

32 个百合品种遗传多样性分析和 DNA 指纹图谱构建

王子康, 苏江硕, 张雪峰, 宁心怡, 周迎雪, 房伟民, 陈发棣, 张 飞^①

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用 SRAP 分子标记研究了亚洲百合 (*Lilium Asiatica Hybrids*) 杂种系 (A)、铁炮百合 (*Lilium longiflorum* Thunb.) 与亚洲百合杂种系 (LA)、东方百合 (*Lilium Oriental Hybrids*) 杂种系 (O) 和东方百合与喇叭百合 (*Lilium Trumpet Hybrids*) 杂种系 (OT) 32 个百合 (*Lilium* spp.) 品种的遗传多样性和亲缘关系, 并构建了 DNA 指纹图谱。结果表明: 筛选到的 17 对多态性引物共扩增出 177 个清晰的多态性条带, 平均每对引物扩增 10.4 个多态性条带; 17 对引物的平均多态性信息含量指数为 0.330 6, 平均 Nei's 基因多样性指数为 0.424 9。32 个百合品种间的遗传相似性系数为 0.356~0.836, 平均值为 0.561。聚类分析结果显示: 在遗传相似系数 0.578 处, 32 个百合品种可被分为 2 个类群: 类群 I 包含 A 和 LA 百合杂种系的 15 个品种, 类群 II 包含 O 和 OT 百合杂种系的 17 个品种; 在遗传相似系数 0.633 处, 类群 I 可被进一步分为 3 个亚类群, 类群 II 可被进一步分为 2 个亚类群, 其中, 'Friso' 单独聚为一类, 说明 'Friso' 与其他供试的 O 和 OT 百合杂种系品种间的亲缘关系较远。PCR 扩增结果显示: 引物 ME11-EM8 可将 32 个百合品种完全区分开, 基于其扩增出的 18 个清晰的多态性条带 (DNA 片段长度分别为 75、110、126、146、158、170、176、187、197、216、217、238、257、277、293、304、359 和 410 bp) 构建了 32 个百合品种的 DNA 指纹图谱, 且指纹图谱的置信概率高达 99.99%。综合研究表明: 基于引物 ME11-EM8 构建的 DNA 指纹图谱在鉴定百合品种上具有很好的准确性, 可用于百合品种资源的鉴定; 在未来百合新品种的选育中, 'Friso' 可作为特殊的亲本材料以增加新品种间的遗传差异。

关键词: 百合; 品种; SRAP 分子标记; 遗传多样性; DNA 指纹图谱

中图分类号: Q943.2; S682.2⁺65 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)05-0058-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.05.07

Analysis on genetic diversity and construction of DNA fingerprinting of 32 *Lilium* spp. cultivars WANG Zikang, SU Jiangshuo, ZHANG Xuefeng, NING Xinyi, ZHOU Yingxue, FANG Weimin, CHEN Fadi, ZHANG Fei^① (College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(5): 58-65

Abstract: The genetic diversity and genetic relationship of 32 *Lilium* spp. cultivars of *Lilium Asiatica Hybrids* (A), *Lilium longiflorum* Thunb. and *L. Asiatica Hybrids* (LA), *Lilium Oriental Hybrids* (O), and *L. Oriental Hybrids* and *Lilium Trumpet Hybrids* (OT) were studied by using SRAP molecular marker, and the DNA fingerprinting was constructed. The results show that 177 clear polymorphic bands are amplified with selected 17 pairs of polymorphic primers, and 10.4 polymorphic bands are amplified with each pair of primers on average; the average of polymorphism information content index of 17 pairs of primers is 0.330 6, and the average of Nei's gene diversity index is 0.424 9. The genetic similarity coefficients among 32 *Lilium* spp. cultivars are 0.356-0.836, and the average is 0.561. The cluster analysis result shows that at the genetic similarity coefficient of 0.578, 32 *Lilium* spp. cultivars can be divided into two groups: group I contains 15 cultivars of A and LA *Lilium* spp. hybrids, and group II contains 17 cultivars of O and OT *Lilium* spp. hybrids; at the genetic similarity coefficient of 0.633,

收稿日期: 2022-05-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1000400); 江苏省现代农业(花卉)产业技术体系建设项目(JATS[2022]459; JATS[2022]455)

作者简介: 王子康(1998—), 男, 湖北荆州人, 硕士研究生, 主要从事花卉遗传育种方面的研究。

^①通信作者 E-mail: zhangfei@njau.edu.cn

引用格式: 王子康, 苏江硕, 张雪峰, 等. 32 个百合品种遗传多样性分析和 DNA 指纹图谱构建[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(5): 58-65.

group I can be further divided into three subgroups, and group II can be further divided into two subgroups, in which, 'Friso' is clustered into one group individually, indicating that 'Friso' has relative far genetic relationships with the other test O and OT *Lilium* spp. hybrids. The PCR amplification result shows that primer ME11-EM8 can totally distinguish 32 *Lilium* spp. cultivars, and the DNA fingerprinting of 32 *Lilium* spp. cultivars is constructed based on 18 clear polymorphic bands amplified with this primer (the DNA fragment lengths are 75, 110, 126, 146, 158, 170, 176, 187, 197, 216, 217, 238, 257, 277, 293, 304, 359, and 410 bp respectively), and the confidence probability of the fingerprinting reaches 99.99%. It is suggested that the constructed DNA fingerprinting based on primer ME11-EM8 has good accuracy on identifying *Lilium* spp. cultivars, and can be used in identification of *Lilium* spp. cultivar resources; in the future breeding of new *Lilium* spp. cultivars, 'Friso' can be used as a special parent material to increase genetic differences among new cultivars.

Key words: *Lilium* spp.; cultivar; SRAP molecular marker; genetic diversity; DNA fingerprinting

百合 (*Lilium* spp.) 是百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium* Linn.) 植物的统称, 品种繁多, 目前全世界的百合品种多达 10 000 余个^[1]。中国观赏百合的商品化栽培较晚, 自主研发的品种较少, 大部分观赏百合的商品种球均依赖进口^[2], 但很多进口品种存在“同物异名”的问题, 亟待进一步鉴定。此外, 不同百合品种表型变异丰富、遗传背景复杂, 了解不同百合品种间的遗传距离及不同杂种系间的亲缘关系对指导中国观赏百合新品种的选育有重要意义^[3]。

DNA 指纹图谱技术是基于 DNA 分子标记建立的能够进行品种纯度及真实性检测的一种现代手段。比起通过植物外部表型来鉴定品种, DNA 指纹图谱具有不受环境因子影响、方便、可靠和快速等优点^[4]。目前, DNA 指纹图谱技术已广泛用于睡莲 (*Nymphaea tetragona* Georgi.)^[5]、钝叶杜鹃 [*Rhododendron obtusum* (Lindl.) Planch.]^[6] 和春兰 [*Cymbidium goeringii* (Rehb. f.) Rehb. F.]^[7]、丛生竹杂交种^[8] 和杨柳科 (Salicaceae) 植物^[9] 等种质资源的鉴定, 还用于药用百合种质资源的品种鉴定^[10], 但在观赏百合上鲜有相关报道^[11]。

相关序列扩增多态性 (SRAP) 标记作为分子标记的一种方法, 除了其引物没有物种特异性外, 还具有操作简单、稳定、成本低和高共显性等优点^[12]。目前, SRAP 分子标记已被广泛应用于植物的遗传多样性评价、亲缘关系分析和指纹图谱构建等方面^[13,14]。然而, 目前国内外相关学者基于 SRAP 标记对百合种质资源的研究主要在其遗传多样性和亲缘关系上^[15-17], 尚无观赏百合品种资源 DNA 指纹图谱构建的相关报道。鉴于此, 本研究利用 SRAP 分子标记分析了来自 4 个不同杂种系的 32 个观赏百合品种的遗传多样性和亲缘关系, 并构建了 DNA 指纹图谱, 旨在

为百合品种资源鉴定和杂交亲本选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试百合种球购自江苏省沭阳县新河镇左猛种子经营部和虹越花卉股份有限公司, 均为进口的观赏百合品种。供试 32 个百合品种来自 4 个杂种系, 包括 'Tiny Moon'、'Tiny Rocket'、'Tiny Padhye'、'Tiny Bee'、'Tiny Ghost' 和 'Yellow Pearl' 6 个亚洲百合 (*Lilium Asiatica* Hybrids) 杂种系 (A) 的品种; 'Sweet Valley'、'Dynamix'、'Mingo Orange'、'Summer Sky'、'Summer Snow'、'Sweet Sugar'、'Eyeliner'、'Acumen' 和 'Mystery Dream' 9 个铁炮百合 (*Lilium longiflorum* Thunb.) 与亚洲百合杂种系 (LA) 的品种; 'Siberia'、'Sorbone'、'Sunny Azores'、'After Eight'、'Sunny Martinique'、'Lotus Wonder'、'Lsabella'、'Snowboard'、'Monica' 和 'Aisha' 10 个东方百合 (*Lilium Oriental* Hybrids) 杂种系 (O) 的品种; 'White Eyes'、'Exotic Sun'、'Conca D'or'、'Palazzo'、'Zambesi'、'Robina' 和 'Friso' 7 个东方百合与喇叭百合 (*Lilium Trumpet* Hybrids) 杂种系 (OT) 的品种。于 2021 年 9 月将 32 个百合品种栽植于南京农业大学湖熟花卉基地; 同年 10 月, 采集处于旺盛营养生长期的植株顶端的嫩叶, 每个品种采 5~8 株, 每株采集 3~5 枚叶片, 用锡箔纸包好后放入液氮中冷冻, 置于 -80 °C 冰箱保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 参考文献 [18], 采用改良的 CTAB 法提取百合基因组 DNA。利用 NanoDrop One 超微量分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 检测 DNA 的浓度和纯度, 然后将其稀释到

100 ng · μL⁻¹,置于-20 °C冰箱保存、备用。

1.2.2 SRAP-PCR 反应程序及电泳检测 SRAP-PCR 体系总体积为 20.0 μL,包括 10×PCR Buffer 2.0 μL、2.5 nmol · μL⁻¹ dNTPs 1.8 μL、10 nmol · μL⁻¹正向和反向引物各 1.0 μL、5 U · μL⁻¹ *Taq*DNA 聚合酶 0.2 μL、100 ng · μL⁻¹模板 DNA 1.0 μL 和 ddH₂O 13.0 μL。所用试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min、35 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min,共 5 个循环;94 °C 变性 1 min、50 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物于 4 °C 保存、备用。

PCR 扩增结束后,用质量体积分数 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)进行电泳分离,介质为 1×TBE 缓冲液,PCR 扩增产物加样量为 5.0 μL,点样结束后在 240 V 恒压下电泳 90 min。电泳结束后用银染法^[18]染色,并对所得电泳胶拍照记录。

1.2.3 引物筛选 SRAP 正向和反向引物序列来源于 Li 等^[19],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。基于前人在百合研究中筛选得到的 53 对多态性良好的 SRAP 引物^[15-17],本研究进一步筛选得到 17 对引物。

1.3 数据处理和分析

本试验仅对扩增条带清晰的多态性位点进行统

计。在相同迁移位置上,有条带的记为“1”,没有条带或条带不明显的记为“0”;品种条带缺失的记为 NA(在后续的软件分析中,根据不同软件对录入数据的要求转换成相应的记录形式)。标记条带的命名方法为“引物对-扩增片段大小”,如“ME11-EM8-110”表示引物 ME11-EM8 在电泳图谱上 DNA 大小为 110 bp 处扩增出的多态性条带。依此方法得到每对引物的“0”“1”数据矩阵,利用 EXCEL 2016 软件记录,并统计多态性条带数。根据数理统计原理,2 个品种的指纹图谱完全相同的概率(P)的计算公式为 $P=1/2^n$,式中, n 表示该 SRAP 引物扩增出的多态性条带数^[20]。

利用 Quantity One 软件计算多态性位点的大小。利用 POWERMARKER Ver.3.25 软件计算 Nei's 基因多样性指数和多态性信息含量指数,利用 NTSYS pc Ver.2.10e 软件计算不同品种间的遗传相似系数,并采用 UPGMA 方法进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 SRAP 标记多态性分析

结果(表 1)显示:筛选得到的 17 对多态性引物,共扩增出 177 个清晰的多态性条带。17 对引物扩增

表 1 17 对多态性 SRAP 引物的扩增结果

Table 1 Amplification results of 17 pairs of polymorphic SRAP primer

引物编号 No. of primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		多态性条带数 Number of polymorphic band	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	多态性信息含量指数 Polymorphism information content index
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer			
ME4-EM5	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAAATTAAC	14	0.377 8	0.301 6
ME3-EM2	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAAATTGC	10	0.401 4	0.317 8
ME3-EM1	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAAATTAAT	10	0.382 2	0.303 4
ME6-EM1	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAAATTAAT	13	0.454 2	0.348 4
ME1-EM3	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAAATTGAC	10	0.427 1	0.330 1
ME5-EM1	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAAATTAAT	11	0.447 6	0.346 7
ME3-EM12	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAAATTGTC	8	0.448 0	0.347 1
ME6-EM4	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAAATTGA	11	0.418 6	0.324 1
ME6-EM11	TGAGTCCAAACCGGTAG	GACTGCGTACGAAATTCC	8	0.453 6	0.349 8
ME7-EM5	TGAGTCCAAACCGGTTG	GACTGCGTACGAAATTAAC	5	0.440 6	0.342 1
ME7-EM8	TGAGTCCAAACCGGTTG	GACTGCGTACGAAATTAGC	10	0.429 9	0.334 6
ME10-EM3	TGAGTCCAAACCGGATG	GACTGCGTACGAAATTGAC	11	0.475 6	0.362 3
ME10-EM10	TGAGTCCAAACCGGATG	GACTGCGTACGAAATTAG	13	0.433 4	0.335 9
ME11-EM8	TGAGTCCAAACCGGACA	GACTGCGTACGAAATTAGC	18	0.447 6	0.344 8
ME12-EM1	TGAGTCCAAACCGGGAT	GACTGCGTACGAAATTAAT	8	0.366 8	0.286 4
ME12-EM4	TGAGTCCAAACCGGGAT	GACTGCGTACGAAATTGA	7	0.441 2	0.342 5
ME12-EM12	TGAGTCCAAACCGGGAT	GACTGCGTACGAAATTGTC	10	0.377 9	0.302 9
均值 Average			10.4	0.424 9	0.330 6

出的多态性条带数在 5~18 之间,引物 ME11-EM8 扩增出的多态性条带数最多,引物 ME7-EM5 扩增出的多态性条带数最少,平均每对引物扩增出的多态性条带数为 10.4。17 对引物的 Nei's 基因多样性指数在 0.366 8~0.475 6 之间,平均 Nei's 基因多样性指数为 0.424 9,引物 ME10-EM3 的 Nei's 基因多样性指数最高,引物 ME12-EM1 的 Nei's 基因多样性指数最低。17 对引物的多态性信息含量指数(PIC)在 0.286 4~0.362 3 之间,平均 PIC 值为 0.330 6,引物 ME10-EM3 的 PIC 值最高,引物 ME12-EM1 的 PIC 值最低。

2.2 遗传相似系数和聚类分析

基于 SRAP 数据分析得到 32 个百合品种的遗传

相似系数(表 2)。结果显示:不同百合品种间的遗传相似系数(GS)为 0.356~0.836,平均值为 0.561,其中,'Tiny Bee'与'Sunny Azores'间的 GS 值最小,'Palazzo'与'Robina'间的 GS 值最大。6 个亚洲百合杂种系(A)品种间的 GS 值为 0.554~0.735,平均值为 0.638;9 个铁炮百合与亚洲百合杂种系(LA)品种间的 GS 值为 0.608~0.753,平均值为 0.674;10 个东方百合杂种系(O)品种间的 GS 值为 0.593~0.808,平均值为 0.709;7 个东方百合与喇叭百合杂种系(OT)品种间的 GS 值为 0.545~0.836,平均值为 0.675。

聚类分析结果(图 1)显示:在 GS 值为 0.578 处,32 个百合品种可分为 2 个类群:类群 I 包含 15 个品

表 2 32 个百合品种的遗传相似系数¹⁾
Table 2 Genetic similarity coefficients of 32 *Lilium* spp. cultivars¹⁾

品种 Cultivar	不同品种间的遗传相似系数 Genetic similarity coefficient among different cultivars															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.000															
2	0.701	1.000														
3	0.627	0.590	1.000													
4	0.633	0.616	0.681	1.000												
5	0.638	0.633	0.554	0.610	1.000											
6	0.684	0.735	0.608	0.633	0.627	1.000										
7	0.633	0.605	0.608	0.548	0.565	0.667	1.000									
8	0.667	0.627	0.584	0.661	0.633	0.667	0.650	1.000								
9	0.605	0.633	0.572	0.610	0.571	0.684	0.712	0.644	1.000							
10	0.633	0.621	0.613	0.639	0.608	0.657	0.627	0.663	0.645	1.000						
11	0.661	0.610	0.584	0.633	0.616	0.650	0.689	0.701	0.695	0.669	1.000					
12	0.627	0.599	0.608	0.644	0.582	0.559	0.667	0.644	0.695	0.651	0.695	1.000				
13	0.606	0.653	0.654	0.612	0.600	0.694	0.724	0.665	0.706	0.704	0.712	0.753	1.000			
14	0.627	0.599	0.627	0.633	0.661	0.605	0.701	0.644	0.684	0.608	0.661	0.695	0.653	1.000		
15	0.576	0.605	0.584	0.627	0.644	0.633	0.627	0.695	0.633	0.639	0.689	0.644	0.647	0.746	1.000	
16	0.389	0.413	0.430	0.443	0.419	0.425	0.473	0.413	0.401	0.442	0.377	0.467	0.438	0.413	0.413	1.000
17	0.429	0.401	0.440	0.412	0.396	0.441	0.424	0.435	0.396	0.410	0.418	0.407	0.388	0.373	0.401	0.689
18	0.396	0.390	0.416	0.356	0.463	0.362	0.446	0.446	0.384	0.416	0.418	0.429	0.400	0.407	0.424	0.725
19	0.412	0.418	0.452	0.384	0.469	0.412	0.441	0.452	0.379	0.458	0.435	0.458	0.424	0.401	0.441	0.731
20	0.429	0.435	0.422	0.424	0.520	0.429	0.458	0.503	0.452	0.470	0.475	0.441	0.382	0.486	0.492	0.755
21	0.497	0.424	0.512	0.458	0.475	0.418	0.469	0.514	0.452	0.500	0.497	0.486	0.429	0.441	0.458	0.689
22	0.480	0.452	0.458	0.429	0.514	0.424	0.463	0.531	0.446	0.494	0.514	0.469	0.441	0.458	0.463	0.593
23	0.497	0.412	0.506	0.492	0.497	0.463	0.525	0.559	0.486	0.506	0.509	0.486	0.435	0.520	0.492	0.653
24	0.396	0.456	0.430	0.391	0.468	0.462	0.515	0.473	0.450	0.506	0.426	0.444	0.426	0.450	0.420	0.667
25	0.412	0.429	0.500	0.441	0.469	0.446	0.475	0.509	0.424	0.524	0.469	0.469	0.441	0.424	0.452	0.677
26	0.463	0.424	0.494	0.480	0.497	0.463	0.514	0.525	0.463	0.500	0.520	0.497	0.465	0.486	0.480	0.689
27	0.482	0.470	0.542	0.464	0.434	0.512	0.560	0.500	0.476	0.542	0.500	0.500	0.541	0.506	0.476	0.647
28	0.486	0.480	0.434	0.469	0.429	0.463	0.503	0.503	0.463	0.458	0.486	0.486	0.482	0.475	0.469	0.635
29	0.486	0.492	0.458	0.458	0.509	0.520	0.458	0.458	0.475	0.518	0.418	0.475	0.447	0.463	0.446	0.647
30	0.512	0.458	0.490	0.476	0.482	0.494	0.512	0.536	0.476	0.439	0.488	0.500	0.484	0.518	0.524	0.673
31	0.480	0.486	0.470	0.486	0.537	0.480	0.463	0.475	0.446	0.482	0.435	0.537	0.465	0.514	0.509	0.599
32	0.521	0.509	0.539	0.491	0.539	0.485	0.449	0.509	0.467	0.487	0.473	0.485	0.494	0.491	0.467	0.548

续表2 Table 2 (Continued)

品种 Cultivar	不同品种间的遗传相似系数 Genetic similarity coefficient among different cultivars															
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
17	1.000															
18	0.706	1.000														
19	0.655	0.746	1.000													
20	0.672	0.740	0.791	1.000												
21	0.684	0.706	0.723	0.763	1.000											
22	0.667	0.689	0.706	0.712	0.757	1.000										
23	0.661	0.638	0.655	0.706	0.808	0.746	1.000									
24	0.681	0.645	0.675	0.728	0.728	0.734	0.716	1.000								
25	0.689	0.678	0.740	0.735	0.780	0.718	0.757	0.781	1.000							
26	0.672	0.661	0.701	0.706	0.785	0.712	0.763	0.734	0.768	1.000						
27	0.608	0.645	0.669	0.639	0.693	0.651	0.663	0.722	0.705	0.687	1.000					
28	0.661	0.638	0.622	0.650	0.661	0.644	0.627	0.645	0.712	0.695	0.771	1.000				
29	0.684	0.672	0.701	0.740	0.774	0.723	0.729	0.740	0.735	0.695	0.711	0.684	1.000			
30	0.651	0.663	0.669	0.651	0.663	0.681	0.687	0.627	0.687	0.711	0.658	0.705	0.645	1.000		
31	0.644	0.689	0.650	0.723	0.712	0.729	0.701	0.710	0.729	0.655	0.675	0.689	0.836	0.681	1.000	
32	0.581	0.551	0.527	0.587	0.575	0.623	0.587	0.547	0.587	0.605	0.545	0.617	0.677	0.583	0.647	1.000

1) 1: 'Tiny Moon'; 2: 'Tiny Rocket'; 3: 'Tiny Padhye'; 4: 'Tiny Bee'; 5: 'Tiny Ghost'; 6: 'Yellow Pearl'; 7: 'Sweet Valley'; 8: 'Dynamix'; 9: 'Mingo Orange'; 10: 'Summer Sky'; 11: 'Summer Snow'; 12: 'Sweet Sugar'; 13: 'Eyeliner'; 14: 'Acumen'; 15: 'Mystery Dream'; 16: 'Siberia'; 17: 'Sorbone'; 18: 'Sunny Azores'; 19: 'After Eight'; 20: 'Sunny Martinique'; 21: 'Lotus Wonder'; 22: 'Lsabella'; 23: 'Snowboard'; 24: 'Monica'; 25: 'Aisha'; 26: 'White Eyes'; 27: 'Exotic Sun'; 28: 'Conca D'or'; 29: 'Palazzo'; 30: 'Zambesi'; 31: 'Robina'; 32: 'Friso'.

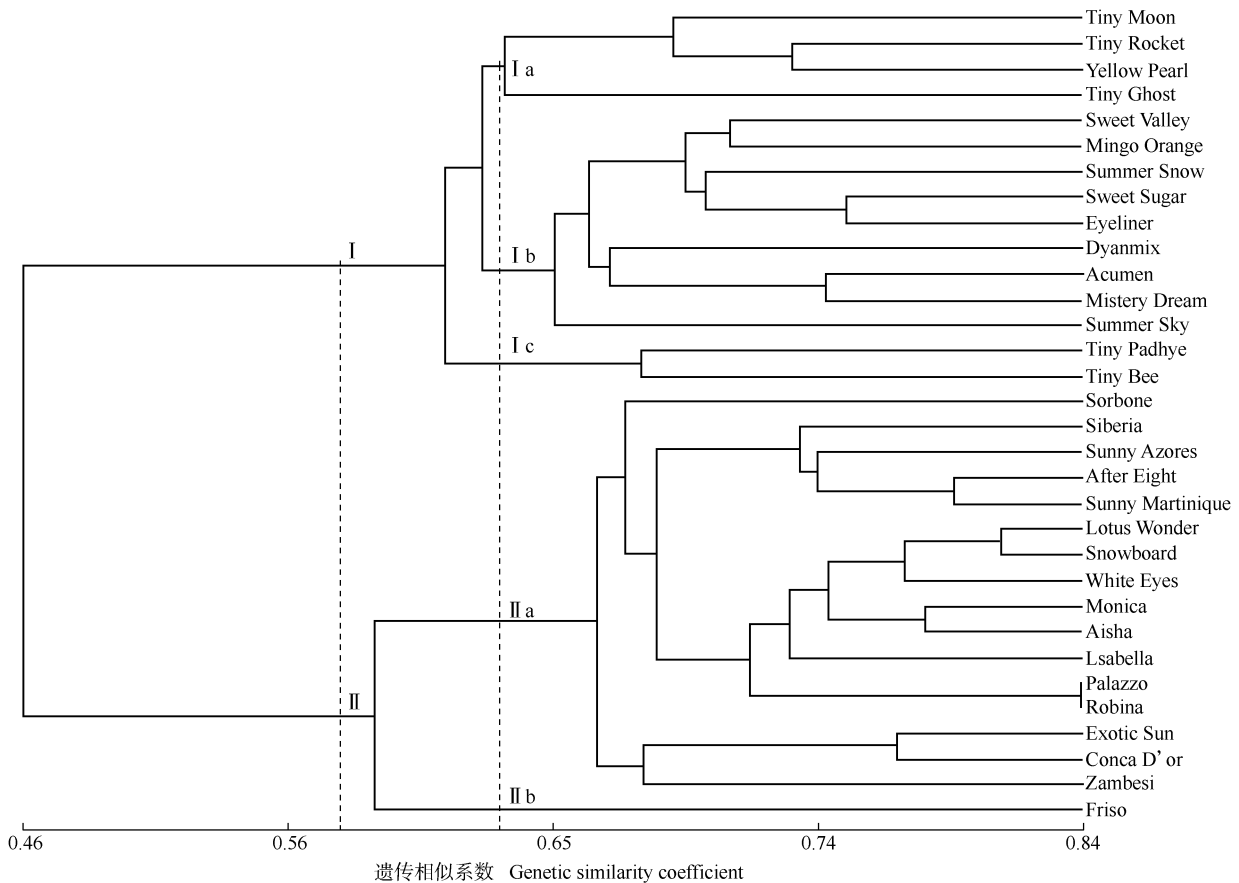


图1 基于SRAP标记的32个百合品种的UPGMA聚类图
Fig. 1 UPGMA clustering diagram of 32 *Lilium* spp. cultivars based on SRAP markers

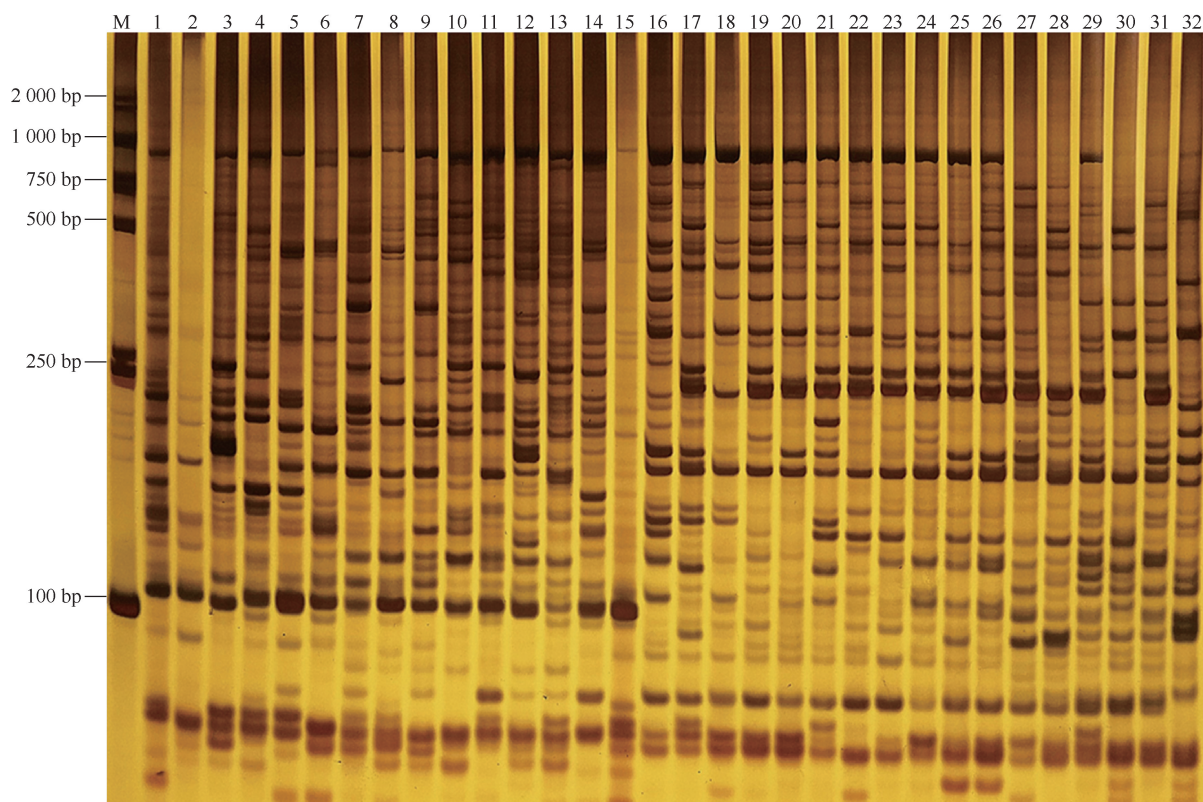
种,均属于A和LA百合杂种系;类群II包含17个品种,均属于O和OT百合杂种系。在GS值为0.632处,类群I可进一步分为3个亚类群,类群II可进一步分为2个亚类群:亚类群I a包含‘Tiny Moon’、‘Tiny Rocket’、‘Yellow Pearl’和‘Tiny Ghost’4个品种,均属于A百合杂种系;亚类群I b包含‘Sweet Valley’、‘Mingo Orange’、‘Summer Snow’、‘Sweet Sugar’、‘Eyeliner’、‘Dynamix’、‘Acumen’、‘Mystery Dream’和‘Summer Sky’9个品种,均属于LA百合杂种系;亚类群I c包含‘Tiny Padhye’和‘Tiny Bee’2个品种,均属于A百合杂种系;亚类群II a包含‘Sorbone’、‘Siberia’、‘Sunny Azores’、‘After Eight’、‘Sunny Martinique’、‘Lotus Wonder’、‘Snowboard’、‘White Eyes’、‘Monica’、‘Aisha’、‘Lsabella’、‘Palazzo’、‘Robina’、‘Exotic Sun’、‘Conca D’or’、‘Zambesi’16个品种,属于O和OT百

合杂种系;亚类群II b仅包含‘Friso’1个品种,属于OT百合杂种系。

2.3 指纹图谱构建

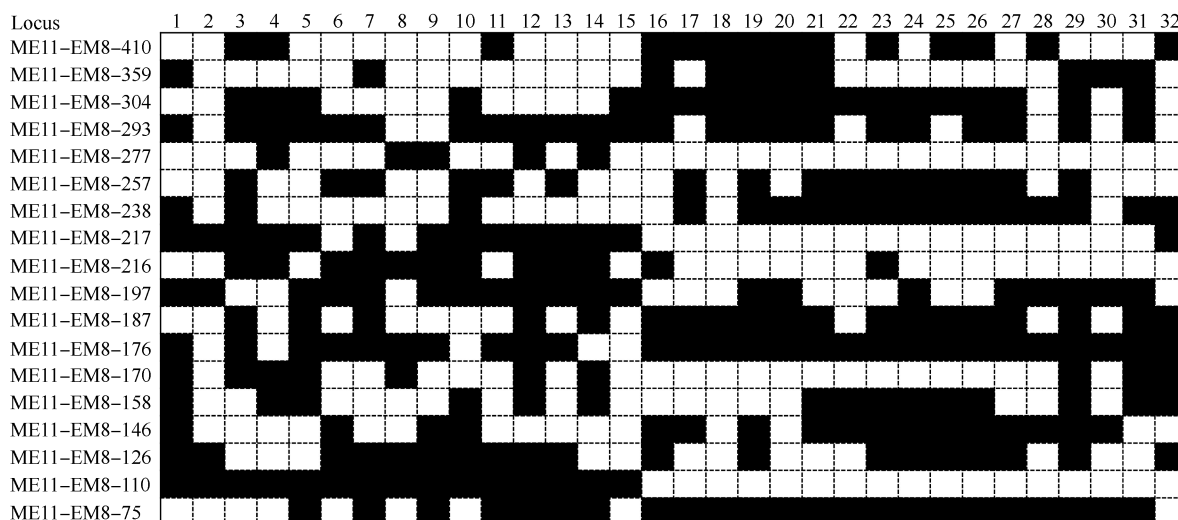
在筛选出的17对多态性引物中,引物ME11-EM8可将32个百合品种完全区分开,其对32个百合品种DNA的扩增结果见图2。结果显示:基于引物ME11-EM8扩增出的32个百合品种的DNA扩增条带清晰,可用于指纹图谱构建。

选择引物ME11-EM8扩增出的18个清晰明显的多态性条带构建32个百合品种的DNA指纹图谱,多态性条带的DNA片段长度分别为75、110、126、146、158、170、176、187、197、216、217、238、257、277、293、304、359和410 bp,结果见图3。统计结果显示:引物ME11-EM8扩增出18个多态性条带,则出现2个品种的指纹图谱完全相同的概率为 $P=1/2^{18}$,指纹图谱的置信概率高达99.99%。



M: DL2000 DNA marker. 1: ‘Tiny Moon’; 2: ‘Tiny Rocket’; 3: ‘Tiny Padhye’; 4: ‘Tiny Bee’; 5: ‘Tiny Ghost’; 6: ‘Yellow Pearl’; 7: ‘Sweet Valley’; 8: ‘Dynamix’; 9: ‘Mingo Orange’; 10: ‘Summer Sky’; 11: ‘Summer Snow’; 12: ‘Sweet Sugar’; 13: ‘Eyeliner’; 14: ‘Acumen’; 15: ‘Mystery Dream’; 16: ‘Siberia’; 17: ‘Sorbone’; 18: ‘Sunny Azores’; 19: ‘After Eight’; 20: ‘Sunny Martinique’; 21: ‘Lotus Wonder’; 22: ‘Lsabella’; 23: ‘Snowboard’; 24: ‘Monica’; 25: ‘Aisha’; 26: ‘White Eyes’; 27: ‘Exotic Sun’; 28: ‘Conca D’or’; 29: ‘Palazzo’; 30: ‘Zambesi’; 31: ‘Robina’; 32: ‘Friso’.

图2 引物ME11-EM8对32个百合品种DNA的扩增结果
Fig. 2 Amplification result of 32 *Lilium* spp. cultivars with primer ME11-EM8



1: 'Tiny Moon'; 2: 'Tiny Rocket'; 3: 'Tiny Padhye'; 4: 'Tiny Bee'; 5: 'Tiny Ghost'; 6: 'Yellow Pearl'; 7: 'Sweet Valley'; 8: 'Dynamix'; 9: 'Mingo Orange'; 10: 'Summer Sky'; 11: 'Summer Snow'; 12: 'Sweet Sugar'; 13: 'Eyeliner'; 14: 'Acumen'; 15: 'Mystery Dream'; 16: 'Siberia'; 17: 'Sorbone'; 18: 'Sunny Azores'; 19: 'After Eight'; 20: 'Sunny Martinique'; 21: 'Lotus Wonder'; 22: 'Lsabella'; 23: 'Snowboard'; 24: 'Monica'; 25: 'Aisha'; 26: 'White Eyes'; 27: 'Exotic Sun'; 28: 'Conca D'or'; 29: 'Palazzo'; 30: 'Zambesi'; 31: 'Robina'; 32: 'Friso'.

图3 基于引物 ME11-EM8 扩增结果构建的 32 个百合品种 DNA 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprinting of 32 *Lilium* spp. cultivars constructed by amplification result of primer ME11-EM8

3 讨论和结论

品种鉴定在植物育种和农业生产等方面具有重要意义,是保护植物品种权、防止假冒劣质品种进入市场的重要手段^[21,22]。常用的品种鉴定方法有形态学鉴定、细胞学鉴定、生理生化鉴定和分子标记鉴定^[23]。其中,分子标记鉴定法从 DNA 水平揭示了基因组结构和排列的特点及碱基序列差异,检测位点数量多,稳定性和可靠性较好^[24]。本研究筛选到的 17 对多态性 SRAP 引物共扩增出 177 个多态性条带,平均每对引物扩增 10.4 个多态性条带,平均多态性条带数多于石斛兰 (*Dendrobium nobile* Lindl.)^[25] 和孤挺花 (*Hippeastrum hybridum* Hort.)^[26] 等花卉。17 对引物的平均多态性信息含量指数 (*PIC*) 为 0.330 6,且每对引物的 *PIC* 值均大于 0.25,根据 Botstein 等^[27] 提出的度量基因座位变异程度的多态性信息含量标准 (当 $0.25 < PIC < 0.50$ 时,此位点表现为中度多态性信息含量),本研究筛选的 SRAP 引物均包含了中度多态性信息,适合进行后续的分析鉴定。

百合品种资源丰富,遗传背景复杂。本研究中,32 个百合品种间的遗传相似系数 (*GS*) 为 0.356 ~ 0.836,平均值为 0.561,说明这些进口的观赏百合品

种在 DNA 水平上存在丰富的遗传多样性。在 32 个百合品种中,同一杂种系的品种间的 *GS* 最小值均大于 0.54,说明同一杂种系的百合品种具有更近的亲缘关系,遗传背景可能更加相似。聚类分析结果显示:在 *GS* 值为 0.578 处,32 个百合品种可分为 2 个类群,其中,亚洲百合杂种系 (A) 和铁炮百合与亚洲百合杂种系 (LA) 的品种聚为类群 I,东方百合杂种系 (O) 和东方百合与喇叭百合杂种系 (OT) 的品种聚为类群 II,聚类结果与百合的杂交育种史相吻合,也与 Cui 等^[28] 和肖伟等^[3] 基于 ISSR 标记研究的不同百合杂种系间的遗传关系的结果一致。进一步分析发现,在 *GS* 值为 0.632 处,类群 II 可进一步被分为 2 个亚类群,其中,亚类群 II b 仅包含 'Friso' 1 个品种,说明 'Friso' 与其他供试的 O 和 OT 百合杂种系品种间的亲缘关系较远,在未来百合新品种的选育中,其可作为特殊的亲本材料以增加新品种间的遗传差异。

DNA 指纹图谱构建的原则是用尽可能少的引物区分尽可能多的品种^[29]。在本研究筛选到的 17 对多态性引物中,引物 ME11-EM8 可将 32 个百合品种完全区分开,基于其扩增出的 18 个多态性条带构建了 32 个百合品种的 DNA 指纹图谱,指纹图谱的置信概率高达 99.99%,说明构建的 DNA 指纹图谱在鉴定百合品种上具有很好的准确性。当然,随着百合品种

数量的增加,需要不断选择和增加核心引物,适时扩充百合品种的指纹图谱数据库,以保证指纹图谱数据的准确性和可靠性。

综上所述,引物 ME11-EM8 可将 32 个百合品种完全区分开,依据其构建的 DNA 指纹图谱在鉴定百合品种上具有很好的准确性,可用于百合品种资源的鉴定;在未来百合新品种的选育中,‘Friso’可作为特殊的亲本材料以增加新品种间的遗传差异。

参考文献:

- [1] 杜 方,李兴桃,徐小晶,等.百合品种的分类及遗传多样性研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2018,38(5):16-22.
- [2] 袁素霞,刘 春,明 军.百合新品种‘京鹤’[J].园艺学报,2016,43(9):1845-1846.
- [3] 肖 伟,张铭芳,贾桂霞,等.百合不同杂种系品种遗传多样性的 ISSR 分析[J].分子植物育种,2019,17(18):6169-6178.
- [4] 林兴娥,牛俊海,陈 莹,等.基于 SSR 标记的 68 份红毛丹种质资源 DNA 指纹图谱构建[J].热带作物学报,2019,40(4):708-714.
- [5] 苏 群,杨亚涵,田 敏,等.睡莲种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建[J].热带作物学报,2020,41(2):258-266.
- [6] FANG L C, MAO J, XU D Y, et al. Development of high quality EST-SSR markers in *Rhododendron obtusum* Hort. ex Wats. and their use in determining relationships among *Rhododendron* cultivars[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2021, 68: 3271-3284.
- [7] 刘 红,瞿 辉,弓 健,等.春兰种质资源的 EST-SSR 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].分子植物育种,2021,19(20):6790-6800.
- [8] 袁金玲,马婧瑕,钟远标,等.基于 SSR 标记的丛生竹杂种鉴定、遗传分析和指纹图谱构建[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(5):10-18.
- [9] 何旭东,郑纪伟,孙 冲,等.33个杨柳品种指纹图谱构建[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(2):35-42.
- [10] 童巧珍,周日宝,刘湘丹,等.百合种质资源间亲缘关系及 RAPD 指纹图谱分析[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):32-36.
- [11] 赵福宽,张建京,夏 婧,等.百合品种 IRAP 指纹图谱构建[J].中国园艺文摘,2010(12):5-6,10.
- [12] 施丽婷,周鑫洋,叶建丰,等.木本观赏植物远缘杂交育种研究进展[J].园艺学报,2021,48(9):1827-1838.
- [13] 沈 瑶,王哈璇,侯海娴,等.基于表型和 SRAP 标记的盆栽菊遗传多样性分析[J].热带作物学报,2020,41(11):2156-2164.
- [14] 张安世,司清亮,齐秀娟,等.猕猴桃种质资源的 SRAP 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].江苏农业学报,2018,34(1):138-144.
- [15] 孙明伟,袁素霞,徐有明,等.基于 SRAP 标记的百合部分种及品种遗传结构分析[J].园艺学报,2011,38(8):1498-1506.
- [16] 智 丽,滕中华,李先源,等.23种野生百合遗传关系的 SRAP 分析[J].农业生物技术学报,2011,19(4):677-684.
- [17] 王 晶,李 建,史根生,等.利用 SRAP 分子标记研究山西省野生山丹的遗传多样性[J].山西农业大学学报(自然科学版),2020,40(6):46-53.
- [18] 李丕睿.切花菊品种遗传多样性及观赏性状、抗逆性与分子标记的关联分析[D].南京:南京农业大学园艺学院,2014:23-25.
- [19] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [20] 齐 兰,王文泉,张振文,等.利用 SRAP 标记构建 18 个木薯品种的 DNA 指纹图谱[J].作物学报,2010,36(10):1642-1648.
- [21] 胡文斌,洪青梅,李 婧,等.火龙果主要商业品种 SSR 指纹图谱构建和遗传多样性分析[J].热带作物学报,2021,42(5):1310-1317.
- [22] 叶新如,刘建汀,李永平,等.基于 EST-SSR 标记的 MCID 法鉴定冬瓜种质资源[J].核农学报,2021,35(4):780-788.
- [23] 肖文芳,李 佐,陈和明,等.红花蝴蝶兰新品种选育与遗传多样性分析[J].中国农业大学学报,2019,24(11):78-88.
- [24] PARK G, CHOI Y, JUNG J K, et al. Genetic diversity assessment and cultivar identification of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using the Fluidigm single nucleotide polymorphism assay [J]. Plants, 2021, 10: 395.
- [25] 林榕燕,叶秀仙,钟淮钦,等.基于 SRAP 分子标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析[J].福建农业学报,2018,33(5):469-473.
- [26] XIONG M, YANG S, WANG Y, et al. Genetic analysis of 38 double-flowered amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) cultivars based on SRAP markers [J]. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus, 2021, 20(3):15-25.
- [27] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [28] CUI G F, WU L F, WANG X N, et al. Analysis of genetic relationships and identification of lily cultivars based on inter-simple sequence repeat markers [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(3):5778-5786.
- [29] 张静珍,王连军,雷 剑,等.基于 cpSSR 标记的山药种质资源 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J].浙江农业学报,2021,33(7):1222-1233.

(责任编辑:郭严冬)