

新疆红花主要栽培品种遗传多样性的 RAPD 分析

岳庆妮, 葛娟, 王蕾, 张霞, 王绍明*, 王建明 (石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003)

摘要 [目的] 利用 RAPD 技术分析新疆红花栽培品种遗传多样性。[方法] 提取 29 份新疆红花栽培品种的基因组 DNA 并利用所筛选的 20 条 RAPD 引物进行 PCR 扩增。[结果] 共扩增出 156 条带, 其中 144 条带具有多态性, 多态性条带占 92.31%, 说明新疆的红花具有较丰富的遗传多样性; 根据引物扩增出的 DNA 指纹图谱, 运用 UPGMA 分析法可将 29 份红花种质聚类划分为 4 个主要类群, 该类群划分结果与红花的生态地域性可能不存相关性。[结论] 该方法可用于在分子水平上分析红花品种的遗传多样性。

关键词 红花; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14417-03

Genetic Diversity in Main Cultivars of Safflower in Xinjiang Ughur Autonomous Region Based on RAPD Analysis

YUE Qing ni et al (College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract [Objective] Study on the genetic diversity in main cultivars of safflower distributing in Xinjiang Ughur Autonomous Region by means of RAPD makers. [Method] Genomic DNAs from 29 safflower accessions from Xinjiang Ughur Autonomous Region were extracted for PCR amplification using 20 RAPD primers. [Result] Totally 156 bands were amplified, of which 144 were polymorphic (accounting for 92.31%) indicating that safflower is endowed with plentiful genetic diversity. Based on the DNA fingerprint, the 29 safflower accessions were grouped into four populations, the classification results may be not related with ecological regionality. [Conclusion] RAPD technique is an available tool to analyze the genetic diversity of safflower germplasm at molecular level.

Key words Safflower; RAPD; Genetic diversity; Cluster analysis

遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分, 是地球上所有生物携带的遗传信息的总和, 通常所说的遗传多样性主要是指种内不同群体之间或同一群体内不同个体间遗传变异的总和。遗传多样性的研究是资源保护和有效利用的关键环节。植物遗传多样性的研究对种质资源的搜集、保存、评价和利用均具有十分重要的意义^[1]。

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 由 Williams 和 Welsh 等^[2-3] 在 1990 年共同提出, 其以基因组 DNA 为模板, 一条随机的 10 bp 寡聚核苷酸为引物, 进行 PCR 扩增反应, 产生不连续的 DNA 产物, 用来检测 DNA 序列的多态性。RAPD 技术在遗传作图、遗传多样性分析以及品系鉴定等方面得到了广泛的应用^[4-11]。

红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 为菊科红花属一年生或二年生草本植物, 是我国传统的中药材, 也是一种新型的油用和工业资源植物。栽培种红花在全世界范围内都有分布, 在我国, 红花主要栽培于新疆、河南、浙江、四川、云南等地^[12-14]。关于红花遗传多样性, 人们曾利用形态标记和生化标记开展了大量研究^[15-20]。分子标记的研究结果表明, 不同省份红花居群存在遗传多样性, 但遗传多样性和地理差异无显著相关性^[21-23]。

新疆因具有特殊的生态地理环境而成为我国红花的主产区, 但是新疆红花品种繁杂, 大多数品种品质退化, 主栽品种少, 现有品种以油用品种居多等原因严重制约了新疆红花产业的发展。该研究利用 20 条 RAPD 引物对 29 份新疆红花种质资源进行 PCR 扩增, 从分子水平上研究其遗传多样性, 并通过聚类分析初步探讨不同红花种质之间的遗传差异, 为保护和有效利用遗传资源以及红花新品种选育提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 供试材料由新疆农业科学院经济作物研究所陈

跃华研究员惠赠。将 29 份红花材料 (表 1) 在温室内种植, 取每个品种取长势一致的 10 个单株, 分别采集幼嫩叶片混合均匀备用。

表 1 红花试验材料

Table 1 Test materials of *Carthamus tinctorius* L.

编号	品种	产地
No.	Cultivars	Origin
1	811	吉木萨尔
2	99407	新疆农业科学院育成系
3	裕民无刺原种	裕民
4	裕民无刺	裕民
5	白红花	吉木萨尔
6	塔原 1 号	塔城
7	鸡冠花下	吉木萨尔
8	99829	新疆农业科学院育成系
9	99826	新疆农业科学院育成系
10	吉木萨红花 1 号	吉木萨尔
11	鸡冠花	吉木萨尔
12	新红 1 号	不详
13	新红 2 号	不详
14	新红 3 号	不详
15	新红 4 号	不详
16	和田无刺	和田
17	疏勒红花	疏勒
18	米泉红花	米泉
19	吉木萨尔有刺	吉木萨尔
20	巴楚有刺	巴楚 (喀什)
21	哈密有刺	哈密
22	额敏有刺	额敏
23	141 少刺	141
24	疏附红花 1	疏附
25	疏附红花 2	疏附
26	吐鲁番 1	吐鲁番
27	塔城有刺	塔城
28	昌吉少刺	昌吉
29	NE27143	野生种 (以色列)

注: 鸡冠花是在吉木萨尔 811 和新红 3 号混种田内出现的表型突变体, 该突变体只有顶端花序呈鸡冠状 (鸡冠花), 其他花序表型正常 (鸡冠花下)。

Note: Coxcomb means the phenotypic mutant in the field with miscegeration of Jinsar 811 and Xinhong No.3, whose inflorescence at upper portion assumes comb shape (coxcomb) and other inflorescences are normal (Jiguanhua).

1.2 基因组 DNA 的提取 在参考文献 [24] 的基础上, 取

基金项目 国家科技支撑计划课题 (No. 2006BAI06A15-14s)。

作者简介 岳庆妮 (1983 -), 女, 新疆石河子人, 硕士研究生, 研究方向: 植物遗传学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-09-04

0.5 g 新鲜嫩叶于研钵中加液氮研磨成粉末状,置于1.5 ml 离心管中,分别用SDS 法和改良CTAB 法提取其DNA。加入RNA 酶A 去除所提取DNA 中的RNA,用紫外分光光度计测定DNA 浓度及纯度,0.8 % 的琼脂糖凝胶电泳检测DNA 质量。

1.3 RAPD 及其产物检测 随机选取2 份DNA 进行预试验,从40 条随机引物中选出20 条能够获得清晰条带、反应稳定的引物(表2) 进行试验。PCR 反应体系为20 μ l,包括1.5 U Taq DNA 聚合酶,2.0 mmol/L Mg^{2+} ,1 \times Taq DNA 聚合酶,30 ng 模板DNA,20 mmol/L 引物,dNTPs 各2.5 mmol/L。PCR 反应在BIO RAD 上进行,扩增程序为:94 预变性7 min;94 45 s,39 45 s,72 45 s,38 个循环;72 延伸7 min,4 10 min。反应产物含有0.5 μ g/ml EB 的3.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测,在紫外光透射仪下观察、拍照。

表2 试验用的寡核苷酸引物

Table 2 Oligonucleotide primers used in the test

引物代号 Primer	序列 Sequence	引物代号 Primer	序列 Sequence
1	TGCCGAGCTG	11	TGACGCATGG
2	GTTCCGATCC	12	CAGCCCAGAG
3	AGGGCGAAG	13	GAACGGACTC
4	GGTGATCAGG	14	GTCCCAGCGA
5	GGAAGCTTGG	15	CTCACCGTCC
6	CCCAAGGTCC	16	AAAGCTGCGG
7	TTATCGCCCC	17	TGICATCCCC
8	GGTACTGTG	18	GACGGATCAG
9	AATCGGGGAG	19	CACACTCCAG
10	AAAGTCCGCC	20	ACTTCGCCAC

1.4 数据分析方法 仔细观察扩增带,有带记为(1) 无带记为(0),不清楚和模糊的带不予记录。形成RAPD 表型数据矩阵,统计29 个引物扩增出的总带数和其中的多态性带数,用NISYS pc2.02j 数据软件计算相似性系数S(Similarity),并用UPGMA(非加权算术平均数聚类)分析样品间的遗传关系。相似性系数的计算公式: $S_{xy} = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$,式中, N_{xy} 分别代表样品X 和Y 共有带数目, N_x 及 N_y 分别代表样品X 和Y 各自条带数。

2 结果与分析

2.1 基因组DNA 的提取 SDS 法和改良CTAB 法均可获得DNA,但是SDS 法提取的DNA 条带弥散,DNA 浓度低(图1)。改良CTAB 法提取DNA 经RNA 酶A 消化后,电泳条带清晰(图2),经紫外分光光度法测定,DNA 样品 OD_{260} / OD_{280} 均在1.7 ~2.0 之间,表明改良CTAB 法提取的DNA 经RNA 酶A 消化后在纯度及浓度方面均可满足RAPD 扩增需要。

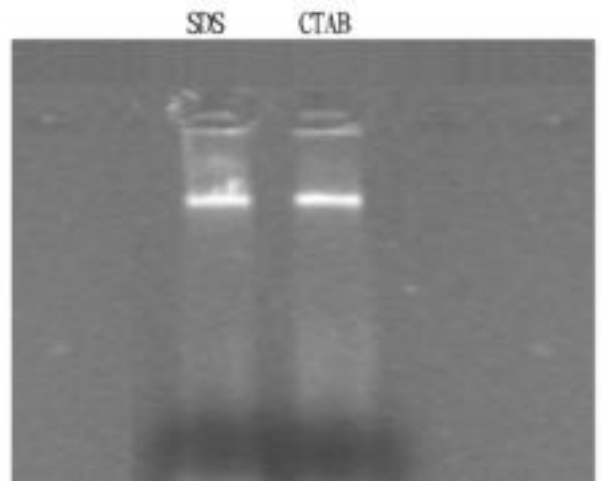
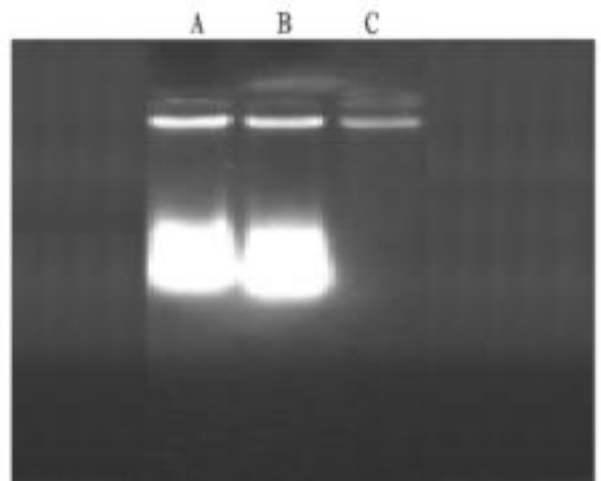


图1 DNA 提取方法的比较

Fig.1 The comparison among DNA extraction methods

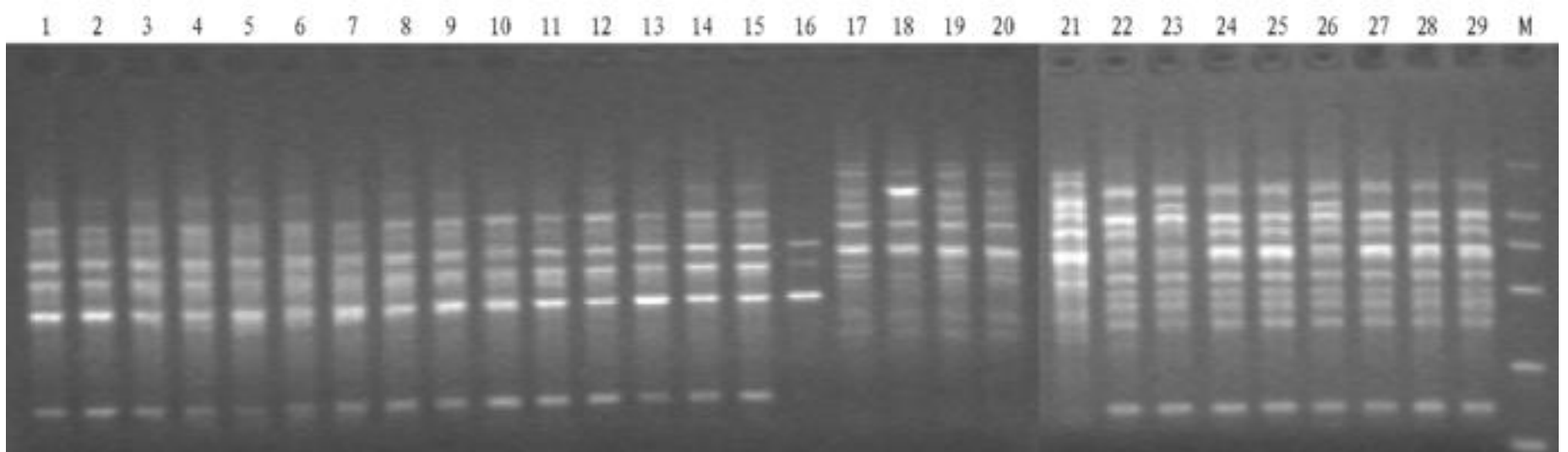


注:A、B 为RNA 酶消化前的DNA;C 为消化后的DNA。

Note :A and B mean DNA before RNAase digestion ;C means DNA after digestion .

图2 RNA 酶A 消化前后DNA 的比较

Fig.2 The comparison of DNA before and after digestion



注:1 ~29 为PCR 产物;M 为marker。

Note :1 - 29 ,PCR products ;M, Marker .

图3 引物1 扩增的RAPD 带型

Fig.3 RAPD patterns amplified by primer 1

2.2 RAPD 扩增结果 选出的20 条随机引物共扩增出156 条重复性好,清晰的多态性条带(图3),大小在100 ~2 000 bp 之间;多态性位点数为144,多态性位点比率为92.31%;平均多样性指数(I) 为0.473 8;每个位点的有效等位基因数(N_e)

是1.508 1; N_e 's 遗传多样性系数为0.311 5。

2.3 聚类分析 基于遗传相似系数,利用UPGMA 法对29 份供试材料进行聚类分析(图4)。从聚类图可以把29 份供试材料聚为4 个主要类群(, , ,) 和2 个中间类群(18 ,

28)。18(米泉红花)和28(昌吉少刺)是2个中间类群,与其他品种的亲缘关系相对较远。22(额敏有刺)和23(141少刺)的亲缘关系较近,聚为同一类群。6(塔原1号),29(NF27143)聚为同一类群。1(811),3(裕民无刺原种),4(裕民无刺),17(疏勒红花)聚为同一类群,剩余品种为同一类群。

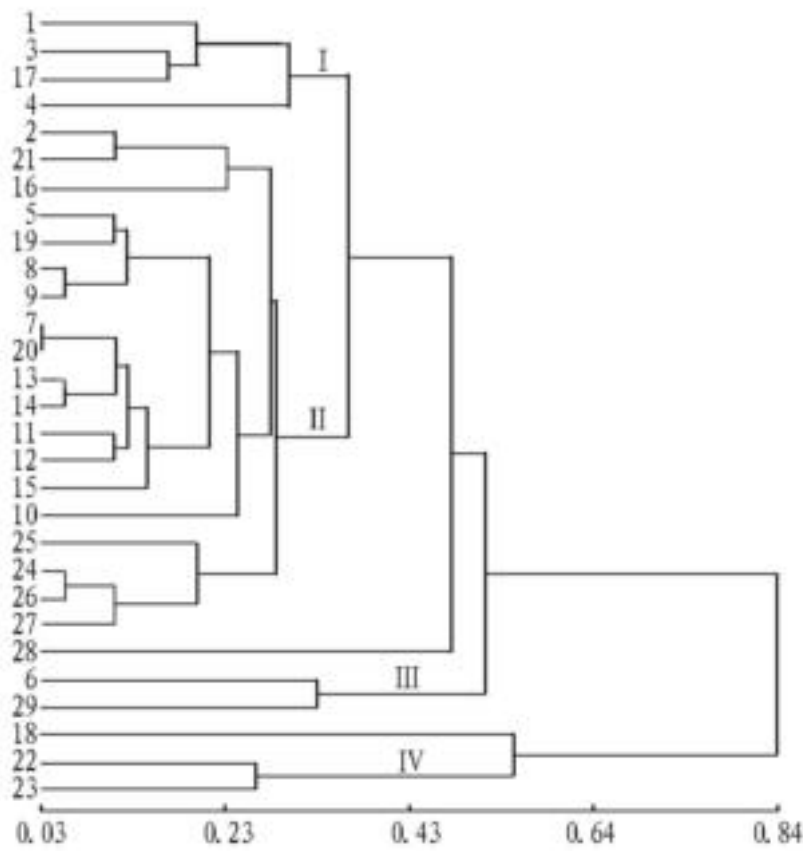


图4 基于RAPD分析产生的红花种质聚类图

Fig.4 Dendrogram of cluster analysis based on RAPD data for safflower germplasm

3 讨论

传统的表型分类方法虽然可以把不同红花品种分为不同的类群,但通常只能选取少数有差异的表型性状作为分类依据,因而很难做到全面分析差异性。同时表现型可见的差异中又有些是由于环境引起的,用作为分类依据不够客观。分子标记技术不受外界环境条件的影响,可从分子水平上揭示遗传变异的程度,在早期即可进行新品种的鉴定^[25]。

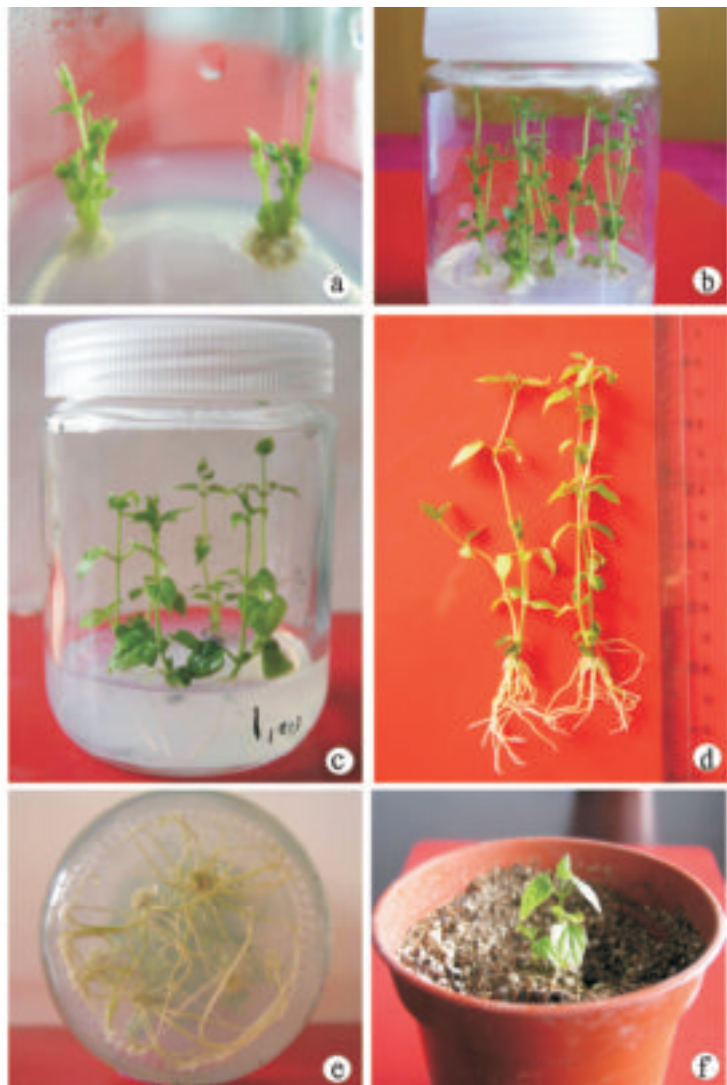
应用分子标记技术研究遗传多样性,首先要建立稳定的反应体系。关于RAPD扩增产物的稳定性,汪小全等^[26]进行了不同浓度的模板DNA和干鲜叶的模板DNA比较,证明RAPD产物具有很好的重复性;N.F. Weeden等^[27]对扩增反应系统中成分的浓度范围进行了比较试验,结果表明模板、引物及镁离子在一定范畴内的变化都不会引起RAPD扩增产物的变化。该研究经过对模板、引物,镁离子、Taq DNA聚合酶、dNTPs浓度以及退火温度进行优化后,能够获得清晰稳定可用于RAPD分析的条带。

遗传多样性是生物多样性研究的核心,反映了物种的遗传背景,育种潜力和利用价值,对优良种质的保护和发掘利用具有重要意义^[28]。该研究表明,新疆红花品种间多态性高达92.31%,不同品种间具有丰富的遗传多样性。从聚类图(图4)可以看出,该方法把除了7(鸡冠花下)和20(巴楚有刺)以外所有的品种分开,野生种未能与其他品种分离开,说明野生种和栽培种红花之间有一定的亲缘关系,栽培种红花可能由野生红花驯化而来,它们之间有可能在不断发生基因的相互渗入^[29]。该方法将29份试验材料聚为4个主要类群(, , ,)和2个中间类群(18,28)。18(米泉红花)和28

(昌吉少刺)是2个中间类群,与其他品种的亲缘关系较远。聚类图中在南北疆均有分布;中除产地不详的品种外,其他品种南北疆均有分布,吉木萨尔县主栽红花品种都聚在该组;的品种包含野生种;的品种分布在北疆地区。虽然29份红花材料在遗传水平上的分类结果与按其地域来源分类的结果并不完全相符(并不是生态地域越近品种间的亲缘关系越近),但每一地区的品种大都聚为一类。在培育新品种时,可根据聚类图,尽量选择亲缘关系较远的品种进行配组,以选配出具有强优势的组^[30]。总之,将供试种质材料的植物学分类方面的背景资料和DNA分子水平的分析结果综合起来加以应用,培育出适合新疆生境的高质量、高药效的品种将极大地促进新疆红花产业的发展,也有助于进一步发挥新疆丰富的红花资源优势。

参考文献

- [1] 张宗文. 红花品种资源的同工酶遗传多样性及分类研究[J]. 植物遗传资源科学,2000,1(4):6-13.
- [2] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. Tingley SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990,18(22):6531-6535.
- [3] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990,18(24):7213-7218.
- [4] 戴思兰, 王丽霞, 吴乃虎. 刺五加遗传多样性的RAPD分析[J]. 自然科学进展,1998,8(4):421-425.
- [5] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 用RAPD标记研究对虫下六个种间的亲缘关系[J]. 动物学报,1998,44(3):353-359.
- [6] WELSH J, PETERSEN C, MCCLELLAND M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping[J]. Nucleic Acids Res, 1991,19(2):303-306.
- [7] CHALMERS K J, WAUGH R. Detection of genetic variation between and within population of *Glinidasepium* and *G. maculata*, using RAPD markers[J]. Heredity, 1996,69:465-472.
- [8] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIAK K J, et al. Tingley SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990,18(22):6531-6535.
- [9] 陈永久. 冬虫夏草的随机扩增多态性DNA及其遗传分化[J]. 遗传学报,1997,24(5):410-413.
- [10] 唐传红. 中国栽培灵芝资源的遗传多样性评价[D]. 南京:南京农业大学,2005.
- [11] 王敏, 黄路琦, 付桂芳. 栝楼3个农家品种间亲缘关系的RAPD分析[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):16-17,62.
- [12] 中国药科大学, 中国医药科技出版社. 中药辞海(第1卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:2386-2390.
- [13] 袁国弼, 韩孕周, 黎大爵, 等. 红花种质资源及其开发利用[M]. 北京:科学出版社,1989:30-42.
- [14] 王兆木. 世界红花种质资源评价与利用[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993.
- [15] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 等. 不同栽培居群红花的孢粉特征, 同工酶谱及化学成分含量[J]. 中国药理学杂志,1999,34(11):728-730.
- [16] BASSIR A. Identification and polymorphism of cultivars and wild ecotypes of safflower based on isozyme patterns[J]. Euphytica, 1977,26(3):709-719.
- [17] PAIL B R, DUDHE R S, GHORPADE P B, et al. Studies on genetic divergence in safflower[J]. Journal of Maharashtra Agricultural Universities, 1991, 16(1):59-62.
- [18] 舒世珍, 庄学鹏, 汪飞杰, 等. 国外红花优异资源的评价、鉴定与聚类分析[J]. 新疆农业科学,1996(5):220-223.
- [19] GHONGADE R A, NAVALE P A. Genetic divergence in safflower[J]. Journal of Maharashtra Agriculture Universities, 1995,20(2):249-251.
- [20] PATEL M Z, REDDI M V, RANA B S, et al. Genetic divergence in safflower (*Cathams tinctorius* L.) [J]. Indian Journal of Genetics & Plant Breeding, 1989,49(1):113-118.
- [21] AMRIR R M, AZD S B, GHANADHA M R, et al. Detection of DNA polymorphism in landrace populations of safflower in Iran using RAPD PCR technique [J]. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 2001,32(4):737-745.
- [22] 郭美丽, 姜伟, 张志珍, 等. 红花种质的随机扩增多态性DNA分子鉴定[J]. 第二军医大学学报,2003,24(10):1116-1119.
- [23] 张磊, 黄蓓落, 开国银, 等. 中国红花遗传多样性的AFLP分子标记[J]. 药学学报,2006,41(1):91-96.



注:a.茎段芽萌发诱导;b.试管苗通过腋芽途径增殖;c.试管苗不定根诱导;d,e.试管苗根生长状况;f.试管苗移栽成活。

Note :a .Bud germination and induction of stem segment ; b .The propagation of test-tube seedling by means of axillary bud ; c .Adventitious root induction of test-tube seedlings ; d and e .Root growth status of test-tube seedling ; f .Survived test-tube seedling after transplanting .

图1 白首乌的离体再生与快繁

Fig.1 In vitro regeneration and rapid propagation of *Cynanchum auriculatum*

表2 不同激素及其浓度对生根的影响

Table 2 Effect of different kinds and concentrations of hormones on the rooting

激素 ng/L Hormones		生根率 % Rooting rate	平均根数 个 Average root number	根生长状态 Growth status of roots
IBA	NAA			
0	0	70.0	5.24	细长
0.05		75.6	6.84	细长
0.10		82.3	7.86	正常
0.20		88.5	8.53	正常
0.50		85.0	8.23	粗,轻度愈伤
1.00		61.1	4.32	过粗,大量愈伤
	0.05	41.5	3.37	粗,短
	0.10	28.1	2.89	过粗,畸形
	0.20	16.3	1.55	大量愈伤

(上接第14419页)

- [24] 张英,柏干荣,黄明辉,等.植物基因组DNA提取方法学评析与验证[J].药品评价,2004(4):292-297,289.
- [25] 汪小全,邹喻苹,张大明,等.RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1996,38(12):954-962.
- [26] WEEDEN NF, II MMERMANG M, HEMMAT M, et al. Inheritance and reliability of RAPD markers [C]. Joint Hart Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, Minnesota. Applications of RAPD Technology to Hart Breeding, 1992: 12-16.
- [27] 贺学勤,刘庆昌,翟红,等.用RAPD,ISSR和AFLP标记分析系谱关系明确的甘薯品种的亲缘关系[J].作物学报,2005,31(10):1300-1304.
- [28] GUO HJ, LONG C L. Biodiversity in Yunnan [M]. Kunming: Yunnan Science

and Technology Press, 1998.

and Technology Press, 1998.

[29] II D, MUNDEL H H. Safflower, *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7 [M]. Rome, Italy, ICGCPR, Catersleben/ IPGRI, 1996.

[30] YUE Q N, GE J, WANG L, et al. Genetic diversity in main cultivars of safflower in Xinjiang uighur autonomous region based on RAPD analysis [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 34-38.

[31] 张晓波.野牛草种质资源遗传多样性的RAPD分析[D].太古:山西农业大学,2005.

[32] XU H X, ZHANG X, WANG S M, et al. Genetic diversity of *Achnather umplendens* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 21-23, 28.

2.3 生根 试验中发现,IBA对白首乌根的诱导效果明显好于NAA。其中以IBA浓度为0.20 ng/L时诱导的不定根生长最好,5~6 d后可见不定根原基突起,20 d后每株可形成6~10条不定根,生根率为88.5%(图1c、d和e)。当IBA浓度为1.00 ng/L时产生大量愈伤组织,根粗短,生长不正常。NAA诱导的不定根短而粗,当浓度达到0.20 ng/L时,愈伤组织过大,根生长缓慢。

3 讨论

白首乌生根苗生长20 d后即可移栽。移栽前2~3 d,打开瓶盖进行适应性锻炼。移栽时,取出小苗,自来水将苗基部琼脂洗净,移入温室的花盆内。栽培基质为腐殖土、珍珠岩按3:1混合。移栽后相对湿度保持在90%左右,逐步降低湿度至温室正常湿度,温度控制在25℃左右。经过20 d左右的培养,即可长出新根成活,成活率达100%(图1f)。

离体培养中一般药用植物茎段增殖的方式是以丛生芽形式进行的,如山茱萸^[4]、白头翁^[5]等。但白首乌茎段是以腋芽-腋芽途径进行增殖,即植株的茎节处产生腋芽,再通过带腋芽茎段的切割、转接从而达到增殖的目的,这与香椿^[6]茎段的增殖方式相似。

一般认为,在试管苗生长与分化过程中,细胞分裂素有利于诱导芽,但在实际应用中不仅要考虑芽的增殖数量,更要注意分化芽苗的质量。该试验结果表明,加入细胞分裂素有利于白首乌茎段增殖,但高浓度的6-BA、KT会影响芽苗的生长,并且导致玻璃化苗的产生,因此,适宜白首乌茎段增殖的培养基为MS+6-BA 0.20 ng/L+NAA 0.10 ng/L。

参考文献

- [1] 刘成娣,龚树生.抗衰老中药白首乌研究的进展[J].北京中医学院学报,1990,13(1):45-47.
- [2] 李文丽,李欣.正交实验设计在白首乌生物工程研究中的应用[J].数理医药学杂志,2001,14(4):383-384.
- [3] 陈秀蕙,符文英.白首乌离体快速繁殖的研究[J].海南大学学报:自然科学版,1995,13(2):134-137.
- [4] 薛建平,张爱民,王月辉,等.山茱萸组织培养技术的研究[J].中国中药杂志,2003(2):118-121.
- [5] 张子学,丁为群,唐勇,等.白头翁组织培养研究[J].中国中药杂志,2004,29(3):215-218.
- [6] 张小红,陈彦生,康冰,等.激素对香椿腋芽增殖生长的效应[J].西北植物学报,2001,21(4):756-760.
- [7] LUO Y H, LENG Q Y, MO R, et al. Asymbiotic germination and low temperature in vitro conservation of *Cynthidium dayanum* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 67-69, 74.
- [8] 佟凤芹,栾岚.凤仙花茎段培养与快速繁殖[J].辽宁师专学报,2006,8(3):107-108.
- [9] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its in vitro rooting technique [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 47-49.