

新铁炮百合自交初代遗传多样性的 RAPD 分析

肖 艳 周厚高* 黄子锋 王凤兰

(仲恺农业技术学院园艺系, 广州 510225)

摘 要: 采用 RAPD 技术研究了新铁炮百合 (*Lilium formolongi*) 自交初代的遗传多样性变化, 建立了自交系纯合分子判断标准。研究结果表明, F_2 、 F_3 、 F_4 世代株系多态性百分比分别为 59.1%、56.6%、48.0%, 遗传多样性指数分别为 1.749、1.530、1.292, 平均遗传距离分别为 0.121、0.207、0.238。在总变异中, 世代内的分布 H_{pop}/H_{sp} 和世代间分布 $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 遗传多样性所占的比率分别为 76.2% 和 23.8%。

关键词: 新铁炮百合; RAPD; 遗传分化; 遗传多样性

中图分类号: S 682 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 03-0524-03

The RAPD Analysis of the Genetic Diversity in Self-inbred Early Generations of *Lilium formolongi*

Xiao Yan, Zhou Hougao*, Huang Zifeng, and Wang Fenglan

(Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In Order to monitor the homozygous progress of inbred breeding in molecular level and to establish homozygous molecular criterion of inbred lines of *Lilium formolongi*, the genetic diversity in self-inbred early generations of *Lilium formolongi* was studied by RAPD. The results indicated that the percentage of polymorphic bands of F_2 , F_3 and F_4 generations were 59.1%, 56.6%, 48.0% respectively, the Shannon genetic diversity indices 1.749, 1.530, 1.292 respectively, the mean genetic distances 0.121, 0.207, 0.238 respectively. Among total variation, intrapopulation genetic diversity accounted for 76.2%, interpopulation for 23.8%.

Key words: *Lilium formolongi*; RAPD; Genetic differentiation; Genetic diversity

1 目的、材料与方法

百合 (*Lilium* spp.) 生产长期以无性繁殖为主, 国内外对其主要性状的遗传与育种研究不多。近年来, 作者进行了新铁炮百合 (*Lilium formolongi*) 的品种改良和遗传规律的初步研究^[1,2], 并在大分子水平上探讨了自交过程中遗传多样性的变化。本试验中采用 RAPD 技术, 试图在分子水平上进一步探讨百合自交初期世代之间的遗传多样性变化与遗传分化, 为百合育种提供分子生物学的理论依据。

试材为新铁炮百合 ‘雷山’ (F_1) 自交形成的 F_2 群体, 选择 K、M、N、O 等 4 个优良株系, 及由它们自交形成的 F_3 株系 K_{1-4} 、 K_{2-7} 、 M_{2-9} 、 N_{2-6} 、 O_{1-7} 、 O_{1-8} 、 O_{1-40} 、 O_{2-28} 和 F_4 群体 K_{2-7s} 、 M_{2-9s} 、 N_{2-6s} 、 O_{1-7s} 、 O_{1-40s} 、 O_{2-28s} 。每株系随机取样 15 ~ 20 株幼嫩植株。

采用 2 × CTAB 法制备模板 DNA^[3]。参照 Couch^[4] 的微量分离 DNA 法。DNA 浓度和纯度的估测采用邹喻苹等^[5]和 Lutz^[6] 的方法进行。

从 102 条 10 碱基随机单引物和 123 组双引物中经过前期筛选出 11 条单引物和 8 组双引物用于新铁炮百合的 RAPD 扩增。

收稿日期: 2004 - 06 - 18; 修回日期: 2004 - 12 - 30

基金项目: 广东省教育厅自然科学基金项目 (200044); 广东省农业攻关项目 (2002C2010301)

*通讯作者 Author for correspondence

PCR反应条件参照赵祥云等^[7]的方法并加以改进。通过单因素和正交优化设计, 确定了新铁炮百合的反应体系。PCR扩增在 PE2400型扩增仪 (Perkin Elmer Cetus公司) 上进行, 2次重复。DNA扩增产物用 1.4%琼脂糖凝胶 (含 EB $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 电泳分离, 紫外光下检测并照相。

多态位点百分比 (P) 按文献 [8] 计算; 相对多态性谱带的频度按文献 [9] 计算; 遗传多样性指数 (Genetic diversity index), 即 Shannon指数按文献 [10] 计算; 世代间的遗传距离 (Genetic distance) 采用 Nei & Li系数用 RAPD istance (2.00) 软件^[11]计算。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

扩增总谱带达 198条, 其中 35条是单态的, 163条是多态的, 多态位点百分率达 81.8%。部分引物的多态百分比均为 100%, 表现极高的多态性 (图 1)。相对多态性频度在 0.053 ~ 0.947之间, 总平均相对多态性频度达 0.620。F₂、F₃、F₄代的多态性谱带分别是 117、112、95, 多态性百分率分别为 59.1%、56.6%、48.0%。多态性百分率呈现出下降的趋势, 体现了在自交、选择作用下, 多态性位点减少, 基因趋向纯合的遗传规律。

Shannon法所估算的遗传多样性在不同引物间存在着较大差异, 19个引物所估计的 18个株系中, 不同引物标记的总世代遗传多样性指数为 3.495 ~ 1.018。从整体来看, 3个世代的遗传多样性指数分别为: 1.749、1.530、1.292, 呈现下降的趋势。总世代遗传多样性指数 (H_{sp}) 为 2.006; 世代内遗传多样性指数 (H_{pop}) 为 1.523。在总变异中, 世代内的分布 H_{pop}/H_{sp} 和世代间分布 $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$ 所占的比率分别为 76.2%和 23.8%, 表现出世代内大于世代间的趋势, 体现了自交选择初代遗传分化的程度不够大, 随着世代的增加, 遗传多样性降低, 遗传分化加强。

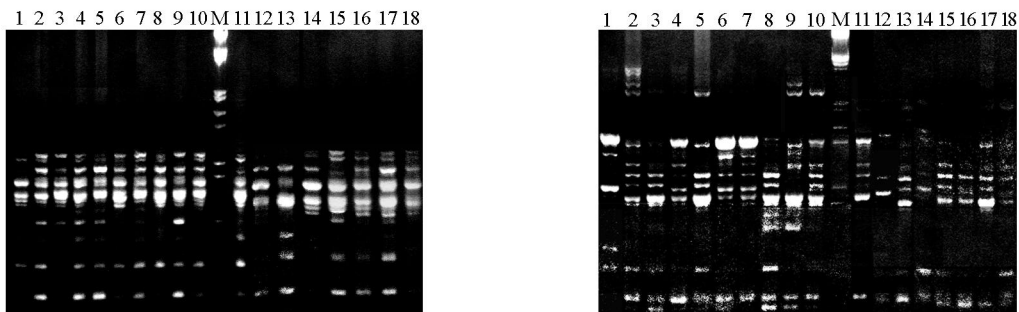


图 1 利用引物 S55 (左) 和 S303 + S1366 (右) 对群体多态性的 RAPD 检测结果

Fig. 1 The RAPD amplification results of populations with primer S55 (left) and S303 + S1366 (right)

1 - 18: N、N₂₋₆、O、O₂₋₂₈、O₁₋₇、O₁₋₄₀、K₂₋₇、K_{1-d}、M₂₋₉、M、O₁₋₈、K、M_{2-9s}、K_{2-7s}、N_{2-6s}、O_{1-7s}、O_{1-40s}、O_{2-28s}; M: Marker

2.2 株系间遗传距离与遗传分化

根据单引物和双引物扩增结果获得的遗传距离和遗传相似度表明 18个株系之间有一定差异, 株系间平均遗传距离为 0.276, 变幅在 0.1 ~ 0.333之间。遗传距离最小的株系分别为 O₁₋₇与 O, 遗传距离为 0.106, M₂₋₉与 M为 0.105, O₁₋₇与 O₁₋₄₀最小, 为 0.1; 遗传距离最大的株系分别为 M_{2-9s}与 K, 遗传距离为 0.328, M_{2-9s}与 O、M_{2-9s}与 K_{1-d}最大, 为 0.333。遗传距离最小的出现在同系统株系相邻世代间, 遗传距离最大的出现在不同系统株系较远世代间。株系间的相似系数差别也较大, 均值为 0.723, 在 0.667 ~ 0.900之间变化, 与遗传距离一样, 体现自交及在分离群体中对不同基因型个体的选择的遗传效应。自交初代中遗传距离偏小, 不利于根据遗传距离的大小选配亲本进行杂种优势利用, 因此应进一步作自交选育, 增加株系的遗传距离。

从同一株系后代的遗传距离 (表 1) 变化也可看出, 随着世代的增加, 遗传距离不断增大, 株系间距离变化有差异。株系 M 及其后代 M₂₋₉、M_{2-9s}增大的幅度最大, 自交一代后, 遗传距离增加了

100%，再进行自交选育后， F_4 世代与 F_2 世代相比遗传距离增加了143.81%，但 F_3 世代与 F_4 世代间的差异并不大，只有21.91%。株系N的 F_3 与 F_2 世代遗传距离增幅只有23.64%，但从 F_3 到 F_4 世代，遗传距离增幅达35.29%，相比 F_2 世代，增加了67.27%。

表 1 遗传距离在世代中的差异

Table 1 Genetic distances (GD) among generations

F_2 株系 F_2 line	F_2 与 F_3 F_2 and F_3	F_3 株系 F_3 line	F_3 与 F_4 F_3 and F_4	F_4 株系 F_4 line	F_2 与 F_4 F_2 and F_4	遗传距离在世代间增加百分数 Increment of GD between generations(%)		
						F_3/F_2	F_4/F_3	F_4/F_2
M	0.105	M ₂₋₉	0.210	M _{2-9s}	0.256	100.00	21.905	143.81
N	0.110	N ₂₋₆	0.136	N _{2-6s}	0.184	23.636	35.294	67.273
O	0.106	O ₁₋₇	0.184	O _{1-7s}	0.240	73.585	30.435	126.415
O	0.129	O ₁₋₄₀	0.259	O _{1-40s}	0.264	100.775	1.931	104.651
O	0.156	O ₂₋₂₈	0.248	O _{2-28s}	0.246	58.974	-0.806	57.692
平均 Mean	0.121		0.207		0.238	71.394	17.752	99.968

可见 RAPD 分析准确揭示了遗传距离与亲缘关系的远近。百合系统间株系的遗传距离较远，系统内株系的距离较近。遗传距离是一项重要指标，遗传距离远，差异大，杂交后代杂种优势也大。因此遗传距离是百合杂交组合亲本选择的重要依据，也有利于提高杂交组合杂种优势程度的预见性，提高百合育种效率。

参考文献：

- 1 周厚高, 周 焱, 宁云芬, 王凤兰, 叶向斌, 王文通. 新铁炮百合自交初代遗传分化的等位酶分析. 遗传学报, 2002, 9 (1): 72~78
Zhou H G, Zhou Y, Ning Y F, Wang F L, Ye X B, Wang W T. The allozyme analysis of the genetic differentiation in self-inbred early generations of *Lilium formolongi* Hort. Acta Genetica Sinica, 2002, 29 (1): 72~78 (in Chinese)
- 2 周厚高, 张西丽, 王中仁, 周世良, 周 焱, 宁云芬. 几个百合品种遗传亲缘关系的等位酶分析. 西南农业学报, 1999, 12 (4): 92~94
Zhou H G, Zhang X L, Wang Z R, Zhou S L, Zhou Y, Ning Y F. Genetic relationship of some lily cultivars by allozyme data. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 1999, 12 (4): 92~94 (in Chinese)
- 3 Scott O R, Arnold J B. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol Biol, 1985, 5: 69~76
- 4 Couch J A, Fritz P J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. Plant Mol Biol Rep., 1990, 8 (1): 8~12
- 5 邹喻苹, 葛 颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001. 27~49
Zou Y P, Ge S, Wang X D. Molecular marker in systematic and evolutionary botany. Beijing: Science Press, 2001. 27~49 (in Chinese)
- 6 Lutz C T. A laboratory manual of molecular biology. Department of Pathology Iowa: University of Iowa, 1989. 52~242
- 7 赵祥云, 陈新露, 方 海, 张云芳. 用 RAPD 标记评价百合品种间遗传关系. 北京农学院学报, 1995, 10 (2): 58~63
Zhao X Y, Chen X L, Fang H, Zhang Y F. Using RAPD marker to evaluate the genetic relationship among genus *Lilium*. Journal of Beijing Agricultural College, 1995, 10 (2): 58~63 (in Chinese)
- 8 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 张志宪, 洪德元. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38 (12): 954~962
Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M, Zhang Z X, Hong D Y. Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics. Acta Botanica Sinica, 1996, 38 (12): 954~962 (in Chinese)
- 9 Belaj A, Trujillo I, Rosa R, Rallo L, Giménez M. Polymorphism and discrimination capacity of random amplified polymorphic markers in an olive germplasm. Amer Soc Hort Sci, 2001, 126 (1): 64~71
- 10 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269~5273
- 11 Armstrong J, Gibbs A, Peakall R, Weiller G. RAPDistance programs. Version 1.04 for the analysis of patterns of RAPD fragments. Cabrera: Australian National University, 1996. 10~25