

# 十八个麝香百合基因型遗传差异性的 RAPD 分析

刘伟<sup>1</sup>, 周厚高<sup>2</sup>, 和兆荣<sup>3</sup>

(1. 文山学院 生化系 云南 文山 663000; 2. 仲恺农业工程学院 农业与园林学院, 广东 广州 510225; 3. 云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091)

**摘要:** 对 18 个麝香百合基因型的遗传差异性进行了 RAPD 分析, 筛选具有优良性状的新品种, 并尝试使用 RAPD 标记技术的 DNA 指纹图谱作为 DUS 测试的分子生物学依据。结果表明: 14 条引物共扩增出 142 条带, 其中多态性条带 106 条, 多态百分比为 74.65%, 总体多态百分比不是很高, 说明各基因型之间遗传差异较小。对 RAPD 扩增结果进行聚类分析, 这 18 个基因型可以分成 4 类。一些引物扩增的结果显示, 部分基因型具有特异性条带, 说明 RAPD 技术在 DUS 测试中可以从分子生物学性状来鉴定新品种的特异性。

**关键词:** 麝香百合; 遗传差异性; DUS; RAPD  
**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)11—0181—04

麝香百合杂种系包括麝香百合、台湾百合及其衍生的品种和杂交种<sup>[1]</sup>。到目前为止, 麝香百合杂种系发展出了性状各异的许多品种, 由于其来源各异, 造成杂种系内品种之间亲缘关系模糊、难以分类定位等问题, 为种系内育种、已育成新品种的审定及系统研究带来了一定的麻烦。RAPD 分子标记技术由于具有信息量大、快速、高效, 而且操作简单、模板需要量少等特点, 已被广泛用于物种亲缘关系、遗传多样性分析以及遗传图谱的构建及杂交种的鉴定<sup>[2-4]</sup>。该研究利用 RAPD 技术对 18 种麝香百合基因型进行 DNA 指纹图谱分析, 以确立其遗传差异性, 并分析此技术在麝香百合新品种审定时分子性状筛选中的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

该试验所用材料是从麝香百合杂种系中的麝香百合(*Lilium longiflorum*)品种、新铁炮百合(*L. formolongi*)品种及二者的杂交种中选择出来的 18 个不同基因型(表 1)。试验材料种植在广州从化市花盛园艺公司种植场; RAPD-PCR 扩增在仲恺农业技术学院园艺园林重点实验室进行。

### 1.2 试验方法

从百合种植场采新鲜幼嫩无病虫害的叶片于塑料封口袋, 封口后立即放入冰盒带回实验室置-80℃超低温冰箱保存备用, 采用改良 CTAB 法<sup>[5]</sup>提取模板 DNA。

**第一作者简介:** 刘伟(1977-), 男, 硕士, 讲师, 现从事观赏植物资源育种及开发利用的研究工作。E-mail: liuwe00780@126.com。  
**通讯作者:** 周厚高(1962-), 男, 博士, 教授, 现从事花卉育种与产业化技术研究工作。  
**基金项目:** 广东省科技攻关资助项目(2002C20129)。  
**收稿日期:** 2009-05-20

扩增的反应体系为: dNTPs 120 μmol/L、Taq 酶 1 U、引物 0.3 μmol/L、Buffer(含 Mg<sup>2+</sup> 15 mmol/L)2.5 μL、模板 DNA 20 ng、DdH<sub>2</sub>O 18 μL, 反应总体积 25 μL。RAPD 扩增程序为: 94℃预变性 2 min、(94℃变性 20 s、37℃退火 30 s、72℃延伸 1.5 min、40 个循环)、72℃延伸 10 min、4℃保存。将反应体系全部加入 PCR 管后, 稍离心或震荡混匀后加入 12 μL 矿物油, 在 P×2 Thermal Cycler PCR 仪中进行扩增, 效果好的重复 2 次。

表 1 18 种麝香百合基因型试验材料编号及来源

| DNA 编号 | 基因型  | 来源  | DNA 编号 | 基因型     | 来源  |
|--------|------|-----|--------|---------|-----|
| 01     | 17-2 | L×f | 10     | 白天堂     | L   |
| 02     | K2-4 | F   | 11     | 48-2    | L×f |
| 03     | N    | F   | 12     | M       | F   |
| 04     | N2-6 | F   | 13     | 61      | L×f |
| 05     | M2-9 | F   | 14     | 59      | L×f |
| 06     | 06   | L   | 15     | C       | F   |
| 07     | 46-2 | L×f | 16     | 2000-14 | L×f |
| 08     | K1-4 | F   | 17     | K 早     | F   |
| 09     | Q1-3 | F   | 18     | K2-7    | F   |

注: L: 麝香百合; F 新铁炮百合; L: (*Lilium longiflorum*); F: (*L. formolongi*)。

**配置 1.4%琼脂糖凝胶**(100 mL 1×TBE 缓冲液加 1.4 g 琼脂糖), 加入 EB 使其浓度为 0.5 μg/mL, 点样时加入 mark, 在 1×TBE 缓冲液中电泳, 电压用 5 V/cm, 在紫外透射、反射仪下观察, 凝胶成像系统拍照。

### 1.3 试验结果统计分析

对扩增出来的条带, 在同一位点有带就定为 1, 没有带则定为 0。在此基础上计算其多态位点百分比(P):  $P = n/m \times 100\%$  (n: 表示多态位点的条带数; m: 表示总条带数); 用欧氏距离计算各基因型之间的相似性系数(Genetic Similarity)或遗传距离(Genetic Distance):  $GS = n/m$ ;  $GD = 1 - GS$ 。试验数据及结果用 SPSS 软件进行

统计分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 结果分析

用 2 个基因型的 DNA 对 150 条 10 碱基随机引物进行筛选。从 150 条引物中筛选出 14 条带型清晰、多态性高、重复性好的引物用作遗传差异性分析(引物序列见表 2)。不同引物扩增的结果在总带数、多态性带数、带型及带的亮度等方面都表现出了差异。14 条引物共扩增出 142 条带, 每个引物扩增的谱带数在 8~14 条之间, 平均每条引物扩增出 10.1 条带, 其中多态性条带有 106 条, 平均每引物 7.6 条, 多态百分比为 74.65%, 总体多态百分比不是很高, 说明各基因型之间亲缘关系较近, 遗传变异较小。引物 Z16 的多态百分比为 100%, 多态性最低的引物 H15、L36 的多态百分比也有 50%, 说明这些引物能有效地区分这 18 个基因型, 也说明 RAPD 分子标记能较好地标记出麝香百合不同基因型的特异性, 能显示出麝香百合在基因位点上的差异性, 是一种能区分鉴定麝香百合品种有效的分子标记技术。将此技术用于麝香百合 DUS 测试可以有效地证明品种之间的特异性, 是值得应用的一项 DUS 测试技术。引物 L14 和 L43 对 18 个麝香百合基因型的扩增产物见图 1、2。从图 1、2 可以看出, 基因型 M2-9、K1-4、48-2 都有特异性条带, 有演化成新品种的趋势。

表 2 引物的编号、序列及扩增带数

| 引物号 | 引物序列        | 扩增带数 | 多态带数 | 多态比率/% |
|-----|-------------|------|------|--------|
| I2  | AGCGCCATTG  | 10   | 8    | 80.00  |
| I4  | AAGGGGACA   | 12   | 10   | 83.33  |
| L12 | CAATGCCCGT  | 9    | 7    | 77.78  |
| L14 | CCCCGGTAAC  | 9    | 7    | 77.78  |
| L22 | CCCGCTTCC   | 11   | 8    | 72.72  |
| L26 | CCCAGCTAGA  | 10   | 8    | 80.00  |
| L28 | CACCGTATCC  | 10   | 7    | 70.00  |
| L36 | GGACGCCGTT  | 14   | 7    | 50.00  |
| L43 | TGGGCGACTG  | 9    | 8    | 88.89  |
| Z16 | CGCCCGGTAA  | 11   | 11   | 100.00 |
| Z35 | AGCCGTTACAG | 12   | 8    | 75.00  |
| H14 | GTGACGTAGG  | 8    | 7    | 87.50  |
| H15 | GGGTAACGCC  | 8    | 4    | 50.00  |
| H16 | CAATGCCCGT  | 9    | 6    | 66.67  |
| 总计  |             | 142  | 106  | 74.65  |

2.2 RAPD 标记的聚类分析

用 SPSS 软件对扩增带谱进行统计分析, 得到相似性系数矩阵(表 3), 并通过遗传距离进行聚类、构建系统树(图 3)。遗传距离范围 0.170~0.513, 平均为 0.368, 其中 K2-7 和 N 的距离最小, 白天堂与 61 的遗传距离最大; 相似性系数在 0.487~0.83 之间, 平均为 0.632。可以看出, K2-7 和 N 的亲缘关系最近; 亲缘关系相对较近

的还有 K2-7 与 K1-4, 46-2 与 61, C 与 M, 他们的相似性系数都在 0.8 以上; 亲缘关系最远的是白天堂与 61, 亲缘关系较远的还有 61 与 N2-6, 61 与 N, 白天堂与 46-2 等等。

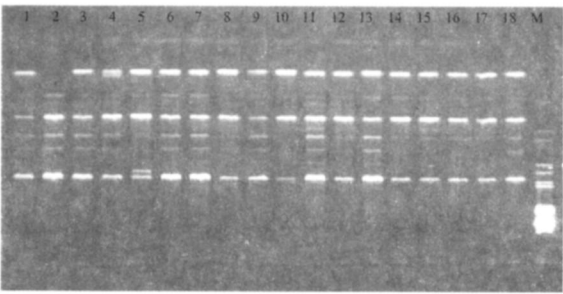


图 1 引物 L14 对 18 个麝香百合基因型的 RAPD 扩增图谱(M 表示 Marker)

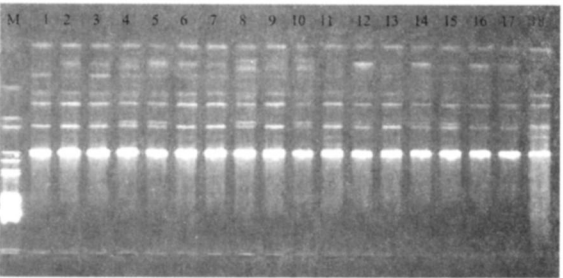


图 2 引物 L43 对 18 个麝香百合基因型的 RAPD 扩增图谱(M 表示 Marker)

通过聚类得到系统树(图 3), 可将其分成 4 个组: K2-7、N、K1-4、K2-4、N2-6、白森林、白天堂聚成一组; K 早单独成一组; M、C、17-2、59 基因型聚成一组; 00-14、48-2、61、46-2、M2-9、Q1-3 聚成一组。

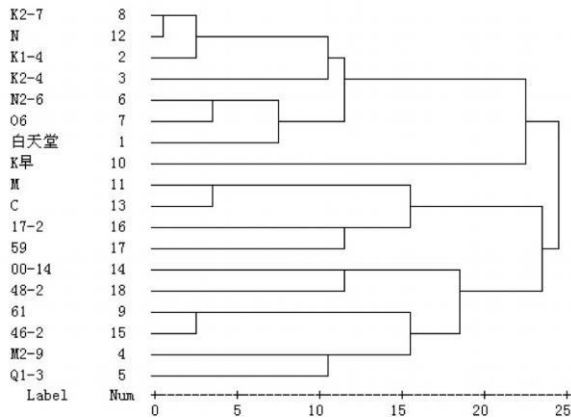


图 3 RAPD 扩增结果聚类图

表 3 18 个基因型分子性状距离系数矩阵(右上是相似性系数、左下是距离系数)

|       | 白天堂  | K1—4 | K2—4 | M—29 | Q1—3 | N2—6 | 白森林  | K2—7 | 61   | K 早  | M    | N    | C    | 00—14 | 46—2 | 17—2 | 59   | 48—2 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|
| 白天堂   |      | .753 | .735 | .598 | .553 | .772 | .755 | .710 | .487 | .596 | .636 | .714 | .630 | .556  | .504 | .552 | .591 | .604 |
| K1—4  | .247 |      | .737 | .645 | .584 | .755 | .704 | .809 | .531 | .647 | .640 | .795 | .634 | .560  | .534 | .571 | .596 | .657 |
| K2—4  | .265 | .263 |      | .726 | .636 | .738 | .676 | .750 | .626 | .625 | .633 | .703 | .657 | .614  | .655 | .570 | .577 | .712 |
| M2—9  | .402 | .355 | .274 |      | .726 | .664 | .638 | .704 | .620 | .632 | .612 | .676 | .607 | .650  | .718 | .607 | .545 | .655 |
| Q1—3  | .447 | .416 | .364 | .274 |      | .576 | .528 | .569 | .672 | .588 | .637 | .530 | .576 | .661  | .730 | .617 | .569 | .609 |
| N2—6  | .228 | .245 | .262 | .336 | .424 |      | .794 | .732 | .500 | .606 | .613 | .701 | .670 | .553  | .516 | .550 | .586 | .583 |
| 白森林   | .245 | .296 | .324 | .362 | .472 | .206 |      | .700 | .517 | .609 | .648 | .758 | .657 | .584  | .520 | .582 | .574 | .617 |
| K2—7  | .290 | .191 | .250 | .296 | .431 | .268 | .300 |      | .586 | .629 | .621 | .830 | .615 | .545  | .602 | .556 | .611 | .653 |
| 61    | .513 | .469 | .374 | .380 | .328 | .500 | .483 | .414 |      | .512 | .584 | .504 | .552 | .667  | .804 | .579 | .587 | .627 |
| K 早   | .404 | .353 | .375 | .368 | .412 | .394 | .391 | .371 | .488 |      | .568 | .631 | .591 | .593  | .528 | .577 | .584 | .657 |
| M     | .364 | .360 | .367 | .388 | .363 | .387 | .352 | .379 | .416 | .432 |      | .624 | .800 | .676  | .600 | .727 | .677 | .604 |
| N     | .286 | .205 | .297 | .324 | .470 | .299 | .242 | .170 | .496 | .369 | .376 |      | .618 | .574  | .548 | .587 | .596 | .673 |
| C     | .370 | .366 | .343 | .393 | .424 | .330 | .343 | .385 | .448 | .409 | .200 | .382 |      | .639  | .555 | .654 | .688 | .613 |
| 00—14 | .444 | .440 | .386 | .350 | .339 | .447 | .416 | .455 | .333 | .407 | .324 | .426 | .361 |       | .696 | .718 | .636 | .725 |
| 46—2  | .496 | .466 | .345 | .282 | .270 | .484 | .480 | .398 | .196 | .472 | .400 | .452 | .445 | .304  |      | .595 | .589 | .673 |
| 17—2  | .448 | .429 | .430 | .393 | .383 | .450 | .418 | .444 | .421 | .423 | .273 | .413 | .346 | .282  | .405 |      | .725 | .660 |
| 59    | .409 | .404 | .423 | .455 | .431 | .414 | .426 | .389 | .413 | .416 | .323 | .404 | .312 | .364  | .411 | .275 |      | .660 |
| 48—2  | .396 | .343 | .288 | .345 | .391 | .417 | .383 | .347 | .373 | .343 | .396 | .327 | .387 | .275  | .327 | .340 | .340 |      |

3 讨论

3.1 麝香百合遗传差异性与形态差异性对育种的影响  
在对植物进行差异性分析时可以用分子标记,也可以用形态标记。试验在进行分子标记之前,也对试验材料进行了形态标记的分析。结果显示,分子标记聚类结果与形态学性状聚类结果不完全一致<sup>[9]</sup>。说明百合在形态建成的过程中不仅仅受遗传基因的影响,也受环境条件的影响。另外,由于 RAPD 标记的并不是百合基因的所有位点,并不能完全反应百合的基因组成,所以该标记虽然能将不同的品种分离鉴定出来,但不能精确地说明品种之间在哪些基因片段或基因位点存在差异;再加上百合的某个形态性状不一定只受一对基因控制,有可能一个形态性状同时受两对或多对基因控制,所以出现分子标记聚类与形态特征聚类不完全一致的情况。针对这些现象,在麝香百合育种的过程中,应充分考虑品种推广栽培地区的气候与土壤状况对品种的影响,结合遗传规律,采用相适应的方法进行科学育种。

3.2 麝香百合新品种 DUS 测试中寻找特异分子生物学性状的方法

申请新品种审定是保护育种者知识产权的重要方式。中国于 1999 年 4 月 23 日加入了国际植物新品种保护联盟(International Unionfor the Protection of New Varieties of Plants, 简称 UPOV)<sup>[7]</sup>。要求申请授权的新品种应具备特异性(Distinctness)、一致性(Uniformity)和稳定性(Stability),简称 DUS。DUS 测试是对申请品种进行实质审查的重要内容,是能否授予品种权的重要依据。明确提出对百合进行 DUS 测试的研究不多,因此对百合 DUS 测试的相关技术和指标没有统一的标准。刘青林<sup>[8]</sup>,郭方其<sup>[9]</sup>,周焱、周厚高<sup>[10]</sup>等从形态和农艺性状对百合 DUS 测试进行了研究,为百合 DUS 测试

性状的确定提供了参考。但是将分子生物学性状用于 DUS 测试的报道未见发表,而分子生物学性状恰恰能从根源上说明品种的特异性。

该试验利用 RAPD 这种最简单的分子标记技术对 18 种麝香百合基因型进行 PCR 扩增,部分引物扩增的结果显示,有些基因型具有特异性条带,这些特异性条带可以作为分子生物学性状来证明这些基因型的特异性。说明在 DUS 测试中,利用 RAPD 技术从分子生物学性状来鉴定新品种的特异性是可行的。

参考文献

[ 1 ] 穆鼎. 观赏百合—生理、栽培、种球生产与育种[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 21.  
[ 2 ] Rajasekar S, Fei S H, Christians N E. Analysis of Genetic Diversity in Rough Bluegrass Determined by RAPD Markers[ J ]. Crop Science 2006, 46 (1): 162-167.  
[ 3 ] Shasany A K, Darokar M P, Dhawan S et al. Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of Mentha[ J ]. Journal of Heredity, 2005, 96(5): 542-549.  
[ 4 ] Nkongolo K K, Michael P, Demers T. Application of ISSR, RAPD and cytological markers to the certification of Picea mariana, P. glauca and P. engelmannii trees, and their putative hybrids[ J ]. Genome, 2005, 48(2): 302-311.  
[ 5 ] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东, 等. 系统与进化植物学中的分子标记[ M ]. 北京: 科学出版社, 2001.  
[ 6 ] 刘伟. 麝香百合杂种系品种遗传差异性评估[ D ]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2007.  
[ 7 ] 马世青, 郑学莉. 植物新品种保护基础知识[ M ]. 北京: 蓝天出版社, 1999.  
[ 8 ] 刘青林, 张云, 原雅玲, 等. 百合品种一致性、稳定性与特异性的研究[ J ]. 北京林业大学学报, 2002, 24(1): 35-40.  
[ 9 ] 郭方其, 朱金庆, 王红友, 等. 新铁炮百合品比及播期试验[ J ]. 浙江农业科学, 2004(2): 61-63.  
[ 10 ] 周焱, 周厚高, 宁云芬, 等. 新铁炮百合分离世代株系间的变异观察[ J ]. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(2): 9-13.

# 组培法筛选高抗盐大花萱草品种的初步研究

张伟丽<sup>1</sup>, 刘凤民<sup>2</sup>, 许旭丹<sup>2</sup>

(1. 仲恺农业工程学院 生命科学院, 广东 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院 实习农场, 广东 广州 510225)

**摘要:** 利用大花萱草的茎尖离体诱导愈伤组织, 先筛选出大花萱草组培离体再生系统, 在该培养基中添加不同浓度 NaCl 做胁迫条件, 统计组培苗的生长情况, 并测定了组培苗的脯氨酸含量的变化。试验表明: 金娃娃和江苏沭阳萱草在 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 4.0 mg/L 培养基上的诱导愈伤率较高。组培苗叶片生长量随盐浓度的增加而递减, 主要表现为叶片的生长受到抑制, 随着盐浓度的增高脯氨酸的含量表现越高, 相同 NaCl 胁迫浓度下江苏沭阳萱草脯氨酸含量高于金娃娃。

**关键词:** 大花萱草; 组织培养; 抗盐筛选; 脯氨酸

**中图分类号:** S 682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0184-03

大花萱草是重要的花境植物, 属百合科萱草属 (*Hemerocallis* sp.)。全世界共约 14 种, 其中原产我国的就约 11 种, 20 世纪以来, 欧美园艺学家主要利用我国的萱草材料, 进行了大量的育种工作, 目前栽种品种多达 10 000 多种。近年来, 我国较多大城市从欧美引进一批杂种大花萱草在植物园、公园、路边广为栽种。广东沿海城市较多盐碱滩涂地, 高盐含量地区等急需高抗盐的萱草品种, 培育高抗盐的大花萱草品种, 是有效、经济且切实可行的措施<sup>[1]</sup>。大花萱草的育种研究在我国尚属起步阶段, 在细胞或组织水平上进行抗盐突变体的筛

选, 变异频率高, 培养条件容易控制且不受季节限制<sup>[2-3]</sup>。

组培法筛选高抗盐植物是现代生物技术之一, 利用离体再生系统结合选育新品种具有简便、速度快、准确的特点。为满足广东地区盐碱地绿化的需求, 先筛选出大花萱草组培离体再生系统, 在不同盐浓度梯度下进行筛选试验, 以期获得较满意的抗盐植株并初步确定其适宜的抗盐浓度。植物中脯氨酸的含量是植物抗逆性(旱、盐、冻等)的一项生理指标<sup>[4]</sup>, 所以通过测定组培苗的脯氨酸含量达到了有效筛选抗盐植株的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验选用大花萱草“金娃娃”和江苏沭阳萱草 2 个萱草品种。

### 1.2 外植体的处理

将萱草植株用自来水线型小水流冲洗 2~3 h 后, 用毛刷轻轻刷去植株表面及叶片间的泥土, 并用刀削去根系和叶片, 保留茎段 3~4 cm 长, 培养皿中晾干备用。在

**第一作者简介:** 张伟丽(1969-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现从事植物分子遗传学及生物技术的研究工作。E-mail: zhangwei-li7218@163.com。

**基金项目:** 仲恺农业工程学院大学生创新基金资助项目(H1407057)。

**收稿日期:** 2009-06-10

## Genetic Difference of 18 *Lilium longiflorum* Genotypes with RAPD Markers

LIU Wei<sup>1</sup>, ZHOU Hou-gao<sup>2</sup>, HE Zhao-rong<sup>3</sup>

(1. Biochemistry Department of Wenshan University, Wenshan, Yunnan 663000, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 3. School of Life Science, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

**Abstract:** Fourteen primers were used for RAPD analysis and produced a total of 142 bands, of which 74.65% bands were polymorphic, this suggested that the relationships among genotypes were close. According to the results of cluster analysis, 18 *Lilium longiflorum* genotypes were divided into 4 groups. The 18 genotypes can be distinguished by the 14 primers, and displayed the difference of genetic site. So we can say RAPD was an effective molecular marker technic in identifying variety of *Lilium longiflorum*, and it could be used for DUS testing.

**Key words:** *Lilium longiflorum*; Genetic difference; DUS; RAPD