

海滨锦葵 (*Kosteletzkya pentacarpos*) 在黄河滩涂的引种及其分子鉴定

许爱华, 田曾元, 崔伟玲, 李 娇, 郭予琦

(郑州大学生物工程系, 郑州 450001)

摘要:为丰富国内海滨锦葵的种质资源,并选育优质高产新品系,本实验室于2011年从美国自然分布的9个州引进15个种群的海滨锦葵,种植于郑州市黄河滩涂,分析各性状间差异和进化关系。试验结果表明,供试海滨锦葵能较好地适应试验田的气候及土壤条件,且产量较高。根据种群间性状的表现和RAPD分子标记分析,15个种群可分为早熟和晚熟2大类群,其中以引自南卡罗来纳州的早熟种群和得克萨斯州的晚熟种群,表现优异,产量可达2.4 t/hm²。这些结果为海滨锦葵的品种选育与杂交育种提供了基础。

关键词:海滨锦葵;引种;RAPD

Molecular Classification and Introduction of *Kosteletzkya pentacarpos* Germplasm at Streamside of the Yellow River in Zhengzhou

XU Ai-hua, TIAN Zeng-yuan, CUI Wei-ling, LI Jiao, GUO Yu-qi

(Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract: To rich the biodiversity of seashore mallow in China and develop new cultivars with high-quality and high-yielding, 15 populations were introduced from its native 9 states of America in 2011, and planted together with Lab1 and Lab2 in barren soil along with the Yellow River at Zhengzhou, Henan Province. Traits of 17 groups of materials and phylogenetic relationship among them were analyzed. The results showed that these populations adapted to the local climate and soil conditions with high seed yields in the experimental field. According to the significant different characters and phylogenetic tree, 15 populations are divided into two groups, the early-maturing group and the late-maturing group. Yields of populations of South Carolina and Texas are the highest, which are up to 2.4 t/hm². These results provide the base for artificial hybridizations between populations.

Key words: *Kosteletzkya pentacarpos* (L.) Ledebour; introduction; RAPD

由于全球气候变化及沙漠化引起的农业土壤问题日趋严重,农业可耕地资源逐年减少。而全球持续增长的人口加剧了人类对粮食需求与耕地日益减少的矛盾,引种和培育抗逆植物已经显得越来越重要。经过筛选,已有一些盐生植物逐渐成为经济作物并被推广利用。盐生植物海滨锦葵 (*Kosteletzkya pentacarpos* (L.) Ledebour) 与 *Kosteletzkya virginica* (L.) C. Presl ex A. Gray 同为海滨锦葵属,前者是海

滨锦葵的一个大种,而后者是属于该大种下的一个变种^[1]。海滨锦葵自然分布于美国东部和南部沿岸的含盐沼泽地带(南起 17°41'N、北至 30°54'N,西起 99°10'W、东至 110°36'W),以及加拿大、古巴、百慕大,在亚欧大陆也有零星分布^[2]。分类学上,海滨锦葵为锦葵科海滨锦葵属,多年生草本盐生双子叶植物,寿命长达 11 年,植株高为 0.6~1.3 m,3 裂条形或披针形叶,7-8 月开 5 瓣粉色花,之后结 5

收稿日期:2013-06-17 修回日期:2013-07-10 网络出版日期:2013-10-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1542.015.html>

基金项目:国家“948”计划项目(2011-Z30)

第一作者研究方向为植物生理与分子生物学。E-mail: xuaihua0@126.com

通信作者:郭予琦,研究方向为盐生植物生理与分子生物学。E-mail: guoyuqi@zzu.edu.cn

角蒴果,内含5粒种子^[3]。耐盐且种子富含蛋白质和脂肪,使其作为一种潜在的油料作物在本土引起了重视^[4-6]。1993年南京大学钦佩教授访问美国特拉华大学盐生植物生物技术中心,将海滨锦葵首次引入中国^[7]。经大田试验初步证明海滨锦葵是一种耐盐、耐涝、耐旱都很强的高抗逆性植物^[8],因此已开始在大连、江苏、山东等沿海滩涂种植。海滨锦葵集油料、饲料、能源、医药、保健、观赏等价值于一身^[9]。经试验,海滨锦葵种子产量达0.8~1.5 t/hm²; (最高产量4.95 t/hm²),而种子富含蛋白质和脂肪,含量可分别高达32%和22%^[10-11],可以从其种子中制备生物柴油,饼粕营养丰富可作为饲料^[12]。其茎干中的纤维与洋麻的非常相似,可用于制备纤维乙醇(104 g/kg)和木糖(47.8 g/kg),也可做为纸浆货板材原料,把生物质能转化为替代木质纤维的非木质纤维资源^[13]。海滨锦葵的地下块根特别发达,其中的活性成分有治疗上呼吸道感染和增强免疫力的作用,可开发各种保健品或药品。

目前生长在我国滩涂的海滨锦葵自然群体内不同个体间性状表现多样,产量存在显著差异,单位面积产量不高。为充分发挥海滨锦葵在合理开发利用滩涂盐碱地中的作用,选育优质高产海滨锦葵新品种是当前急需解决的问题^[14]。因此,进一步引种海滨锦葵的多种种质资源十分必要。2011年9-10月,本实验室从美国引进自然分布在9个州的15个种群的海滨锦葵种质资源。

引种的15个海滨锦葵种质资源的一部分种植于河南省黄河流域贫瘠沙壤土,因种群间地理位置较远、气候条件差别较大,导致种群间许多性状有相当明显的差别,希望通过此次引种丰富国内海滨锦葵的生物多样性,为选育优质高产海滨锦葵新品系奠定基础,从而为合理开发利用我国数千万亩海滨滩涂做出贡献。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

供试的15个种群海滨锦葵种子,来自其在美国东南沿海自然分布的9个州,分别为阿拉巴马州(AL),特拉华州(DE),佛罗里达州(FL),佐治亚州(GA),路易斯安那州(LA),北卡罗莱纳州(NC),南卡罗莱纳州(SC),德克萨斯州(TX),弗吉尼亚州(VA),另外2份种子来自南京大学盐生植物实验室,Lab1为实验室人工选育种子,Lab2是Lab1经离

子注入处理的种子,N⁺注入剂量为3×10¹⁷,其采集地详见表1,引种地区地理位置见图1。

表1 供试海滨锦葵种子收集记录

Table 1 List of accessions with native states and abbreviation

编号 Code	来源(缩写) Origin(Abbr.)	编号 Code	来源(缩写) Origin(Abbr.)
1	Alabama(AL)	10	Louisiana(LA)
2	Delaware(DE-a)	11	North Carolina(NC)
3	Delaware(DE-b)	12	South Carolina(SC)
4	Delaware(Frank)	13	Texas(TX)
5	Florida(FL)	14	Virginia(VA)
6	Delaware(Freed)	15	Delaware(WC)
7	Delaware(Freeman-a)	16	南京大学(Lab1)
8	Delaware(Freeman-b)	17	Lab1 离子注入(Lab2)
9	Georgia(GA)		

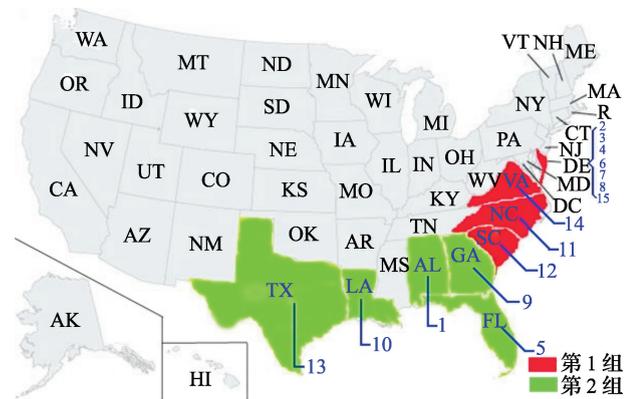


图1 15个海滨锦葵种群引种地区地理位置示意图

Fig. 1 Native states of 15 populations of *K. pentacarpos*

1.2 引种试验及性状调查

试验区位于34°83'N、113°50'E,地处河南省郑州市北郊黄河滩涂。本地区属北温带大陆性季风气候,年平均气温14.4℃,年平均降雨量640.9 mm、年相对变率17%~23%,干旱少雨。年降雨量主要集中在夏季。年平均相对湿度在60%~75%之间。全年日照时间约2400 h,无霜期220 d,冻土高度180 mm左右。全市初终雪间隔96~105 d,最大降雪量15~25 cm,主要在12-2月,而以1月份出现为多。郑州市地势自东北向西南地势逐渐增高,平均日照时数和年太阳辐射量属中等水平。试验区为沙壤土,地势平坦,有机质含量0.86%,速效氮57.43 mg/kg,速效磷14.22 mg/kg,速效钾188.20 mg/kg, pH值8.2,有效铜1.56 mg/kg,有效锌1.92 mg/kg,有效锰1.33 mg/kg,有效铁5.14 mg/kg,土壤浇灌后板结严重^[15-16]。

按照随机区组设计方法在试验区设计 3 个区组,每个区组设 17 个小区,每个小区定植供试材料每份 15 株(株距 30 cm,行距 60 cm),第 1 个区组供试材料按编号 1~17 的顺序依次种植,其他 2 个区组随机种植。将 17 份海滨锦葵种子淡水浸种 1 d,于 2012 年 4 月 17 日随机播种于小区内。观察记录其种子萌发情况和生长情况,根据需要进行灌溉和除草,不做其他特殊管理。海滨锦葵生长进入花晚期后,当大部分果实成熟时,对每个小区随机选取 5 株进行收获,并对下列 8 个农艺性状进行调查和测定。(1)株高:地面到最高主茎(包括分枝)的高度;(2)地径:近地面茎的直径;(3)分枝数;(4)种子数;(5)千粒重;(6)收获种子产量;(7)花期;(8)生育期。利用 SPSS19.0 对农艺性状进行相关分析与通径分析。

1.3 RAPD 分子标记

当植株生长至 10 片真叶左右时,每个种群随机选取 5 株材料取幼嫩叶片,混合,用百泰克新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(BioTeke DP3113),提取基因组 DNA。采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度。

RAPD 随机引物采用 OPA01-20,由华大基因合成。选择 Lab1 的 DNA 样品作模板进行引物筛选,首先从 20 个 10 bp 引物中选择扩增出清晰谱带的引物,然后将其自由组合并对其筛选,将筛选出的单引物和引物组合用于所有基因组 DNA 样品的扩增。

PCR 50 μ L 反应体系为: *Taq* 酶 2.5 U, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 引物 1 μ L, 20 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, dNTP Mix 2.5 μ mol/L each dNTP 4 μ L。扩增循环程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,

37 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,电泳恒压 90 V,凝胶扫描系统拍照。

每个 PCR 反应 2 次重复扩增,取稳定扩增的谱带,同一个 RAPD 位点上有扩增带存在时赋值 1,否则赋值 0,作 0,1 矩阵,利用 NTSYSpc2.10e 软件的非加权组平均法(UPGMA)构建聚类树状图。

2 结果与分析

2.1 不同种群间海滨锦葵性状存在着明显差异,花期明显不同

性状调查结果表明,15 个海滨锦葵种群间许多性状存在着明显差异,如株型,叶形,被毛,各器官,蒴果与种子等,其中,叶形有披针形、3 裂条形,叶缘有锯齿状、重锯齿状,被毛有长短疏密之分,叶、花、种子等器官也有明显的偏大和偏小的区别。另外,种群间差异最明显的是花期和生长期(表 2)。引自美国东部沿海连续 4 个州特拉华州、弗吉尼亚州、北卡罗莱纳州、南卡罗莱纳州的种群开花较早,初花开放时间为 7 月 26-29 日,生育期 190 d 左右,为早熟品种;引自美国南部沿海连续 5 个州阿拉巴马州、佛罗里达州、佐治亚州、路易斯安那州、德克萨斯州的种群开花较迟,初花开放时间为 8 月 12-14 日,其中引自佐治亚州的种群 9 月 8 日才开花,与引自北卡罗莱纳州的种群初花日期相隔 40 d,差异十分明显,且这些种群生育期为 210 d 左右,为晚熟品种。开花比较迟的几个种群来自美国南部沿海(25.98 $^{\circ}$ N~32.04 $^{\circ}$ N),且株型高大,可能是试验材料被引种至较高纬度的试验田(34.83 $^{\circ}$ N)后,响应光周期变化而表现出开花延迟的现象,导致生育期拉长、株型比较高大。

表 2 不同种群海滨锦葵花期及生育期

Table 2 Florescence and growth period of 15 populations of *K. pentacarpos*

编号 Code	11	4	2	6	7	8	3	14	12	15	1	10	5	13	9
初花日期(月.日) First flowering date	7.26	7.27	7.28	7.28	7.28	7.28	7.29	7.29	7.29	8.3	8.12	8.12	8.14	8.14	9.8
花期(d) Florescence	43	37	44	43	44	42	45	46	46	36	59	58	62	59	55
生育期(d) Growth period	188	185	190	186	187	187	187	192	194	189	209	207	208	208	211

来自美国东部 4 州的种群具有短而稀疏的被毛,锯齿状叶缘,种子较大,蒴果 5 角比较尖锐;而来自美国南部 5 州的种群则是长而密的被毛,重锯齿

状叶缘,种子较小,蒴果 5 角较平滑。两组材料间性状差异详见表 3。根据以上各种性状差别可将 15 个种群分为 2 组,其地理位置见图 1 中所示。

表 3 两组海滨锦葵性状比较

Table 3 Trait comparisons of two groups of *K. pentacarpos*

性状 Trait	第 1 组(来自 DE, SC, NC, VA) Group I(From DE, SC, NC, VA)	第 2 组(来自 GA, FL, LA, AL, TX) Group II(From GA, FL, LA, AL, TX)
叶形 Leaf shapes	多为 3 裂条形与披针形同时存在同一植株	多为披针形
株型 Plant type	株型较小, 枝节较紧凑	株型较高大, 枝节较稀疏
被毛 Pubescence	叶、茎、枝等被毛短而稀疏	叶、茎、枝等被毛长而密
器官 Organs	叶、花等各器官比较小	叶、花等各器官比较大
开花时间 First flowering date	7 月 28 日陆续开放	9 月 8 日第 9 种群陆续开放, 其余种群 8 月 12 日个别植株陆续开放
花期 Florescence	50 d 左右	60 d 左右
生长期 Growth period	190 d 左右	210 d 左右
蒴果 Capsule	蒴果 5 角较平滑	蒴果 5 角较尖锐
种子 Seed	种子较大	种子较小

2.2 不同种群海滨锦葵植株生长情况

观察表明,在河南地区黄河滩海滨锦葵生长期约 185 ~ 210 d,不同种群间花期和生长期差异较大,根据分组情况对其进行描述。在试验田,种子于 4 月中旬播种,10 ~ 14 d 齐苗,5 月中旬植株开始分叉(枝)。第 1 组材料 7 月下旬开花结实,8 月上旬至 9 月上旬为盛花期,8 月下旬至 10 月下旬为种子成熟期;第 2 组材料则表现出晚熟的特点,8 月中旬开花结实,株高和分枝数明显高于第 1 组;两组材料株高中值分别为 119 cm 和 180 cm,分枝数中值分别为 31 和 35 个,且生育期相差 20 d 左右。种子成熟日

期相差 20 ~ 30 d。11 月开始,叶片逐渐枯黄、脱落,紧接着地上部分枯死,而以肉质的粗大地下块根形式越冬,第 2 年萌发成新的植株。两组材料生长期详见表 4。

2.3 不同种群海滨锦葵数量性状统计及相关和通径分析

不同种群海滨锦葵数量性状的调查和统计见表 5。第 5、10、12、13、16、17 种群种子产量比较理想,均超过 2 t/hm²。其中,第 12 种群来自南卡罗莱纳州,属第 1 组成员,其植株高大挺拔,分枝和主茎夹角比较大,蒴果和种子也比较大,在所有种群中,种

表 4 海滨锦葵生长期

Table 4 Growth period of two groups of *K. pentacarpos*

生长期 Growth period	日期(月·日)Date		高度(cm)Plant height		生长情况 Growth situation	
	第 1 组 Group I	第 2 组 Group II	第 1 组 Group I	第 2 组 Group II	第 1 组 Group I	第 2 组 Group II
浸种 Soaking seeds	4. 16	4. 16			淡水浸种	淡水浸种
播种 Sowing	4. 17	4. 17			沟播	沟播
初苗 First seedling	4. 23	4. 24				
齐苗 Emerging of all seedlings	4. 29	5. 3	3 ~ 6	3 ~ 6	60% ~ 80%	60% ~ 80%
开始分枝 First branch	5. 16	5. 17	10 ~ 17	10 ~ 17	真叶 3 ~ 5	真叶 3 ~ 5
分枝 Shooting	6. 11	6. 11	20 ~ 45	20 ~ 44	1 级分枝 5 ~ 11	1 级分枝 5 ~ 11
初蕾 First flower bud	7. 9	7. 23	50 ~ 70	50 ~ 74	孕蕾 20%	孕蕾 20%
盛蕾 Majority flower buds	7. 13	7. 27	60 ~ 80	70 ~ 90	孕蕾 > 60%	孕蕾 > 60%
初花 First blossom	7. 26	8. 12	70 ~ 110	80 ~ 140	1 级分枝 17 ~ 27	1 级分枝 18 ~ 31
盛花 Full-blossom	8. 5 ~ 9. 5	8. 18 ~ 9. 18	75 ~ 140	90 ~ 216	1 级分枝 23 ~ 35	1 级分枝 24 ~ 38
种子成熟 Seed maturation	8. 25 ~ 10. 8	8. 25 ~ 11. 12	80 ~ 145	120 ~ 220	1 级分枝 25 ~ 37	1 级分枝 28 ~ 43
种子采收 Harvesting seed	9. 3 ~ 10. 18	9. 3 ~ 11. 13	80 ~ 145	140 ~ 220	1 级分枝 25 ~ 37	1 级分枝 28 ~ 43
地上收割 Reaping aboveground plant	10. 24 ~ 10. 28	10. 24 ~ 11. 14	80 ~ 155	150 ~ 220	1 级分枝 25 ~ 37	1 级分枝 28 ~ 43

子千粒重最重,坐果率高,且不易落花落果,种子产量达 2.4 t/hm^2 以上;第 5、10、13 种群分别来自佛罗里达州、路易斯安那州、德克萨斯州,属第 2 组成员,共同的特点是植株高大,分枝和主茎夹角较小,蒴果和种子较小,但分枝多,单株种子数大,特别是第 10 种群,其分枝数和单株种子数在所有

种群中居第 1 位;来自德克萨斯州的种子产量也达到 2.4 t/hm^2 以上,显示了较好的适应性。第 17 种群是实验室原有海滨锦葵种子进行了离子注入处理,其产量是所有种群中最高的,在对照(第 16 种群)的基础上提高了 29%,且其各个数量性状均有所提高。

表 5 17 份海滨锦葵的数量性状

Table 5 Quantitation traits of 15 populations and of *K. pentacarpos* and Lab1 and Lab2

编号 Code	种子产量 (t/hm^2) Seed yield	株高 (cm) Plant height	地径 (cm) Collar diameter	分枝数 No. of branches	单株种子数 No. of seeds	千粒重 (g) 1000-seed weight
1	1.39 ± 0.12	166.10 ± 0.17	2.58 ± 0.13	32.12 ± 0.16	2490.12 ± 0.11	18.19 ± 0.04
2	1.83 ± 0.10	146.34 ± 0.23	2.28 ± 0.08	29.10 ± 0.22	1960.42 ± 0.18	18.67 ± 0.03
3	1.74 ± 0.13	147.96 ± 0.29	2.22 ± 0.13	31.08 ± 0.18	1879.16 ± 0.09	18.56 ± 0.06
4	1.68 ± 0.12	142.94 ± 0.26	2.26 ± 0.15	28.10 ± 0.22	1730.12 ± 0.08	19.39 ± 0.02
5	2.26 ± 0.09	183.34 ± 0.23	2.64 ± 0.17	33.62 ± 0.16	4540.24 ± 0.15	16.17 ± 0.06
6	1.52 ± 0.11	145.90 ± 0.22	2.22 ± 0.08	27.56 ± 0.13	1750.06 ± 0.13	17.34 ± 0.04
7	1.60 ± 0.08	156.77 ± 0.25	2.17 ± 0.21	31.08 ± 0.11	1865.10 ± 0.14	17.08 ± 0.09
8	1.58 ± 0.15	142.22 ± 0.18	2.22 ± 0.13	31.08 ± 0.18	1910.18 ± 0.16	16.48 ± 0.10
9	1.88 ± 0.11	175.00 ± 0.14	2.66 ± 0.11	33.94 ± 0.13	3845.94 ± 0.17	17.56 ± 0.04
10	2.30 ± 0.09	181.12 ± 0.13	3.94 ± 0.11	35.30 ± 0.27	7560.10 ± 0.12	16.32 ± 0.09
11	1.97 ± 0.06	143.06 ± 0.13	2.24 ± 0.11	28.94 ± 0.13	3210.52 ± 0.15	19.93 ± 0.05
12	2.42 ± 0.14	174.04 ± 0.05	2.96 ± 0.11	30.96 ± 0.09	3275.30 ± 0.16	24.08 ± 0.07
13	2.46 ± 0.14	193.06 ± 0.09	2.56 ± 0.05	34.88 ± 0.11	4365.24 ± 0.11	18.31 ± 0.02
14	1.77 ± 0.11	151.02 ± 0.15	2.34 ± 0.11	29.58 ± 0.18	1735.28 ± 0.19	20.46 ± 0.05
15	1.38 ± 0.14	139.02 ± 0.04	2.05 ± 0.07	30.54 ± 0.05	1610.08 ± 0.13	17.19 ± 0.08
16	2.07 ± 0.05	154.12 ± 0.08	2.33 ± 0.08	30.30 ± 0.16	2124.10 ± 0.10	19.45 ± 0.06
17	2.66 ± 0.08	175.08 ± 0.13	2.67 ± 0.12	34.16 ± 0.11	3862.70 ± 0.19	22.41 ± 0.04

2.3.1 相关性分析 为探究海滨锦葵主要数量性状间的相关关系,对不同性状进行了相关分析(表 6)。其中,株高、地径、分枝数、单株种子数、花期和生育期与种子产量呈显著正相关,且株高、单株种子数与种子产量的相关达到极显著水平,说明这 6 个数量性状的增大均有利于种子产量的提高。株高、地径、分枝数、单株种子数、花期和生育期等 6 个性状间均

呈极显著正相关。值得注意的是,千粒重与其余性状未达显著相关。分析表明对种子产量呈显著相关的性状株高与单株种子数进行定向选择是提高海滨锦葵单产的主要育种目标和有效措施。千粒重与分枝数、生育期呈负相关,因此定向选育高产品种时要根据实际情况做进一步的分析,不可盲目单一追求某一性状的选择。

表 6 海滨锦葵的主要数量性状间的相关系数

Table 6 Phenotypic correlations among quantitative traits of *K. pentacarpos*

	种子产量 Seed yield	株高 Plant height	地径 Collar diameter	分枝数 No. of branches	单株种子数 No. of seeds	千粒重 1000-seed weight	花期 Florescence
株高 Plant height	0.735 **						
地径 Collar diameter	0.578 *	0.689 **					
分枝数 No. of branches	0.589 *	0.861 **	0.657 **				
单株种子数 No. of seeds	0.680 **	0.779 **	0.904 **	0.783 **			
千粒重 1000-seed weight	0.461	0.057	0.029	-0.162	-0.123		
花期 Florescence	0.517 *	0.885 **	0.619 **	0.809 **	0.724 **	-0.168	
生育期 Growth period	0.498 *	0.874 **	0.625 **	0.850 **	0.718 **	-0.106	0.931 **

*、** 分别代表在 $P=0.05$ 、 $P=0.01$ 水平有统计学意义

* and ** represent different significance at 0.05 and 0.01 level, respectively

2.3.2 通径分析 为进一步分析海滨锦葵各性状对种子产量的直接影响和间接影响,以及影响效应的大小,对种子产量与株高、地径、分枝数等 7 个数量性状进行通径分析。经正态性检验,种子产量服从正态分布,可以进行回归分析。简单相关系数、通径系数及间接通径系数列于表 7。其中,单株种子数、千粒重 2 个数量性状与种子产量建立了最优通径模型,而且通径系数为正值。3 个性状对种子产量的直接影响中,单株种子数的直接作用最大,其次为千粒重,而地径对种子产量的直接影响为负值。

表 7 海滨锦葵主要数量性状对种子产量的影响效应

Table 7 Coefficients of direct path and indirect path of seed yield components to seed yield

自变量 Independent variables	与 y 的简单相关系数 Simple correlation coefficients	通径系数(直接影响) Direct path coefficients	间接通径系数(间接影响) Indirect path coefficients			
			地径 Collar diameter	单株种子数 No. of seeds	千粒重 1000-seed weight	合计 Total
地径 Collar diameter	0.578	-0.771	-	1.266	0.019	1.285
单株种子数 No. of seeds	0.680	1.400	0.639		0.081	-0.720
千粒重 1000-seed weight	0.461	0.653	0.020	0.172		-0.192

2.4 17 份材料间进化关系

2.4.1 引物筛选 选择 Lab1 的 DNA 样品作模板,进行随机引物的筛选,从 20 个 10 bp 引物中共选择了 8 个谱带清晰的引物(图 2)。将其自由组合为 28 对引物组合并进行筛选,筛选出 15 对谱带清晰的引物组合。将 8 个单引物和 15 对引物组合用于所有基因组 DNA 样品的扩增。

2.4.2 RAPD 扩增 8 个单引物和 15 对引物组合对供试的 17 份海滨锦葵材料扩增出 23 张 DNA 指纹图谱,共获得 213 条 DNA 谱带,其中多态性条带 143 条,占总扩增带数的 67.1%。每个引物扩增的

综合直接影响和间接影响的作用得出,单株种子数对种子产量影响最大,千粒重其次。因此,选取杂交亲本时应保证杂交组合的单株种子数和千粒重两个性状表现优异。地径的通径系数为负值,因此在考虑产量因素时,在选择单株种子数、千粒重做为选择性状的同时应协调单株种子数、千粒重 2 个生殖生长性状和地径、株高这些营养生长性状的关系。以期子代继承双亲优良性状。但此分析中,剩余因子 $e = 0.394$,说明还有一些对种子产量有影响的因素未考虑在内,有待进一步研究。

带数在 4 ~ 16 条之间,平均为 9.3 条,扩增出的 DNA 片段大小在 250 ~ 5000 bp 之间。图 3 为引物组合 OPA-11 × OPA-18 的 RAPD 扩增图谱。表 8 为各引物的扩增结果。

2.4.3 聚类分析 据扩增结果对供试的 17 份海滨锦葵进行聚类,结果如图 4 所示。遗传相似系数取 0.607 为阈值时,将 17 份海滨锦葵划为 2 大类群。第 1 类群包括 AL、LA、TX、FL、GA,其中 LA 和 TX 进化关系最近,其次是 AL、FL、GA,类群内进化关系与地理位置远近基本一致,说明此类群内 5 种海滨锦葵的变异可能是地理隔离和不同生境下自然选择

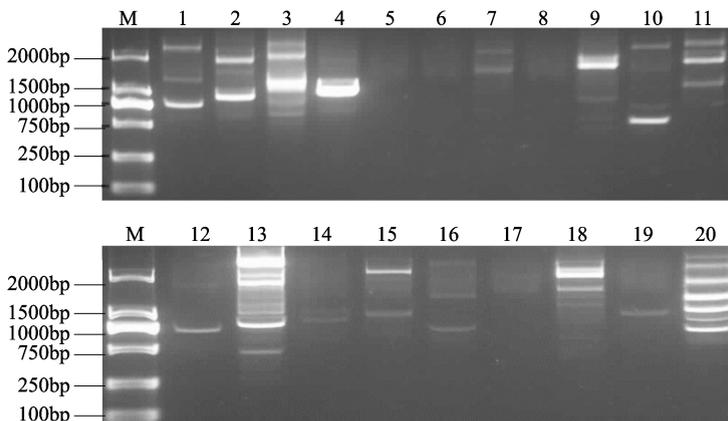


图 2 OPA01-20 单引物筛选扩增结果

Fig. 2 Amplification result for screening single primers

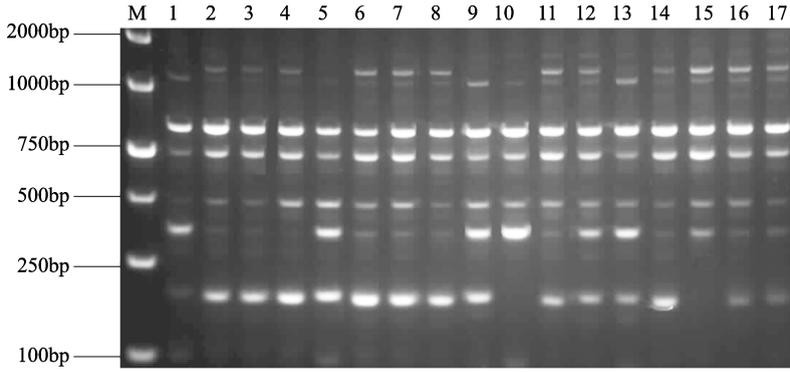


图3 引物组合 OPA-11、OPA-18 的扩增结果

Fig. 3 DNA amplifications of seventeen accessions of materials using the primer couple OPA-11 and OPA-18

表8 筛选引物及引物组合对 17 份供试材料的扩增结果

Table 8 Total number of bands, number of polymorphic bands and percentage of polymorphic bands of primers screened

引物 Primers	扩增带数 TNB	多态性带数 NPB	多态性带数 比例 (%) PPB	引物 Primers	扩增带数 TNB	多态性带数 NPB	多态性带数 比例 (%) PPB
OPA-01	9	5	55.6	OPA-03 × 13	13	13	100.0
OPA-02	4	2	50.0	OPA-03 × 16	8	4	50.0
OPA-11	10	7	70.0	OPA-03 × 18	8	7	87.5
OPA-16	7	7	100.0	OPA-03 × 20	9	7	77.8
OPA-03	12	5	41.7	OPA-11 × 13	10	3	30.0
OPA-13	11	6	54.5	OPA-11 × 16	5	4	80.0
OPA-18	16	11	68.8	OPA-11 × 18	10	6	60.0
OPA-20	7	6	85.7	OPA-13 × 16	16	13	81.3
OPA-01 × 18	11	10	90.9	OPA-13 × 18	11	3	27.3
OPA-02 × 03	6	2	33.3	OPA-13 × 20	6	5	83.3
OPA-02 × 13	12	9	75.0	OPA-16 × 18	8	6	75.0
OPA-02 × 20	4	2	50.0	合计 Total	213	143	67.1

TNB、NPB 和 PPB 分别表示每个引物或引物组合扩增的总带数、多态性带数和多态性带数比例

TNB, NPB and PPB refer to total number of bands, number of polymorphic bands and percentage of polymorphic bands, respectively

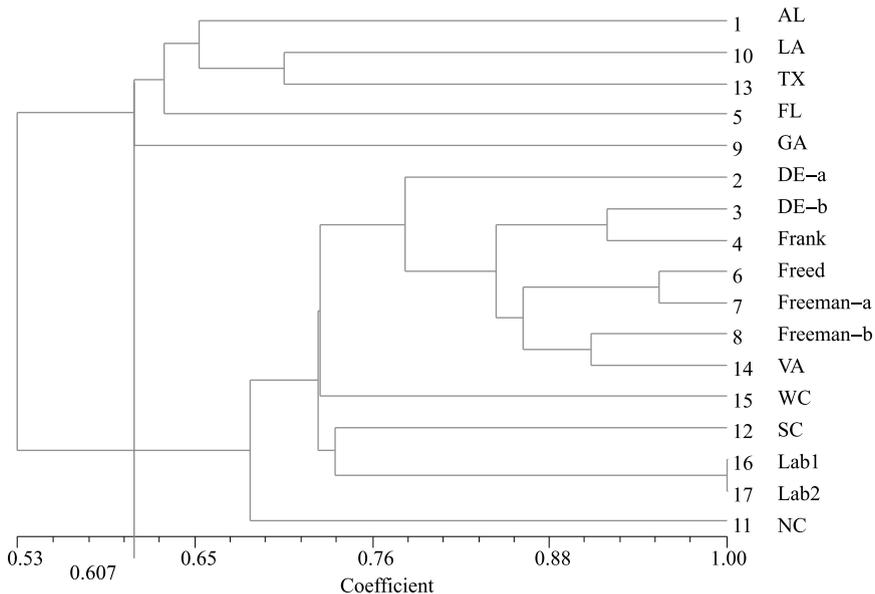


图4 17 份海滨锦葵的 RAPD 聚类分析图

Fig. 4 Phylogenetic tree of 15 populations of *K. pentacarpos* and Lab1 and Lab2 based on mean similarity matrix

的结果。第 2 类群包括 DE-a、DE-b、Frank、Freed、Freeman-a、Freeman-b、VA、WC、SC、Lab1、Lab2、NC, 其中 Lab1 和 Lab2 相似系数为 1.00, 说明此次离子注入可能并未改变其 DNA 序列, 类群内进化关系与地理位置远近基本一致, 说明此类群内海滨锦葵的变异可能是地理隔离和不同生境下自然选择的结果。而且, 聚类分析得到的系统进化树中的 2 大类群, 与根据各种性状差异的分组情况(表 3)相对应, 从分子水平对各性状之间差异程度提供支持。

3 讨论

1978 年, 海滨锦葵 *Kosteletzkya virginica* 首次因其种子富含蛋白质和油脂, 而被提出可作为耐盐作物来栽培, 并于 1992 年首次由美国特拉华州引入我国。为丰富国内海滨锦葵的生物多样性, 选育优质高产新品系, 本实验室从海滨锦葵在美国自然分布的 9 个州引进 15 个种群海滨锦葵 (*Kosteletzkya pentacarpos*) 的种子, 于郑州市北郊黄河滩试验田获得直播成功, 不同种群间各个性状差异明显, 丰富了国内海滨锦葵生物多样性。

由于地理位置和生境的差异, 15 个种群长期进化过程中已分化成两个类群, 且经 RAPD 分子标记技术^[17-18]验证, 第 1 类群为来自美国东部大西洋沿岸 4 个州的种群, 第 2 类群为美国南部墨西哥湾沿岸 5 个州的种群, 这两个类群以 32°2'N (南卡莱罗纳州南缘纬度线) 为分界线, 沿大西洋西岸和墨西哥湾北岸, 自北而南又向西分布。虽然种群间各个性状差异很大, 但是两亚种内均有种子产量比较理想的种群, 如第 12 种群(第 1 类群), 第 5、10、13 种群(第 2 类群), 可达 2 t/hm² 以上, 适合黄河滩涂种植。所有材料中种子产量最高的是离子注入处理后的种子种植后获得的, 但用 RAPD 分子标记的方法没有检测出其与对照的差异, 可能是离子注入引起的遗传物质的变化不在 RAPD 可检测的范围内。

对海滨锦葵各个数量性状的相关和通径分析表明, 各性状间互相影响, 均对种子产量产生效应, 其中最重要的是单株种子数、地径和千粒重。所以这 3 个数量性状都很高的情况下, 种子产量也会很高。但是这 3 个性状间对种子产量的互动却既有协同又有拮抗, 也就是说没有一个种群同时具备 3 个性状的最优指标, 而通过杂交的方式是否可能实现这一

目标, 有待于进一步试验。建议在进行杂交种的鉴定和进一步选育过程中, 应特别重视亲本高产的组合, 如第 5、10、12、13 种群和 Lab2 的组合, 以及性状间互补, 亲本组合共同满足株高等 3 个主导性状为最优的组合, 以期子代继承双亲优良性状。

参考文献

- [1] Nazarin A S, Lee A C H, Weeks A. A subspecific revision of North American saltmarsh mallow, *Kosteletzkya pentacarpos* (L.) Ledeb [J]. *Castanea*, 2012, 77(1): 106-122
- [2] Blanchard O J. Innovations in *Hibiscus* and *Kosteletzkya* (Malvaceae, Hibiscaceae) [J]. *Novon*, 2008, 18(1): 4-8
- [3] Halchak J L, Seliskar D M, Gallagher J L. Root system architecture of *Kosteletzkya pentacarpos* (Malvaceae) and belowground environmental influences on root and aerial growth dynamics [J]. *Am J Bot*, 2011, 98(2): 163-174
- [4] Gallagher J L. Halophytic crops for cultivation at seawater salinity [J]. *Plant Soil*, 1985, 89: 323-336
- [5] Blits K C, Gallagher J L. Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica*. I. Shoot growth, ion and water relations [J]. *Plant Cell Environ*, 1990, 13: 409-418
- [6] Blits K C, Gallagher J L. Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica*. II. Root growth, lipid content, ion and water relations [J]. *Plant Cell Environ*, 1990, 13: 409-418
- [7] 徐国万, 钦佩, 谢民, 等. 海滨锦葵 (*Kosteletzkya virginica*) 的引种生态学研究 [J]. *南京大学学报*, 1996, 32(2): 268-274
- [8] Ruan C J, Li H, Guo Y Q, et al. *Kosteletzkya virginica*, an agroecoenvironmental halophytic species for alternative agricultural production in China's east coast: Ecological adaptation and benefits, seed yield, oil content, fatty acid and biodiesel properties [J]. *Ecol Eng*, 2008, 32: 320-328
- [9] He Z X, Ruan C J, Qin P, et al. *Kosteletzkya virginica*, a halophytic species with potential for agroecotechnology in Jiangsu Province, China [J]. *Ecol Eng*, 2003, 21: 271-276
- [10] Ruan C J, Qin P, Chen J W, et al. Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkya virginica* [J]. *AAS*, 2004, 32(9): 901-905
- [11] Islam M N, Wilson C A, Watkins T R. Nutritional evaluation of seashore mallow seed, *Kosteletzkya virginica* [J]. *J Agric Food Chem*, 1982, 30(6): 1195-1198
- [12] Moser B R, Dien B S, Seliskar D M, et al. Seashore mallow (*Kosteletzkya pentacarpos*) as a salt-tolerant feedstock for production of biodiesel and ethanol [J]. *Renew Energ*, 2013, 50: 833-839
- [13] Fan L S, Wang S D, Qin P. Preparation, composition, structure and properties of the *Kosteletzkya virginica* bast fiber [J]. *Fiber Polym*, 2011, 12(7): 911-918
- [14] 阮成江, 钦佩, 韩睿明. 耐盐油料植物海滨锦葵优良品系选育 [J]. *作物杂志*, 2005(4): 71-72
- [15] 李明, 郭孝, 哈斯, 等. 河南省黄河滩区以草业为核心的综合开发与利用 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, 30(1): 71-74
- [16] 韦翠珍, 周凌云. 黄河滩区建立草地畜牧业主导型农业类型的探讨 [J]. *土壤*, 2008, 40(6): 894-897
- [17] Ruas P M, Bonifacio A, Ruas C F, et al. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD) [J]. *Euphytica*, 1999, 105(1): 25-32
- [18] Upadhyay A, Jayadev K, Manimekalai R, et al. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers [J]. *Hortic-Amsterdam*, 2004, 99: 353-362