

中国水仙与欧洲水仙品种 RAPD 指纹的研究

陈林皎 田惠桥 武 剑

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用随机多态性 DNA (RAPD) 技术对中国水仙和欧洲红口水仙共 6 个品种进行了分析。选用了 12 个 10 bp 引物共扩增出 119 条 DNA 片段。计算各样本间的相似性系数和遗传距离, 并采用 UPGMA 法对遗传距离进行了聚类分析。结果表明: 中国水仙 3 个品种亲缘关系十分密切, 红口水仙 3 个品种亲缘关系较近, 而中国水仙与红口水仙 3 个品种间的亲缘关系较远。建立的水仙 RAPD 技术体系可帮助育种亲本的选配及水仙品种的鉴定。

关键词: 水仙; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: Q949.718.250.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395 (2003) 02-0177-04

The Study on RAPD Fingerprints of *Narcissus* in China and Europe

CHEN Lin-jiao TIAN Hui-qiao WU Jian

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Three cultivars of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and three cultivars of *N. poeticus* have been studied by RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Twelve 10-bp arbitrary primers were screened and 119 DNA bands were amplified, among which 84.86% were polymorphic. Genetic similarities were calculated using simple matching coefficient, and the phenogram was constructed by using UPGMA method. Three cultivars of *N. tazetta* var. *chinensis* were very closely related, while the three cultivars of *N. poeticus* were clustered together, indicating that there is a distance in relationship between the first three and the latter. It is suggested that molecular marker technique is helpful for the breeding and variety identification of *Narcissus*.

Key words: *Narcissus*; RAPD; Genetic diversity

水仙为石蒜科水仙属 *Narcissus* 植物, 约有 40 个原生种, 大多数原产于地中海沿岸及欧洲中部^[1,2], 我国仅产中国水仙 1 个变种。水仙花是著名花卉, 具有悠久的栽培历史。据英国皇家园艺学会统计, 现约有 1 万多个园艺品种, 并将其分为十一大类: 喇叭水仙、大杯水仙、小杯水仙、重瓣水仙、仙客来水仙、西班牙水仙、丁香水仙、多花水仙、红口水仙、原种野生水仙和其它杂种水仙。

中国水仙属于多花水仙类, 目前主要有“金盏银台”、“玉玲珑”、“金三角”三个品种, 以水仙花球大、花多、味香而驰名中外^[3]。然而, 数百年来中国水仙品种稀少, 传统的选育方法培育新品种困难。并且, 由于长期的无性繁殖, 中国水仙存在着品种

退化、品质下降等问题, 严重制约了这一花卉的生产和发展^[4]。为此, 本研究以中国水仙 (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.) 和欧洲红口水仙 (*N. poeticus* L.) 共 6 个品种为材料, 通过 RAPD 标记分析它们的遗传多样性和亲缘距离, 以便为采用现代生物工程新技术将国外水仙优良的种质引入中国水仙、选育新品种提供指导。

1 材料和方法

材料 中国水仙 (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem.) “金盏银台”、“玉玲珑”、“金三角”3 个品种来源于主产地漳州, 欧洲红口水仙 (*N. poeticus* L.) “花唱片”、“冰花”、“拉丝维加斯”3 个品种来自于荷兰。用鳞茎水培, 每个分类群各取 10 个单株植物幼叶混合, 提取 DNA。

收稿日期: 2002-07-22 接受日期: 2002-11-04

基金项目: 福建省自然科学基金 (B0010001) 资助

DNA 的提取与纯化 采用丙酮醋酸钾法^[5]提取 DNA, 去 RNA 后用 24:1 的氯仿-异戊醇抽提 2 次, 最后溶于 TE 中。在 BECKMAN DU640 核酸蛋白分析仪上测定 DNA 的纯度和浓度, 通过琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性, -20℃ 保存备用。

DNA 扩增 扩增反应在德国 Biometra UNO II PCR 仪上进行。反应体积 25 μl, 包含 2.5 μl 10×buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.0 μmol/L 引物 (以上试剂皆购自 Sangon 公司), 0.6 单位的 Tag 酶 (华美公司), 60 ng DNA 模板。每次扩增反应设置不含 DNA 模板的空白对照。扩增程序为: 94℃ 4 min, 预变性, 94℃ 15 s, 42℃ 30 s, 72℃ 75 s, 45 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。RAPD 产物经 1.4% 琼脂糖电泳, 以 λ DNA/EcoR I + HindIII (Sangon 公司) 作为相对分子量标记。EB 染色, 于紫外灯下观察照相。在电泳图谱上同一 RAPD 位点有带者记为 1, 缺乏记为 0, 强带和弱带的赋值均为 1, 仅仅那些可重复的带才被记录。

数据分析 任意两样品间的相似性系数计算公式为: $S_{SM} = (a+d)/(a+b+c+d)$, 式中: S_{SM} 为单匹配系数; a 为 2 个样本均为 1 的条带总数; b 、 c 为 2 个样本分别为 1 或 0 的条带总数; d 为 2 个样本均为 0 的条带总数。两样本间的遗传距离 (D) 根据以下公式计算: $D = 1 - F$, $F = 2a / (2a + b + c)$ 采用 UPGMA 法对遗传距离进行聚类分析, 构建亲缘树系图。

2 结果

我们从 80 个 10 个核苷酸长的随机引物筛选出的 12 个重复性较好的引物对 6 个样本进行 DNA 扩增。所用引物及检测结果见表 1。每个引物产生 4-15 条带, 共检出 119 个位点, 其中 101 位点表现多态性, 占总数的 84.86%。图 1 示部分随机引物扩增所得 DNA 指纹图谱。计算 6 个品种间的相似性系数和遗传距离 (表 2), 采用 UPGMA 法对遗传距

离进行聚类分析, 构建树系图 (图 2)。

3 分析和讨论

3.1 水仙的遗传多样性

本文首次对中国和国外的 6 个水仙品种进行了 RAPD 指纹研究, 由表 2 和图 2 可知, 中国水仙三个品种彼此间相似性系数高达 0.8235-0.916, 最小遗传距离为 0.0714, 表明中国水仙 3 个品种亲缘关系十分密切, 各品种的遗传背景基本一致, 多样性水平颇低。这与前人的细胞学研究^[6]、同工酶研究^[7]结果相吻合。红口水仙 3 个品种彼此间相似性系数分布在 0.747-0.8992 之间, 亲缘关系较近。红口水仙 3 个品种在外部形态特征上与中国水仙有着明显差异, 其花单朵, 花大, 花被白色, 副冠黄色, 味淡; 而中国水仙一支花葶上有花 3-14 朵, 花小, 有浓郁香味。中国水仙与国外的 3 个水仙品种在 DNA 水平上亦表现出较大差异, RAPD 扩增所获得

表 1 引物、碱基序列及扩增结果

Table 1 The sequences of 12 random primers and their amplification results

引物 Primer	序列 Sequence	扩增出位点数 No. of bands	多态位点数 No. of polymorphic bands
S22	TGCCGAGCTG	13	10
S45	TGAGCGGACA	5	4
S48	GTGTGCCCCA	13	9
S68	TGGACCGGTG	11	11
S70	TGTCTGGGTG	4	2
S71	AAAGCTGCGG	7	4
S75	GACGGATCAG	4	4
S121	ACGGATCCTG	15	13
S123	CCTGATCACC	11	8
S154	TGCGGCTGAG	14	13
S287	AGAGCCGTCA	12	11
S295	AGTCGCCCTT	10	10
Total		119	101

表 2 6 个样本间单匹配相似性系数 (左下部) 和遗传距离 (右上部)

Table 2 The single matching similarity coefficients (below the diagonal) and genetic distances (above the diagonal) between any two taxa

	1	2	3	4	5	6
1 金盏银台 Jinzhanyingtai	-	0.714	0.1367	0.5738	0.6508	0.6393
2 玉玲珑 Yulinglong	0.9160	-	0.1533	0.5500	0.6290	0.6167
3 金三角 Jinsanjiao	0.8403	0.8235	-	0.5462	0.6423	0.6303
4 花唱片 Flowerrecord	0.4118	0.4454	0.4538	-	0.2642	0.2549
5 冰花 Icefollies	0.3109	0.3445	0.3361	0.7647	-	0.1132
6 拉丝维加斯 Lasvegas	0.3445	0.3782	0.3697	0.7815	0.8992	-

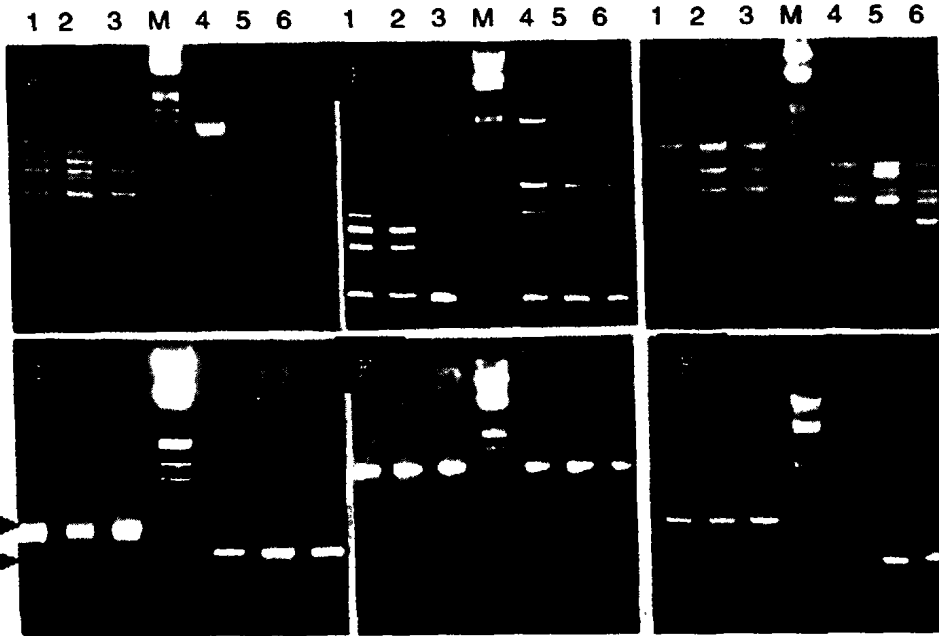


图 1 随机引物 S48 (A) , S287 (B) , S154 (C) , S295 (D) , S70 (E) , S68 (F) 的扩增产物
 Fig.1 Amplification products of primer S48(A), S287(B), S154 (C), S295 (D), S70(E), S68 (F)

1-6 为样品编号, M. 分子量标准 (λ DNA/EcoR I +HindIII), 分子量依次为 21226, 5148, 2000, 1584, 1375, 947, 831bp。
 Lanes 1-6 are numbers for samples as shown in Table 2; M: Molecular weight standard (λ DNA/EcoRI+Hind III); MW are 21226, 5148, 2000, 1584, 1375, 947, and 831 bp, respectively.

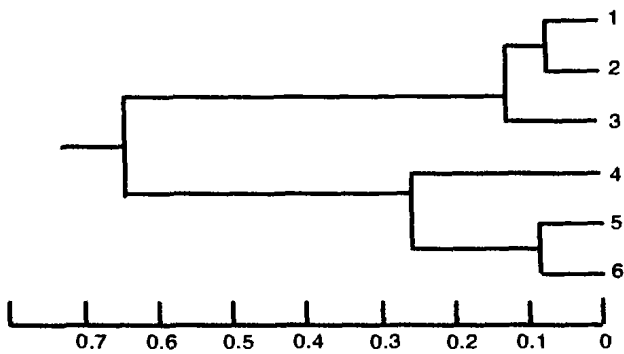


图 2 用遗传距离产生的聚类分析树状图 (UPGMA)
 Fig. 2 Dendrogram generated using UPGMA algorithm to cluster genetic distances

1-6 为样品编号。Lanes 1 to 6 are numbers for samples as shown in Table 2.

的多态性带占总数的 84.86%，其相似性系数在 0.3109-0.4538 之间，遗传距离在 0.5462-0.6508 之间，表明它们的亲缘关系较远。

3.2 利用 RAPD 技术进行水仙新品种选育与品种亲缘鉴定

RAPD 技术自 1990 年创立以来，以其快速、简便、高效等优点在植物遗传多样性研究、分子标记辅助育种、种质鉴定、植物系统分类等方面得到了

广泛应用^[8-11]。在育种工作中，育种材料亲缘关系过分单一，常常造成育种工作难以取得突破；亲缘关系太远，杂交不亲和性难以克服而导致育种失败^[12]。采用 RAPD 技术分析育种材料间的亲缘关系，有助于选择适宜的亲本以提高育种效率。中国水仙各品种间遗传多样性水平很低，表明该物种进化过程中基因突变频率低；并且，中国水仙为同源三倍体，自然情况下很难通过有性生殖过程同其它物种进行杂交获得新基因。这可能是中国水仙数百年来少有创新的内在原因。只有采用现代生物新技术将其它种质引入中国水仙才有可能取得大的突破。如：将控制花色的基因转入中国水仙、与欧洲水仙进行体细胞杂交等，可望获得花色丰富、花朵大的水仙花新品种，本实验室目前正在开展这方面的工作。另一方面，通过 RAPD 标记，可以获得各样本的特征谱带，如引物 S295 (图 1D) 扩增出的约 900 bp 片段为中国水仙所具有，红口水仙 3 个品种没有；扩增出的约 750 bp 片段为红口水仙的 3 个品种所具有，而中国水仙 3 个品种没有。根据亲本、远缘杂种或体细胞杂种的指纹图谱，可以有效鉴定杂种的真实性；也可以通过建立品种 (组合) 的 RAPD 指纹档案，用来鉴定品种纯度。此外，水仙由于长期的栽

培与人工选育, 加上常常发生自然杂交和多倍化, 以致于水仙属属下分类困难, 种的数量至今没有统一的界限, 其亲缘关系更是知之甚少^[1]。采用 RAPD 技术对水仙属植物进行分析, 不仅可以探讨水仙属下各分类群的亲缘演化关系, 检测种内的遗传分化, 而且还可以为属、种的分类提供强有力的证据。本研究所建立的水仙 RAPD 技术体系将为水仙种质鉴定及系统分类等研究提供一种有效的方法和基础。

参考文献

- [1] Heidi E M, Juan A, Gunnar B, et al. Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae)[J]. *Biochem System Ecol*, 1997, 25 (8) : 685-706.
- [2] Worley A C, Baker A M, Thompson J L, et al. Floral display in *Narcissus*: variation in flower size and number at the species, population and individual level [J]. *Inter J Pl Sci*, 2000, 161:69-79.
- [3] Guo W C (郭文场), Yang B M (杨柏明). *Zhangzhou Narcissus* [J]. *Spec Econ Anim Pl* (特种经济动植物), 1999, 2(1):39-40. (in Chinese)
- [4] Lin H X (林含新), Lin Q Y (林妾英), Xie L H (谢联辉). Virus of *Narcissus* and its research progress [J]. *Plant Quarant* (植物检疫), 1996, 10(4):227-229. (in Chinese).
- [5] Shi S H (施苏华), Zhang Q (章群), Chen Y Q (陈月琴), et al. A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants[J]. *Acta Sci Natur Univ Sun* (中山大学学报), 1996, 35 (2):103-105. (in Chinese)
- [6] Zhuang W J (庄伟建), Lin Z L (林治良), Su J W (苏金为). Karyotypes and Giemsa C-bands of two local cultivars in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem [J]. *Fujian J Agri Sci* (福建农业学报), 1999, 14(1):51-57. (in Chinese)
- [7] Xu R Y (许荣义), Ye J B (叶季波). Studies on peroxidase isozymes from wild Chinese *Narcissus* and cultivated species[J]. *J Fujian Agri Coll* (福建农学院学报), 1993, 22(1):126-128. (in Chinese)
- [8] Jia J H (贾建航), Wang P (王萍), Jin D M (金德敏), et al. The application of RAPD markers in diversity detection and variety identification of *porphyra* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42 (4) : 403-407. (in Chinese)
- [9] Luo S L (罗素兰), Huo P C (贺普超), Zheng X Q (郑学勤), et al. Genetic diversity in wild grapes native to China based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2001, 43 (2) : 158-163. (in Chinese)
- [10] Liu X L (刘雄伦), Li X (李恂). Application of RAPD in plant genetics and breeding [J]. *Prog Biol Engin* (生物工程进展), 2000, 20(5):21-24 (in Chinese)
- [11] Jie X M (解新明). Application of RAPD in plant systematic evolution [J]. *Bull Biol* (生物学通报), 2000, 35(4):11-13. (in Chinese)
- [12] Brandham P. Principles and problems in *Narcissus* hybridization [J]. *Royal Hort Soc*, 1994, 5:37-41.