

一串红花色遗传多样性研究

胡国富, 李凤兰, 李成雁, 胡宝忠

(东北农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以4种花色一串红为试材,利用孢粉学及RAPD方法对花色的遗传多样性进行了研究。通过扫描电镜对一串红花粉沟长、沟宽和极轴等纹饰特征进行观察、量化,并构建了聚类分析图。结果表明:紫色和红色首先聚在一起,然后和红白相间聚在一起,最后与白色一串红聚在一起,此结果和表面纹饰的分析结果大致相同。通过建立一串红RAPD最佳反应体系,筛选出12条引物,构建遗传图谱,其聚类图分析结果与孢粉学聚类结果基本相同。

关键词:一串红;花色;RAPD;孢粉

中图分类号:S 681.403 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)08-0194-05

一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawl),是唇形科鼠尾草属植物。原产于南美巴西,是重要的观赏花卉,花期都集中在6~10月之间,花期较长,尤其是常用的红色品种,其花萼、花冠的红艳,色泽纯正,花序比较大,表现极为突出。但其花色比较单一,只有红色系、白色系和紫色系等较少的花色,因此,其亲缘关系确定对于花色改良等育种方面可以提供重要依据。

花粉做为生殖器官,其形态特征是受植物基因控制的,较少受环境的影响^[1,2],属于比较稳定的遗传性状。花粉大小、形状、外壁纹饰特征可作为花色分类的重要依据之一。可反映出其间的亲缘关系和进化过程。亲缘关系越相近的种质,花粉形态越相似。因此研究花粉形态可为研究植物起源、系统发育、分类、遗传提供了可靠依据。还可用于正常花粉的形态分类,及作为不同种类花粉育性的形态鉴定指标。

RAPD技术是Williams J与Welsh J 2个研究小组于1990年同时提出的一项DNA多态性分析技术^[3]。这种方法以PCR技术为基础,无须预先了解DNA序列的信息,具有分析速度快,DNA样品用量少,操作简便,随机引物合成方便等优点。因此,RAPD技术广泛的应用于鉴定植物种间和种内的亲缘关系领域的研究中。

该试验通过孢粉学特征观察,建立了一串红花粉形态的量化指标,并结合RAPD标记,通过聚类分析探讨不同花色一串红之间的亲缘关系,为进一步研究一串

红的遗传多样性及品种培育提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以美国进口品种太阳神系列中的4种花色一串红:红色、紫色、红白相间、白色为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 孢粉学分析 采用HITACHI S-520型扫描电镜对不同花色成熟花粉进行孢粉学观察。

1.2.2 RAPD分析 ①随机引物:该试验共采用60个随机引物,分别为L01~L20、O01~O10和F01~F10、A01~A10、P01~P10共60个,为北京赛百盛公司产品。

②DNA的提取及凝胶检测:采用改良后的SDS法进行DNA的提取,对提取的DNA进行紫外吸收和凝胶电泳检测。

③RAPD体系的建立:RAPD反应条件参照Williams^[1]推荐的反应条件,以4种花色混合DNA为模板建立体系,筛选最佳反应体系。④电泳结果数字化记录与多态性判断:DNA模板经PCR扩增,反应条件为94℃变性4 min;45个循环:94℃变性90 s,34℃退火1 min,72℃延伸105 s;72℃延伸7 min,反应终止,对重复性好且条带清晰的图片作数据统计。对同一引物不同模板的电泳结果,迁移率相同的带为分子量相同的RAPD带,所有模板都具有的带为公共带,表示无多态性,其余为特异带,表示有多态性。有带记为1,无带记为0。得出二态数据矩阵。⑤RAPD图谱分析:对4种花色RAPD条带进行统计和比较,计算多态性位点百分率并寻找品种特异带及特有带。并利用软件SPSS12.0进行聚类分析,构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 4种花色一串红孢粉学分析

2.1.1 孢粉学形态学特征观察 通过扫描电镜观察,具体特征如表1所示,一串红的4种花粉的P/E值即极

第一作者简介:胡国富(1974-),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,研究方向为植物分子生物学。E-mail: guofuh2003@yahoo.com.cn

通讯作者:胡宝忠(1962-),男,黑龙江哈尔滨人,教授,博士生导师,研究方向为发育生物学。E-mail: bzhu@neau.edu.cn

收稿日期:2009-02-20

轴/赤道轴的范围在 0.66 ~ 0.76 之间,花粉的形状为椭圆形。花粉极轴较短,赤道面是椭圆形,赤道轴比极轴长。4 种花粉赤道轴变化范围为 40.98 ~ 47.40 μm ,极轴的变化范围为 30.75 ~ 32.40 μm ,属于小型花粉。此外,不同花色之间花粉大小差异不明显。一串红花粉的纹饰均有明显的网状雕纹。不同花色间外网纹纹脊宽窄没有明显差别。一串红的纹饰分为内外两层,外层网孔较大,不同一串红之间外网孔直径略有差别(表 1),以红白相间的最大,其次是白色、紫色和红色;其次,单位外网中内部小网孔的数目差别较大,以红色品种(平均

为 10.40)中的内网孔数目最多,其次是紫色、红白相间和白色品种。一串红花粉粒有 6 条萌发沟,均没有延伸到两极。4 种花色一串红萌发沟很相似,一般萌发沟呈梭形狭缝状,中央部扩大,在往两极延伸过程中渐狭;萌发沟在极端不汇合。从表 1 可知,沟长和沟宽略有差别。以红白相间的花粉最为突出,沟长和沟宽大于其他花粉,但从二者比值上来说,紫色>红色>白色>红白相间。从沟内乳突的大小和数量上有所不同(表 1)。由多到少的顺序依次为白色>红白相间>红色>紫色。

表 1

4 种花色一串红花粉形态特征

花色	特征						萌发孔内乳突数量/30 μm^2
	沟宽	沟长	L/W	极轴	赤道轴	P/E	
紫色	3.83	25.10	6.55	31.50	41.70	0.76	12
红色	4.50	25.83	5.74	32.40	42.45	0.76	14
红白相间	5.00	25.84	5.17	31.65	47.40	0.66	16
白色	4.33	24.66	5.70	30.75	40.98	0.75	22

2.1.2 通过孢粉学特征的聚类分析 通过沟长等 6 项指标对 4 种花色的相关性分析表明,各品种之间表现出极度相关,以红色和紫色相关系数最高,为 0.996,以白色和紫色之间的相关度最差,为 0.935(表 2)。通过欧几里德聚类分析可以看出(表 3,图 1),紫色和红色首先聚在一起,然后和红白相间的聚在一起,最后与白色一串红聚在一起,此结果和表面纹饰的分析结果大致相同。证明花粉在遗传上具有较高的相关性,可以作为分类的基本指标。

表 2 4 种花色一串红孢粉学特征的相关性分析

	紫色	红色	红白相间	白色
紫色				
红色	0.996 (**)			
红白相间	0.987 (**)	0.987 **		
白色	0.935 (**)	0.938 **	0.969 **	

注 ** 在 0.01 水平上的相关性

表 3 4 种花色一串红通过孢粉特征得出的欧几里德距离矩阵

花色	欧几里德距离			
	紫色	红色	红白相间	白色
紫色				
红色	2.905			
红白相间	7.496	7.268		
白色	12.912	13.640	10.788	

2.2 RAPD 分析

2.2.1 DNA 的最优提取方法 通过对改良的 SDS 法所提取的 DNA 颜色为透明色, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.61~1.88 之间。且电泳谱带清晰,无降解,说明利用该方法提取的 DNA 较纯,可以用于一串红 RAPD 分析。

2.2.2 RAPD 反应的优化 考虑 DNA 模板浓度、dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度和引物浓度等对 PCR 反应体系的影响,分别设计浓度梯度和退火温度,最后采用 25 μL

反应体系: 2 μL 的 10 \times buffer; 0.45 mmol/L 的 dNTPs; 2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} ; 2 U 的 Tag DNA 聚合酶(TaKa-Ra); 0.30 $\mu\text{mol/L}$ 的引物(上海生工); 40 ng 的模板。

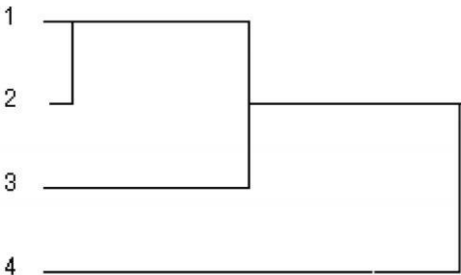


图 1 4 种花色一串红孢粉学特征树状聚类图

注: 1. 紫色一串红; 2. 红色一串红; 3. 红白相间一串红; 4. 白色一串红; 以下同。

表 4 RAPD 分析所用的引物序列

引物	引物序列	引物	引物序列	引物	引物序列
L01	5'-GGCATGACCT-3'	L12	5'-GGGCGGTACT-3'	F3	5'-CCTGATCACC-3'
L04	5'-GACTGCACAG-3'	L13	5'-ACCGCCTGCT-3'	A05	5'-AGGGGTCTTG-3'
L07	5'-AGGGGGAAG-3'	L14	5'-GTGACAGGCT-3'	P1	5'-GTAGCACTCC-3'
L11	5'-ACGATGAGCC-3'	002	5'-ACGTAGCGTC-3'	G4	5'-AGGCTGCTCG-3'

2.2.3 不同花色的 RAPD 扩增结果 该试验通过 60 个随机引物对供试材料进行的 PCR 扩增,共筛选出 12 个引物,对 4 个不同花色的一串红进行 RAPD 分析,得到了稳定性好、条带清晰、具有多态性的谱带,扩增片段的大小在 150~2 000 bp 之间。12 个引物的序列见表 4。12 个特异引物对 4 个花色扩增出 84 条带,平均每个引物可获得扩增带 7 条,最少的也可扩增 5 条带,最多的达 10 条,具有特异性的谱带为 28 条,占总带数的 33%。

表 5 利用 RAPD 计算的 4 个花色一串红的
欧几里德距离

颜色	欧几里德距离			
	紫色	红色	红白相间	白色
紫色	0.000			
红色	7.105	0.000		
红白相间	7.496	6.61	0.000	
白色	11.912	12.640	9.878	0.000

2.2.4 数据的聚类结果 用 12 个引物对 4 种花色的一串红材料基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增的结果转化成 1.0 数据, 采用欧几里德统计量(表 5), 通过 SPSS 软件数据处理系统, 进行聚类分析, 得到树状聚类图(图 2)。从一串红 4 种花色聚类图(图 2)分析可知, 可把 4

种花色一串红划分为两大类, 首先是红色和红白双色聚为一类, 然后和紫色聚在一起。白色单独为一类。从这种划分可以看出, 红色和红白双色亲缘关系较近, 紫色距离红色亲缘关系较近, 而白色一串红和其他花色关系较远, 但与红白双色的距离较近。

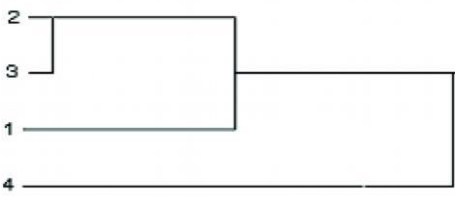


图 2 根据欧几里德距离做的 4 种花色一串红聚类图

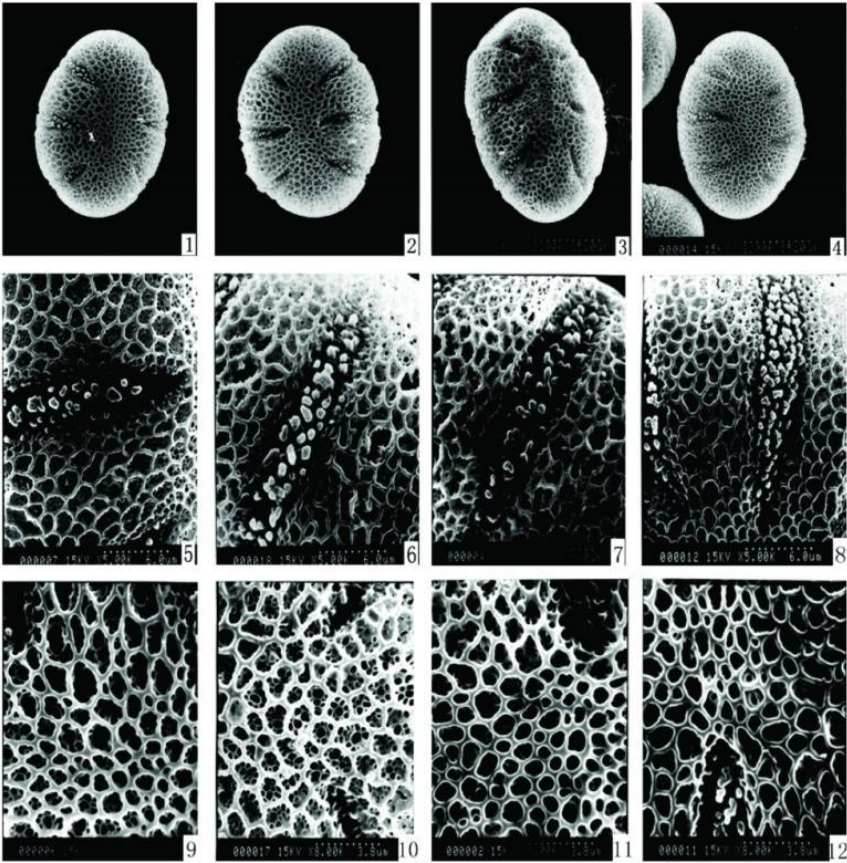


图 3 1~4: 紫色、红色、红白相间和白色一串红成熟花粉粒×2 000(扫描电镜); 5~8: 紫色、红色、红白相间和白色一串红花粉示萌发沟×5 000(扫描电镜); 9~12: 紫色、红色、红白相间和白色一串红成熟花粉粒示网纹×8 000(扫描电镜)

3 讨论

Walker^[4] 认为植物的花粉外壁由光滑简单向复杂的纹饰进化, 表面从原始无孔覆盖(无孔穴)向穿孔覆盖和半覆盖层演变。花粉壁的纹饰具有遗传性, 是研究分类的重要依据之一。

近些年来, 不少学者借助扫描电镜观察园艺植物的

花粉形态, 阐释了许多园艺植物种间或品种间的亲缘关系^[59]。种以下的栽培品种也已进行过不少研究, 应用花粉形态在苹果 (*Malus pumila*)、梨 (*Pyrus bretschneideri*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、柑橘 (*Citrus reticulata*)、桃 (*Prunus persica*)、玫瑰 (*Rosa rugosa*)、梅花 (*Prunus mume*)、山茶 (*Camellia japonica*)、杜鹃花属 (*Rhododen-*

dron)、枇杷(*Eriobotrya japonica*)等^[5-13]园艺植物方面进行品种分类和演化研究,都取得了不错的结果。

一串红花粉的纹饰均有明显的网状雕纹。不同花色间外网纹纹脊宽窄没有明显差别。一串红的纹饰分为内外两层,外层网孔较大,不同一串红之间外网孔直径略有差别,以红白相间的最大,其次是白色、紫色和红色;其次,单位外网中内部小网孔的数目差别较大,以红色品种(平均为 10.40)中的内网孔数目最多,其次是紫色、红白相间和白色品种。

一串红花粉粒有 6 条萌发沟,均没有延伸到两极。4 种花色一串红萌发沟很相似,一般萌发沟呈梭形狭缝状,中央部扩大,在往两极延伸过程中渐狭;萌发沟在极端不汇合,以红白相间的花粉最为突出,沟长和沟宽大于其他花粉,但从二者比值上来说,紫色>红色>白色>红白相间。

从沟内乳突的大小和数量上有所不同。由多到少的顺序依次为白色>红白相间>红色>紫色。综合一串红花粉大小、形态和纹饰的研究,可以推断白色一串红较原始,红白相间次之,最进化的是红色一串红,处于演化的最高阶段。

通过欧几里德聚类分析可以看出,紫色和红色首先聚在一起,然后和红白相间的聚在一起,最后与白色一串红聚在一起,此结果和表面纹饰的分析结果大致相同。证明花粉在遗传上具有较高的可靠性。可以作为分类的基本指标。

RAPD 可鉴别形态学上难以区分的品种乃至株系,更有利于生物种以下分类单元的鉴定区分,以科学的阐明其遗传进化关系。在观赏植物方面,戴思兰^[14]等对菊属、陈新露^[15]等对丁香、赵祥云^[16]等对百合的遗传关系进行了分析。汪小全^[17]等用 RAPD 方法研究了乌头属、升麻属与类叶升麻属植物的亲缘关系,结果与经典分类学结果基本吻合。此外,陈向明等^[18]用 RAPD-PCR 技术对 7 个花色 35 个牡丹品种,曹雅男^[19]等对正品龙胆遗传多样性等作了相关分析,潘远智^[20]等对报春花属植物的亲缘关系做了分析,田源^[21]等利用 RAPD 标记从 DNA 水平上对 30 份甘蓝类蔬菜材料进行亲缘关系和遗传多样性分析,都得到较好的分析效果。以上说明, RAPD 技术已广泛应用于种内不同种群间亲缘关系的研究,且其聚类结果与经典分类学方法基本吻合;在种间或近缘属间关系的研究中已显示一定的潜力。

在一串红 RAPD 的研究中,通过聚类图可把 4 种花色一串红划分为两大类:首先是红色和红白双色聚为一类,然后和紫色聚在一起。白色单独为一类。从这种划分可以看出,红色和红白双色亲缘关系较近,紫色距离

红色亲缘关系较近,而白色一串红和其他花色关系较远,但与红白双色的距离较近。RAPD 的聚类结果与孢粉学分类结果大致相同,因此 RAPD 和孢粉学结合起来可作为一串红亲缘关系鉴定的一种有效手段。

参考文献

[1] 埃尔塔曼 G. 孢粉学手册[M]. 中国科学院植物研究所古植物研究室孢粉组,译. 北京:科学出版社 1978.

[2] 王开发,王宪曾. 孢粉学概论[M]. 北京:北京大学出版社 1983.

[3] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J. 18 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acid res. 1990; 6531-6534.

[4] walker J W. Evolutionary Significance of the exine in the pollen of the primitive angiosperms in "The Evolutionary Significance of the Exine" I. K. Ferguson and J. Mullered. Linnean Soc[M]. London: Academic Press, 1976. 251-308.

[5] 张秀英,王雁,王桂萍. 桃花种质资源花粉形态的观察与比较[J]. 北京林业大学学报. 1997. 19: 57-62.

[6] 袁涛,王莲英. 几个牡丹野生种的花粉形态及其演化、分类的探讨[J]. 北京林业大学学报. 1999. 21(1): 17-21.

[7] Westwood M N, Challice J S. Morphology and surface topography of pollen and anther of Pnysspecies[J]. J Amer Soc Hort Sci. 1978, 103(1): 28-37.

[8] 康素红,包满珠,陈龙清. 梅花品种分类的花粉形态学研究[J]. 园艺学报. 1997. 24(2): 170-174.

[9] 毛加宁. 杜鹃花属 4 种植物花粉形态特点研究[J]. 西南农业大学学报. 2000. 22(6): 525-529.

[10] 王文莉,赵兰勇,丰震. 平阴玫瑰花粉亚显微形态及品种分类研究[J]. 园艺学报. 2005. 32(3): 527-530.

[11] 王奎玲,刘庆超,黄鑫. 耐冬山茶孢粉学研究[J]. 中国农学通报. 2007. 23(11): 267-272.

[12] 郑林,陈红,张雷. 木瓜属植物的花粉形态及品种分类[J]. 林业科学. 2008. 44(5): 53-57.

[13] 周兰英,王永清,张丽. 26 种杜鹃属植物花粉形态及分类学研究[J]. 林业科学. 2008. 44(2): 55-63.

[14] 戴思兰,李文彬. DNA 提纯方法对 9 种菊属植物 RAPD 的影响[J]. 园艺学报. 1996. 23(2): 169-174.

[15] 陈新露,赵祥云. 应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系[J]. 园艺学报. 1995(4): 235-239.

[16] 赵祥云,张云芳. 用 RAPD 标记评价百合品种间的遗传关系[J]. 北京农学院学报. 1995. 10(2): 58-63.

[17] 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.

[18] 陈向明,郑国生,孟丽. 不同花色牡丹品种亲缘关系的 RAPD-PCR 分析[J]. 中国农业科学. 2002. 35(5): 546-550.

[19] 曹雅男,李庆章,孙岳. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J]. 中草药. 2005. 36(1): 100-103.

[20] 潘远智,庞博,孙振元. 等. 川西南 13 种报春花属植物亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 林业科学研究. 2008. 21(3): 391-396.

[21] 田源,王超. 甘蓝类蔬菜亲缘关系的 RAPD 初步分析[J]. 中国蔬菜. 2008(1): 20-22.

四季石榴盆景的栽培与管理

韩翠香

(哈尔滨市阿城区园林绿化工程处, 黑龙江 哈尔滨 150300)

中图分类号: S 665.4 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2009)08-0198-01

石榴为石榴科(或安石榴科)石榴属落叶灌木或小乔木, 四季石榴又名小石榴, 植株矮小, 枝虬叶细, 花期长, 结果多, 是优良的盆景素材。石榴的繁殖方法为播种、分株、压条、嫁接、扦插等, 以扦插应用最广。扦插苗一般栽培2~3 a就能开花结果, 可截干蓄枝培育中、小型盆景。

1 花盆的选择

应选择泥瓦盆, 排水透气性好, 利于石榴生长。缺点是不太美观。

2 配制培养土

石榴对土壤要求不严, pH 4.5~8.2 之间的壤土均宜, 但以排水良好、疏松透气、营养丰富的土壤为最佳。可按园土、马粪、细沙各 1/3 的比例混合配成营养土。高温杀菌 15~20 d 后再装盆。

3 造型

石榴盆景主要观赏石榴树各种造型的姿态以及干、花、果与枝叶等的特色。选取长势健壮, 侧枝分布均匀, 分枝多的四季石榴, 根据树苗特征造型, 可制作成直干式、曲干式、斜干式、卧干式等多种树形。蟠扎时先将金

属丝顺主干所要弯曲的部位缠绕, 将主干按预定形式弯曲, 再对主枝进行弯曲, 最后疏剪多余枝头。

4 促花促果

要使四季石榴多开花又能结果, 要注意光照、修剪、肥水 3 个方面的管理。石榴盆景要放在阳光充足的地方。光照充足, 植株生长健壮, 可

促进花芽分化, 开出鲜艳的花朵, 反之则枝叶徒长, 不开花或少开花。四季石榴的花朵着生在当年生新梢上, 每个结果枝着花 2~5 朵, 顶花最易坐果。利用四季石榴新梢开花这一特性, 在生长期进行适当的修剪, 可使四季石榴不断抽生新梢, 从而不断开花结果, 可达到调控挂果期的目的。石榴盆景的整形, 常在春季萌芽前进行, 剪除枯枝、病虫枝、纤弱枝、徒长枝、过密枝、交叉枝, 保留健壮的枝干和冠形。幼苗可在 10 cm 高开始多次摘心, 促生分枝以达到冠幅丰满。

浇水时应枝叶萎蔫时浇透。结果后适当疏果, 以利营养集中, 果大而少落。花后应及时剪去残花和已开过花的残枝, 以利再发新枝, 再次开花。

四季石榴因开花次数多, 花期为 6~11 月份, 又要结出果实, 肥料不足易黄萎脱落。定植时要施足底肥, 生长旺盛期要每半月施 1 次腐熟稀薄的有机肥, 以补充植株生长所需的养分。最理想的肥料是鸡粪粉、饼肥和骨粉。早春季节, 可结合翻盆换土, 将晒干的鸡粪粉和豆饼末置于盆底作基肥。在生长期, 进行 3~5 次叶面施肥, 喷施浓度为 0.3%~0.5% 的磷酸二氢钾液, 以补充土壤施肥。在盛花期, 用 0.3% 的硼砂液喷施叶面, 可提高坐果率。果实发育期间, 喷施磷酸二氢钾和尿素, 可促使果实着色。提高观赏价值。

Genetic Analysis on Color-Flowered of *Salvia Splendens* Ker-Gawl

HU Guo-fu, LI Feng-lan, LI Cheng-yan, HU Bao-zhong

(Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: In this study, we used palynology and RAPD method to study color-flowered genetic of four kinds of *Salvia splendens* Ker-Gawl. Characteristics (length and width of pollen germinal furrow, polar axis etc.) of pollen grains were observed by using SEM, and the cluster analysis map had established. And the result showed that the purple color and red color were grouped together, then they grouped with red-white color into one cluster, and the white color was single. The results were roughly similar with surface emblazonry analysis. Through establishing optimal RAPD reaction system, 12 primers were picked out, and the cluster analysis map had established. The result of cluster analysis and classify were similar with palynology.

Key words: *Salvia splendens* Ker-Gawl; Color-flowered; RAPD; Palynology