

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.10.005

玛瑙红樱桃离体快繁及组培苗的变异检测^①

田 田, 刘鹏飞, 乔 光, 文晓鹏

贵州大学 农业生物工程研究院, 贵阳 550025

摘要: 以贵州玛瑙红樱桃的休眠芽为外植体, 通过不同激素质量浓度组合的正交试验, 建立了高效的离体培养体系; 利用 ISSR 分子标记, 对组培苗的遗传变异进行检测, 结果表明: 在引物检测范围内, 玛瑙红樱桃离体快繁至第 8 代仍然能保持其遗传稳定性; DNA 甲基化的 MASP 分析表明, 组培苗的甲基化敏感多态性随继代次数的增加而逐步升高, 第 5 代组培苗总甲基化率最高, 为 21.4%, 全甲基化率为 12.4%, 半甲基化率为 9.0%。

关键词: 玛瑙红樱桃; 离体培养; ISSR 检测; MSAP 分析; 遗传变异

中图分类号: S662.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2015)10-0030-08

玛瑙红樱桃是在贵州省 2011 年审定的新品种, 该品种丰产优质、耐贮性好, 目前在贵州省大面积栽培^[1], 并推广到周边省区. 在大面积生产的过程中存在繁殖系数低、病毒病传播严重等问题, 组织培养能够有效解决生产中存在的这些问题. 尽管对于樱桃离体快繁的研究较多^[2], 但对贵州大面积栽培的玛瑙红樱桃尚未见报道; 同时组培材料广泛存在遗传变异和表观遗传变异, 但涉及樱桃再生植株的遗传变异和 DNA 甲基化分析尚未见报道. 建立玛瑙红樱桃离体快繁体系, 并利用 ISSR 标记及 MSAP 检测对继代增殖的组培苗进行遗传变异分析, 旨在为工厂化育苗奠定技术和理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

贵州玛瑙红樱桃成熟植株休眠芽为无菌苗建立试验材料.

1.2 离体再生体系的建立

取玛瑙红樱桃休眠芽为外植体, 用 0.1% (v/v) 升汞溶液加入两滴吐温 80 灭菌 6~10 min, 无菌水清洗 5 次, 接入 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L GA3+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂 (pH 值为 6.0~6.2) 培养基中培养. 待休眠芽萌发后长至 1~2 cm 时转接至 MS+1.0 mg/L KT+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L GA3+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂进行培养.

选取长势相同的组培苗, 根据 $L_9(3^4)$ 正交设计 (表 1), 以 KT(A), 6-BA(B), IBA(C), GA3(D) 为实验因子, 各设计 3 个梯度, 培养 45d 后观察组培苗生长情况, 统计增殖系数, 筛选出最适增殖培养基.

使用壮苗生根一步法 (表 2), 培养 45 d 后, 统计其生根率、根长、根数及植株长势, 筛选出利于玛瑙红樱桃苗壮苗、生根的培养基.

选取长势良好的组培苗, 移栽在已灭菌的基质中, 40 d 后观察植株长势并统计成活率.

① 收稿日期: 2015-05-05
基金项目: 贵州省农业攻关项目 (黔科合[2012]3016); 研究生创新基金项目 (研农 2014025).
作者简介: 田 田 (1990-), 女, 贵州安顺人, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种的研究.
通信作者: 文晓鹏, 教授.

表 1 激素质量浓度对试管苗增殖影响的实验设计

处理号	KT/(mg · L ⁻¹)	6-BA/(mg · L ⁻¹)	IBA/(mg · L ⁻¹)	GA3/(mg · L ⁻¹)
CK	0	0	0	0
1	0.5	0.1	0.1	0.5
2	0.5	0.5	0.5	1.0
3	0.5	1.0	1.0	1.5
4	1.0	0.1	0.5	1.5
5	1.0	0.5	1.0	0.5
6	1.0	1.0	0.1	1.0
7	1.5	0.1	1.0	1.0
8	1.5	0.5	0.1	1.5
9	1.5	1.0	0.5	0.5

表 2 生根壮苗实验设计处理号

处理号	IBA	GA3	处理号	IAA	GA3	处理号	NAA	GA3
1	0.1	0	10	0.1	0	19	0.25	0
2	0.1	0.5	11	0.1	0.5	20	0.25	0.5
3	0.2	1.0	12	0.2	1.0	21	0.25	1.0
4	0.2	0	13	0.2	0	22	0.5	0
5	0.2	0.5	14	0.2	0.5	23	0.5	0.5
6	0.3	1.0	15	0.3	1.0	24	0.5	1.0
7	0.3	0	16	0.3	0	25	0.75	0
8	0.3	0.5	17	0.3	0.5	26	0.75	0.5
9	0.1	1.0	18	0.1	0	27	0.75	1.0

1.3 遗传变异的 ISSR 检测

选取玛瑙红樱桃田间母株叶片，第 1 代至第 8 代组培苗中每代随机抽取 3 个单株材料，采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取组培苗叶片 DNA，并用 0.1%(w/v)琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量，RNA 去除干净，无降解现象或降解很少，无拖尾，无弥散，且质量比较稳定，一致性高，放入-20℃保存备用。

以各代组培苗 DNA 为模版，选取 21 条 ISSR 引物，进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳后统计条带数，进行 ISSR 遗传变异性检测。采用 10 μL 反应体系中进行 ISSR-PCR 扩增，反应体系包括：0.8 μL 引物(引物及序列见表 3)，1.0 μL DNA，5.0 μL Mix(天根生化科技有限公司 2×Taq Plus Master Mix)，3.2 μLddH2O(其中，引物浓度为 10 mmol/μL)。PCR 扩增程序：94℃预变性 5 min，94℃变性 40 s，Tm(各个引物的退火温度)60 s，72℃延伸 60 s，35 个循环，之后 72℃延伸 7 min，4℃保存。

表 3 用于 ISSR 扩增的引物及序列

引物	序 列	引物	序 列
M01	CAC ACA CAC ACA R	840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
M03	CAC CAC ACA CAR g	846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
M05	gCT gCT gCT gCT Y	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
M08	AgC AgC AgC AgC AY	863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	873	GAC AGA CAG ACA GAC A
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	876	GAT AGA TAG ACA GAC A
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	880	GGA GAG GAG AGG AGA
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA		

1.4 MSAP 检测

对玛瑙红樱桃 1 至 8 代离体组培材料,每代组培苗中随机选出 3 株长势一致的叶片提取 DNA,参考 Xiong 等^[3]的方法并进行一定优化,进行酶切、连接、PCR 预扩增及采用 17 对选择扩增的引物(表 4)进行 PCR 选择性扩增.选择性扩增后的混合液加入 3.5 μL SGB,97 ℃变性 7 min,,取 5 μL 上样于 6%(w/v)变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电板电泳,预电泳 80 W,10 min,电泳 150 W,100 min 后银染观察.

采用 *Eco*R I/*Hpa* II 和 *Eco*R I/*Msp* I 对材料叶片 DNA 进行双酶切,将得到的 MSAP 条带进行统计分析,根据泳道内条带的有无,可将条带类型分为 3 种:Ⅰ型,H,M 酶切均有的条带;Ⅱ型,前者有带,后者无带,单链外甲基化;Ⅲ型,前者无带,后者有带,为双链内甲基化.8 代离体组培苗基因组 DNA 扩增条带,在 Excel 内将有条带处记为“1”,无条带记为“0”,将得到的条带进行统计分析.

表 4 MSAP 分析的接头和引物序列

	引物名称	序列
接头	<i>Eco</i> R I -adapter I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>Eco</i> R I -adapter II	5'-AATTGGGTACGCAGTC-3'
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I -adapter I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	<i>Hpa</i> II- <i>Msp</i> I -adapter II	5'-CGCTCAGGACTCAT-3'
预扩引物	E-A	5'-GTAGACTGCGTACCAATTCA-3'
	H/M+T	5'-GAGTCCTGAGCGGT-3'
选扩引物	E+A+P2	GTAGACTGCGTACCAATTCACA
	E+A+P4	GTAGACTGCGTACCAATTCACC
	E+A+P5	GTAGACTGCGTACCAATTCACG
	E+A+P7	GTAGACTGCGTACCAATTCAAC
	E+A+P9	GTAGACTGCGTACCAATTCAAT
	H/M+T+P1	GAGTCCTGAGCGGTCA
	H/M+T+P2	GAGTCCTGAGCGGTCC
	H/M+T+P3	GAGTCCTGAGCGGTCT
	H/M+T+P4	GAGTCCTGAGCGGTAC
	H/M+T+P6	GAGTCCTGAGCGGTGA
	H/M+T+P7	GAGTCCTGAGCGGTAG
	H/M+T+P8	GAGTCCTGAGCGGTTA

1.5 数据统计分析

利用 DPS 数据分析软件对各处理的增殖系数、根长及根数进行方差分析,每个处理内接种 4 株苗,并进行 4 次重复;各处理平均值采用 Duncan's 多重比较进行检验.生根率为生根植株数与接种组培苗数之比,并用 SPSS 18.0 的 *t* 检验进行生根率的显著性分析.

2 结果分析

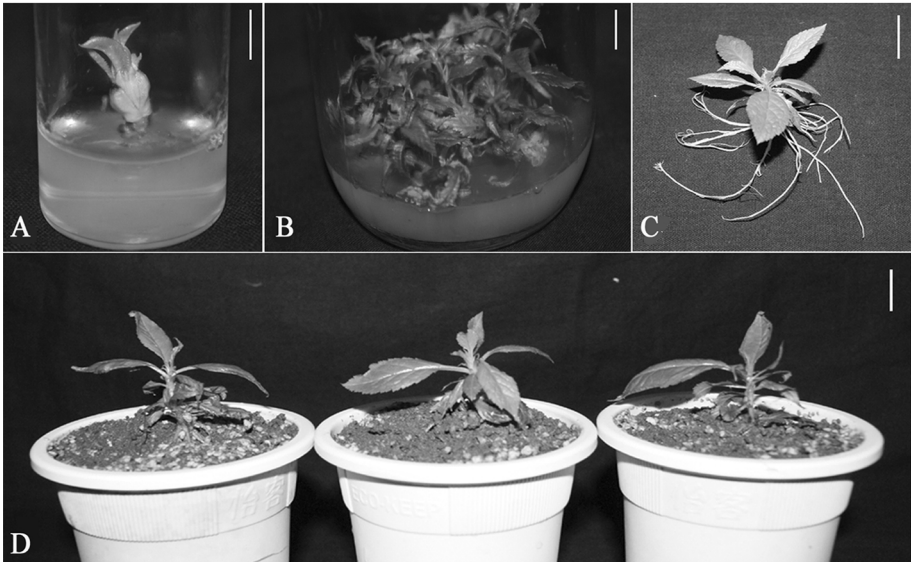
2.1 再生体系的建立

采用污染率小、存活率高的休眠芽作为外植体,接种 10 d 后逐渐萌发(图 1A),25 d 后休眠芽长至 1~2 cm 后转入新的培养基中 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+1.0 mg/L GA3+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 值为 6.0~6.2.

正交试验表明,4 号处理最为显著,见图 2.组培苗长势较其他处理旺盛,植株较高,叶色较深,增殖效果最好(图 1B),五号处理也较为显著;由此可以选定玛瑙红樱桃最佳增殖培养基为:MS+1.0 mg/L KT+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+1.5 mg/L GA3+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂.

通过生根壮苗试验结果表明,植株在培养基:4 号处理:MS+0.2 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;7 号处理:MS+0.3 mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;13 号处理:MS+0.2 mg/L IAA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,生根率达到 75%,长势良好,主根粗壮且须根较多(图 1C),且 GA3 对玛瑙红樱桃的生

根影响没有统计学意义。根据 DPS 软件得到的根长及根数的平均值及标准差可以得到以下结果见表 5，表明 4,7,13 号处理有统计学意义，且生根率最好，植株长势最好，可以视作最适生根壮苗培养基。



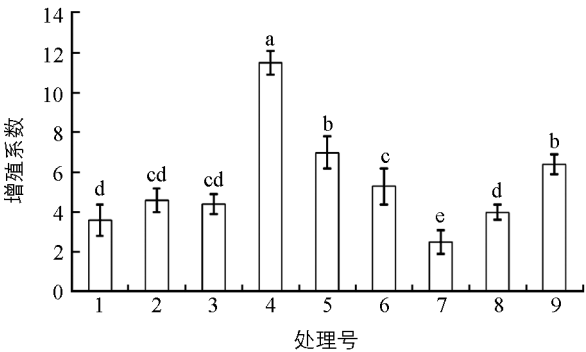
A. 休眠芽外植体的萌发; B. 增殖培养; C. 组培苗生根; D. 组培苗的驯化(图中比例尺“|”表示 1 cm).

图 1 玛瑙红樱桃再生体系

将植株及根部长势良好的组培苗打开培养瓶后炼苗 2~3 d，洗净根部培养基，移栽至已灭菌的基质中，移栽 50 株，置于能充分保湿的温室中培养，每 5~6 d 浇 1 次水，30 d 后植株呈现较好长势(图 1D)。

2.2 遗传变异检测

玛瑙红樱桃共继代 8 代，从每代继代组培苗中随机选出 3 株长势一致的叶片提取 DNA，利用 21 条 ISSR 引物对玛瑙红樱桃不同继代次数的组培苗叶片基因组进行 PCR 扩增，21 条引物共扩增出 95 条清晰的谱带，引物扩增出的谱带数为 3~6 条，平均每个扩增 4.5 条，DNA 长度均在 250~2 000 bp 之间，其中 95 条带全部为单态带(图 3)，表明玛瑙红樱桃在上述培养条件下继代 8 次后，组培苗遗传稳定。



不同字母表示经邓肯氏多重极差检验，在 0.05 水平上差异有统计学意义。

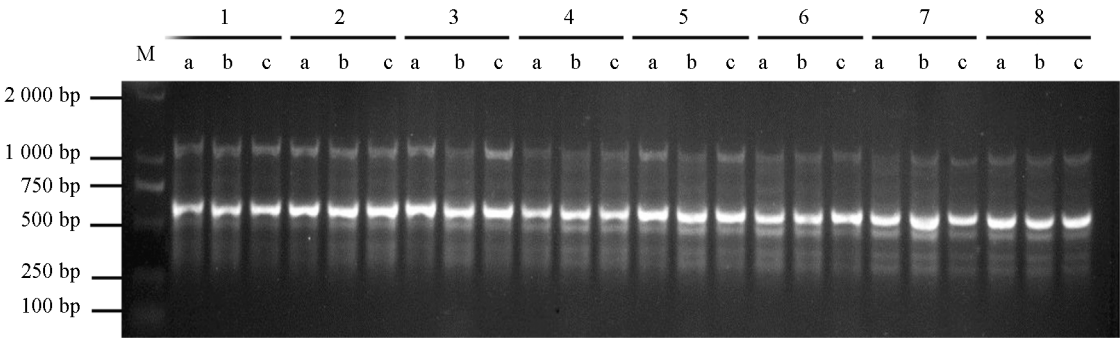
图 2 不同激素组合继代培养基的增殖效果

表 5 不同处理对试管苗生根壮苗的影响

处理	生根率/%	根数	根长/cm	植株及根系形态
1	41.67d	2.3±1.0g	3.0±0.0c	植株正常；根粗，呈黄褐色
2	0.00i	1.0±0.0ij	0.0±0.0l	植株矮小
3	16.67g	1.0±0.0ij	1.5±0.6fgh	植株矮小；根细，呈乳白色
4	75.00a	7.8±1.0d	2.8±0.5cd	植株较壮；根粗且须根多，呈乳白色
5	8.33h	1.0±0.0ij	0.6±0.3jk	植株正常；根细且少，呈乳白色
6	8.33h	1.0±0.0ij	0.5±0.0kl	植株呈病状；根细且少，呈乳白色
7	75.00a	9.8±1.0c	2.4±0.5de	植株较壮；主根粗壮，须根较多，呈黄褐色
8	8.33h	1.0±0.0ij	0.5±0.0kl	植株矮小；根细且少，呈乳白色
9	41.67d	3.0±0.8g	1.5±0.4fgh	植株较壮；根系正常，呈黄褐色
10	33.33e	4.0±0.8f	2.8±0.5cd	植株正常；根系正常，呈黄褐色
11	25.00f	1.8±0.5hi	1.1±0.3ij	植株正常；主根粗壮，呈黄褐色

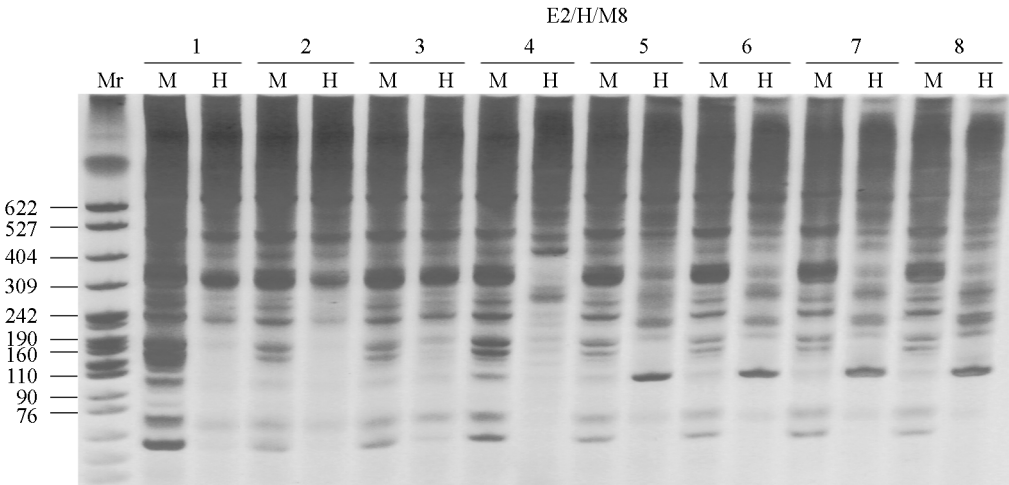
续表 5

处理	生根率/%	根数	根长/cm	植株及根系形态
12	0.00i	0.0±0.0jk	0.0±0.0l	植株矮小
13	75.00a	15.8±1.0a	3.6±0.3ab	植株较壮; 主根粗壮, 须根较多, 呈黄褐色
14	25.00f	1.3±0.5i	1.5±0.6fgh	植株呈病状; 根细且少, 呈乳白色
15	8.33h	1.0±0.0ij	1.0±0.0ijk	植株正常; 根细且少, 呈乳白色
16	58.33b	5.5±1.3e	1.7±0.3fg	植株较壮; 主根粗壮, 须根较多, 呈黄褐色
17	33.33e	1.8±0.5hi	2.0±0.8ef	植株呈病状; 根细且少, 呈乳白色
18	50.00c	2.8±0.5g	3.8±0.5a	植株正常; 须根较多, 呈黄褐色
19	75.00a	11.8±1.0b	3.0±0.8c	植株较壮; 主根粗壮, 须根较少, 呈黄褐色
20	16.67g	1.0±0.0ij	1.0±0.0ijk	植株正常; 须根较多, 呈黄褐色
21	8.33h	1.0±0.0ij	1.0±0.0ijk	植株正常; 根粗, 须根较少, 呈黄褐色
22	58.33b	4.0±0.8f	1.4±0.3ij	植株呈病状; 根粗, 呈黄褐色
23	25.00f	2.3±0.5gh	1.1±0.3ij	植株呈病状; 须根较多, 呈黄褐色
24	0.00i	0.0±0.0jk	0.0±0.0l	植株矮小
25	75.00a	12.0±0.8b	3.2±0.2bc	植株呈病状; 根粗, 呈黄褐色
26	8.33h	1.0±0.0	1.0±0.0ijk	植株正常; 呈乳白色
27	8.33h	1.0±0.0	1.0±0.0ijk	植株正常; 呈乳白色



M 为相对分子质量标记, 1—8 泳道为随机取出的第 1 代至第 8 代组培苗材料, 其中, a,b,c 分别为每代组培苗的重复.

图 3 不同继代次数组培苗遗传变异的 ISSR(引物 876)检测



Mr 为相对分子质量标记.

图 4 不同继代次数组培苗 DNA 甲基化部分电泳图

2.3 甲基化检测

在 81 对选择性扩增引物中筛选出 17 对引物,对 8 代离体组培苗基因组 DNA 进行选择性的扩增(图 4),从第 1 代至第 8 代,共扩增出 5 990 条带,其中全甲基化位点 717 个,半甲基化位点 395 个,各代组培苗 DNA 基因组半甲基化率、全甲基化率及总甲基化率见表 6.随着继代次数的增加,甲基化水平从第 1 代至第 5 代逐步增高,第 6 代至第 8 代总甲基化水平逐步降低,但仍然比前 4 代组培苗的甲基化水平高,推测可能在组织培养的过程中 DNA 甲基化的同时存在去甲基化作用,此动态过程使得甲基化水平呈现逐步升高后又逐步降低的趋势.第 5 代组培苗总甲基化率最高为 21.4%,全甲基化率为 12.4%,半甲基化率为 9.0%;直至第 8 代组培苗,总甲基化率为 20.5%,全甲基化率为 12.5%,半甲基化率为 8.0%.

表 6 分析各代玛瑙红樱桃苗 DNA 甲基化多态性

样品	条带类型			总扩增条带数 I + II + III	半甲基化率/ %	全甲基化率/ %	总甲基化率/ %
	I	II	III				
1	658	27	71	756	3.6	9.4	13.0
2	632	26	81	739	3.5	11.0	14.5
3	614	29	100	743	3.9	13.5	17.4
4	585	61	87	733	8.3	11.9	20.2
5	578	66	91	735	9.0	12.4	21.4
6	587	68	91	746	9.1	12.2	21.3
7	608	56	99	763	7.3	13.0	20.3
8	616	62	97	775	8.0	12.5	20.5

3 结 论

玛瑙红樱桃作为贵州特有的樱桃品种,其适应性良好,产量较高,具有较好的经济效益,为了能够快速获得大量品质优良的组培苗,离体培养成为必要手段;离体培养多利用茎段^[4-5]、茎尖^[6-7]作为外植体,不仅能够快速繁殖,在植物品种改良、基因工程育种方面均发挥着重要作用,采用组织培养可为微嫁接^[8]及茎尖脱毒^[9]提供基础材料.在樱桃离体培养的研究中,中国樱桃增殖培养中添加 6-BA,NAA,其增殖系数达到 8.0^[10],贵州野生樱桃增殖培养基中添加 IBA,IAA,其增殖系数 4.42^[11];在甜樱桃组培苗生根研究中,魏明杰等^[12]研究了 F14 培养基及 IBA 对组培苗生根的作用;本研究以玛瑙红樱桃休眠芽为外植体,在其他樱桃离体培养中多选用茎段为外植体进行培养,随后筛选出外植体的最适灭菌方式,并进行增殖培养基的激素配比的筛选,增殖培养基内激素组合 KT,6-BA,IBA,GA3 进行筛选,结果证明增殖系数为 11.5,在樱桃组织培养中增殖系数较高,后期用 IAA,IBA,NAA 以及与 GA3 组合对玛瑙红樱桃组培苗生根的影响,不仅将各激素对生根的作用进行单独验证,也将 GA3 与各激素的组合对生根的作用进行了验证,结果表明 IBA,IAA 对樱桃生根影响较为明显,GA3 对玛瑙红樱桃组培苗的生根并无促进作用.

体细胞无性系变异成为不可忽视的问题,植株发生体细胞遗传变异及表观遗传变异会导致优良性状的丢失,严重影响其利用价值^[13],在组织培养的过程中,体细胞无性系变异为常见现象,变异率可以高达 30%~40%^[14],因此对组培苗进行遗传变异鉴定尤为重要.在近年研究中,对樱桃组织培养的离体遗传变异及表观遗传变异均未见报道,仅利用生理生化方法对甜樱桃实生后代的部分品质性状的遗传变异进行了研究^[15];本文仅对继代后的植株叶片进行代间遗传变异及表观遗传变异检测,对玛瑙红樱桃叶片单细胞具有的变异并未进行检测.

本文利用 ISSR 检测方法对离体培养的玛瑙红樱桃组培苗进行遗传变异检测,在樱桃研究中,多利用 ISSR 技术进行种质资源的检测^[16-17],并未将 ISSR 检测技术利用于遗传变异检测,但在其他植物中,利用 ISSR 技术对离体材料进行遗传变异检测^[18-20].本文采用 ISSR 标记,对建立的玛瑙红樱桃快繁体系培育的组培苗进行遗传变异检测,其可覆盖整个基因组 DNA 的多态性信息,并直接从 DNA 水平检测碱基序列的变化,本文结果得出 DNA 片段无论是带型还是谱带的强弱、数目均与再生前的母株 DNA 一致,这说明再生苗在 DNA 水平上并未发生变异,其遗传物质是稳定的,保持了母株的遗传特性.

DNA 甲基化是表观遗传变异的主要形式,且 DNA 甲基化与植物的体细胞变异密切相关,在植物体

内, 甲基化/脱甲基化是一个高频发生的动态过程, 维持基因稳定性及基因表达调控是植物 DNA 甲基化的生物学作用^[21]. 离体培养时间及继代次数对植物的 DNA 甲基化水平有一定的影响^[22-25], 因此, 对离体培养材料的 DNA 甲基化进行检测, 有助对离体培养材料的种质资源遗传稳定性进行评估, 为离体材料的繁殖及保存提供依据. 本试验采用 MSAP 技术对 DNA 甲基化水平进行检测, 目前该技术已在马铃薯^[26]、豌豆^[27]、竹子^[28]等许多植物离体培养材料种质鉴定中成功应用, 表明 MSAP 技术能够对离体材料培养和保存的遗传稳定性进行准确鉴定; Guo 等^[29]对党参愈伤组织再生植株进行 MSAP 分析, 测出较高的多态性, 其结果与 RAPD, ISSR 分析的遗传变异具有很高的一致性, 表明离体材料的 DNA 甲基化与其遗传变异之间存在内在的联系. 玛瑙红樱桃的 DNA 甲基化检测结果表明, 其甲基化水平随着继代次数逐步增高, 与多数植物的甲基化水平相似, 第 1 至 8 代组培苗, 第 5 代组培苗总甲基化率最高为 21.4%, 第 8 代组培苗总甲基化率下降, 与部分植物甲基化水平变化相符, 植物的甲基化与脱甲基化呈动态变化趋势. 其研究结果为快速获得遗传稳定且品性优良的玛瑙红樱桃组培苗提供保障, 也为今后进一步的工作奠定了基础.

参考文献:

[1] 陈祖瑶, 郑元红, 徐富军. 樱桃早熟新品种玛瑙红的选育 [J]. 中国果树, 2013(1): 8—10.

[2] 何文, 张静, 黄智林, 等. 基于 ITS 序列对栽培中国樱桃遗传多样性及其群体遗传结构的分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(3): 463—472.

[3] XIONG LI ZHONG, MAROOF M A, et al. Patterns of Cytosine Methylation Pattern in an Elite Rice Hybrid and Its Parental Lines Detected by a Methylation Polymorphism Technique [J]. Mol Gen Genet, 1999, 261(3): 439—446.

[4] 赵许朋, 周月, 杨立, 等. “红阳”猕猴桃茎段高效再生体系的建立 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(2): 6—10.

[5] 王茜龄, 余亚圣, 何宁佳, 等. 单倍体川桑(*M. notabilis* Schneid)愈伤组织诱导及丛生芽分化培养 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(10): 50—55.

[6] 黄远新, 张凯, 赵勇, 等. 叶原基形态对甘薯茎尖脱毒培养的影响 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(1): 18—23.

[7] 莫秀媚, 吴秀华, 李明惠, 等. 红花钓钟柳的组织培养及离体快速繁殖 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2014, 36(6): 62—66.

[8] 成密红, 郭军战, 苏美琼, 等. 樱桃组培苗微型嫁接技术研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(12): 63—66.

[9] 刘聪利, 李明, 赵改荣, 等. 樱桃病毒病脱毒检测技术及抗病毒基因工程研究进展 [J]. 果树学报, 2014, 31(增刊): 7—13.

[10] 郑巧娜, 陈学森, 焦其庆, 等. 中国樱桃泰小红樱的组培快繁研究 [J]. 山东农业科学, 2011(6): 20—23.

[11] 陈红, 黄国恩, 冯江平. 贵州野生樱桃离体快繁技术体系的建立 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 59—61.

[12] 魏明杰, 姚振远, 梅丹娜, 等. 樱桃组培快繁技术研究 [J]. 落叶果树, 2012, 44(2): 9—13.

[13] 李卫国, 常天俊, 龚红梅. MSAP 技术及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 生物技术, 2008, 18(1): 83—87.

[14] 丰先红, 李健, 罗孝贵. 植物组织培养中体细胞无性系变异研究 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 70—73.

[15] 郭梁, 陈学森, 王海波, 等. 甜樱桃实生后代部分品质性状的遗传变异 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(5): 200—204.

[16] 陈新, 张庆霞, 徐丽, 等. 12 份樱桃品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 山东农业科学, 2014, 46(11): 12—14.

[17] 宋常美, 文晓鹏, 杨尔泰. 贵州樱桃种质资源的 ISSR 分析 [J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1531—1538.

[18] 于海玲, 王发国, 李仕裕. 东方百合离体再生前后叶片遗传稳定性的 ISSR 检测 [J]. 亚热带农业研究, 2014, 10(1): 35—40.

[19] FAN Qing-jie, ZHENG Si-cheng, YAN Feng-xia, et al. Efficient Regeneration of Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) and an Assessment of the Genetic Fidelity of in Vitro-Derived Plants Using ISSR Markers [J]. Horti Sci Biotech, 2013, 88(5): 631—637.

[20] 王志敏, 牛义, 汤青林, 等. 生姜二倍体与四倍体基因组 DNA 的 RAPD 和 ISSR 分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(2): 15—19.

[21] 李娜, 张畅, 解莉楠, 等. 植物 DNA 甲基化研究进展 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(11): 1027—1036.

[22] 李浚明, 朱登明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 72—73.

- [23] VALLEDOR L, HASBUN R, MEIJON M, et al. Involvement of DNA Methylation in Tree Development and Micropropagation [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 91(2): 75—86.
- [24] PEREDO E L, ARROYO G R, REVILLA M A. Epigenetic Changes Detected in Micropropagated Hop Plants [J]. *Plant Physiol*, 2009, 166: 1101—1111.
- [25] 陈兆贵, 黄学林. 植物离体培养过程中 DNA 甲基化变异研究进展 [J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(4): 575—580.
- [26] JOYCE S M, CASSELLS A C. Variation in Potato Microplant Morphology in Vitro and DNA Methylation [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2002, 70(2): 125—137.
- [27] SMYKAL P, VALLEDOR L, RODRIGUEZ R, et al. Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Long-Term in Vitro Shoot Culture of Pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(11): 1985—1998.
- [28] GILLIS K, GIELIS J, PEETERS H, et al. Somatic Embryogenesis from Mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as Basis for Mass Production of Elite Forestry Bam-Boos [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 91(2): 115—123.
- [29] GUO WAN LI, WU RUI, ZHANG YU FEI, et al. Tissue Culture-Induced Locus-Specific Alteration in DNA Methylation and Its Correlation with Genetic Variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(8): 1297—1307.

Micropropagation of *Prunus pseudocerasu* ‘Manaohong’ and Assessments of Its Genetic Variation

TIAN Tian, LIU Peng-fei, QIAO Guang, WEN xiao-peng

Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: *Prunus pseudocerasu* ‘Manaohong’ is a new cultivar which was recently bred and is widely cultivated in Guizhou Province. With the dormant buds of *P. pseudocerasu* ‘Manaohong’ as explants, an orthogonal experiment was conducted, in which different concentrations of plant regulators (PGRs) were combined on MS media. In the result, a highly efficient micropropagation system for this cultivar was established. Then, the genetic stability of the in vitro shoots, which were consecutively subcultured, was assessed using ISSR markers. The results showed that all the primers displayed the same profiles between the stock plant and the randomly-selected shoots in vitro within 8 cycles of micropropagation from the optimized system. DNA methylation analysis demonstrated that with the increase of subculture cycles, MSAP value of the in vitro shoots gradually increased. The highest rate was obtained from the 5th cycle, whose total methylation ratio was 21.4%, full-methylation ratio was 12.4%, and semi-methylation ratio was 9.0%. Therefore, the established system may facilitate the micropropagation of this elite cultivar.

Key words: *Prunus pseudocerasu* ‘Manaohong’; in vitro culture; ISSR marker; MSAP analysis; genetic variation

责任编辑 周仁惠

