

耧斗菜园艺品种与野生华北耧斗菜亲缘关系的 SRAP 分析

李 森, 李 婷 婷, 亢 秀 萍, 邢 国 明

(山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘 要:以采自山西省沁水县历山等 8 处植物多样性丰富的山区 10 个华北耧斗菜材料和 5 个耧斗菜园艺品种为试材,采用 SRAP(sequence-related amplified polymorphism)分子标记技术进行了亲缘关系分析。结果表明:从 88 对引物中筛选出 17 对多态性丰富的引物组合用于 PCR 扩增,得到扩增条带 352 条,其中多态性条带 307 条,多态性比率为 87.2%。利用 NTSYSpc-2.0 软件进行 UPGMA 聚类分析,分别得出 15 个供试材料与 10 个华北耧斗菜材料间的亲缘关系树状图。15 个供试材料的相似系数为 0.6416~0.8571,聚类结果遵循植物学分类。10 个华北耧斗菜材料的相似系数为 0.7218~0.8571,生境是影响华北耧斗菜聚类结果的主要因素,地理分布为次要因素。

关键词:华北耧斗菜;亲缘关系;SRAP 分析

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0098-04

华北耧斗菜(*Aquilegia yabeana*)属毛茛科(Ranunculaceae)耧斗菜属(*Aquilegia* L.)多年生宿根草本,又称五铃花、紫霞耧斗,在山西各大山区多有分布^[1]。生山地草坡或林边。根含糖类,可作饴糖或酿酒。种子含油,可供工业用^[2]。滕红梅等^[3]在对山西南部野生花卉种质资源的野外调查中曾提及华北耧斗菜的观赏特性、花果期及资源状况。华北耧斗菜花型美丽而独特,花期长,作为一种有很高观赏价值的野生花卉,有广阔的开发利用前景。

DNA 分子标记技术已广泛应用于观赏植物亲缘关系的分析中。明军等^[4]利用 AFLP 技术进行‘美人’梅与其近缘种亲缘关系研究,结果与形态学、遗传育种学的结论相符;刘青林等^[5]曾用 RAPD 技术对梅花亲缘关系进行了研究;戴思兰等^[6]曾对菊花的起源进行了 RAPD 分析;赵宣等^[7]用 RFLP 技术对芍药属牡丹组种间亲缘关系进行了分析;陈向明等^[8]对玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物的亲缘关系进行了 RAPD 分析;王亚玲等^[9]对几种玉兰亚属植物的 RAPD 亲缘关系进行了分析;苏友波等^[10]用 RAPD 技术对香石竹品种的亲缘关系进行了分析。

第一作者简介:李森(1982-),男,博士研究生,讲师,研究方向为园艺植物种质资源利用与创新。E-mail:saulisen@163.com.

基金项目:山西省重大科技攻关资助项目(20080311010-1);山西农业大学青年基金资助项目(201002)。

收稿日期:2014-09-04

SRAP 是一种新型的基于 PCR 的标记系统,由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年提出,又叫基于序列扩增多态性(Sequence-related Amplified Polymorphism SRAP)^[11]。现利用 SRAP 分子标记技术对耧斗菜园艺品种和山西省野生华北耧斗菜的亲缘关系进行分析,旨在为华北耧斗菜的种质创新和园艺开发提供分子水平的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009 年 5—7 月在山西省沁水县历山等 8 处植物多样性丰富的山区采集了华北耧斗菜(*Aquilegia yabeana*)的叶片材料 10 份(表 1),在山西农业大学园艺学院花卉研究所内采集耧斗菜(*Aquilegia caerulea*)园艺品种的叶片材料 5 份(表 2),用硅胶充分干燥后^[12],进行 DNA 提取。

表 1 供试野生华北耧斗菜材料的相关信息

Table 1 The information of wild *Aquilegia yabeana* materials

编号	采集地	所属区域	经纬度	海拔/m	生境
6	芮城百梯山	山西南部	34.4090°N,110.4336°E	1 656	阴坡疏林
7	沁水历山	山西南部	35.4042°N,112.0433°E	1 502	阴坡疏林
8	陵川王莽岭	山西南部	35.6773°N,113.5703°E	1 204	林缘
9	陵川王莽岭	山西南部	35.6778°N,113.5705°E	1 420	阴坡疏林
10	陵川王莽岭	山西南部	35.6782°N,113.5710°E	1 608	阴坡疏林
11	吕梁庞泉沟	山西中部	37.2490°N,112.1536°E	1 783	阴坡疏林
12	宁武情人谷	山西中北部	38.7989°N,112.0281°E	1 781	阴坡裸岩
13	五台山南山寺	山西中北部	38.9818°N,113.5736°E	1 619	阴坡裸岩
14	浑源悬空寺	山西北部	39.6591°N,113.7089°E	1 232	阴坡裸岩
15	天镇张家河	山西北部	40.3799°N,114.2756°E	1 408	阴坡疏林

表 2 供试耧斗菜园艺品种

Table 2 The cultivars' list of *Aquilegia caerulea*

编号	所属系列	品种名	花色	来源
1	八音鸟	知更鸟	玫瑰红白双色	美国泛美种子子公司
2	八音鸟	金丝雀	纯淡黄色	美国泛美种子子公司
3	八音鸟	白脸鸟	蓝白双色	美国泛美种子子公司
4	八音鸟	夜莺	淡紫白双色	美国泛美种子子公司
5	天鹅	薰衣草	玫瑰红白双色	美国泛美种子子公司

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 采用改良 CTAB 法进行 DNA 的提取^[13]。取叶片于液氮中研磨后转入 2.0 mL 离心管中,加 CTAB 提取液于 65℃ 水浴 45 min。用等体积 Tris 饱和酚和氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次,氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次,充分摇匀后离心。取其上清液加入异丙醇沉淀 DNA,用无水乙醇洗涤 1 次,洗涤 2 次。加 RNase 酶于 37℃ 水浴 2 h,等体积 Tris 饱和酚和氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次,氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次。用无水乙醇和 70% 乙醇各洗涤 1 次,无菌水溶解。用 1% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 质量。

1.2.2 SRAP 反应 引物序列及反应程序参照 Ferriol 等^[14-15]的方法,反应程序为 94℃ 5 min,1 个循环;94℃ 1 min,35℃ 1 min,72℃ 80 s,5 个循环;72℃ 10 min,94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 80 s,37 个循环;最后 72℃ 延伸 12 min。反应体系为 20 μ L,包括 10 \times Taq buffer(含 Mg^{2+}) 3 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1 μ L, 正反向引物 (100 μ mol/L) 各 1.5 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L) 1.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L (2.5 U/ μ L) 和无菌水 11.2 μ L。试验所用引物(表 3)由上海生工合成,其余试剂均购自博迈德公司。扩增产物进行垂直板变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%)^[16]。变性程序为 95℃ 5 min 后 4℃ 保存,65 W 恒功率电泳 2.0~2.5 h 至溴酚蓝移到凝胶底部结束后进行 AgNO₃ 染色。

表 3 SRAP 引物序列

Table 3 The primer sequence of SRAP

正向引物	正向引物序列	反向引物	反向引物序列
ME1	5'TGAGTCCAAACCGGATA-3'	EM1	5'GACTGCGTACGAATTAAT-3'
ME2	5'TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	EM2	5'GACTGCGTACGAATTTCG-3'
ME3	5'TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	EM3	5'GACTGCGTACGAATTGAC-3'
ME4	5'TGAGTCCAAACCGGACC-3'	EM4	5'GACTGCGTACGAATTGTA-3'
ME5	5'TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	EM5	5'GACTGCGTACGAATTAAAC-3'
ME6	5'TGAGTCCAAACCGGTAA-3'	EM6	5'GACTGCGTACGAATTGCA-3'
ME7	5'TGAGTCCAAACCGGTCC-3'	EM7	5'GACTGCGTACGAATTCAA-3'
ME8	5'TGAGTCCAAACCGGTGC-3'	EM8	5'GACTGCGTACGAATTCTG-3'
		EM9	5'GACTGCGTACGAATTCCA-3'
		EM10	5'GACTGCGTACGAATTTCAG-3'
		EM11	5'GACTGCGTACGAATTCCA-3'

1.3 数据分析

每个引物组合的多态性比率(%)=引物组合扩增的多态性条带数/总条带数 \times 100。采用 Jaccards 相似系数,使用 NTSYS-pc 2.0 软件,非加权组平均法(UPGMA)聚类。相似系数计算公式为: $S_{ij} = a/(a+b+c)$, 其中, a 表示 2 份材料共有带数, b 表示 i 材料特有的条带数,

c 表示 j 材料特有的条带数。

2 结果与分析

2.1 SRAP 引物的扩增结果

用筛选出的 17 个引物组合对 15 个供试材料进行 SRAP 扩增,得到扩增条带 352 条,每个引物组合扩增的 DNA 带数为 13~31 条,平均每个引物组合扩增 20.71 条带,其中每个引物组合扩增出的多态性条带数为 10~27 条,17 个引物组合共扩增出 307 条多态性条带,多态性比率为 87.2%,其中单个引物组合的多态性比率为 71.4%~96.0%。可见 15 个供试材料的多态性较高。

表 4 17 对引物产生的多态性

Table 4 The polymorphism of 17 pairs primers

组合编号	组合名称	总条带数	多态性条带数	多态性比率/%
3	ME-1/EM-3	13	11	84.6
6	ME-1/EM-6	15	11	73.3
10	ME-1/EM-10	23	20	87.0
11	ME-1/EM-11	15	14	93.3
16	ME-2/EM-5	25	22	88.0
29	ME-3/EM-7	31	27	87.1
32	ME-3/EM-10	25	24	96.0
38	ME-4/EM-5	18	16	88.9
46	ME-5/EM-2	30	27	90.0
47	ME-5/EM-3	19	18	94.7
51	ME-5/EM-7	21	19	90.5
53	ME-5/EM-9	15	13	86.7
54	ME-5/EM-10	20	17	85.0
68	ME-7/EM-2	14	10	71.4
73	ME-7/EM-7	20	16	80.0
76	ME-7/EM10	26	23	88.5
77	ME-7/EM-11	22	19	86.3

2.2 聚类分析

2.2.1 华北耧斗菜及园艺品种的亲缘关系 15 个供试材料的相似系数为 0.6416~0.8571。亲缘关系最远的是八音鸟系列知更鸟(1 号)和采自吕梁庞泉沟的华北耧斗菜(11 号)和天镇张家河的华北耧斗菜(15 号),亲缘关系最近的是采自吕梁庞泉沟的华北耧斗菜(11 号)和采自天镇张家河的华北耧斗菜(15 号)。在相似系数为 0.70 的水平上,可以将 15 个供试材料聚为两大类。其中耧斗菜 5 个园艺品种聚为第一类群;10 个华北耧斗菜材料聚为第二类群。从聚类结果来看,15 个供试材料的聚类结果遵循植物学分类,华北耧斗菜与耧斗菜园艺品种分别聚为两大类群。园艺品种间亲缘关系的远近取决于花色及所属系列。在第一类群的 5 个园艺品种中,1、5 号材料为玫瑰红白双色、2 号材料为纯淡黄色,均为暖色系列,其亲缘关系较近;而 1、2 号材料均属八音鸟系列,其相似系数更高,为 0.7769。3、5 号材料为蓝白双色和淡紫白双色,均为冷色系列,其亲缘关系较近。

2.2.2 华北耧斗菜的材料亲缘关系 10 个华北耧斗菜材料的相似系数(Genetic Similarity, GS)为 0.7218~0.8571,遗传距离 $D = 1 - GS$,得出材料间的遗传距离为 0.1429~0.2782。可见,华北耧斗菜材料间有一定的遗传距离,但不是很大。在相似系数为 0.76 的水平上,可以将 10 个华北耧斗菜材料聚为两大类。采自宁武情人

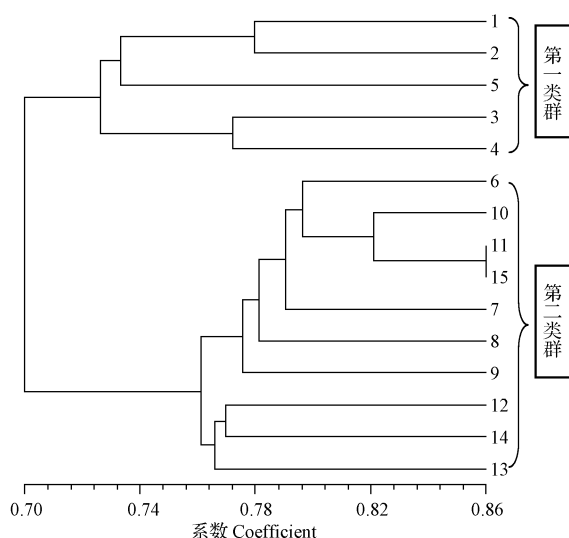


图1 基于 SRAP 标记获得的 15 个供试材料的聚类图

Fig. 1 The clustering chart of 15 materials based on the SRAP marker

谷(12号)、浑源悬空寺(14号)、五台山南山寺(13号)的3个材料聚为第二类群,剩余材料聚为第一类群。

从华北耧斗菜的聚类结果可以看出,生境是影响聚类结果的主要因素,地理分布为次要因素。12、14、13号材料的生境均为阴坡裸岩,聚为第二类群;而剩余材料的生境为阴坡疏林或林缘,聚为另一类。同时,12、14、13号材料采自山西省的中北部或北部地区,而剩余材料中除15号材料采自位于山西北部得天镇张家河外,其余材料均采自山西中部或南部地区,可见聚类结果与地理分布也有一定关系。而采自陵川王莽岭3个不同海拔的8、9、10号材料虽然聚在第一类群,但是其亲缘关系并不是最近,可见即使在同一山区,不同海拔的自然条件也稍有区别,使得该山区植物有较丰富的遗传多样性。

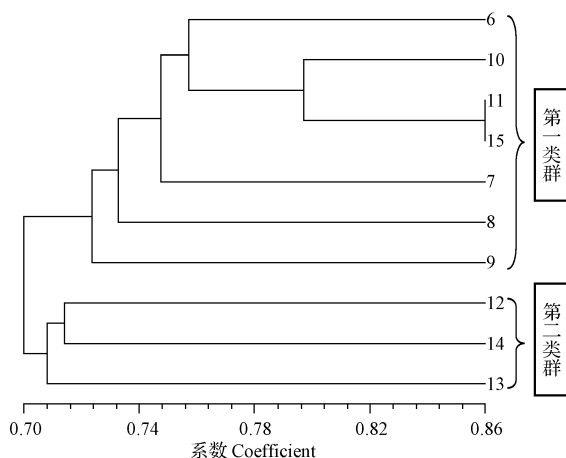


图2 基于 SRAP 标记获得的 10 个野生华北耧斗菜材料的聚类图

Fig. 2 The clustering chart of 10 wild *Aquilegia yabeana* based on the SRAP marker

3 讨论

从15份供试材料的聚类结果来看,与植物学分类一致,华北耧斗菜与耧斗菜园艺品种分别聚为两大类群。花色在园艺品种的聚类中起到了关键作用,如八音鸟系列冷色和暖色的品种间在遗传背景上也有一定差别。而八音鸟系列知更鸟与天鹅系列薰衣草虽属于不同系列,但花色相同,其亲缘关系也较近。

从10份华北耧斗菜材料的聚类结果来看,材料生境是影响聚类结果的主要因素。由于不同生境其温度、水分、光照、土壤等生态因子的区别使得植物产生了丰富的遗传多样性。采自山西中北部及北部地区的材料聚为一类,而采自中部及南部地区的材料聚为另一类,可能也是由于山西南北地区环境气候有一定差异造成的。而采自陵川王莽岭3个不同海拔的材料虽然聚为一类,但相似系数并不是很高,可见即使在同一山区,不同海拔的自然条件也稍有区别,使得该山区植物有较丰富的遗传多样性。

参考文献

- [1] 朱蕊蕊,杨姗姗,明晓,等. 耧斗菜愈伤组织和不定芽诱导的初步研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(7): 81-82.
- [2] 吕晋慧,杨玉芳. 山西野生观赏植物种质资源及其利用研究[J]. 山西农业科学, 2007, 35(6): 12-15.
- [3] 滕红梅,姚建信,李鸿俊,等. 山西南部野生花卉种质资源调查研究[J]. 运城学院学报, 2008, 26(2): 41-47.
- [4] 明军,张启翔,毛庆山,等. ‘美人’梅与其近缘种亲缘关系的 AFLP 研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 588-589.
- [5] 刘青林,陈俊愉. 梅花亲缘关系 RAPD 研究初报[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(5): 81-85.
- [6] 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): 110-116.
- [7] 赵宣,周志钦,林启冰,等. 芍药属牡丹组(Paeonia sect. Moutan)种间关系的分子证据: GPAT 基因的 PCR-RFLP 和序列分析[J]. 植物分类学报, 2004, 42(3): 236-244.
- [8] 陈向明,郑国生,孟丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 78-80.
- [9] 王亚玲,李勇,张寿洲. 几种玉兰亚属植物的 RAPD 亲缘关系分析[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 299-302.
- [10] 苏友波,林春,毛静,等. 香石竹品种的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 109-111.
- [11] 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 in Brassica[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(1): 168-180.
- [12] 邱英雄,胡邵庆,陈跃磊,等. ISSR-PCR 技术在桂华品种分类研究中的应用[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 529-532.
- [13] 张西西,徐进. 万寿菊杂交一代遗传多态性的 SRAP 标记分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1221-1226.
- [14] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 271-282.
- [15] Ferriol M, Pico B, Pascual Fernandez de Cordova, Nuez F. Molecular diversity of a gemplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP marker[J]. Crop Science, 2004, 44: 653-664.
- [16] 高丽霞,胡秀. 中国姜花属基于 SRAP 分子标记的聚类分析[J]. 植物分类学报, 2008, 46(6): 899-905.

藜芦碱对枸杞蚜虫室内活性测定及安全性评价

王芳¹, 李文玲², 刘畅¹, 金徽³, 杜玉宁¹

(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏吴忠市孙家滩农业综合开发区管理委员会, 宁夏 吴忠 751100;
3. 银川市农业技术推广服务中心, 宁夏 银川 750011)

摘要:以枸杞蚜虫为研究对象,采用浸虫法测定藜芦碱对枸杞蚜虫(成虫、若虫)的室内毒力,采用药害评价法测定藜芦碱对枸杞树生长发育的使用安全性。结果表明:供试药剂 0.5% 藜芦碱 SLX 与 1% 藜芦碱 TKL 对枸杞成蚜的毒力相当,0.5% 藜芦碱 SLX 对枸杞若蚜的毒力略高于 1% 藜芦碱 TKL,枸杞若蚜对藜芦碱的敏感性高于枸杞成蚜。藜芦碱制剂对枸杞树的叶片、花、果实均无药害产生,田间使用安全。

关键词:枸杞蚜虫;藜芦碱;毒力测定;安全性评价

中图分类号:S 436.639 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)02-0101-03

枸杞蚜虫(*Aphis* sp.)属同翅目(Homoptera)蚜科(Aphididae)^[1],在全国枸杞种植区均有发生,主要危害

第一作者简介:王芳(1980-),女,宁夏吴忠人,硕士研究生,助理研究员,现主要从事生物农药的研发与利用等研究工作。E-mail: wangfangwf80@163.com.

责任作者:杜玉宁(1962-),男,本科,高级农艺师,现主要从事生物农药研制和蔬菜病虫害防治等研究工作。E-mail: duyuning01@163.com.

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关资助项目(KGX-09-10-10);宁夏农林科学院自主研发资助项目(NKYQ-13-09);宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ14186,NZ13122)。

收稿日期:2014-10-20

枸杞嫩梢、幼果,是枸杞生产中的成灾性害虫。枸杞蚜虫在宁夏 1 年约发生 18 代左右^[2],年发生代数多,繁殖能力强,扩散蔓延快,为害时间长,防治难度大,最高可使枸杞减产 20% 左右。目前,枸杞在宁夏的种植面积已发展至 4.67×10^4 hm²,约占全国枸杞种植总面积的三分之一,枸杞产品已出口 30 多个国家和地区^[3]。随着宁夏枸杞种植面积的逐年扩增,枸杞蚜虫的危害呈加重趋势。在枸杞生产中,防治枸杞蚜虫常以化学农药为主,由于枸杞生长季节长,防治蚜虫次数多,致使农药残留超标^[4-5],严重破坏了枸杞的品质,危害人体健康,影响枸杞产区的生态环境,增加了宁夏枸杞进入国际市场的难度,为此,生产管理部门和广大农户提出了纯植物源制

The SRAP Analysis on the Genetic Relationship of Wild *Aquilegia yabeana* and Cultivated *Aquilegia caerulea*

LI Sen, LI Ting-ting, KANG Xiu-ping, XING Guo-ming

(College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi, 030801)

Abstract: The genetic relationship among 10 wild samples of *Aquilegia yabeana* from 8 main mountains in Shanxi province and 5 horticulture cultivars of *Aquilegia caerulea* were analyzed with the method of SRAP Marker. The results showed that 17 pair primers among 88 were selected for PCR, and 352 clear amplified bands were obtained. The total number of polymorphism bands was amounted to 307, the polymorphism rate of genetic was 87.2%. The 15 samples' matrix of genetic similarity coefficient was calculated by the software of NTSYSpc-2.0, and the clustering dendrograms were obtained for 15 samples and 10 samples of *Aquilegia yabeana*. The similarity coefficient of 15 samples was between 0.6416—0.8571, the samples had more relationship with botanical classification. The similarity coefficient of the 10 samples of *Aquilegia yabeana* was between 0.7218—0.8571, and the clustering result of these samples has more relationship with the environment and geographical distribution.

Keywords: *Aquilegia yabeana*; genetic relationship; SRAP analysis