

# 乳白石蒜 17 份种质资源的 RAPD 分析

刘志高<sup>1</sup>, 童再康<sup>2</sup>, 黄华宏<sup>2</sup>, 高燕会<sup>2</sup>

(1. 浙江农林大学 园林学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:**为分析不同种源乳白石蒜材料的亲缘关系,利用 RAPD 标记对乳白石蒜的 17 份样品的遗传多样性进行了分析。结果表明:从 200 个随机引物中筛选出 33 个多态性较高的引物,扩增出 623 条 DNA 带,其中 527 条为多态带,占 84.6%,平均每个引物扩增的 DNA 带数为 18.88 条。根据 RAPD 扩增结果,将乳白石蒜各样品进行聚类,在阈值为 0.352 时划分为 3 类。分子聚类结果与原产地和花形态特征具有一定的联系。

**关键词:**乳白石蒜; RAPD; 遗传多样性

**中图分类号:**S682.31      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2012)04-0113-04

RAPD Analysis on 17 Accessions of *Lycoris albuliflora* Germplasm Resources

LIU Zhi-gao<sup>1</sup>, TONG Zai-kang<sup>2</sup>, HUANG Hua-hong<sup>2</sup>, GAO Yan-hui<sup>2</sup>

(1. College of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Linan, Zhejiang 311300, China;

2. College of Forestry and Life Sciences, Zhejiang A&F University, Linan, Zhejiang 311300, China)

**Abstract:**In order to verify the genetic relationship of *Lycoris albuliflora*, the genetic diversity of 17 different varieties of *L. albuliflora* were analyzed by using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) in the study. The results were as follows: 33 effective primers were selected from 200 primers, which generated 623 bands in total, and 527 bands showed polymorphism, the average polymorphism rate was 84.6%. The dendograms of 17 different variations were generated by UPGMA method, and were divided into 3 groups when genetic distance coefficient was given as 0.352. The results of molecular dendrogram demonstrated some connections with phylogenetic and origin of 17 different variations of *L. albuliflora*.

**Key words:***Lycoris albuliflora*; RAPD; genetic diversity

乳白石蒜(*Lycoris albuliflora*)隶属于石蒜科(Amaryllidaceae)石蒜属(*Lycoris*),其花色多为乳白色,且野生类型中花色变异丰富,是优良的观赏植物材料,在我国主要分布于浙江、江苏<sup>[1]</sup>。前人运用 RAPD、ISSR 等分子标记方法对石蒜、长筒石蒜等种类的亲缘关系进行了深入讨论<sup>[2-4]</sup>,结合染色体核型分析结果探讨了石蒜属植物的起源与演化<sup>[5-6]</sup>,为揭示本属植物的系统发育和进化过程提供了重要的基础资料。作为本土球根花卉,石蒜属植物的园林应用日益受到人们的关注,有关其观赏特性与应用

形式的研究也取得了诸多成果<sup>[7-9]</sup>。但目前乳白石蒜和其他石蒜属植物一样多处于野生状态,少数应用的几个种也是由原生地直接引种栽培,没有经过系统的品种选育,存在花期不一致、花色花型差异较大、花葶高度不均匀等问题,影响了观赏效果和在城市绿化中的推广应用。本文在广泛收集野生乳白石蒜种质资源的基础上,对不同种源样品的花色、形态进行了详细的观测记录,运用 RAPD 分析其种内遗传多样性,为观赏新品种的选育提供分子生物学资料。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

选用浙江和江苏收集到的 17 个乳白石蒜的变异类型(表 1), 经过 3 a 连续观测, 花色性状相对稳定。采集刚发出的幼叶, 用液氮罐带回实验室, 后保存于 -40℃ 的低温冰箱中备用。

表 1 用于 RAPD 分析的乳白石蒜样品

Table 1 Materials of *L. albuliflora* used for the RAPD analysis

编号	花色	产地
1	花被片乳白色, 腹面散生粉红色条纹, 背面中肋红色, 花丝上端淡红色, 柱头玫瑰红色。(此为原种基本特征, 以下不再重复)	江苏 1
2	花被片乳白色, 腹面顶端淡红色晕	江苏 1
3	花被片乳黄色, 背面中肋淡绿色, 花柱呈淡红色	江苏 2
4	花被片乳白色, 腹面条纹不明显	浙江 1
5	花被片乳白色, 腹面无散生条纹, 中肋乳黄色	浙江 1
6	花被片乳白色, 腹面条纹不明显, 中肋淡红色, 花丝上部淡蓝色	浙江 1
7	花被片乳白色, 腹面条纹不明显, 中肋淡绿色, 花丝上部淡蓝色	浙江 1
8	花被片乳白色, 边缘皱折上不规则分布粉红色晕	浙江 1
9	花被片乳白色, 花被片强度反卷皱缩	浙江 1
10	花被片乳白色, 花丝与花柱呈淡红色	浙江 1
11	花被片乳白色, 腹面上分布不规则淡红色晕斑	浙江 2
12	花被片亮白色, 花被片强度反卷皱缩	浙江 2
13	花被片乳白色, 腹面具明显红色晕斑	浙江 2
14	花被片乳白色, 背面中肋淡黄绿色	浙江 2
15	花被片乳白色, 花柱呈淡红色	浙江 2
16	花被片乳黄色, 背面中肋淡黄绿色,	江苏 3
17	花被片乳黄色, 花柱呈淡红色	江苏 3

## 1.2 方法

DNA 的提取采用 CTAB+ 硅珠法, 用紫外分光光度计测定浓度。对购自上海 Sangon 公司的 200 个 10 碱基随机引物进行了筛选, 从中选取扩增条带清晰、重复性较好的 33 个引物用于 PCR 扩增。扩增反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ : 10  $\times$  扩增缓冲液 2  $\mu\text{L}$  (Tris-Cl 200 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , pH 8.3, KCl 500 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ , 0.5% Triton-X 100), 2.4  $\mu\text{L}$  Mg $^{2+}$  (20 mmol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{M}$  随机引物 (Sangon 公司, 2  $\mu\text{L}$ ), 2 U Taq 聚合酶 (0.4  $\mu\text{L}$ ), DNA 模板 30 ng (2  $\mu\text{L}$ ), ddH<sub>2</sub>O (10.8  $\mu\text{L}$ )。

扩增反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 再进入 38 个 PCR 循环 (94℃ 变性 30 s, 38℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s), 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增反应在 HY-BAID 公司 PCREXPRESS 扩增仪上进行。扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上以 3.0 V  $\cdot$  cm $^{-1}$  电场强度电泳 1.5 h, 经紫外凝胶成像系统观察并照相。

将 RAPD 图谱上清晰出现的条带记为“1”, 同一位置没有条带记为“0”, 将条带信息转换成由“0”

和“1”组成的原始矩阵。使用 NTSYS-pc 软件计算样品间(OUT) 的表征 Nei 氏相似性系数并由此计算其相对遗传距离, 采用 UPGMA 法构建聚类图。用 PopGen 32 软件分析各类群之间的遗传多样性及亲缘关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳白石蒜种质资源基因组 DNA 的 RAPD 多态性分析

通过复筛获得的 33 个引物对 17 个样品进行 RAPD 扩增, 共获得 623 条扩增产物, 各个引物的扩增条带为 13~28 条, 平均为 18.9 条, 产生出的 DNA 片段大小分布在 0.09~3.0 kb 之间; 其中 527 条带具有遗传多态性, 约占总数的 84.6%, 每个引物检测到的 RAPD 多态谱带从 7 条到 26 条(表 2)不等, 平均数为 16.0 条。乳白石蒜不同类型的扩增多态性条带的差异很大, 同一引物在不同材料上具有不同的指纹图谱, S193 引物的扩增带数变幅最大, 0~22, S122 的扩增带数变幅最小, 为 9~12; S89 引物的扩增带数最多, 达到 28 条。同一材料不同引物扩增条带数差异也较大, 其中以 9 号样品变幅最大, 为 1~22。这表明不同种源乳白石蒜各类型的 DNA 多态性十分丰富, 遗传变异幅度大, 进行观赏新品种选育具有良好的遗传基础。

### 2 乳白石蒜种内变异类型间亲缘关系

采用 UPGMA 法对 17 个样品进行聚类分析, 得到亲缘关系树状图(图 2)。在阈值 0.368 处 17 个乳白石蒜样品被归为两大类: 1~10 号和 11~17 号样品各为一类。而在阈值 0.352 处, 3 号样品从第一类中分出, 单独成为一类, 分为三大类。表明三个大类间的相似性较低, 变异幅度较大。阈值逐渐减小, 16 和 17 号样品聚为一组, 1 和 2 号样品也会聚为一组, 其原产地都在江苏省, 表明种源地对聚类过程产生了重要影响。在阈值为 0.320 处, 样品被分为 4 组, 其中 3 号自成一组, 16 号和 17 号聚为一组, 这两组样品花被片色泽均为乳黄色, 另外两组样品花被片则为乳白色, 可见花被片色泽对聚类同样具有一定的影响, 这可能是其遗传变异幅度较大的表现。在花被片为乳白色的两组中, 各样品由于腹面条纹的明显度、背面中肋色泽、花柱色泽和被片皱缩程度的不同而分别成组, 以上表型因素均对聚类有一定的影响。

5 号和 4 号样品的遗传距离最近, 为 0.11, 其花色与形态特征也极为相似。其次是 6、7 号样品, 两者相似系数为 0.175, 花被片色泽都为乳白色, 且花丝和雌蕊花柱的中下部均为乳白色, 花丝上部为淡

蓝色。以上 4 个样品都采自浙江 1, 其相似系数较高可能与其生长的地点较为接近、自然起源相近有关。14 和 15 号样品间的遗传距离为 0.192, 都采自浙江 2, 观测发现其花被片颜色都为乳白色, 主要区别在于背面中肋色泽和花柱色泽不一, 花被片腹面

散生的条纹宽度不一致。1、2 号样品花被片色泽一致, 花型相似度也较高, 产地均在江苏 1, 其遗传距离仅为 0.188。可见花色、花型相近, 原产地相同的类型遗传距离相对较小, 这在一定程度上体现了 RAPD 聚类与形态分类的一致性。

表 2 不同引物的碱基序列及扩增结果

Table 2 Sequence and amplification efficiency

引物	序列	扩增谱带 (多态谱带)	引物	序列	扩增谱带 (多态谱带)	引物	序列	扩增谱带 (多态谱带)
S6	TGCTCTGCC	26(24)	S116	TCTCAGCTGG	17(17)	S142	GGTGCGGAA	21(15)
S10	CTGCTGGAC	22(20)	S119	CTGACCAGCC	19(14)	S143	CCAGATGCAC	15(15)
S43	GTCGCCGTCA	21(16)	S122	GAGGATCCCT	14(9)	S147	AGATGCAAGCC	17(12)
S48	GTGTGCCCA	18(14)	S123	CCTGATCACC	21(19)	S153	CCCGATTCTGG	17(16)
S65	GATGACGCC	14(12)	S124	GGTGATCAGG	17(10)	S154	TGCGGCTGAG	20(16)
S71	AAAGCTGCGG	19(19)	S125	CCGAATTCCC	17(13)	S159	ACGGCGTATG	20(20)
S89	CTGACGTAC	28(26)	S126	GGGAATTCTGG	17(17)	S178	TGCCCAAGCCT	24(23)
S91	TGCCCGTCGT	25(21)	S127	CCGATATCCC	19(14)	S181	CTACTGCGCT	18(18)
S92	CAGCTCACGA	22(14)	S128	GGGATATCGG	12(12)	S190	ACCGTTCCAG	20(16)
S113	GACGCCACAC	18(17)	S132	ACGGTACCAAG	19(10)	S193	GTCGTTCCCTG	23(23)
S115	AATGGCGCAG	13(11)	S141	CCCAAGGTCC	13(7)	S197	TGGGGACCAC	17(17)

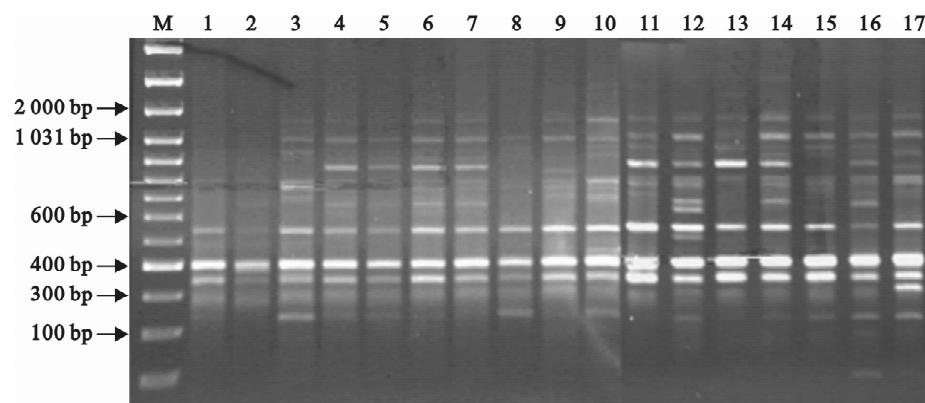


图 1 引物 S190 扩增结果

Fig. 1 RAPD results produced by S190 primer

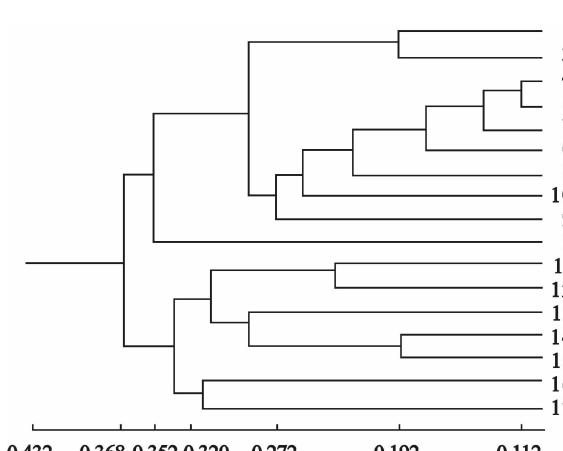


图 2 17 个乳白石蒜样品的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram obtained from the UPGMA analysis on genetic distance between 17 samples of genus *L. albiiflora*

### 3 结论与讨论

#### 3.1 乳白石蒜种内遗传多样性

根据聚类结果可以看出, 就试验涉及的 17 个样

品而言, 影响聚类的主要因素是原产地和花被片色泽, 其他表型因素对聚类的影响有限。这与赵庆芳<sup>[10]</sup>在对百合栽培品种的 Rapd 分析中所得结论类似, 同一原产地的百合品种具有较近的亲缘关系, 花色则是影响聚类结果的第二主要因素。对不同花色蝴蝶兰的品种遗传多样性分析结果也表明, 属于同源且同一色系的品种总是被归为一类, 而花丝、花柱色泽对聚类没有显著影响<sup>[11]</sup>。

多态位点百分率<sup>[12]</sup>是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标, 是遗传多样性的重要参数, 具有计算结果直观、简单的特点, 能够比较确切的反映出遗传多样性的丰富程度, 被广泛应用于分子辅助育种中。乳白石蒜种内遗传分化明显, DNA 水平多样性丰富, 多态位点比例为 84.6%。从各样品之间的分析结果看他们之间的遗传距离变幅很大, 从最高的 0.494 到最低的 0.112, 表明乳白石蒜种内遗传多样性十分丰富, 作为进一步开展种内新品种选

择潜力很大。

### 3.2 乳白石蒜种质的花色、花形态多样性

乳白石蒜各样品的花被色泽、花丝和花柱的颜色,花被片的皱缩程度,以及腹面着生的条纹和晕斑的明显程度,都与遗传多样性关系密切。对梅花、菊花、建兰品种和黄牡丹的遗传多样性分析也表明,花被片色泽、重瓣性、花丝色泽及其瓣化共同决定了各品种变异的丰富多彩,同时其遗传力也存在较大的差异<sup>[13-16]</sup>。花被片、花丝等花器官色泽的变化也许与查尔酮基因表达的组织特异性有关,但是花瓣颜色具体变化的遗传本质揭示仍需要进一步的研究得到证实。对于乳白石蒜观赏新品种的选育而言,其花色的多样性是选育过程中主要的参考指标。

生态遗传学认为,植物有相当大的发育灵活性,相同的基因型由于发育期间环境条件不同,结果产生极不相同的表型,许多形态指标甚至受到个体发育阶段的影响<sup>[17-18]</sup>,基因型和表现型之间并不一定存在一对一的关系,这就给品种性状的描述和品种间的亲缘关系确定造成了较大困难<sup>[19]</sup>。在对芍药种质资源的研究中发现,生产中以花型、花色作为主要分类依据的方法和 RAPD 得到的聚类结果存在较大差异,一些花色独特的类型并未从其他栽培品种中被分离出来<sup>[20]</sup>。就乳白石蒜而言,由于收集的各种变异类型均来自野生种群,其生长环境差异较大,特别是海拔高度、土壤和水分等条件有较大的差异,为自然变异的产生提供了有利条件。通过对花色变异类型间遗传多样性的分析,有利于在 DNA 分子水平上揭示差异的大小、亲缘关系及相互之间遗传物质的交流情况,同时为基因工程手段进行石蒜属植物花色遗传改良提供有利的理论依据。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985, 16(1): 1-27.
- [2] 张露, 蔡友铭, 诸葛强, 等. 石蒜属种间亲缘关系 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 915-921.  
ZHANG L, CAI Y M, ZHU G Q, et al. Analysis of the Inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(10): 915-921. (in Chinese)
- [3] 邓传良, 刘建, 周坚. 长筒石蒜居群遗传多样性 RAPD 分析[J]. 广西植物, 2007, 27(3): 401-405.  
DENG C L, LIU J, ZHOU J. Analysis of population genetic diversity of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD[J]. *Guizhou Botany*, 2007, 27(3): 401-405. (in Chinese)
- [4] 张雷凡, 高燕会, 朱玉球, 等. 石蒜属植物种质资源 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2007, 24(2): 156-161.  
ZHANG L F, GAO Y H, ZHU Y Q, et al. An inter simple sequence repeats (ISSR) reaction system for *Lycoris* (Amaryllidaceae)[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 2007, 24(2): 156-161. (in Chinese)
- [5] 邵建章, 杨积高, 张定成, 等. 二倍体石蒜在安徽发现[J]. 植物分类学报, 1994, 32(6): 549-552.  
SHAO J Z, YANG J G, ZHANG D C, et al. The discovery of diploid *Lycoris radiata* (L'Her.) herb from Anhui[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1994, 32(6): 549-552. (in Chinese)
- [6] 周守标, 余本祺, 罗琦, 等. 六个石蒜居群的核型及四倍体石蒜的发现[J]. 植物分类学报, 2007, 45(4): 513-522.  
ZHOU S B, YU B Q, LUO Q, et al. Karyotypes of six populations of *Lycoris radiata* and discovery of the tetraploid[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2007, 45(4): 513-522. (in Chinese)
- [7] 张波, 袁娥. 石蒜属植物的观赏价值及在环境美化中的应用[J]. 金陵科技学院学报, 2006, 2(1): 86-90.  
ZHANG B, YUAN E. Ornamental values of *Lycoris* and its application in environment beautification[J]. *Journal of Jinling Institute of Technology*, 2006, 2(1): 86-90. (in Chinese)
- [8] 于明华. 石蒜属植物及其在园林绿化中的应用[J]. 华东森林经理, 2007, 3, 21(1): 67-68.
- [9] 刘志高, 邵伟丽, 黄华宏. 石蒜属植物的园林应用[J]. 河北农业科学, 2008, 12(3): 52-54.  
LIU Z G, SHAO W L, HUANG H H. Application of *Lycoris* plants in landscape garden[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2008, 12(3): 52-54. (in Chinese)
- [10] 赵庆芳, 马世荣, 曾小英, 等. 百合栽培品种资源的分析[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2005, 41(2): 30-33.  
ZHAO Q F, MA S R, ZENG X Y, et al. Rapd analysis of *Lilium* cultivar resources[J]. *Journal of Lanzhou University: Natural Sciences Edition*, 2005, 41(2): 30-33. (in Chinese)
- [11] 明凤, 董玉光, 娄玉霞, 等. 蝴蝶兰不同花色品种遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 上海农业学报, 2003, 19(2): 44-47.  
MING F, DONG Y G, LOU Y X, et al. Rapd analysis on genetic diversities of phalaenopsis varieties with different flower colors[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2003, 19(2): 44-47. (in Chinese)
- [12] WILLIANS K A R, LIVAK K L. DNA polymorphisms amplified arbitrary are useful as genetic makers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 18: 6231-6235.
- [13] 张俊卫, 包满珠. 利用 RAPD 分析梅栽培品种间的遗传变异[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29 (增刊 1): 54-58.  
ZHANG J W, BAO M Z. Analysis of genetic diversity among *Prunus mume* cultivars via RAPD[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007, 29(Suppl. 1): 54-58. (in Chinese)
- [14] 韩洁, 胡楠, 李玉阁, 等. 菊花品种资源遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 1041-1046.  
HAN J, HU N, LI Y G, et al. Genetic diversity of *Chrysanthemum* cultivars revealed by AFLP analysis[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(4): 1041-1046. (in Chinese)
- [15] 胡薇, 黄儒珠, 潘晓华, 等. 建兰 38 个品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(2): 289-294.  
HU W, HUANG R Z, PAN X H, et al. RAPD Analysis of thirty eight *Cymbidium ensifolium* cultivars[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(2): 289-294. (in Chinese)