

# 云南栽培金盏花遗传多样性 RAPD 分析

鲁京慧

(河北旅游职业学院 园艺系,河北 承德 067000)

**摘 要:**用来自云南昆明、曲靖和玉溪等地的 8 份金盏花种质资源为试材,利用改良 CTAB 法提取 DNA,筛选引物,优化 PCR 反应体系,对其进行遗传多样性 RAPD (random amplified polymorphic DNA)和 NTSYS2 聚类分析,以建立金盏花亲缘关系分析方法,明确分布在云南省各地的金盏花种质资源之间的亲缘关系和遗传多样性。结果表明:优化的 PCR 反应体系能达到良好的扩增效果,30 条 RAPD 引物在 8 份金盏花种质资源中共产生 165 个位点,其中 45 个位点具有遗传多态性,约占 27.28%。CK 与 7 号的相似性最小,用 CK 和 7 号作为亲本的后代会有较大的分离。试验表明金盏花种植资源遗传多样性丰富,遗传关系与其地理关系密切相关,但并非严格的限聚在一起,需结合表型更深入地分析。

**关键词:**金盏花;RAPD;遗传多样性

**中图分类号:**S 681.703.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0123-05

金盏花(*Calendula officinalis* L.)属菊科金盏菊属一年生草本植物,又名金盏菊、山金菊等,适合于我国大多数地区栽培,具有较高的经济价值。首先作为园林植物中最为重要的观赏花卉之一,其在城市园林造景,局部区域美化中具有独特作用,其次以金盏花的植株和花为原料可提取叶黄素和精油,不但是化妆品中一种天然的、具有良好抗氧化功能的原料,还可用于治疗多种皮肤疾病,如外伤、皮疹、皮肤破裂等,具有抗感染和杀菌消炎等功效<sup>[1]</sup>。近些年来,国内外学者主要开展金盏花

授粉结实和环境条件的关系<sup>[2]</sup>、水肥措施对经济性状的影响<sup>[3]</sup>、盐胁迫对金盏花生长和逆境的生理响应机制<sup>[4]</sup>、雄性不育两用系选育及植物学特性研究<sup>[5]</sup>,而关于金盏花种质资源的研究尚鲜见报道。

分子标记技术是分析种质亲缘关系的有力工具,其中 RAPD 分子标记是建立在 PCR 基础之上。用筛选的有 10 个碱基的单链随机引物,对基因组 DNA 进行 PCR 扩增以检测其多态性位点,具有操作简单、无需专门设计引物、对模板 DNA 质量要求不高、不受材料生长情况限制,能反应材料的遗传信息差异等优点;虽然 RAPD 分子标记有重复性不佳的缺点,但可以通过改良 PCR 反应体系加以改善<sup>[6]</sup>。已有学者为了在金盏花雄性不育的育种过程中使用 RAPD 分子标记技术,通过条件优化

**作者简介:**鲁京慧(1967-),女,河北承德人,本科,实验师,现主要从事园林工程及园林史的教学与科研工作。E-mail:lsz520999@126.com

**收稿日期:**2015-06-01

## 白檀未成熟胚的器官发生和植株再生

杨 艳<sup>1</sup>, 蒋丽娟<sup>2</sup>, 汤玉喜<sup>1</sup>, 李昌珠<sup>1</sup>, 唐 洁<sup>1</sup>, 李永进<sup>1</sup>

(1.湖南省林业科学院,湖南 长沙 410004;2.中南林业科技大学 生命科学院,湖南 长沙 410004)

**摘 要:**以白檀未成熟胚为试材,以改良 MS 为培养基,研究了白檀未成熟胚的器官发生和植株再生。结果表明:改良 MS(mMS)能够很好的诱导愈伤组织,在添加了 0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的培养基中,诱导率高达 92.5%;胚性愈伤组织分化最佳培养基为 mMS+0.25 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA,分化率为 72.4%;分化出的胚性愈伤组织在空白 mMS 培养基上继代培养 15 d,76.6%的组织分化出芽,再转入 1/2mMS+1.5%蔗糖培养基上培养 20 d,芽长至 1.5 cm。

**关键词:**白檀;未成熟胚;器官发生;植株再生

确定了比较稳定的 PCR 反应体系,为该技术的应用奠定了基础<sup>[7]</sup>。但是用 RAPD 分子标记技术对云南金盏花资源进行研究的报道还十分匮乏。

为了加快金盏花的育种进程,有必要对金盏花地方资源进行遗传关系分析。该研究以云南境内不同来源的 8 个金盏花资源为材料,通过筛选的多态性较高的 RAPD 引物进行扩增,对云南 8 个地方金盏花划分为不同的类群,并对其亲缘关系进行分析,以期在金盏花植物的种质资源保护和选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 金盏花植株叶片采自云南各地区(表 1),每个地区采取 3 个样品,采后放入便携液氮罐中,待用。

表 1 金盏花样品来源

Table 1 *Calendula* sample source

样品	来源	样品	来源
Sample	Source	Sample	Source
CK	云南昆明西山区	4	云南玉溪江川县
1	云南大理古城	5	云南曲靖陆良县
2	云南大理弥渡	6	云南楚雄牟定县
3	云南丽江市古城区	7	云南弥勒

1.1.2 供试仪器 超低温冰箱(SANYO ULTRA LOW MDF-382E);电子天平(Explorer OHAUS 公司);台式高速离心机(Heraeus D-37520);PCR 仪(BIO-RAD S1000TM);凝胶成像分析系统(BIO-RAD Gel Doc TM XR+);电泳仪(北京六一仪器厂 DYY-III7B 型);恒温循环水浴锅(北京博医康技术公司 HX-1050);微量加样器(德国 Eppendorf)等。

1.1.3 供试试剂及引物 RAPD 随机引物由上海生工生物工程有限公司合成,植物 DNA 提取试剂、*Taq*ase、dNTPs 等生化试剂购自北京天根生化科技有限公司,其它化学试剂均为分析纯。合成的 RAPD 随机引物序列见表 2。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 提取方法按照改良 CTAB 法进行。取少量新鲜叶片,放入 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管中,把组织研磨成匀浆,加入预热 65℃的 2×CTAB(0.2%巯基乙醇)缓冲液 500 μL,65℃恒温水浴锅放置 40 min,取出冷却至室温,加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻轻混匀,静置 10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清到一新离心管中,加 2/3 体积的异丙醇,混匀,-20℃放置 20 min,4℃、10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,70%乙醇洗涤 2~3 次,吸净残留的乙醇,在超净工作台上将 DNA 吹干,加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O,室温放置 0.5 h,-20℃保存备用。DNA 提取后采用 1%琼脂糖电泳和紫外分光光度计进

表 2 RAPD 随机引物序列

Table 2 Random primer sequences of RAPD

引物编号	引物序列	引物编号	引物序列
Primer number	Primer sequence(5'-3')	Primer number	Primer sequence(5'-3')
1	CAGGCCTTC	26	GAGGGACCTC
2	TCGGCGATAG	27	AACCGCGGCA
3	GTTGCGATCC	28	CAGACGACC
4	GGAAGCTTGC (G)	29	TCTACCCGTC
5	GAGTCTCAGG	30	GATGCGATGG
6	CCGATTTCGG	31	ACGGGACTCT
7	GGTGACTGTG	32	ACCAACCAGG
8	GGACTCCAGA	33	ACTT (C) CACGTC
9	AACGGTGACC	34	AGCCAGGCTG
10	CCGCTAGTTC	35	TCGCTGCGGA
11	TGTTCCACGG	36	AAGGCTGCTG
12	ACAACGCGAG	37	GGGGGAGATG
13	ACATGCCGTG	38	CTGTGTGCTC
14	TCTCCGCCCT	39	GTCCATGCAG
15	AAAGTGCAGC	40	AACGGCGGTC
16	CTACTGCGCT	41	AGCCCGGTAA
17	CACCCCTTGT	42	TTTGCCCGGT
18	TCCGATGCTG	43	GGGAACCGCT
19	TCTGTGTC	44	TGATGCCGCT
20	CCTCTCGACA	45	GTGTGAGTC
21	CACCTTTCCC	46	ACCACGCTT
22	GGTACTCCCC	47	AAGACGACGG
23	CCAGTCACT	48	TTCCCCCAG
24	CCACGGGAAG	49	ACTTCGCCAC
25	ACTTGACGGG	50	CAGCTCACGA

行质量检测,以保证满足 PCR 扩增需求。

1.2.2 RAPD 反应体系的建立 通过对 PCR 反应程序的参数及反应体系各成分浓度的比较试验,确定 PCR 的最终反应体系。25 μL 反应体系中包含 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),1.8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.2 μmol/L dNTPs,0.25 μmol/L 引物,1 U *Taq* 酶,基因组 DNA 约 20 ng。PCR 扩增程序:94℃(预变性) 5 min,94℃(变性) 45 s,36℃(退火) 45 s,72℃(延伸) 1 min,40 个循环,72℃(延伸) 10 min,4℃保存 PCR 产物。

1.2.3 RAPD 引物筛选 随机选取 3 个样品作为模板,利用优化后的 PCR 反应体系,从 50 条 RAPD 引物(表 2)中筛选出扩增多态性好,且条带清晰、重复性好的引物用于后续试验。

### 1.3 项目测定

由琼脂糖凝胶电泳获得 DNA 图谱,在重复 2 次后都能稳定出现的条带用于数据分析,分析方法参照 WILLIAMS 等<sup>[8]</sup>和 NEI 等<sup>[9]</sup>方法,记录时按扩增条带的有无分别赋值,有带记为 1,无带记为 0,统计扩增的条带数和差异条带数,计算多态位点百分率。

### 1.4 数据分析

采用 Excel 2003、NTSYS 1.3 软件进行统计分析,NTSYS 2.10e 软件进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 质量检测

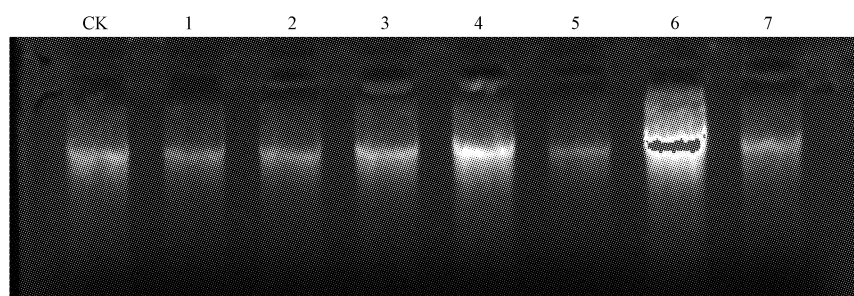
采用 CTAB 法提取的基因组 DNA 完整性好,长度

约 48 kb (以  $\lambda$ DNA 为标准),纯度较好,DNA 的产率较高(500 ng/ $\mu$ L)(图 1)。适宜于 RAPD 分析中 PCR 扩增对模板 DNA 的要求,能产生稳定、重复性较好的结果。

## 2.2 特异性引物的筛选

对合成的 50 条随机引物全部进行 PCR 扩增,扩增产物采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,其中 48 条扩增结果如图 2 所示,从中筛选出了 DNA 扩增片段电泳条带

亮度清晰、稳定性好的引物 30 条,编号分别为 1,2,4,6,8,9,11,12,16,17,21,22,23,24,25,26,28,30,31,32,33,34,36,37,38,41,42,43,45,46,其中每个引物扩增出 3~12 条可分辨的 DNA 片段,绝大多数扩增条带的长度介于 400~2 000 bp,因此对金盏花材料以此 30 条引物来进行多态性检测。

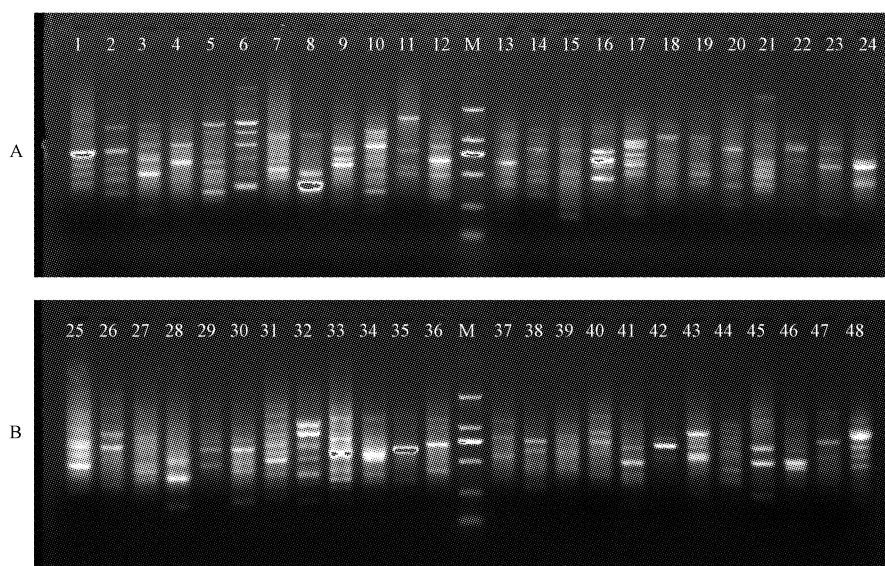


注:CK 为对照样品,1~7 为检测样品。

Note:CK was control,1-7 were testing samples.

图 1 金盏花 DNA 质量检测

Fig. 1 *Calendula* DNA quality inspection



注:A,引物顺序为 1~12,M,13~24;B,引物顺序为 25~36,M,37~48;M,DNA Marker (2 000 bp,1 500 bp,1 000 bp,700 bp,400 bp 和 200 bp)。

Note:A,the order of primers is 1-12,M,13-24;B,the order of primers is 25-36,M,37-48;M,DNA Marker (2 000 bp,1 500 bp,1 000 bp,700 bp,400 bp and 200 bp).

图 2 以 CK 为模板筛选随机引物

Fig. 2 Random primer screening with CK as template

## 2.3 样品遗传多样性

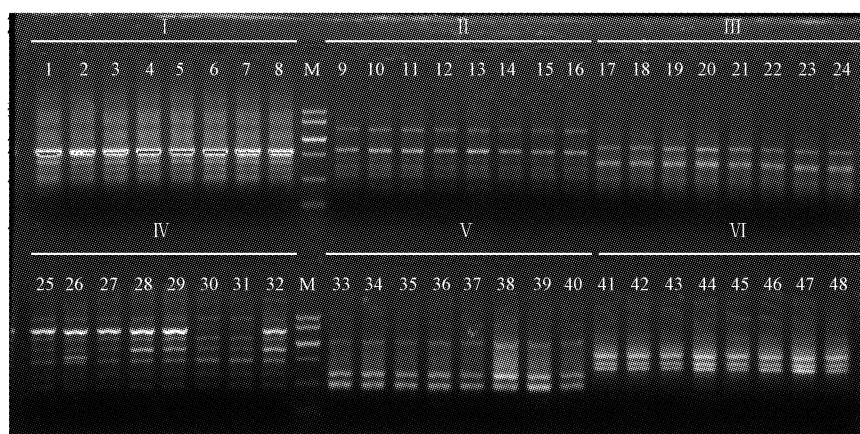
用编号 1、2、4、6、8 和 9 号引物的扩增结果显示(图 3),扩增效率较高、条带清晰,扩增体系成熟,对扩增结果可以统计差异条带数目,分析多态性。用筛选的 30 条引物对 8 份材料进行扩增,共获得 165 个条带,差异条带有 45 个(表 3),表明这 45 个位点存

在差异。其中引物 1、8、11、23、25、28、41 和 46 扩增后无差异条带,说明这些位点无多态性,引物 34 的扩增后差异最大,表明该位点的多态性最大。

## 2.4 样品的聚类分析

根据 RAPD 标记数据计算材料间的遗传相似系数矩阵,采用 UPGMA 法,使用 NTSYS 1.3 分析遗传多样





注:1,9,17,25,33和41为对照样品;M为DNA标准分子量;其余为检测样品;I、II、III、IV、V、VI组的检测引物分别为1、2、4、6、8和9号。

Note:1,9,17,25,33,41 were control samples,M was DNA Marker,others were test samples.I、II、III、IV、V、VI were primers of 1,2,4,6,8 and 9,respectively.

图3 金盏花DNA多态性检测

Fig.3 Polymorphism of *Calendula* DNA

表3 筛选引物扩增结果

Table 3 Result of screening primers amplification

引物 Primer	扩增条带 Amplified band	差异条带 Different band	引物 Primer	扩增条带 Amplified band	差异条带 Different band
1	7	0	26	5	3
2	6	2	28	3	0
4	4	2	30	5	2
6	8	2	31	9	2
8	3	0	32	6	2
9	6	2	33	5	1
11	4	0	34	8	5
12	5	3	36	4	1
16	9	1	37	4	1
17	6	2	38	6	1
21	7	2	41	4	0
22	4	2	42	4	2
23	5	0	43	5	3
24	11	3	45	5	1
25	4	0	46	3	0

性差异,构建了8份金盏花材料的遗传关系聚类图(图4)。可知,CK与7号的相似性最小为85%,3号和4号的相似性达96%,其余各材料间的相似性介于85%~96%。以相似性90%为标准将8份材料分为4组,其中

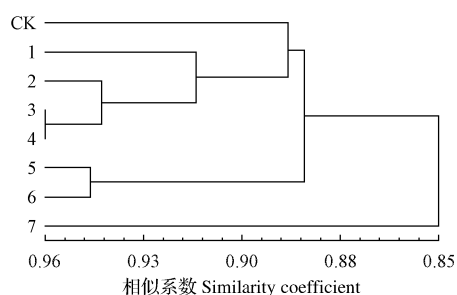


图4 金盏花遗传多样性聚类图

Fig.4 The genetic diversity clustering

云南昆明为1组,曲靖陆良、楚雄牟定、丽江古城和玉溪江川为1组,大理弥渡和大理古城为1组,云南弥勒为1组。由于这8份材料间最小相似性都达85%,比较可知,8份金盏花种质进行的聚类分析结果基本一致,说明这批样品亲缘关系较近,多态性不高。这种遗传相似性与形态分类结果的差异,可能是物种在同一生存环境中长期趋同进化的结果。

### 3 讨论与结论

利用RAPD分子标记技术对云南地区种植金盏花种质资源进行遗传多样性分析和聚类分析,其遗传变异受到栽培环境和小气候的影响<sup>[9-11]</sup>,聚类结果显示金盏花品种间差异性与其所处的地理位置和长期的栽培环境有一定的相关性,可导致其自身的遗传性状发生改变,所以在育种选材中,应尽可能选遗传差异性相差大的种植资源作为亲本<sup>[12-13]</sup>。

优化的RAPD反应体系能达到较好的扩增效果。该研究得出在25 μL反应体系中,模板DNA最佳为20 ng,配以10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),引物为0.25 μmol/L,dNTPs为0.2 μmol/L,Taq DNA聚合酶为1 U,镁离子浓度为1.8 mmol/L。该反应体系与沈一岚等<sup>[7]</sup>得到的RAPD优化反应体系相近,但该试验中使用低浓度的镁离子减少了非特异扩增,提高了反应的稳定性。戴思兰等<sup>[10]</sup>以6种菊科为材料建立的RAPD优化反应体系,也是降低了镁离子浓度得到较好的扩增结果。

RAPD分子标记结果显示,8份金盏花资源具有较丰富的遗传多样性。该试验利用30条RAPD引物在8份金盏花种质资源中产生了165条条带,其中多态性条带45条,多态性条带比率为27.28%,表明这8份资源间的遗传差异较小。因受采集种质资源条件的限制,该

试验中样品数量只有 8 份,但试验结果在某种程度上也反映了云南省金盏花种质资源的遗传多样性较为丰富,在后续研究计划中,将采集更多金盏花种质资源提供指示作用。

RAPD 扩增后,在此基础上构建 UMPGA 聚类图,经过分析得知,8 份金盏花种质资源主要是按照地理位置而聚类,这和菊属植物的 RAPD 分析的研究结果相似<sup>[10]</sup>,表明材料的遗传特性有区域性,用 RAPD 分析单叶蔓荆种质资源遗传多态性时也得出遗传特性与来源地区密切相关<sup>[12]</sup>。汤志成等<sup>[13]</sup>在对野生大麻进行 RAPD 分析也有类似结果,胡尊红等<sup>[14]</sup>使用 AFLP 分子标记对大麻群体进行遗传多样性分析也表明,种质资源在遗传变异趋势上有较强的地域性,这与该研究结果相符。因此,采用 RAPD 分析金盏花种质资源遗传多样性是较为理想的技术,云南的金盏花种质资源遗传多样性呈较强的地域性。要深入开展这方面的研究还需结合表型调查,进行对照研究,这样能更加深入地分析金盏花种质资源遗传多样性。

#### 参考文献

- [1] 金敬宏,张卫明,孙晓明,等.金盏花的栽培和经济用途[J].中国野生植物资源,2003(4):40-41.
- [2] 赵继荣,张肖凌,雒淑珍,等.不同授粉次数和环境条件对金盏花结实率的影响[J].广西农业科学,2010,41(3):250-252.
- [3] 赵继荣,雷耀湖,何庆祥,等.水氮耦合对金盏花产量和叶黄素含量变化的影响[J].南方农业学报,2011(8):923-925.
- [4] 刘爱荣,张远兵,方园园,等.盐胁迫对金盏菊生长、抗氧化能力和盐胁迫蛋白的影响[J].草业学报,2011(6):52-59.
- [5] 田海燕,王平,沈向群,等.万寿菊 W205 雄性不育两用系的遗传及植物学特征研究[J].北方园艺,2007(2):105-107.
- [6] 胡裕清,赵树进. RAPD 技术及其在植物研究中的应用[J].生物技术通报,2010(5):74-77.
- [7] 沈一岚,续九如,李福荣,等.万寿菊 RAPD 分子标记优化体系的建立[J].吉林林业科技,2006(1):10-14.
- [8] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA Polymerphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic morkors[J]. Nucleic Acids Research, 1990(18):6531-6534.
- [9] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1979, 74:5267-5273.
- [10] 戴思兰,陈俊愉,李文彬.菊属植物 RAPD 反应体系的建立[J].北京林业大学学报,1996(1):47-52.
- [11] 徐文斌,郭巧生,王长林.药用菊花遗传多样性的 RAPD 分析[J].中国中药杂志,2006(1):18-21.
- [12] 孙维洋,李剑芳,邱进,等.单叶蔓荆种质资源遗传多态性的 RAPD 分析[J].中国医药导报,2011,8(33):5-7.
- [13] 汤志成,陈璇,张庆滢,等.野生大麻种质资源表型及其 RAPD 遗传多样性分析[J].西部林业科学,2013,42(3):61-66.
- [14] 胡尊红,郭鸿彦,胡学礼,等.大麻品种遗传多样性的 AFLP 分析[J].植物遗传资源学报,2012,13(4):555-561.

## RAPD Analysis of the Genetic Diversity of *Calendula officinalis* Cultivated in Yunnan Province

LU Jinghui

(Department of Horticulture, Hebei Tourism of Career Academy, Chengde, Hebei 067000)

**Abstract:** Taking 8 marigold germplasm resources collected in Yunnan Province as materials, the DNA was extracted by modified CTAB method. The PCR reaction system was built and the primers were selected to establish a method for analyzing the genetic relationship by RAPD and NTSYS2. The results showed that the optimal reaction system could achieve better amplified effect. A total of 165 loci were obtained, of which 45 loci were polymorphic, accounting for about 27.28%. The similarity between CK and No. 7 was minimum. The test showed that the genetic diversity of marigold germplasm resources in Yunnan were abundant in Yunnan Province, and relationship between genetic and geographical relationship were closely related with each other, but not strictly limited together, and more in-depth analysis of phenotype should be combined.

**Keywords:** *Calendula officinalis*; RAPD; genetic diversity