

菊花 18 个品种的 RAPD 分析

秦贺兰* 游 捷 高俊平

(中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094)

摘 要: 采用 RAPD 技术分析了 18 个菊花品种 DNA 的多态性。从 80 个 10 碱基随机引物中筛选出多态性频率高的 3 个引物。扩增的多态性片段在 600 bp ~ 1300 bp 之间。检测出两个品种特有的分子标记, ‘大红托桂’有 OPD15 (1200 bp), ‘玉翎管’缺失 OPA17 (1100 bp)。瓣型一致的品种间基因型相似系数较高。

关键词: 菊花; RAPD; 品种鉴定; 相似系数

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 05-0488-03

1 目的、材料与方法

菊花 (*Dendranthema × grandiflorum*) 原产我国, 品种资源丰富^[1]。戴思兰等^[2]曾用 RAPD 技术进行菊花起源的探索。作者尝试用 RAPD 技术进行 18 个菊花品种的鉴定和分析, 以期建立一套高效、准确的室内鉴定技术。试验在北京市农林科学院林果研究所完成。18 个菊花品种 (表 1) 全部来自中国农业大学菊花资源圃。每个品种选取 10 株生长健壮的植株, 摘取顶部完全展开的嫩叶混合提取 DNA。DNA 的提取采用改良 CTAB 法, 以 DNA/ ECORI+ Hind 作分子量标记, 经 0.7 % 琼脂糖凝胶电泳检测。电场强度 3 ~ 5 V/ cm, 电泳 60 ~ 90 min。Tur-1001 型紫外分光光度计测定浓度, 记录 DNA 样品 OD₂₆₀ 及 OD_{260/280} 值。扩增反应在 MJ ReseARCH, Inc 公司生产的 PTC-100™ programmable Thermal Controller 仪上进行。20 μL 反应体系中, 模板 DNA 浓度为 20 ng/ μL, TaqDNA 聚合酶为 0.075 U, dNTP 为 0.2 mmol/ L, Mg²⁺ 浓度为 1.75 mmol/ L, 引物为 0.75 ng/ μL。94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 36 复性 1 min 30 s, 72 延伸 2 min, 共 39 个循环; 最后 72 延伸 10 min。RAPD 反应产物在含有 0.5 ng/ mL EB 的 1.0 % 琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 电压为 100 V, 电泳 1 h。紫外灯下观察, 并照相。

表 1 菊花品种 RAPD 分析试验材料及编号

Table 1 The number of the tested Chrysanthemum cultivars

| 编号 No. | 品种 Cultivar | 瓣型 Petal type | 编号 No. | 品种 Cultivar | 瓣型 Petal type |
|--------|---------------------|---------------|--------|-----------------------|---------------|
| 1 | 黄秀芳 Huangxiufang | 平瓣 Flat | 10 | 十丈珠帘 Shizhang zhulian | 管瓣 Quilled |
| 2 | 白秀芳 Baixiufang | 平瓣 Flat | 11 | 苍龙爪 Canglongzhao | 畸瓣 Unnormal |
| 3 | 国华百万 Guohua baiwan | 匙瓣 Spoon | 12 | 蜜蜂腺汁 Mifeng xianzhi | 畸瓣 Unnormal |
| 4 | 国华欣然 Guohua xinran | 匙瓣 Spoon | 13 | 太真图 Taizhentu | 管瓣 Quilled |
| 5 | 国华绿丝 Guohua l üi | 管瓣 Quilled | 14 | 玉翎管 Yulingguan | 管瓣 Quilled |
| 6 | 国华游美 Guohua youmei | 管瓣 Quilled | 15 | 墨魁 Mokui | 平瓣 Flat |
| 7 | 紫桂 Zgui | 桂瓣 Anemone | 16 | 小桂 Xiaogui | 桂瓣 Anemone |
| 8 | 大红托桂 Dahongtuogui | 桂瓣 Anemone | 17 | 血清 Xueqing | 平瓣 Flat |
| 9 | 嫦娥奔月 Chang e benyue | 匙瓣 Spoon | 18 | 风卷万里 Fengguanwanli | 匙瓣 Spoon |

2 结果与分析

2.1 引物筛选和 RAPD 的多态性分析

本试验共筛选了 OPERON 公司 10 碱基随机引物 80 个, 选取带型清晰、重复性好、多态性强的 5

收稿日期: 2001 - 11 - 01; 修回日期: 2002 - 01 - 22

基金项目: 农业部 DUS 测试项目资助 (95 农 - 11 - 01 - 07)

*现工作单位: 北京市园林科学研究所

个引物进行分析。多态性片段大小在 600 bp ~ 1300 bp 之间。其中尤以 700 bp ~ 800 bp 之间为最多 (共 5 条), 占总数的 28 %。其次为 1100 bp ~ 1200 bp 之间共 4 条, 占总数的 22 %。即在这两个长度范围内表现出了较多的多态性。引物不同, 扩增结果不同 (见表 2)。5 个引物共扩增出谱带 26 条, 其中多态性谱带 18 条, 多态性达 69 %, 显示菊花品种内丰富的遗传多样性。在引物 OPC07、OPD15 及 OPA17 的扩增反应中, 分别扩增出 1 条共有带, 5 条多态性带。利用 C07、D15 及 A17 中的任意 2 个引物扩增的多态性条带就可以区分出其中 16 个 (1 号、2 号除外) 菊花品种, 显示出 RAPD 在鉴别菊花品种方面具有较大优越性。

表 2 5 个引物扩增结果统计

Table 2 The amplified results of 5 primers

| 引物 Primer | 总条带数 Total amplified bands | 具多态性条带数 The polymorphic bands | 多态性频率 Percentage of polymorphic bands (%) | 引物序列 The frequency of the primer |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------------|
| C07 | 6 | 5 | 83 | 3 'GTCCCACGAS' |
| D15 | 6 | 5 | 83 | 3 'CATCCGTCIS' |
| A17 | 6 | 5 | 83 | 3 'GACCGCTGIS' |
| D13 | 3 | 1 | 33.3 | 3 'GGGGTGACGAS' |
| A10 | 5 | 2 | 40 | 3 'GTGATCGCAGS' |

2.2 品种间基因型相似系数分析

各品种间基因型的相似系数 = $(2M_{xy} / M_x + M_y) \times 100\%$ 。其中 M_x 表示品种 x 所具有的条带数; M_y 表示品种 y 所具有的条带数, M_{xy} 表示品种 x 、 y 共有的条带数。由表 3 可见, 品种间基因型的相似系数差别很大, 变异幅度从 13 % ~ 92 %。所选的 18 个品种, 与 1 号相似系数最高的 (2 号除外) 为 17 号 (80 %)、15 号 (71 %)。它们表型上的共同特征为平瓣。12 号与 1 号相似系数也较高 (63 %), 分析原因认为 12 号在分类中瓣型虽属于畸瓣, 但其舌状花基本瓣型为平瓣, 只不过花瓣背面长有毛刺状附属物。在所有品种中, 与 3 号相似系数最高的为 4 号 (78 %) 及 9 号 (74 %), 3 号、4 号、9 号均为匙瓣品种。

与 5 号相似系数最高的为 6 号 (71 %), 其次为 10 号 (67 %), 5 号、6 号、10 号均为管瓣。由此可见, 舌状花基本瓣型 (平瓣、匙瓣、管瓣) 相同的品种, 品种间基因型相似系数较高。

表 3 菊花品种间基因型相似系数分析

Table 3 The genotype similarity coefficients of the 18 Chrysanthemum cultivars

(%)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 63 | 63 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 53 | 53 | 78 | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 67 | 67 | 67 | 71 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 67 | 67 | 67 | 71 | 71 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 40 | 40 | 56 | 57 | 43 | 57 | | | | | | | | | | | |
| 8 | 56 | 56 | 48 | 35 | 35 | 47 | 35 | | | | | | | | | | |
| 9 | 50 | 50 | 74 | 53 | 53 | 40 | 53 | 33 | | | | | | | | | |
| 10 | 50 | 50 | 63 | 53 | 67 | 53 | 40 | 33 | 63 | | | | | | | | |
| 11 | 53 | 53 | 56 | 43 | 43 | 57 | 53 | 59 | 80 | 53 | | | | | | | |
| 12 | 63 | 63 | 53 | 67 | 53 | 40 | 53 | 44 | 50 | 50 | 40 | | | | | | |
| 13 | 31 | 31 | 38 | 50 | 50 | 33 | 33 | 13 | 31 | 92 | 17 | 46 | | | | | |
| 14 | 47 | 47 | 56 | 71 | 57 | 43 | 57 | 47 | 53 | 27 | 43 | 67 | 17 | | | | |
| 15 | 71 | 71 | 47 | 62 | 62 | 46 | 46 | 38 | 43 | 57 | 31 | 86 | 55 | 62 | | | |
| 16 | 46 | 46 | 50 | 50 | 50 | 33 | 17 | 40 | 62 | 77 | 50 | 46 | 60 | 33 | 55 | | |
| 17 | 80 | 80 | 67 | 71 | 71 | 57 | 43 | 59 | 40 | 40 | 29 | 67 | 33 | 57 | 77 | 50 | |
| 18 | 46 | 46 | 50 | 50 | 33 | 33 | 33 | 40 | 46 | 46 | 50 | 46 | 60 | 33 | 36 | 60 | 50 |

2.3 品种特异性条带及鉴定

品种特有的遗传标记可作为重要的分子生物学性状,用于作物品种鉴定。本试验中引物 OPD15-1200 bp 处只有大红托桂品种有产物(见图 1),其余 17 个品种均缺失,因而 OPD15-1200 bp 为大红托桂特有产物。另外玉翎管品种具备特异缺失条带,即于 OPA17-1100 bp 处缺失(见图 2)。

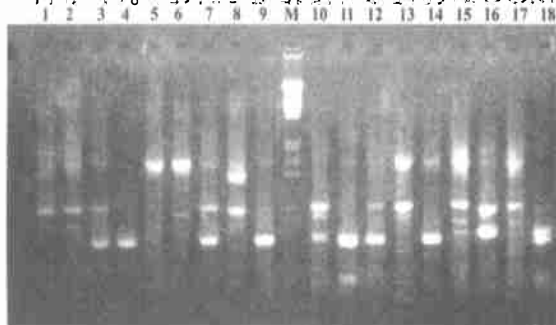


图 1 引物 OPD15 扩增的 RAPD 反应结果
数字与表 1 品种对应。

Fig. 1 RAPD patterns amplified by primer OPD15

M: DNA marker, DNA/ECORI+Hind
Numbers refer to the cultivars listed in table 1.

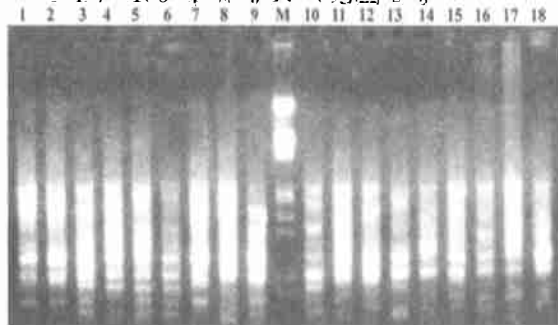


图 2 引物 OPA17 扩增的 RAPD 反应结果
数字表 1 品种对应。

Fig. 2 RAPD patterns amplified by primer OPA17

M: DNA marker, DNA/ECORI+Hind
Numbers refer to the cultivars listed in table 1.

本试验在 18 个菊花品种的 RAPD 分析中,筛选出 3 个多态性高的引物,并检测出两个品种特有的分子标记,显示 RAPD 技术在菊花品种鉴定上的优越性。所用的黄秀芳和白秀芳(1 号、2 号)两个品种,二者只有花色不同,其余植物学性状基本相同,本试验筛选出的 3 个引物扩增出的多态性条带不能将其区分开。究其原因,可能与以下因素有关:(1)因为菊花的染色体组特别大($M=3 \times 10^9$ bp),引起表型差异的突变位于整个基因组一个很小的位点上,而本研究所筛选的引物还不够充分,没有覆盖整个基因组^[3]。(2)茎、叶和腋芽均由 3 个细胞层(layer)发育而来,而花瓣仅仅由最外的两层细胞层(layer and layer)发育而来^[4],如果花色区别仅仅是由最外层或最外两层决定的,那么由于我们所用的 DNA 是从叶片提取而来的,包含了所有的 3 个细胞层,因而有可能在 DNA 分析中被忽略。

参考文献:

- 1 陈俊愉. 中国农业百科全书. 观赏园艺卷. 北京: 农业出版社, 1996. 238
- 2 戴思兰, 陈俊愉, 李文彬. 菊花起源 RAPD 分析. 植物学报, 1998, 40 (1): 1053~1059
- 3 Isabel N, Tremblay L, Michaud M, et al. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryo-genesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B. S. P. Ther. Appl. Genet., 1993, 86: 81~87
- 4 Bush S R, Earle E D. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the pericarpal chimera *Chrysanthemum morifolium* "Indianapolis". Am. J. Bot., 1976, 63: 729~737

RAPD Analysis of 18 Chrysanthemum Cultivars

Qin Helan, You Jie, and Gao Junping

(Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: 18 cultivars of *Chrysanthemum* were analyzed using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Three primers out of 80 random primers showed high polymorphism, the polymorphic amplification fragment length ranged from 600 bp to 1300 bp. The 1200 bp fragment generated by primer OPD15 was present only in 'Dahongtuogui', while the 1100 bp fragment generated by primer OPA17 was only absent in 'yulingguan' in 18 cultivars. The cultivars with similar petal type have high similarity coefficient (SC) among 18 cultivars.

Key words: *Chrysanthemum*; RAPD; Cultivars identification; Similarity coefficient