

山西省野罂粟种质资源亲缘关系的 RAPD 分析

亢秀萍, 常啸啸, 陈琳, 李森, 邢国明

(山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘要:为了明确分布在山西省不同地域的野罂粟材料之间的亲缘关系和遗传多样性,以在山西省采集的 6 份野罂粟和采集于内蒙古的 1 份野罂粟引种为研究对象,利用改进的 CTAB 法提取 DNA,并通过单因素多水平梯度试验,筛选了模板、 Mg^{2+} 、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 和随机引物的浓度及用量,建立了山西省野罂粟 RAPD 技术扩增体系。结果表明:在 20 μ L 反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶、模板、引物、 Mg^{2+} 和 dNTP 5 种主要成分的适宜浓度和用量分别为:2.0 U、20 ng、1.2 μ mol/L、2.0 mmol/L、150 μ mol/L,并在此基础上构建 UMPGA 聚类图,经过分析得知,地域分布为野罂粟聚类的主导因素,花色为野罂粟聚类的次要因素。

关键词:野罂粟;遗传多样性;RAPD

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)16-0104-04

野罂粟(*Papaver nudicaule*)为罂粟科罂粟属多年生草本植物^[1],又名毛罂粟,为抗寒植物,生长于山地林缘、草甸、草甸草原、沙地灌丛和沟谷地带。作为药材有镇咳、镇痛和镇静作用,作为园林观赏植物有较大的开发价值^[2]。

以往研究以野罂粟的花粉、化学成分和药理作用等方面为多,尚未有关于引种驯化、亲缘关系或分子水平的研究报道^[3]。该试验采用 RAPD 标记方法对山西省野罂粟种质资源的 DNA 多态性进行分析,构建 UMPGA 聚类图,目的在于明确分布于山西省不同地域的野罂粟材料之间的亲缘关系和遗传多样性,为野罂粟种质资源的园艺开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为采集于山西境内朔州市平鲁区打草坪

村、忻州市原平市云中山、五台县五台山和吕梁市交城县关帝山的 6 份野罂粟和山西农业大学园艺学院蔬菜花卉研究所采集于内蒙古四子王旗的 1 份野罂粟驯化种(表 1)。采样用叶片硅胶干燥法^[4]。

表 1 供试野罂粟材料

编号	名称	来源	海拔/m	经度°	纬度°	花色	生长环境
A	野罂粟 (引种驯化)	内蒙古四子王旗	1 487	111°42"	41°32"	纯黄	草甸草原
B	野罂粟	吕梁市关帝山	2 831	111°26"	37°8"	纯黄	亚高山草甸
C	野罂粟	忻州市五台山	2 485	113°19"	38°43"	纯黄	亚高山草甸
D	野罂粟	忻州市五台山	2 485	113°19"	38°43"	橙黄	亚高山草甸
E	野罂粟	平鲁区打草坪村	2 147	112°12"	39°53"	纯黄	沟谷地带
F	野罂粟	原平市云中山	2 348	112°42"	38°44"	纯黄	山地林缘
G	野罂粟	原平市云中山	2 348	112°42"	38°44"	橙黄	山地林缘

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取样品的嫩叶叶尖,采用改良 CTAB 法提取 DNA,采用琼脂糖凝胶电泳法进行 DNA 检测^[5]。

第一作者简介:亢秀萍(1962-),女,山西临汾人,副教授,硕士生导师,现主要从事花卉栽培的教学与科研工作。

基金项目:山西省重大科技攻关资助项目(20080311010-1)。

收稿日期:2012-05-24

Abstract: Taking diploid *Malus zumi* as control, the changes of morphological characteristics of tetraploid *Malus zumi* were studied. The results showed that the height and the diameter of trees were 41% and 72% of the control, respectively. The number of the first and the second lateral roots were 1.50 and 1.65 times of the control, respectively. The diameter of the backbone roots became lessened, and the number was 56% of the control. The number of the long, medium and the short shoot was 1.7%, 16.3% and 9.3% of the control. The thickness of the shoot bark was thicker and 1.33 times of the control. The length and width of the leaf and the length of the petiole were 77%, 89% and 63% of the control, respectively. The length and width of the stomatal were bigger, and 1.13 and 1.68 times of the control. However, the density of the stomatal was 55% of the control. The diameter and the area of the lenticel were 1.15 and 1.13 times of the control, however the density of the lenticel was 55% of the control.

Key words: *Malus zumi*; tetraploid; morphological characteristics

1.2.2 RAPD 反应体系的优化 对总体积为 20 μL 的 RAPD 反应体系中的各个成分包括模板 DNA 用量、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度、随机引物浓度等影响因素,逐一设置多个水平进行试验^[6],探讨适合于野罂粟 RAPD 反应的最佳条件。

1.2.3 RAPD 产物检测 RAPD 产物在 $0.5 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液中,用 1% 琼脂糖凝胶(加入 EB)80 V 电压下电泳 160~180 min,电泳结果在凝胶成像分析系统下观察并照相,记录多态性片段,以 DL2 000TM DNA Marker 表示 DNA 谱带分子量大小^[7]。

1.3 数据分析

利用 NTSYS-PC(Version 2.10y)软件进行数据分析,分别计算样品间遗传相似系数与遗传距离,并导出对应的矩阵表。聚类分析树状图使用其中的 SAHN 程序,选用非加权组平均法(UPGMA)生成。

2 结果与分析

2.1 野罂粟 DNA 检测

采用改良 CTAB 法提取的 DNA 纯度和产率都较好,絮状 DNA 在干燥后绝大部分都成白色或透明。电泳检测结果见图 1,由图 1 可知,改良 CTAB 法提取的 DNA 泳带清晰整齐,DNA 纯度高,无酚类化合物、多糖、单宁和萜类化合物等杂质,能满足进行 RAPD 分析的条件,可用于 RAPD 分析。

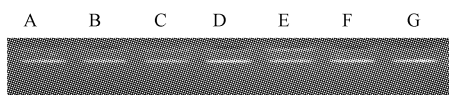


图 1 样品 DNA 的电泳图谱

Fig. 1 DNA electrophoresis of samples

2.2 RAPD 反应体系的优化

2.2.1 模板 DNA 浓度对 RAPD 结果的影响 在 20 μL PCR 反应体系中,模板设计 4 个浓度梯度。由图 2 可知,用量为 20 ng 的模板 DNA 比用量 25、30、35 ng 的扩增条带多且清晰。

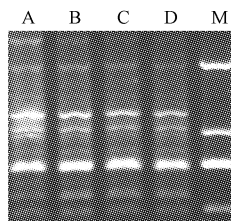


图 2 模板浓度(ng)对扩增的影响

Fig. 2 Effect of template DNA concentration(ng) on amplification

注(Note): A:20, B:25, C:30, D:35, M:Marker。

2.2.2 dNTP 浓度对 RAPD 结果的影响 该试验 dNTP 用量为 100、150、200、250 $\mu\text{mol/L}$ 。由图 3 可知,浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增条带数量均减少,都出现弱带;浓度为 150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增条带清晰度无明显差异。

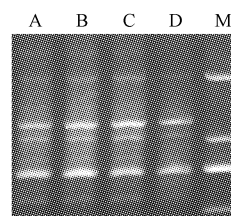


图 3 dNTP 浓度(mol/L)对扩增的影响

Fig. 3 Effect of dNTP concentration(mol/L) on amplification

注(Note): A:100, B:150, C:200, D:250, M:Marker。

2.2.3 Mg^{2+} 浓度对 RAPD 结果影响 在该试验中 Mg^{2+} 设 4 个浓度梯度,分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L。由图 4 可知,随着浓度的增大,扩增条带明显增多,当浓度大于 2.0 mmol/L 时不利于扩增,条带有缺失现象。

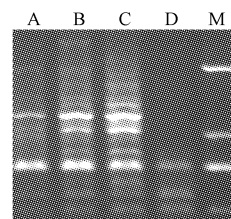


图 4 Mg^{2+} 浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对扩增的影响

Fig. 4 Effect of Mg^{2+} concentration($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on amplification

注(Note): A:1.0, B:1.5, C:2.0, D:2.5, M:Marker。

2.2.4 引物浓度对 RAPD 结果的影响 该试验中,引物浓度设为 4 个梯度。由图 5 可知,在各引物浓度下均能扩增出一条一致的条带,1.2 $\mu\text{mol/L}$ 比 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 条带要清晰一些。

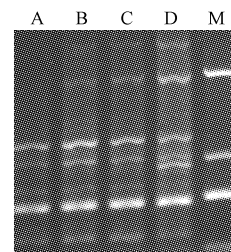


图 5 引物浓度($\mu\text{mol/L}$)对扩增的影响

Fig. 5 Effect of primer concentration($\mu\text{mol/L}$) on amplification

注(Note): A:0.9, B:1.2, C:1.5, D:1.8, M:Marker。

2.2.5 *Taq* DNA 聚合酶浓度对 RAPD 结果的影响 在该试验中,*Taq* DNA 聚合酶的浓度设 4 个梯度。由图 6 可知,2~3.5 U 之间均能扩增出条带,对扩增结果并无

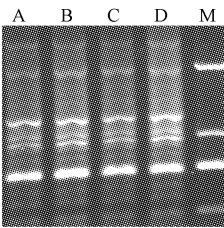


图 6 *Taq* 酶浓度(U)对扩增的影响
Fig. 6 Effect of *Taq* DNA polymerase concentration(U) on amplification
注(Note): A;2, B;2. 5, C;3, D;3. 5, M; Marker。

太大影响。

2.3 引物筛选结果

由表 2 可知,该试验共选用了 50 条引物,所选引物对所供试材料中都显带,且具有多态性,其中多态性较好的有 21 条(图 7~9)。

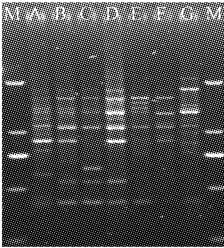


图 7 引物 S17 对材料扩增结果

Fig. 7 Result of S17 primer for cultivars of *Papaver nudicarule*

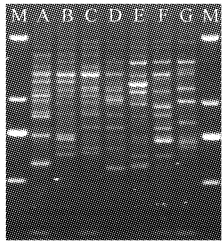


图 8 引物 S36 对材料扩增结果

Fig. 8 Result of S36 primer for cultivars of *Papaver nudicarule*

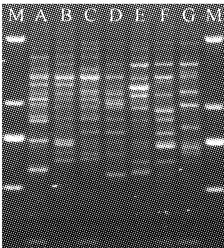


图 9 引物 S45 对材料扩增结果

Fig. 9 Result of S45 primer for cultivars of *Papaver nudicarule*

表 2 引物筛选结果

Table 2 Promer screening results

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
S02	GGACTGGAGT	S22	CATCCGTGCT
S04	CCTTGACGCA	S27	GAACGGACTC
S06	AGGGAACGAG	S31	CACACTOCAG
S08	AGTCAGCCAC	S32	ACTTCGCCAC
S09	GTGACGTAGG	S36	GTGCCTAACC
S13	GACCGCTTGT	S40	GGATGAGACC
S14	AGGTGACCGT	S41	ACGACCGACA
S17	ACCTGAACGG	S45	AGACGTCCAC
S19	GGTCTACACC	S46	ACGCATCGCA
S21	CACCGTATCC	S47	CTGCATCGTG
		S50	ACGCGCATGT

2.4 聚类分析

将 RAPD 图谱分析所得的 0/1 矩阵表格用 NTSYS-PC (Version 2.10y) 软件计算出遗传相似系数,生成聚类树状图(图 10);并计算遗传距离,所得矩阵与遗传相似系数矩阵,见表 3。

表 3 野罂粟野生资源和野罂粟园艺引种的遗传相似性(左下)与遗传距离分析(右上)

Table 3 Similarity coefficients(down left) and genetic distance(up with) between *Papaver nudicarule* varieties

	内蒙古驯 化(纯黄)	平鲁 (纯黄)	原平 (纯黄)	原平 (橙黄)	五台 (纯黄)	五台 (橙黄)	吕梁 (纯黄)
内蒙古驯化(纯黄)		0.3995	0.3862	0.3836	0.3519	0.3757	0.3254
平鲁(纯黄)	0.6005		0.3201	0.3968	0.3545	0.3836	0.3333
原平(纯黄)	0.6138	0.6799		0.2884	0.3571	0.2963	0.3148
原平(橙黄)	0.6164	0.6032	0.7116		0.3175	0.2619	0.3704
五台(纯黄)	0.6481	0.6455	0.6429	0.6825		0.3095	0.2751
五台(橙黄)	0.6243	0.6164	0.7037	0.7381	0.6905		0.3624
吕梁(纯黄)	0.6746	0.6667	0.6852	0.6296	0.7249	0.6376	

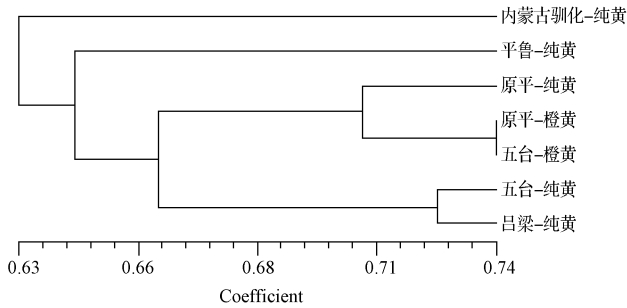


图 10 野罂粟野生资源和野罂粟园艺引种的聚类树状图

Fig. 10 Tree diagram of *Papaver nudicarule*

由表 3 和图 10 可知,样品间亲缘关系最近的是原平(橙黄)和五台(橙黄),相似性系数为 0.7381;亲缘关系最远的是内蒙古驯化(纯黄)和平鲁(纯黄),相似性系数为 0.6005。以遗传相似系数 0.64 为分割线,将 7 份野罂粟样品聚为二大类:第 1 类为内蒙古引种驯化种(纯黄);第 2 类包括平鲁(纯黄)、原平(纯黄)、原平(橙黄)、五台

(纯黄)、五台(橙黄)、吕梁(纯黄)。从整体来分析,将内蒙古引种驯化种(纯黄)与山西省 6 份野罂粟样品聚为二大类是因为内蒙古地区纬度高于山西地区纬度。从山西省内来分析,平鲁(纯黄)与其余 5 份野罂粟样品分为二类是因为平鲁区位于其余地区的北部。从花色来分析,将样品间亲缘关系最近的原平(橙黄)和五台(橙黄)聚为一类是因为其花色同为橙黄色。

3 结论与讨论

试验结果表明,在 20 μL 反应体系中,最佳模板 DNA 用量为 20 ng, dNTP 150 $\mu\text{mol/L}$, Buffer 浓度 2.0 mmol/L, 引物浓度 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 。从试验成本上考虑, *Taq* DNA 聚合酶的浓度均采用最少量 2 U。在此基础上构建 UMPGA 聚类图,经过分析得知,地域分布为野罂粟聚类的主导因素,花色为野罂粟聚类的次要因素。

受采集条件的制约,该试验中样品数量只有 7 份。试验结果只在一定程度上反映了山西省野罂粟种质资源的遗传多样性与亲缘关系,试验结果有待进一步完善^[8]。

RAPD 技术克服了 RFLP 操作技术复杂、成本高、同位素放射性和 DNA 用量多等缺点,也弥补了同工酶可标记位点少的缺憾,但是其稳定性不高^[9-10]。从该试验结果来看,只要严格控制其反应参数, RAPD 扩增产物还是比较稳定的。因此,在试验过程中,建立一个严格的试验体系十分重要,建立并推行 RAPD 分析的统一

标准势在必行。

除地域分布、花色之外,观赏植物的花型、植株高矮、植物的抗寒性和抗逆性等园艺性状和生理性状也是花卉品种分类的重要依据,该试验只对地域分布和花色这 2 个因素进行了分析,进一步探索其它因素对野罂粟分类及亲缘关系的影响具有重要意义。

参考文献

- [1] 庄漩. 罂粟科植物的分类、进化与分布[J]. 云南植物研究, 1993, 15(2): 137-148.
- [2] 李云祥, 甄占萱, 马双马, 等. 野罂粟生态调查及引种驯化研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5834-5835.
- [3] 冯夏莲, 何秉忠, 张志毅, 等. 植物遗传多样性研究方法概述[J]. 南林学院学报, 2006(26): 69-79.
- [4] 刘龙昌, 向其柏, 刘玉莲. RAPD 标记在桂花遗传多样性检测和品种鉴定中的应用(英文)[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(zl): 76-82.
- [5] 伊艳杰, 黄莹, 尚富德. 利用 RAPD 研究桂林桂花品种间的亲缘关系[J]. 广西植物, 2005, 25(2): 129-133.
- [6] 谢伟, 乐超银, 周艳. 5 种中国兰花 RAPD 反应条件的优化[J]. 热带农业科学, 2005, 25(4): 19-23.
- [7] 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊花起源的 RAPD 分析[J]. 植物学报, 1998, 40(11): 1053-1059.
- [8] 王小全, 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.
- [9] 刘春林, 官春云, 李梅. 关于植物随机扩增多态性的 DNA 的可靠性问题[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 53-59.
- [10] 裴严龙, 邹喻苹, 尹秦, 等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报[J]. 植物分类学报, 1999, 33(4): 350-356.

The RAPD Analysis of *Papaver nudicarule* in Shanxi

KANG Xiu-ping, CHANG Xiao-xiao, CHEN Lin, LI Sen, XING Guo-ming
(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: To provide bases of establishing *Papaver nudicarule* genetic relationship and genetic diversity, taking 7 *Papaver nudicarule* collected and preserved from Shanxi and Inner Mongolia as test materials, DNA was extracted by improved CTAB and concentration and dosage of template, dNTP, Mg^{2+} , *Taq* DNA polymerase, dNTP and primer were screened by single-factor multi-level gradient experiment. The experiment established RAPD technology amplification system on *Papaver nudicarule* in Shanxi Province. The results showed that the optimized RAPD system was *Taq* DNA polymerase 2.0 U, template DNA 20 ng, primer 1.2 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 2.0 mmol/L and dNTP 150 $\mu\text{mol/L}$ in total volume 20 μL amplification system and on this basis build UMPGA dendrogram. Clustering results showed that geographical distribution of *Papaver nudicarule* was the leading factor, and the flower color was a secondary element.

Key words: *Papaver nudicarule*; genetic diversity; RAPD