

响^[22]。目前的研究表明多倍体内 ITS 区序列的进化十分复杂(尤其在异源多倍体中),祖先的 ITS 区序列在多倍体内可能共存^[23],也可能朝着某一祖先的序列进化^[24]。绞股蓝种内有 4 种倍性,其多倍体复杂的起源(种内还是种间起源)与扩散方式,以及不同于二倍体的基因交流方式和复杂的 ITS 同步进化方向可能导致其 ITS 基因型与地理分布的差异。应用分子生物学方法对绞股蓝多倍体的来源和性质进行研究是十分必要的。鉴于绞股蓝 ITS 基因型与地理分布的部分不一致性,要确定不同地区的绞股蓝合理的亲缘关系还需要结合其他方面的证据,从而达到准确的分子鉴定的目的。

参考文献:

- [1] 吴征镒,陈书坤. 中国绞股蓝属(葫芦科)的研究[J]. 植物分类学报,1983,21(4):355-367.
- [2] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布[J]. 植物分类学报,1995,33(4):403-410.
- [3] 刘世彪,胡正海. 绞股蓝结构和发育与其总皂甙积累相关性的研究[D]. 西安:西北大学,2005.
- [4] 陈剑雄,廖瑞芳. 绞股蓝总皂甙对氧自由基所致脑血管痉挛的保护作用[J]. 中草药,1997,28(4):219-221.
- [5] 王 翀,周天华,杨 雪,等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物[J]. 中草药,2008,39(4):588-591.
- [6] Tumer B J, Elder J R. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes [J]. *Quart Rev Biol*, 1995, 70: 297-317.
- [7] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报,1999,37(4):407-416.
- [8] Hsiao C, Chatterton N L, Asay K H. Phylogenetic relationship of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in monocots [J]. *Genome*, 1994, 37: 112-120.
- [9] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from *Compositae* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, 1: 3-16.
- [10] Law S, Ronsted N, Thomson H, et al. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliales; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria* [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 35: 509-527.
- [11] 葛 颂, Schaal B A, 洪德元. 用核糖体 DNA 的 ITS 序列探讨裂叶沙参的系统学位置——兼论 ITS 片段在沙参属系统学研究中的价值[J]. 植物分类学报,1997,35(5):385-395.
- [12] 沈 洁,丁小余,贺 佳,等. 泽泻 rDNA ITS 区序列特征及其居群鉴别研究[J]. 南京师范大学学报,2005,28(3):86-88.
- [13] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [14] White T J, Bruns T, Lee S, et al. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* [M]. California: Academic Press, 1990.
- [15] 黄培堂. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京:科学出版社,2002.
- [16] Swofford D L. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* [M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.
- [17] 屈良鹄,陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):1-6.
- [18] Wang C, Zhang H, Qian Z Q, et al. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation [J]. *Biochem Systemat Ecol*, 2008, 36(9): 699-705.
- [19] 江 波,孙 敏,邓洪平. 缙云山药用植物绞股蓝遗传多样性研究[D]. 重庆:西南师范大学,2005.
- [20] 李汝娟,尚宗燕,张继祖. 三种绞股蓝植物染色体观察[J]. 植物学通报,1989,6(4):245-247.
- [21] 高信芬,陈书坤,顾志建,等. 绞股蓝属的染色体研究[J]. 云南植物研究,1995,17(3):312-316.
- [22] Dover G A. Concerted evolution, molecular drive and natural selection [J]. *Curr Biol*, 1994, 4: 1165.
- [23] Sang T, Crawford D J, Stuessy T F. Documentation of reticulate evolution in *Paonia* using ITS sequences of nuclear rDNA: Implication for biogeography and concerted evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995(92): 6813-6817.
- [24] Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995(92): 280-284.

高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生

刘剑锋,程云清,陈智文*

(吉林师范大学,吉林 四平 136000)

摘 要:目的 利用高山红景天组培苗叶片分离得到原生质体,经培养后获得再生植株。方法 研究了外植体前期预处理、外植体大小、酶液配比、酶液中甘露醇浓度等影响原生质分离的相关因素,确定最优分离条件。结果 用于原生质体分离的外植体无需黑暗预培养便可进行原生质体分离,外植体叶片长度大于 1.5 cm 为宜。获得原生质体的酶液组成为:1.0%纤维素酶 Onzuka R-10 + 0.5%果胶酶 Macerozyme R-10 + 10 mmol/L CaCl₂ · 2H₂O + 0.1% MES + 0.7 mmol/L KH₂PO₄ + 0.5 mol/L 甘露醇,在 25℃ 条件下酶解 4 h,原生质体最高产量为 39.43 × 10⁶ 个/g 鲜质量,原生质体活力为 78.6%。原生质体培养基为 1/2MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L ZT + 0.5 mol/L 甘露醇 + 500 mg/L 水解酪蛋白。浅层培养 40 d 时形成小愈伤组织。愈伤组织在 MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA

* 收稿日期:2008-10-19

基金项目:国家自然科学基金项目“药用植物高山红景天优良种质筛选与倍性创新研究”(30801516);吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目“高山红景天四倍体的诱导与鉴定(吉教科合字 2007 第 367 号)”

作者简介:刘剑锋(1976—),男,湖北黄石人,吉林师范大学生命科学院副教授,硕士生导师,从事细胞生物学的教学研究工作,已发表论文 30 余篇。Tel: (0434) 3292019 E-mail: jianfengliu1976@163.com

诱导产生不定芽,不定芽转入 1/2MS 基本培养基可获完整再生植株。结论 本研究为高山红景天多倍体育种提供了科学依据。

关键词:高山红景天;原生质体;培养;再生

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1127-05

Protoplast isolation and plant regeneration from leaves of *Rhodiola sachalinensis*

LIU Jian-feng, CHENG Yun-qing, CHEN Zhi-wen

(Jilin Normal University, Siping 136000, China)

Abstract : Objective To isolate protoplasts from tube plant leaves of *Rhodiola sachalinensis* and regenerate plantlets after protoplast culture. **Methods** Preculture treatment and size of explants, enzyme concentration, mannitol concentration in enzyme mixture related with protoplasts isolation were studied to determine the superior optimized conditions. **Results** Explants could be used to isolate protoplast without dark preculture, and leaf length should be longer than 1.5 cm. The best incubating enzyme solution contains 1.0 % cellulase Onzuka R-10, 0.5 % Macerozyme R-10, 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % MES, 0.7 mmol/L KH_2PO_4 , and 0.5 mol/L mannitol. The enzyme and explants mixture were shaken for 4 h at 25 °C. The protoplasts yield and viability were 39.43×10^6 /g fresh weight and 78.6 %, respectively. Purified protoplasts were cultured in medium 1/2 MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L ZT + 0.5 mol/L mannitol + 500 mg/L hydrolysis of casein initially with shallow liquid layers, and calli formed within 40 d. After calli were transferred to MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, adventitious buds were induced from calli. Shoots longer than 2 cm rooted within 30 d when they were transferred to 1/2 MS medium. **Conclusion** The study provides the scientific base for protoplast fusion in polyploidy breeding of *R. sachalinensis*.

Key words : *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.; protoplast; culture; regeneration

高山红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. 为景天科红景天属(*Rhodiola* L.) 多年生草本植物,是长白山珍稀药用植物之一,具有抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗微波辐射等显著功能。由于高山红景天资源的大量开发利用,野生资源日趋枯竭^[1,2]。近年来,高山红景天人工栽培技术逐渐完善^[3],但其人工栽培迄今始终受海拔高度限制,还受栽培周期长、产量不丰、药用活性成分的量偏低等问题的严重制约^[4~6],因此,创造适宜人工栽培的新种质是推动高山红景天可持续发展的根本出路之一。原生质体培养、融合和转化已经成为植物细胞改良创造新种质的新途径,并已在改变植物遗传性的应用研究和基础研究中广泛应用^[7,8]。高山红景天多倍体育种与原生质体培养研究在国内外尚未见到相关报道,本研究在建立高山红景天组织培养体系的基础上,探讨酶液配比、酶解时间等多种因素对分离高山红景天原生质体的产量和活力的影响,并进行培养获得愈伤组织,进而再生完整植株,为高山红景天原生质体融合、遗传转化等研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料:建立高山红景天组培体系,参照刘剑锋等^[9]的方法进行,以高山红景天组培苗叶片为材料

进行原生质体的分离纯化。

1.2 原生质体分离与纯化:在进行原生质体的分离纯化前,对组培苗进行 2 d 的暗培养,对比分析光照与暗培养对原生质体分离的影响。幼嫩叶片(长 0.5~3.0 cm)切成宽 1.0~2.0 mm 的条状,以 1:10 的量将材料放入酶液。酶液组成为 0.5%~2% 纤维素酶 Onzuka R-10, 0.3%~1.0% 果胶酶 Macerozyme R-10, 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % MES, 0.7 mmol/L KH_2PO_4 , 0.4~0.6 mol/L 甘露醇, pH = 5.8。于 25 °C,黑暗条件下振荡酶解 1~5 h,转速为 80 r/min。酶解后的原生质体和酶混合液经 250 目的尼龙网滤过后以 800 r/min 离心 8 min 沉降原生质体。向沉降的原生质体中再加入洗涤液和液体培养基各清洗 1 次备用。洗涤液为 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % MES, 0.7 mmol/L KH_2PO_4 , 0.4 mol/L 甘露醇, pH = 5.8。原生质体液体培养基为:1/2MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L ZT + 0.5 mol/L 甘露醇 + 500 mg/L 水解酪蛋白。

1.3 原生质体存活率及产量的测定:原生质体产量用血球计数板进行计数,以每克鲜质量组织获得的原生质体个数(个/g)来表示;活力测定采用 Evans Blue 染色法^[10],存活率 = (未染蓝细胞数/细胞总

数) $\times 100\%$ 。

1.4 原生质体培养:将原生质体密度调到 2.0×10^5 个/mL,转入原生质体液体培养基中进行液体浅层黑暗静置培养。在培养过程中每10 d以3:1(原生质体培养基:无渗透压调节剂培养基)比例加入无渗透压调节剂培养基,逐步降低渗透压。

1.5 愈伤培养与植株再生:当多细胞团进一步增大,形成肉眼可见的小愈伤组织时,挑出并转移到愈伤组织培养基 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L,转为光照培养之前,首先经过2~3 d的弱光培养锻炼阶段,然后转入光照培养,继续培养约1个月时间。经3次继代培养后,挑选鲜绿色愈伤组织转入芽分化培养基 MS+1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,待小芽长至2.0 cm左右,切下转入生根培养基上形成完整植株,生根培养基为1/2MS。培养基 pH=5.8,琼脂 6 g/L,蔗糖 25 g/L,在 1.2 kg/cm^2 压力下灭菌 20 min,培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为 2 000~3 000 lx,每天光照 12 h。

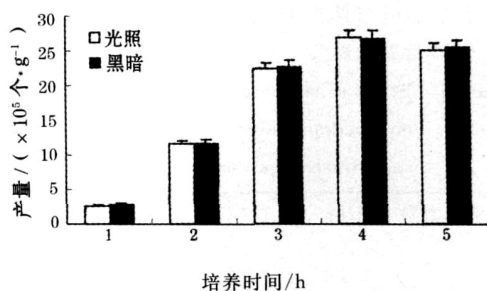
1.6 统计分析:应用 SAS8.2 统计软件中 GLM 模块进行邓肯氏新复极差显著性分析,如结果为百分率数据,经过反正弦转化后进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 光照与黑暗预培养对高山红景天原生质体分离的影响:进行原生质体分离以前,材料常进行一段时间的暗培养,暗培养可提高原生质体的产量^[7]。在本研究中,光照与黑暗培养对高山红景天原生质体分离的影响见图1,结果表明,在相同酶解时间条件下,光照与黑暗培养处理的原生质体产量间差异均不显著($P > 0.05$)。因此,在进行原生质体分离以前,用于原生质体分离的组培苗的光照条件似乎并不是影响其最终的原生体产量的关键因素,在此后的实验中,直接采用没有进行黑暗预培养的组培苗进行原生质体分离。

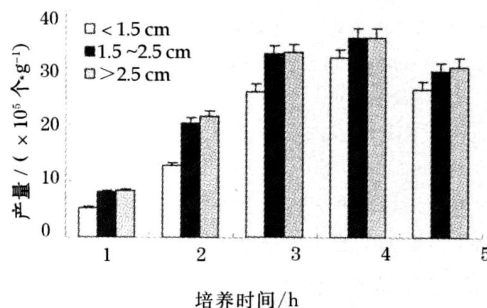
2.2 叶片大小对高山红景天原生质体分离的影响:采用不同长度叶片进行原生质体的分离,结果表明外植体叶片长度与原生质体产量间存在密切的关系(图2)。相同酶解时间条件下,叶片长度为1.5~2.5 cm和大于2.5 cm的叶片原生质体产量显著高于叶片长度小于1.5 cm的处理($P < 0.05$),但前两者间的差异并不显著($P > 0.05$)。因此,高山红景天叶片进行原生质体分离时,选用长度大于1.5 cm的叶片较为适宜。

2.3 酶类组合对高山红景天原生质体分离的影响:纤维素酶与果胶酶组合对高山红景天原生质体分离



本实验中采用的酶液为:1%纤维素酶+1%果胶酶+10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +0.1% MES+0.7 mmol/L KH_2PO_4 +0.4 mol/L 甘露醇
Enzyme solution of experiment contains 1.0% cellulase, 1% macerozyme, 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +0.1% MES, 0.7 mmol/L KH_2PO_4 , and 0.4 mol/L mannitol

图1 光照与黑暗培养对高山红景天原生质体分离的影响
Fig.1 Effect of light and dark regime on isolation of *R. sachalinensis* protoplasts



本实验中采用的酶液为:1%纤维素酶+1%果胶酶+10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +0.1% MES+0.7 mmol/L KH_2PO_4 +0.4 mol/L 甘露醇
Enzyme solution of experiment contains 1.0% cellulase, 1% macerozyme, 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +0.1% MES, 0.7 mmol/L KH_2PO_4 , and 0.4 mol/L mannitol

图2 叶片大小对高山红景天原生质体分离的影响
Fig.2 Effect of leaf size on isolation of *R. sachalinensis* protoplasts

的影响见表1。在9种酶类的组合中,从存活率的大小来看,各处理存活率大小顺序为:1>4>5>2>7>3>8>6>9,从产量来看,各处理产量大小顺序为:5>3>6>2>7>4>8>1>9。因此,存活率与产量间的变化并不一致。综合来看,处理5的产量显著高于其他处理($P < 0.05$),而其存活率也保持较高的水平,考察产量 $\times$ 存活率的数值,处理5也显著高于其他处理($P < 0.05$)。因此,采用处理5的酶组合(1%纤维素酶+0.5%果胶酶)可获得最大存活原生质体产量。

2.4 酶解时间与酶液中甘露醇浓度对高山红景天原生质体产量的影响:酶液中酶解时间与甘露醇浓度对高山红景天原生质体产量的影响见表2。从原

表 1 纤维素酶与果胶酶组合对高山红景天原生质体分离和存活率的影响

Table 1 Effect of cellulase and pectinase combination on isolation and survival rate of <i>R. sachalinensis</i> protoplasts					
处理	纤维素酶 / %	果胶酶 / %	产量 (×10 ⁶ 个·g ⁻¹)	存活率 / %	产量×存活率 (×10 ⁶ 个·g ⁻¹)
1	0.5	0.3	29.6 e	67.3 a	19.92 bc
2	0.5	0.5	32.7 bcd	58.4 b	19.09 cd
3	0.5	1.0	35.4 b	49.7 d	17.59 d
4	1.0	0.3	32.4 cd	65.4 a	21.18 b
5	1.0	0.5	38.3 a	60.3 b	23.09 a
6	1.0	1.0	33.7 bc	47.2 d	15.90 e
7	2.0	0.3	32.7 cd	54.2 c	17.72 d
8	2.0	0.5	30.4 de	47.7 d	14.50 e
9	2.0	1.0	24.7 f	39.6 e	9.78 f

本实验中采用的酶液为:纤维素酶(0.5%~2%)+果胶酶(0.3%~1%)+10 mmol/L CaCl₂·2H₂O+0.1% MES+0.7 mmol/L KH₂PO₄+0.4 mol/L 甘露醇,酶解时间为4 h。同列内相

同字母表示邓肯氏新复极差法检验在0.05水平上差异不显著

Enzyme solution of experiment contains 0.5%—2% cellulase, 0.3%—1% macerozyme, 10 mmol/L CaCl₂·2H₂O+0.1% MES, 0.7 mmol/L KH₂PO₄, and 0.4 mol/L mannitol. Duration of enzymatic digestion is 4 h. Different letters within a column indicate significant difference at *P*=0.05 by Duncan's multiple range tests

原生质体产量看(表2),酶解时间1 h时,仅有少量原生质体游离出来;在1~4 h,随酶解时间的延长,产量递增,并在4 h时达到最高值,这与图1和2的结果相似;以后随酶解时间的延长,产量下降。从原生质体存活率看,酶解早期的原生质体存活率较高,到产量最高值时,仍保持较高的存活率水平。但当酶解时间达到5 h时,存活率明显下降。酶解后期的产量和存活率下降,是由于酶解液长时间浸泡造成部分原生质体破裂和损伤引起的,当大量原生质体

表 2 酶解时间和酶液中甘露醇浓度对高山红景天原生质体产量和存活率的影响

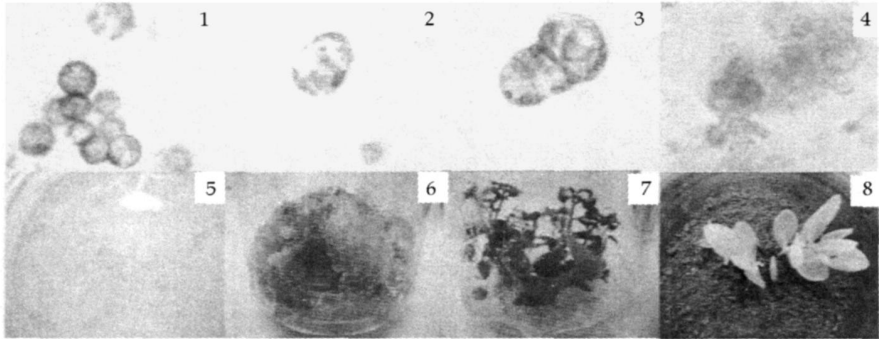
Table 2 Effects of enzymatic digestion time and mannitol concentrations on yield and survival rate of <i>R. sachalinensis</i> protoplasts						
培养时间/h	原生质体产量/(×10 ⁵ 个·g ⁻¹)			存活率/%		
	0.4/(mol·L ⁻¹)	0.5/(mol·L ⁻¹)	0.6/(mol·L ⁻¹)	0.4/(mol·L ⁻¹)	0.5/(mol·L ⁻¹)	0.6/(mol·L ⁻¹)
1	6.42 d	8.97 e	5.21 e	65.4 a	78.6 a	63.2 a
2	19.64 c	24.87 d	16.45 d	65.3 a	74.8 a	55.8 b
3	30.47 b	35.71 b	24.66 b	63.6 a	69.4 b	49.8 c
4	35.75 a	39.43 a	28.33 a	58.4 b	65.9 bc	40.4 d
5	30.65 b	32.11 c	21.87 c	50.4 c	60.7 c	32.3 e

本实验中采用的酶液为:1%纤维素酶+0.5%果胶酶+10 mmol/L CaCl₂·2H₂O+0.1% MES+0.7 mmol/L KH₂PO₄+甘露醇(0.4~0.6 mol/L),同列内相同字母表示邓肯氏新复极差法检验在0.05水平上差异不显著

Enzyme solution of experiment contains 1% cellulase, 0.5% macerozyme, 10 mmol/L CaCl₂·2H₂O+0.1% MES, 0.7 mmol/L KH₂PO₄, and 0.4-0.6 mol/L mannitol. Duration of enzymatic digestion is 4 h. Different letters within a column indicate significant difference at *P*=0.05 by Duncan's multiple range tests

游离出来以后,应及时终止酶解过程并对原生质体进行收集与纯化。

酶液中甘露醇的浓度对原生质体产量与存活率均有十分明显的影响(表2)。酶液中采用0.4 mol/L的甘露醇,其原生质体产量与存活率均显著低于采用0.5 mol/L甘露醇的处理(*P*<0.05),如甘露醇浓度进一步提高,原生质体产量及存活率明显下降。从观察的结果来看,酶液中采用0.5 mol/L甘露醇的处理经纯化后呈圆球型,可观察到大量叶绿体的存在(图3-1)。因此,酶液采用0.5 mol/L的甘露醇用于维持原生质体渗透压效果较好。



1-分离纯化后的原生质体 2-原生质体第1次分裂 3-原生质体多次分裂 4-细胞团形成
5-愈伤组织形成 6-愈伤组织开始分化成芽 7-试管苗生根 8-移栽
1-protoplasts after isolation and purification 2-first cell division of protoplast 3-protoplasts after several times of cell division
4-cell cluster formed 5-calli formed 6-buds differentiated from calli 7-tube plant rooted 8-tube plant after transplant

图 3 高山红景天原生质体分离纯化、培养分化与植株再生
Fig 3 Isolation, differentiation and plant regeneration of *R. sachalinensis* protoplasts

2.5 高山红景天原生质体培养与植株再生:将纯化的原生质体密度调到 2×10^5 个/mL,在黑暗条件下进行液体浅层培养,经 3 d 可见第 1 次细胞分裂(图 3-2),图 3-3、4 为液体浅层培养 14 d 和 20 d 形成细胞团的情况。在液体浅层培养约 40 d 时,可形成图 3-5 中肉眼可见的愈伤组织。经过 2~3 d 的弱光培养锻炼,将愈伤组织转移到培养基 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 上进行光照培养。继续培养约 45 d 时,愈伤组织生长十分旺盛,并有少量芽体萌发(图 3-6)。挑选鲜绿色愈伤组织转入芽分化培养基 MS + 1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 进行芽诱导,待小芽长至 2.0 cm 左右,切下转入 1/2MS 生根培养基上形成完整植株(图 3-7),再生苗移栽温室 1 个月的情况见图 3-8。

3 结语

目前,高山红景天的人工栽培需 4~5 年,通过原生质融合的方式获得多倍体种质是提高其药用成分、缩短栽培年限的可行性途径之一。高山红景天的原生质体培养研究在国内外尚未见报道,本研究结果为

高山红景天的多倍体育种等研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天(*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)茎尖包埋—玻璃化法超低温保存与植株再生[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(3):265-270.
- [2] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天愈伤组织的玻璃化法保存及植株再生[J].北京林业大学学报,2007,29(2):147-151.
- [3] 石铁源,全雪丽,张美淑,等.高山红景天栽培条件探讨[J].中药材,2006,29(2):107-108.
- [4] 石铁源,郑明焕,李熙英,等.高山红景天育苗技术[J].林业科技,2006,31(2):60-62.
- [5] 阎秀峰,王洋,于涛,等.红景天的栽培采收方法[P].中国专利:CN1579134,2004-05-19.
- [6] 阎秀峰,王洋,尚辛亥,等.温室栽培光强和光质对高山红景天生物量和红景天甙含量的影响[J].生态学报,2003,23(5):841-849.
- [7] Kanchanapoom K, Jantaro S, Rakchad D. Isolation and Fusion of protoplasts from mesophyll cells of *Dendrobium pom-padour* [J]. *Sci Asia*, 2001, 27: 29-34.
- [8] Mandal P, Sikdar S R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Rorippa indica* (L.) Hiern, a wild crucifer [J]. *Curr Sci*, 2003, 85(10): 1451-1454.
- [9] 刘剑锋,阎秀峰,程云清,等.高山红景天叶片愈伤组织诱导与植株再生[J].东北林业大学学报,2007,35(2):33-34.
- [10] 唐克轩.中草药生物技术[M].上海:复旦大学出版社,2005.

夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化

廖 丽,郭巧生*

(南京农业大学中药材研究所,江苏 南京 210095)

摘要:目的 建立并优化夏枯草 ISSR-PCR 反应体系和扩增程序,为探讨夏枯草种质间遗传多样性奠定基础。方法 采用单因子试验和正交设计方法,研究 Mg^{2+} 、dNTP、引物、*Taq* DNA 聚合酶、模板 DNA、退火温度及循环次数对 PCR 扩增的影响。结果 夏枯草 ISSR-PCR 的最佳反应体系为:在 20 μ L 的反应体系中含模板 DNA 30 ng, Mg^{2+} 2.2 mmol/L, dNTP 175 μ mol/L, 引物 0.75 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。在此基础上,从 92 条引物中筛选出 18 条扩增稳定、多态性丰富的 ISSR 引物,并通过梯度 PCR 试验,确定引物最佳退火温度。结论 采用单因子试验和正交设计方法可以快速建立 ISSR-PCR 反应体系,经过 24 份夏枯草种质检验,证明该体系稳定可靠,可用于夏枯草遗传分析。

关键词:夏枯草;ISSR-PCR;正交设计;单因子试验

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1131-05

Establishment of ISSR marker technology and optimization of its system in *Prunella vulgaris*

LIAO Li, GUO Qiao-sheng

(Institute of Chinese Medicinal Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: **Objective** To establish and optimize the ISSR-PCR reaction system for *Prunella vulgaris* and lay foundation for its genetic diversity research. **Methods** The single-factor and orthogonal design were applied for optimizing seven factors in the ISSR-PCR reaction system including Mg^{2+} , dNTP, prim-

* 收稿日期:2008-10-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772730)

作者简介:廖 丽(1981—),女,江西乐安人,博士研究生。E-mail:fafu301@yahoo.com.cn

*通讯作者 郭巧生 Tel:(025)84396591 E-mail:gqs@njau.edu.cn