

11 个红花品种遗传多样性与亲缘关系的 SRAP 分析

江磊¹, 李刚¹, 岳帅¹, 刘虹¹, 严兴初², 覃瑞^{1*}

(1. 中南民族大学南方少数民族地区生物资源保护与综合利用工程中心, 湖北 武汉, 430074;

2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉, 430062)

摘要: 利用 SRAP 技术对来源于中国不同地区的 11 份红花品种材料亲缘关系进行了分析。选用了 25 对具有多态性条带的引物组合, 获得了 308 条清晰的条带, 其中 109 条具有多态性, 多态性位点百分率为 35%。遗传相似系数变幅在 0.82 ~ 0.934 2 之间, 平均相似系数为 0.87, 表明红花种内不同品种间存在一定的遗传多样性。聚类结果分析表明, 在相似系数 $GS = 0.8914$ 处, 可以将 11 份红花材料分为四类。

关键词: 红花; SRAP(序列扩增多态性); 基因组

中图分类号: S565.903 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2013)05-0546-05

Analysis of genetic diversity and relationship of 11 *Carthamus tinctorius* L. varieties by SRAP

JIANG Lei¹, LI Gang¹, YUE Shuai¹, LIU Hong¹, YAN Xing-chu², QIN Rui^{1*}

(1. Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in

Ethnic Area of Southern China, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;

2. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: 11 *Carthamus tinctorius* L. varieties were used to study their genetic diversity and relationship using SRAP. With 25 SRAP primers, 308 bands were amplified, among them 109 bands (35%) were polymorphism. The genetic similarity coefficients ranged from 0.82 to 0.934 2 with an average of 0.87, indicating the existence of genetic diversity among these 11 varieties which were divided into four groups by cluster analysis at the similarity coefficient of 0.891 4.

Key words: Safflower; SRAP(Sequence-related amplified polymorphism); Genome

红花(*Carthamus tinctorius* L.)为菊科红花属 1~2 年生植物, 又名红蓝花、草红花、杜红花、刺红花等, 具食用、药用、染料和饲料等广泛用途, 喜温暖干燥气候, 有较强的抗旱、抗寒、耐盐能力, 不耐涝。原产埃及, 现多栽培于中亚、西南亚及地中海地区^[1]。我国红花栽培历史悠久, 早在汉代就有关于红花栽培和药用的记载^[1]。红花是具有巨大开发潜力的经济作物, 红花籽油是高端食用油, 号称“亚油酸之王”, 长期服用有明显的降血压、降血脂等功效。目前我国红花种植主要集中在新疆、云南、河南、安徽等省份^[2], 种植面积也不断扩大。

SRAP(sequence-related amplified polymorphism)是 Li 等^[3]在芸薹作物中建立并开发的一种

新型分子标记技术。该标记相比 RAPD、AFLP、SSR 等常规分子标记而言, 克服了成本高、技术繁杂以及 RAPD 的重复性差、SSR 引物设计需要预先知道序列信息的缺点, 具有简便、中产率、高共显性、易于分离条带及测序、在基因组中分布均匀的优点^[4]。目前已经在棉花^[5,6]、甘蓝^[7]、辣椒^[8]、黄瓜^[9]、油菜^[10]、烟草^[11]、小麦^[12]、水稻^[13]等植物研究中得到越来越多的应用, 并广泛应用于图谱构建、基因定位、遗传多样性以及比较基因组学等方面的研究。

目前, 对红花的研究主要集中于红花品种资源搜集以及某些品种的选育工作^[14~17], 也有利用分子标记对红花进行初步分析研究的报道^[18,19]。Peng 等曾运用 SRAP 标记分析了 25 个红花品种的遗传

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 武陵山区原生态农副产品研发技术服务项目(HZY11043)

作者简介: 江磊(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞遗传, E-mail: whitejoker@vip.qq.com

* 通讯作者: 覃瑞(1972-), 男, 教授, E-mail: 1469971784@qq.com

多样性^[20],证明SRAP技术用于分析红花品种的遗传多样性是有效的。本文拟利用SRAP技术分析中国不同地区来源的11份红花品种材料的亲缘关系,为进一步开展红花种质资源鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

表1 红花种名与产地
Table 1 Varieties and origins of safflower

编号 No.	品种名称 Variety name	产地 Origin	编号 No.	品种名称 Variety name	产地 Origin
1	库车无刺 Kuchewuci	新疆 Xinjiang	2	西昌红花 Xichanghonghua	四川 Sichuan
3	南涧红花 Nanjianhonghua	云南 Yunnan	4	芮城红花 Ruichenghonghua	山西 Shanxi
5	西安红花 Xianhonghua	陕西 Shaanxi	6	巨野无刺 Juyewuci	山东 Shandong
7	南溪红花 Nanxihonghua	四川 Sichuan	8	巨野红花 Juyehonghua	山东 Shandong
9	启东红花 Qidonghonghua	江苏 Jiangsu	10	鄱陵红花 Yanlinghonghua	河南 Henan
11	云红三号 Yunhong 3	云南 Yunnan			

1.2 试验方法

1.2.1 DNA的提取 采用CTAB微量法提取红花全基因组DNA。具体步骤如下:取红花嫩叶1.0g,液氮研磨成粉末转入1.5mL离心管中;加入12%CTAB,65℃水浴1h;加入等体积氯仿/异戊醇(24/1),振荡混匀20min;在室温下用8 000r/min的速度离心20min,取上清;再次加入等体积氯仿/异戊醇(24/1)抽提,振荡20min,室温下8 000 r/min离心20min,取上清液;加入2/3体积异丙醇,混匀,室温下8 000r/min离心10min,去上清;用500μL75%乙醇冲洗沉淀,8 000r/min室温10min,去上清,充分干燥;加入200μL TE溶解,-20℃保存备用。

1.2.2 DNA-SRAP PCR扩增体系 根据Li和Quiros^[3]的标准PCR并略做修改:94℃预变性5min;94℃变性1min,35℃复性1min,72℃延伸1.5min,循环5次;94℃变性1min,49℃复性1min,72℃延伸1.5min,循环35次;72℃延伸10min;4℃保存。

扩增反应总体系根据彭飒报道^[21]并略作修改。总体系为10μL,其中Taq酶0.04U/μL,dNTP 0.2mmol/L,引物浓度0.3mmol/L和Mg²⁺浓度2.0mmol/L。

1.2.3 引物筛选及产物检测 选用引物组合35条,对11个品种进行SRAP扩增。从35对引物中,挑选出扩增条带清晰、反应稳定、信号强、背景清晰的组合,用于条带分析和系统进化树重建。PCR反应产物用6%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液为0.5×TBE。

1.2.4 数据统计分析 实验重复3次,对清晰可辨并能重复的电泳条带全部用于统计分析,按有带赋

红花材料种子由中国农业科学院油料作物研究所提供(表1),种植于中南民族大学温室。苗期采取嫩叶,洗净并用吸水纸吸干,直接用于DNA提取或-80℃冰箱保存。

Taq酶与buffer均购自Fermentas公司,dNTP购自罗氏公司,引物为北京六合华大基因武汉分公司合成。

值为“1”,无带赋值为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。根据Nei-li相似系数法(也称为Dice法)求得品种i与j之间的相似系数S_{ij}然后用类平均方法(UPGMA)对其进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 扩增条带多态性

从35对引物组合中筛选出多态性引物组合25对(表2)。共308条清晰的条带,其中多态性条带109条,多态性比率为35%,每对引物的多态性条带数为1~7,平均每对引物产生4.36条多态性带,表明红花种内不同品种间存在一定的遗传多样性。部分引物扩增结果见图1。

2.2 遗传相似系数分析

利用25对SRAP引物组合,在11份红花供试材料中共扩增出308条清晰谱带(对于连锁条带只记为1条),用扩增带计算材料间的遗传相似系数,结果表明这些材料间的遗传相似系数(GS)的变化范围在0.82和0.9342之间(表3)。最大值为0.9342(发生在鄱陵红花和云红三号之间),最小值为0.82(发生在巨野红花和西昌红花之间)。

2.3 聚类分析

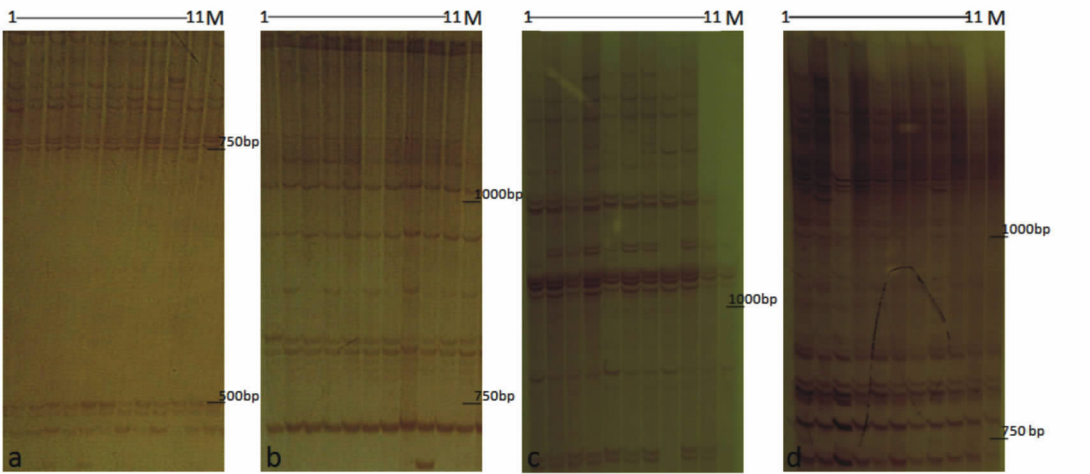
根据25对引物组合的PCR扩增结果,绘制出供试材料SRAP标记遗传多样性聚类图。

由图2可以看出,在遗传相似系数为0.8914时,11份材料可以分为四类。第一类包括南涧红花,启东红花,鄱陵红花和云红三号,其中南涧红花和云红三号均来自于云南,启东红花来自于江苏,鄱陵红花来自于河

表 2 红花遗传多样性分析的引物组合

Table 2 Primers screened for genetic diversity analysis of *Carthamus tinctorius* L.

引物组合 Primer combination	引物序列 Primer sequence	引物组合 Primer combination	引物序列 Primer sequence
M17E11	TGA GTCCAAA CCGG TGC GACTGCGTACG AA TT CAA	M3E4	TGA GTCCAAA CCGG AAC GACTGCGTACG AA TT ACG
M25E11	TGA GTCCTTT CCGG TGC GACTGCGTACG AA TT CAA	M7E4	TGA GTCCAAA CCGG ACT GACTGCGTACG AA TT ACG
M5E12	TGA GTCCAAA CCGG ATA GACTGCGTACG AA TT CAT	M10E4	TGA GTCCAAA CCGG AGA GACTGCGTACG AA TT ACG
M7E12	TGA GTCCAAA CCGG ACT GACTGCGTACG AA TT CAT	M13E3	TGA GTCCAAA CCGG TAG GACTGCGTACG AA TT ATG
M18E6	TGA GTCCAAA CCGG CAG GACTGCGTACG AA TT TAG	M17E3	TGA GTCCAAA CCGG TGC GACTGCGTACG AA TT ATG
M22E6	TGA GTCCAAA CCGG GGT GACTGCGTACG AA TT TAG	M21E3	TGA GTCCAAA CCGG GTA GACTGCGTACG AA TT ATG
M11E5	TGA GTCCAAA CCGG AGC GACTGCGTACG AA TT AGC	M12E2	TGA GTCCAAA CCGG AGG GACTGCGTACG AA TT AAC
M12E5	TGA GTCCAAA CCGG AGG GACTGCGTACG AA TT AGC	M3E3	TGA GTCCAAA CCGG AAC GACTGCGTACG AA TT ATG
M19E4	TGA GTCCAAA CCGG CTA GACTGCGTACG AA TT ACG	M9E3	TGA GTCCAAA CCGG ACG GACTGCGTACG AA TT ATG
M20E4	TGA GTCCAAA CCGG GAC GACTGCGTACG AA TT ACG	M17E18	TGA GTCCAAA CCGG TGC GACTGCGTACG AA TT CTG
M11E4	TGA GTCCAAA CCGG AGC GACTGCGTACG AA TT ACG	M17E19	TGA GTCCAAA CCGG TGC GACTGCGTACG AA TT CCA
M13E4	TGA GTCCAAA CCGG TAG GACTGCGTACG AA TT ACG	M11E2	TGA GTCCAAA CCGG AGC GACTGCGTACG AA TT AAC
M14E4	TGA GTCCAAA CCGG TTG GACTGCGTACG AA TT ACG		



注/Note: a,M17E18; b,M17E19; c,M22E6; d,M7E11

图 1 4 对引物组合的扩增结果

Fig.1 Amplified results of 4 primers

表 3 11 个红花品种之间的遗传相似系数

Table 3 Genetic similarity matrix between 11 populations of *Carthamus tinctorius* L.

名称 Name/编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
库车无刺 Kuchewuci(1)	1.00										
西昌红花 Xichanghonghua(2)	0.84	1.00									
南涧红花 Nanjianhonghua(3)	0.89	0.86	1.00								
芮城红花 Ruichenghonghua(4)	0.83	0.89	0.88	1.00							
西安红花 Xianhonghua(5)	0.88	0.82	0.89	0.86	1.00						
巨野无刺 Juyewuci(6)	0.85	0.89	0.86	0.88	0.90	1.00					
南溪红花 Nanxihonghua(7)	0.86	0.85	0.89	0.87	0.93	0.92	1.00				
巨野红花 Juyehonghua(8)	0.88	0.82	0.86	0.84	0.91	0.87	0.90	1.00			
启东红花 Qidonghonghua(9)	0.86	0.84	0.92	0.88	0.89	0.87	0.90	0.88	1.00		
鄱陵红花 Yanlinghonghua(10)	0.88	0.87	0.89	0.88	0.89	0.88	0.92	0.89	0.90	1.00	
云红三号 Yunhong 3(11)	0.89	0.85	0.88	0.86	0.88	0.86	0.89	0.89	0.89	0.93	1.00

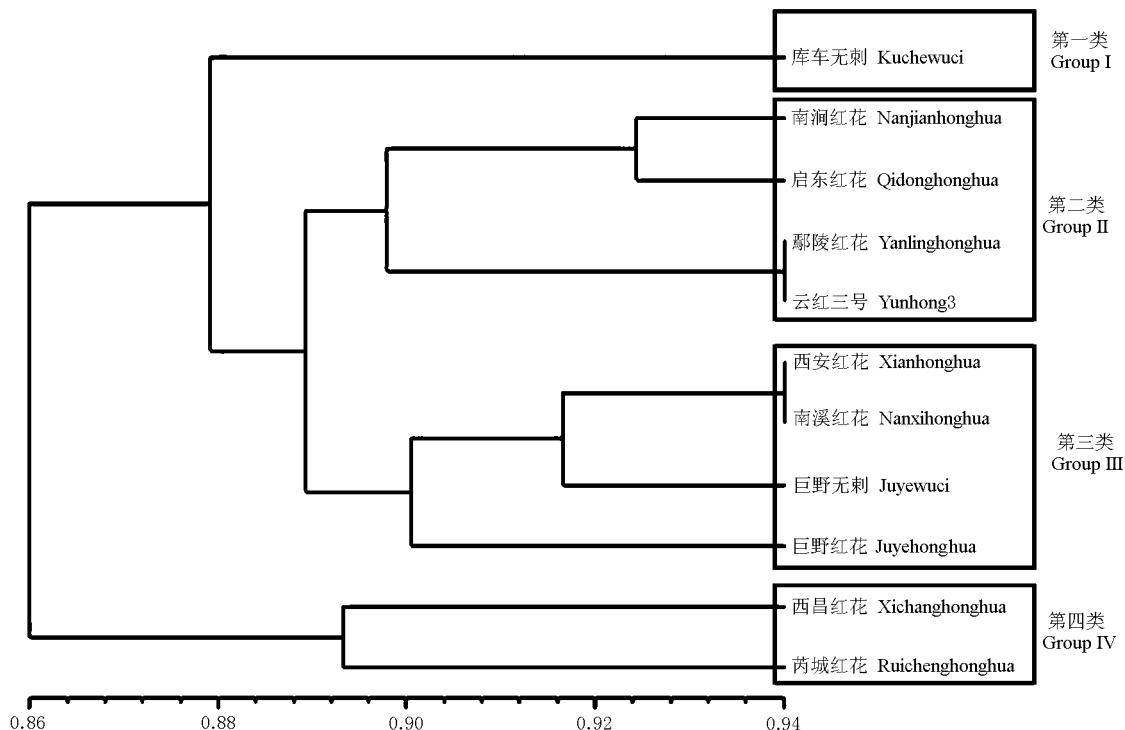


图 2 基于 SRAP 数据绘制的 11 份红花材料之间的聚类图
Fig.2 Dendrogram of cluster of 11 *Carthamus tinctorius* L. accessions based on SRAP markers

南。第二类包括西安红花,南溪红花,巨野无刺,巨野红花,其中南溪红花来自于四川,西安红花来自于陕西,巨野红花和巨野无刺来自于山东。第三类包括两个品种,西昌红花和芮城红花,西昌红花来自于四川,而芮城红花来自于山西。来自新疆的品种库车无刺被单独归为一类。

3 讨论

SRAP 分子标记所揭示的遗传多样性已经在棉花^[5,6]、甘蓝^[7]、辣椒^[8]、黄瓜^[9]、油菜^[10]、烟草^[11]、小麦^[12]、水稻^[13]等植物得到证实。已报道的红花属内种间(红花和毛红花)的 SRAP 多态性比率 57%。而本研究中多态性比率仅为 35%,多态性比率相对较低,笔者认为与本研究的供试材料有关,因为 11 个红花品种均为红花栽培种,遗传基础相近,导致变异位点较少,SRAP 在不同物种内的多态性比率差异明显,与植物基因组进化方式的多样性有关。以本实验结果来看,SRAP 仍然能够准确地在品种或亚种间进行遗传多样性分析,体现出它是评价种质资源遗传多样性与亲缘关系的一种快速、可靠、有效的新技术。

本研究采用 25 对 SRAP 引物组合的 PCR 扩增结果,在遗传相似系数为 0.891 4 时,11 份材料可以分为四类。库车无刺被划分为单独一类,但是可以看到库车无刺与第一类和第二类的亲缘关系比第三

类关系要近一些。从地理位置上分析,库车无刺在新疆地区独特的气候条件长期栽培,使植株对周围环境产生适应性,并且与其它品种相隔较远,不容易与其它的品种产生杂交,因而在亲缘关系上较中南部地区的品种较远。而类群 3 的两个品种芮城红花和西昌红花虽然与类群 1 和类群 2 的品种地理位置相隔很近却被单独分开来,我们推断两个品种是由同一个亲缘关系较远的品种分化而来,并且没有与其它品种进行杂交。从品种来源地看,类群 1 的品种分布在东南部地区,而类群 2 的品种分布在中部地区。东南部地区气候相较于中部地区而言,日照强度更高、降雨量更丰富。而红花喜温暖干燥气候,有较强的抗旱、抗寒、耐盐能力,不耐涝。因此推测类群 2 较其它类群有着更为抗涝的特点。山东巨野红花和巨野无刺存在形态上的差异,在本研究中仍然被分到同一个群体,说明二者的亲缘关系很近。本研究中选用的仅仅是 25 对引物,多态性比率就达到 35%,其差异性足够区分不同品种。

参考文献:

[1] 王岩军. 红花的组织培养及基因工程研究进展[J]. 新疆农业科学,2008,S1:237-241.
[2] 杨玉霞,吴卫,郑有良. 红花研究进展[J]. 四川农业大学学报,2004,22(4):365-369.
[3] Li G, Quiros C F. Sequence - related amplified polymor-

- phism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461.
- [4] 杨迎花, 李先信, 曾柏全, 等. 新型分子标记 SRAP 的原理及其研究进展 [J]. *湖南农业科学*, 2009(5): 15-17, 20.
- [5] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建 [J]. *科学通报*, 2003, 48(15): 1 676-1 679.
- [6] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F_2 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622-626.
- [7] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(1): 168-180.
- [8] 任 羽, 王得元, 张银东, 等. 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2(5): 689-693.
- [9] 潘俊松, 王 刚, 李效尊, 等. 黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位 [J]. *自然科学进展*, 2005, 15(2): 167-172.
- [10] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(6): 1 118-1 126.
- [11] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立 [J]. *中国烟草学报*, 2005, 11(4): 33-38.
- [12] 武志朴, 杨文香, 刘大群, 等. 小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2005(3): 66-69.
- [13] 张吉贞, 马晓磊, 王效宁, 等. 水稻 SRAP-PCR 体系的建立与优化 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2008(S1): 421-425.
- [14] 张宗文. 红花品种资源的同工酶遗传多样性及分类研究 [J]. *植物遗传资源科学*, 2000, 1(4): 6-13.
- [15] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 等. 不同栽培居群红花的孢粉特征、同工酶谱及化学成分含量 [J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(11): 10-12.
- [16] 逯晓萍, 吕学理, 张 众, 等. 油用红花数量性状的多元遗传分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2004, 26(2): 40-43.
- [17] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明, 等. 不同产地红花药材的质量评价 [J]. *中国中药杂志*, 2000(8): 21-23.
- [18] 岳庆妮, 葛 娟, 王 蕾, 等. 新疆红花主要栽培品种遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(33): 14 417-14 419, 14 432.
- [19] 郭美丽, 姜 伟, 张志珍, 等. 红花种质的随机扩增多态性 DNA 分子鉴定 [J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(10): 1 116-1 119.
- [20] Peng S, Feng N, Guo M, et al. Genetic variation of *Carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008, 36(7): 531-538.
- [21] 彭 飒, 郭美丽, 陈跃华, 等. 红花 SRAP 扩增体系的建立和优化 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(5): 544-547.

(责任编辑:王丽芳)