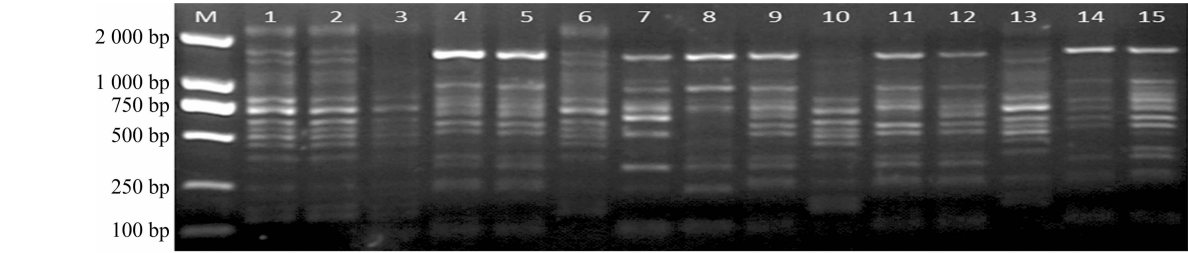
2.2 核心种质的确立

根据各样品群的遗传多样性分析结果(表 2),各样本群 P_5 的有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数均大于其他样本群,说明 P_5 在分子水平上的遗传多样性最高,与初始种质遗传指数更为接近。样本群 P_3 、 P_6 的各指数与 P_5 较为接近,可能是由于 P_3 、 P_6 的多态基因保留率均低于 P_5 ,导致 P_3 、 P_6 的 Nei's 基因多样性指数 H 、Shannon's 信息



M—标准分子量 DNA；1~15—湖南省不同地区的百合种质

图1 部分 SRAP 扩增结果



M—标准分子量 DNA；1~15—湖南省不同地区的百合种质

图2 部分 SRAP 扩增结果

指数 I 均低于 P_5 。为更为全面地保存位点信息及验证样本群 P_5 的代表性,以样本群 P_3 、 P_6 为基础,互相补充确立新的候选核心种质 P_{36} (20 个样本),编号为 1、3、4、8、11、12、13、20、23、27、28、33、34、35、38、39、40、41、43、45。由 P_{36} 、 P_5 构成初选核心种质进行遗传数据分析。

表 2 湘产百合种质各样品群的遗传多样性分析

群体	多态位点数 (个)	多态位点 百分比(%)	多态基因 保留率(%)	观测等位 基因数(个)	有效等位 基因数(个)	Nei's 基因 多样性指数	Shannon's 信息指数
初始种质	218	78.42		1.784 2	1.559 0	0.307 9	0.446 9
P_1	218	78.42	100.00	1.784 2	1.512 3	0.297 7	0.439 4
P_2	218	78.42	100.00	1.784 2	1.513 3	0.297 7	0.439 6
P_3	217	78.06	99.54	1.780 6	1.528 0	0.304 6	0.448 1
P_4	204	73.38	93.58	1.733 8	1.481 1	0.277 6	0.409 9
P_5	218	78.42	100.00	1.784 2	1.531 0	0.305 5	0.448 8
P_6	216	77.70	99.08	1.777 0	1.514 3	0.297 5	0.438 6
P_7	100	78.06	99.54	1.780 6	1.513 1	0.297 0	0.438 1

通过对比初始种质、样本群 P_5 、 P_{36} 遗传信息,发现候选种质 P_{36} 、 P_5 的各遗传信息指标保留率在 97% 以上,符合 70% 的最低要求^[15];候选种质 P_5 的有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数仍明显优于 P_{36} (表 3)。说明样本群 P_5 较其他群组更具有代表性,更能反映初始种质的遗传信息,经筛选最终确立样本群 P_5 为湘产百合的核心种质。

表 3 湘产百合初选核心种质的遗传多样性分析

群体	种质样本 数量(个)	多态位点数 (个)	多态位点百分率 (%)	观测等位 基因数(个)	有效等位 基因数(个)	Nei's 基因 多样性指数	Shannon's 信息指数
初始种质	45	218	78.42	1.784 2	1.559 0	0.307 9	0.446 9
P_5	15	218	78.42	1.784 2	1.531 0	0.305 5	0.448 8
P_{36}	18	218	78.42	1.784 2	1.518 5	0.299 8	0.441 9
P_5 保留率(%)	33.33	100.00	100.00	100.00	98.20	99.22	100.43
P_{36} 保留率(%)	44.44	100.00	100.00	100.00	97.40	97.37	98.88

2.3 核心种质的评价

将初级核心种质余下的 30 份样品作为保留种质,通过对比核心种质与保留种质,核心种质保留 87 份百合样品中的 15 份样品 (17.2%),很好地保留了多态位点,各项指标明显优于保留种质 (表 4)。表明由初级种质中抽取的 15 份核心种质很好地保留了初级种质的遗传多样性,保留种质中因减少了遗传距离较大的种质,导致各指标明显降低。

利用 SPSS 17.0 软件对有效等位基因数、Nei's 基因多样

性指数、Shannon's 信息指数进行 t 检验。由表 5 可见,核心种质与初始种质的有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数、Shannon's 信息指数在 0.05 水平上差异不显著,核心种质能很好地代替初始种质。

3 结论与讨论

3.1 核心种质的代表性、异质性、多样性

构建湘产百合核心种质要满足代表性、异质性、多样性的

表 4 核心种质与保留种质遗传多样性对比

群体	种质数量 (个)	多态位点数 (个)	多态位点百分比 (%)	有效等位基因数 (个)	Nei's 基因 多样性指数	Shannon's 信息指数
核心种质	15	218	78.42	1.531 0	0.305 5	0.448 8
保留种质	30	197	70.86	1.470 5	0.268 9	0.396 2

表 5 初始种质与核心种质的 *t* 检验结果

指数	平均数		标准差		标准误		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	初始种质	核心种质	初始种质	核心种质	初始种质	核心种质		
<i>N_E</i>	1.559 0	1.531 0	0.397 7	0.350 3	0.023 9	0.021 0	1.577	0.116
<i>H</i>	0.307 9	0.305 5	0.201 6	0.184 1	0.120 9	0.110 4	0.332	0.740
<i>I</i>	0.446 9	0.448 8	0.259 1	0.278 2	0.016 7	0.015 5	-0.222	0.824

需求,尽可能地对各地区广泛取样,使其具有较好的代表性、多样性;但是对主要产区取样须考虑相互引种、种内基因交流、遗传变异及优良品种推广等因素;为获得更多的多态位点,应适当扩大主要产区的取样,筛除相似种质,优选多样性种质。本研究表明,来自龙山县洗洛乡编号为 27、34 的样本间遗传距离为 0.503 7,SRAP 分子数据显示为较大的遗传差异,说明扩大主要产区内取样的必要性,以避免漏选;最终确定核心种质时,不能忽略各地区百合种质因杂交和基因变异对多样性的影响,须确定 1 个相对固定的遗传相似性阈值,对最终核心种质各地区种质所占份额进行调整,以保证湘产百合的代表性和异质性。SRAP 扩增获得 278 个位点,其中 218 个具有多态性,满足了核心种质遗传多样性需求。

3.2 核心种质取样方法

核心种质含 15 份样品,其中 3 份种质来自湘东北地区,占湘东北地区种质数量的 42.9%,占核心种质数量的 20%;5 份种质来自湘中南地区,占湘中南地区种质数量的 62.5%,占核心种质数量的 33.3%;3 份种质来自湘西南地区,占湘西南地区种质数量的 33.3%,占核心种质数量的 20%;4 份种植来自湘西北地区,占湘西北地区种质数量的 19.0%,占核心种质数量的 26.7%。该来源分布符合核心种质代表各区域遗传分布的基本需求。湘西北地区的龙山县、湘西南地区的隆回县为湖南省百合主要产区,本研究在上述 2 个地区采样较多,在龙山县采样 31 份,采样量占湘西北地区采样量的 72.6%,根据 50% 的取样原则,其中 16 份入选初级种质;在隆回县采样 10 份,采样量占湘西南地区采样量的 55.6%,其中 5 份入选初级种质。因此,区域组内部分种质间会具有很高的遗传相似性,且相似种质数量较多,但根据 76.37% 的遗传变异存在于地域内的分析结果,又表明区域组内具有较大的遗传差异,少部分种质对区域组内的遗传多样性有很大影响。因此,有必要依据遗传相似性阈值将其划分为不同的亚组,以说明地域内的遗传分化及各样本对区域组遗传多样性的影响,再利用 50% 比例在各亚组内随机抽取一定数量的种质构成样本群。通过该方法筛选,减少了样本数量对筛选结果的影响,以 50% 比例亚组抽取比例,又进一步确定了核心种质的规模,使各区域组间所选取的样本遗传相似性较大的种质入选数量减少,所取得的群体更具有代表性,也结合百合种质相互引种和优良品种推广种植而导致各区域组内存在较大的遗传变异的结论,避免相似种质入选概率。

3.3 核心种质的取样比例

在确定核心种质所含样本总量时,须结合所收集样本的总体数量选择恰当的抽样比。我国有悠久的百合使用历史,人工选择对物种进化有很大影响,核心种质构建的抽样过程中,须更多地平衡推广品种与野生自然品种、区域特有品种的抽样比例;对多态性好的群组,在抽取比例选取时可扩大其在核心种质中的比例。多数植物核心种质的抽样比例为全部收集种质的 5% ~ 30%,一般为 10% 左右,但较小种质资源群体保存的遗传变异和结构对抽样比更为敏感^[16]。湘产百合核心种质选用逐步聚类取样法和分层抽样法选取多个抽样比 50%、35%、20%,最终优选出 15 个样本构成核心种质,占收集百合种质总量的 17.2%,符合构建核心种质的要求。

3.4 结论

通过分层抽样法使用 SRAP 分子标记信息,优选出的核心种质保存 218 个多态位点中的 218 个,保留率 100%,多态性比例 78.42%,观测等位基因数 1.784 2 个,有效等位基因数 1.531 0 个,Nei's 基因多样性指数 0.305 5,Shannon's 信息指数 0.448 8。通过遗传多样性分析和 *t* 检验,认为所建立的湘产百合核心种质很好地代表了初级核心种质,又很好地代表了湖南省各地区的百合遗传变异,核心种质群体的差异性和多样性很高,具有很大的保存意义。

参考文献:

[1]胡 再,孙志国,黄莉敏,等. 百合资源地理标志权与植物新品种权保护[J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8997-8999.
[2]姚启伦,陈发波,方 平. 武陵山区玉米地方品种核心种质的遗传多样性与评价[J]. 湖北农业科学,2014,53(7):1506-1508,1512.
[3]李保印,周秀梅,张启翔. 中原牡丹品种资源的核心种质构建研究[J]. 华北农学报,2011,26(3):100-105.
[4]聂 琼,刘仁祥,梁 微. 用 ISSR 标记构建烟草核心种质的指纹图谱[J]. 西南农业学报,2010,2(2):335-339.
[5]李丹婷,夏秀忠,农保选,等. 广西地方稻种资源核心种质构建和遗传多样性分析[J]. 广西植物,2012,32(1):94-100.
[6]Shashidharal G,Hema M V,Koshy B,et al. Assessment of genetic diversity and identification of core collection in sandal wood germplasm using RAPDs[J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2003,78(4):528-536.

段丽君,邓青云,李国元,等. 冬枣花药培养愈伤组织诱导的影响因素[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):60-62.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.015

冬枣花药培养愈伤组织诱导的影响因素

段丽君, 邓青云, 李国元, 汪殿蓓

(湖北工程学院生命科学技术学院,湖北孝感 432000)

摘要:以冬枣花药为试验材料,探讨冬枣花药离体培养中不同麦芽糖浓度、不同激素浓度及低温预处理和高温预处理对花药培养效果的影响,建立一套更适合冬枣花药培养技术体系。结果表明:花药膨大率与出愈率之间有明显的相关性;在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+麦芽糖 20 g/L+琼脂 4 g/L 培养基中最高花药愈伤组织诱导率达 37.2%,4℃低温预处理 3 d 能显著提高愈伤组织诱导率,35℃高温预处理出愈率会显著降低。

关键词:冬枣;花药培养;愈伤组织;诱导;技术体系;膨大率;出愈率;影响因素

中图分类号:S665.104⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0060-03

冬枣 (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) 为鼠李科枣属植物,别称果子枣、雁过红、庙上福、苹果枣、冰糖枣,果皮薄,核小,果肉汁多、细嫩酥脆、色泽鲜艳、甜味浓,富含钙、铁、锌等多种矿物质,维生素 C 含量颇丰富,素有维生素 C 之王的称号,其含糖量适中,味美可口,具有清理肠胃,有助于消化之功效,是美容和减肥的佳品。关于冬枣的花药培养研究较少,王娜通过诱导胚胎愈伤组织的途径对冬枣花药进行培养,获得 1 株单倍体植株^[1];武晓红研究了甘露醇、不同温度条件预处理对枣花药愈伤组织诱导的影响^[2];刘晓光研究了冬枣花药愈伤组织的诱导,悬浮系的建立、培养及愈伤悬浮系原生质体的分离^[3]。本试验分析了麦芽糖、激素和低温预处理等多种因素在冬枣花药愈伤组织诱导中的作用,建立一套更适合冬枣花药培养的技术体系,从而推动湖北省孝昌县冬枣产业的快速发展。

1 材料与方法

收稿日期:2014-12-25

基金项目:湖北省教育基础 Research 计划(编号:D20102703);湖北工程学院学校科研项目(编号:2012021)。

作者简介:段丽君(1982—),女,湖北黄冈人,硕士,讲师,主要从事园林植物的研究和园林设计。E-mail:46362782@qq.com。

通信作者:李国元,教授。E-mail:472030137@qq.com。

1.1 试验材料

冬枣花药采自湖北省孝昌县种植地。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 5—6 月选取直径为 0.3~0.6 cm 且花萼尚未张开的未成熟的新鲜花蕾,在 70% 乙醇中浸泡 10 s,用无菌水冲洗 3 次,用 0.1% 氯化汞溶液浸泡 10 min,再用无菌水冲洗 3~4 次,将花蕾转移至已经灭过菌、铺有滤纸的灭菌培养皿内,剥取花蕾,取出花药,接种到盛有 50 mL 固体培养基的 100 mL 的三角瓶中,每瓶接种 30 枚,每个处理接种 10 瓶,放在(26±1)℃培养室黑暗条件下培养,观察不同条件下花药愈伤组织的诱导。

1.2.2 继代和分化培养 愈伤组织在培养基上生长一段时间后,营养物枯竭,水分散失,并已经积累了一些代谢产物,此时须要将这些组织转移到新的培养基上,继代培养基使用 MS+6-BA 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+麦芽糖 20 g/L+琼脂 4 g/L。每次继代培养约 20 d,1~2 次继代后,挑选脆的胚性愈伤组织转移至分化培养基 MS+NAA 0.2 mg/L+麦芽糖 20 g/L+琼脂 4 g/L 上。

2 结果与分析

2.1 花药愈伤组织的诱导

花药在诱导培养基上培养 2 d 后,局部开始发生褐变,4~5 d 后大部分的花药开始膨胀,出现不同程度的卷曲,花

[7] Vandemark G J, Ariss J J, Baughan G A, et al. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms [J]. *Euphytica*, 2006, 152(1): 9-16.

[8] 吴莺莺,彭方仁,郝明灼,等. 油茶 SRAP-PCR 反应体系的建立[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2011, 35(5): 112-116.

[9] 曹亮,魏宝阳,李顺祥. SRAP 和 SCAR 分子标记应用于中药材研究进展[J]. *科技导报*, 2010, 28(12): 104-109.

[10] 黄永芳,杨懋勋,柳军,等. 广东野百合 DNA 提取和 RAPD 条件的优化[J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(3): 251-255.

[11] 陈名红,李玉,刘多,等. 适于 ISSR-PCR 扩增的百合基因组 DNA 的提取[J]. *北方园艺*, 2012(24): 108-110.

[12] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2/3): 455-461.

[13] 张林,陈俊百,黄勇,等. 基于 ISSR 标记初选格鲁桑类型桑树核心种质[J]. *蚕业科学*, 2011, 37(3): 380-388.

[14] 黎毛毛,黄永兰,余丽琴,等. 利用 SSR 标记构建江西稻种资源核心种质库的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(6): 952-957.

[15] Brown A D. Core collections: a practical approach to genetic resources management [J]. *Genome*, 1989, 31(5): 818-824.

[16] 李自超,张洪亮,曹永生,等. 中国地方稻种资源初级核心种质取样策略研究[J]. *作物学报*, 2003, 29(1): 20-24.