

## 长筒石蒜种质资源的 RAPD 及 ISSR 研究

邓传良<sup>1</sup>, 周 坚<sup>2</sup>, 卢龙斗<sup>1</sup>, 高武军<sup>1</sup>, 李书粉<sup>1</sup>, 王 琼<sup>1</sup>

(1 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2 南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

摘要: 借助 RAPD 及 ISSR 分子标记对长筒石蒜的种质资源进行了初步的研究, 结果表明: RAPD 扩增得到的 77 个位点中, 53 个位点具有多态性, 约占总数的 68.8%; ISSR 扩增得到的 67 个位点中, 其中 62 个位点具有多态性, 约占总数的 92.5%。因此, 长筒石蒜遗传多样性是十分丰富的, 可以作为育种材料储备种质资源。从 UPGMA 聚类图来看, 依据花色区分的 3 种类型, 被聚在一起, 表明亲缘关系较近。因此, 在未来的长筒石蒜种质资源利用中, 不同花色的长筒石蒜可以作为品系进行开发。

关键词: 长筒石蒜; 种质资源; 随机扩增多态性 DNA; inter-简单重复序列

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)03-300-05

## Study on Germplasm Resources of *Lycoris longituba* (Amaryllidaceae) by RAPD and ISSR

DENG Chuan-Liang<sup>1</sup>, ZHOU Jian<sup>2\*\*</sup>, LU Long-Dou<sup>1</sup>, GAO Wu-Jun<sup>1</sup>, LI Shu-Fen<sup>1</sup>, WANG Qiong<sup>1</sup>

(1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) methods were used to study the germplasm resources of *Lycoris longituba*. Using RADP with 12 primers, a total of 77 discernible loci were obtained, of which 53 loci were polymorphic (PPB = 68.8%). Using ISSR with 9 primers, 67 disemible loci were obtained, of which 62 loci were polymorphic (PPB = 92.5%). The results indicate that genetic diversity of *Lycoris longituba* is abundant, therefore, it is a good genetic material to store for breeding purpose. From UPGMA dendrograms, three *Lycoris longituba* types were recognized, which could be also distinguished by their flower colors. For future use, different varieties of *Lycoris longituba* could be cultivated.

**Key words:** *Lycoris longituba*; Germplasmic resources; RAPD; ISSR

长筒石蒜 (*Lycoris longituba* Y. Hsu et Q. J. Fan) 隶属于石蒜属植物, 为中国特有种, 分布范围非常狭小, 主要分布在江苏、安徽等地, 但其花色奇特, 且花型变异也非常大, 有的还具幽香, 这为杂交育种选配亲本提供了丰富的种质资源。石蒜属 (*Lycoris*) 植物是单子叶植物中颇为特殊的类群, 主要表现在: 不同种的发叶期存在

着显著差异, 一部分种于秋末发叶, 而另一部分则于初春展叶, 物候期相差数月, 故区分为秋出叶种和春出叶种两类, 但他们的开花期却基本一致。石蒜属植物不但具有很高的药用价值, 而且是很好的地被和切花植物 (鲍海鸥和陈波红, 2000)。因此, 要对石蒜属植物进行开发和利用, 其野生种质资源研究就势在必行。

基金项目: 国家科技部“863”项目 (2002AA241051)

通讯作者: Author for correspondence. E-mail: zjian@public1.ptt.js.cn

收稿日期: 2005-09-29, 2006-02-16 接受发表

作者简介: 邓传良 (1975-) 男, 山东定陶人, 河南师范大学生命科学学院讲师, 博士, 主要从事植物遗传学研究。

E-mail: DCL75@163.com

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 是由 Williams (1990) 和 Welsh (1990) 建立的一项分子标记技术, 用任意序列的 10 碱基寡核苷酸作为引物在全基因组上扫描, 不需要预知基因组的序列信息, 在理论上可提供无限的信息量, 而且其 DNA 用量少, 快速、高效、操作简单。现已广泛应用于遗传多样性 (乔爱民等, 1998; 王丽等, 2005)、种间亲缘等研究领域 (张露等, 2002)。ISSR (inter-simple sequence repeats) 技术主要是以一条与微卫星 (SSRs) 序列互补的并在 3' 或 5' 端含有 2~4 个随机碱基的 DNA 序列为引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增的一种新型分子标记技术 (Zietkiwica 等, 1994)。与 RAPD 技术相比, ISSR 标记的实验稳定性更好、检测到的多态性更高 (Wolff 等, 1995)。目前, 它已经广泛应用于玉米、油菜、小麦、水稻、葡萄、红薯、小米、柑橘等植物的遗传多样性或品种鉴定等研究 (Ajibades 等, 2000; Huang and Sun, 2000; Blair 等, 1999; Moreno 等, 1998; Fang 等, 1998; Akagi 等, 1996)。

由于长筒石蒜的变异类型主要表现在花色与

花型上, 在叶形上看不到差别, 并且花叶不同时, 如以叶片为材料, 需要对不同变异类型长筒石蒜进行标记, 于第二年春天才能进行研究, 时间跨度大。因此, 本研究以长筒石蒜花被片为材料, 进行 DNA 的提取, 并对长筒石蒜的种质资源进行了 ISSR 及 RAPD 研究, 为开发野生资源提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在长筒石蒜的盛花期, 花被片采集于江苏句容、安徽滁州和江苏盱眙, 包含了分布的主要区域。材料分两种方法保存, 一种是硅胶干燥室温保存, 另一种是新鲜花被片用冰壶拿回实验室, 放置于 -70℃ 冰箱中。从采集的长筒石蒜变异类型中, 选取有代表性的 12 种变异类型作为本次实验的材料, 相同类型的花被片混合提取 DNA (表 1)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用 CTAB (Rogers and Bendich, 1988) 和硅珠悬浮 (Milligan, 1998) 两种方法, 而略有改动, 分别对不同保存方式的材料进行 DNA 提取。

表 1 材料

Table 1 Material and character

编号 Number	来源 Origin	花被片颜色 Perianth color	性状 Character
1	宝华山、 琊山林场、 铁山寺国家森林公园	白色	花被片大
2	宝华山、 琊山林场、 铁山寺国家森林公园	白色	小花型, 花朵多, 达 10 朵以上
3	宝华山、 琊山林场、 铁山寺国家森林公园	白色	花被片腹面黄色条纹
4	宝华山、 琊山林场、 铁山寺国家森林公园	白色	花被片腹面红色条纹
5	宝华山、 琊山林场	粉红色	花被片大
6	宝华山、 琊山林场	粉红色	花被片较小
7	宝华山、 琊山林场	粉红色	花被片较小, 且花茎细
8	宝华山、 琊山林场	黄色	花被片深黄
9	宝华山、 琊山林场	黄色	花被片端部微红
10	宝华山、 琊山林场	黄色	小花型
11	宝华山、 琊山林场	黄色	花被片乳黄
12	宝华山、 琊山林场	黄色	花被片腹面有红色条纹

1.2.2 扩增 采取 RAPD 及 ISSR 两种标记, 进行 PCR 扩增。

1.2.2.1 RAPD 扩增 扩增反应在美国 PE 公司 9600 扩增仪上进行, 反应总体积为 20  $\mu$ l: 10  $\times$  Taq 酶扩增缓冲液 2  $\mu$ l (Tris-HCl 200 mmol L pH 8.3, KCl 500 mmol L, 0.5% Triton-X 100), 3  $\mu$ l  $Mg^{2+}$  (20 mmol L), 0.4  $\mu$ l dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 10 mmol L), 1  $\mu$ l 随机引物 (Operon 公司产, 10  $\mu$ mmol L), 0.75 U Taq 聚合酶 (上海 Promega 公司), DNA 模板 10~30 ng。扩增反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 进入 40 个 PCR 循环 (94℃ 变性 30 s, 38℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 90 s), 最后于 72℃ 延伸 7 min。

1.2.2.2 ISSR 扩增 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 进

入 38 个 PCR 循环 (94℃ 变性 30 s, 58℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 90 s), 最后于 72℃ 延伸 7 min。扩增反应总体积为 20  $\mu$ l: 1  $\times$  Taq 酶扩增缓冲液, 1.5 mmol L  $Mg^{2+}$ , 200  $\mu$ mol L dNTP, 0.5  $\mu$ mol L 随机引物, 0.5 U Taq 聚合酶, DNA 模板 10~30 ng。

1.2.2.3 电泳检测 扩增产物加 2  $\mu$ l 上样缓冲液, 用 0.5  $\mu$ g ml 溴化乙锭 (EB) 染色, 1.2% 琼脂糖凝胶 (5 V cm) 在 0.5  $\times$  TBE 缓冲液中电泳分离, 天能 UV-2000 系列紫外分析仪中 300 nm 紫外灯下观察并照相。

1.2.3 数据统计分析 对扩增产物的条带总数和多态性带数量进行统计, 计算多态条带所占比例 (PPB) 和单个引物多态条带数。RAPD 和 ISSR 都为显性标记, 扩增带用 1 (有), 0 (无) 来表示, 建立基本数据矩阵, 并

用加拿大 Alberta 大学开发的 TFPGA 软件计算 Nei's (1978) 遗传距离 (genetic distance) 并用 UPGMA 法进行聚类分析, 构建聚类树。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 扩增结果

利用 3 份不同颜色花被片为材料进行预备试验, 从 200 条随机引物 (A、B、C、D、E、F、G、H、S、X 组, 每组 20 条) 筛选出 12 个能获得清晰条带, 稳定的引物 (A-10、A-16、C-04、D-20、E-17、E-19、F-05、G-08、G-12、S-01、X-02、X-04) 用于进一步分析。12 个引物共扩增出 77 个位点, 平均每个引物扩增出 6.4 个位点, DNA 片段大小分布在 0.4~3.0 kb 之间, 其中 53 个位点具有多态性, 约占总数的 68.8%, 每个引物检测到的多态位点平均为 4.4 个 (表 2, 图 1)。

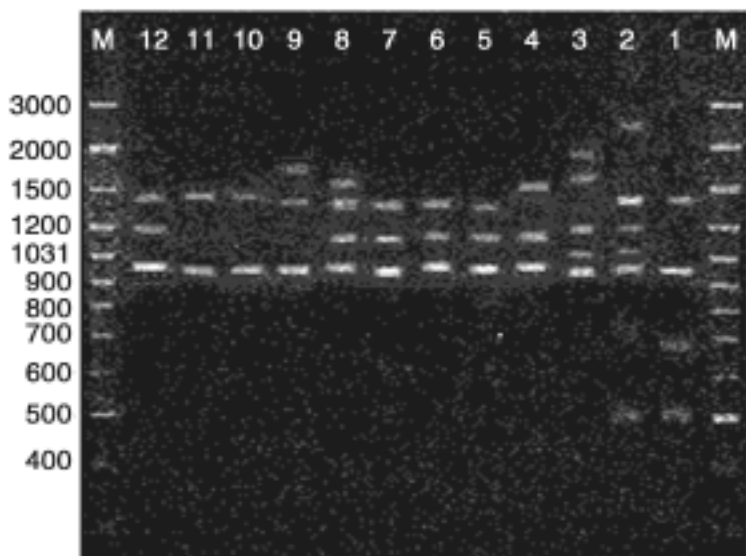


图 1 RAPD 扩增结果 (引物 OPA-10)

Fig. 1 RAPD amplification products using primer OPA-10

表 2 RAPD 引物序列及扩增结果

Table 2 RAPD primer sequences and amplified results

引物名称 Primer	引物碱基序列 Primer sequence	谱带 总数 <i>Nb</i>	多态谱 带数 <i>Npb</i>	多态谱带 比例 (%) <i>PPB (%)</i>
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'	6	4	66.7
OPA-16	5' AGCCAGCGAA 3'	6	6	100.0
OPC-04	5' CCGCATCTAC 3'	5	1	20.0
OPD-20	5' ACCCGGTCAC 3'	6	3	50.0
OPE-17	5' CTACTGCCGT 3'	5	3	60.0
OPE-19	5' ACGGCGTATG 3'	5	3	60.0
OPF-05	5' CCGAATTCCC 3'	11	8	72.7
OPG-08	5' TCACGTCCAC 3'	5	3	60.0
OPG-12	5' CAGCTCACGA 3'	6	3	50.0
OPS-01	5' CTACTGCGCT 3'	8	7	87.5
OPX-02	5' TTCCGCCACC 3'	7	6	85.7
OPX-04	5' CCGCTACCGA 3'	7	6	85.7
Total		77	53	
Mean		6.4	4.4	68.8

### 2.2 ISSR 扩增结果

用 3 份不同颜色花被片为材料进行预备试验, 从 36 条 ISSR 引物 (南京生兴公司) 中筛选出 9 个能获得清晰条带, 稳定的引物 (ISSR-03、ISSR-04、ISSR-05、ISSR-23、ISSR-30、ISSR-44、ISSR-45、ISSR-47、ISSR-59)。9 个引物共扩增出 67 个位点, 平均每个引物扩增出 7.4 个位点, DNA 片段大小分布在 0.4~3.0 kb 之间, 其中 62 个位点具有遗传多态性, 约占总数的 92.5%, 每个引物检测到的多态位点平均为 6.9 个 (表 3, 图 2)。

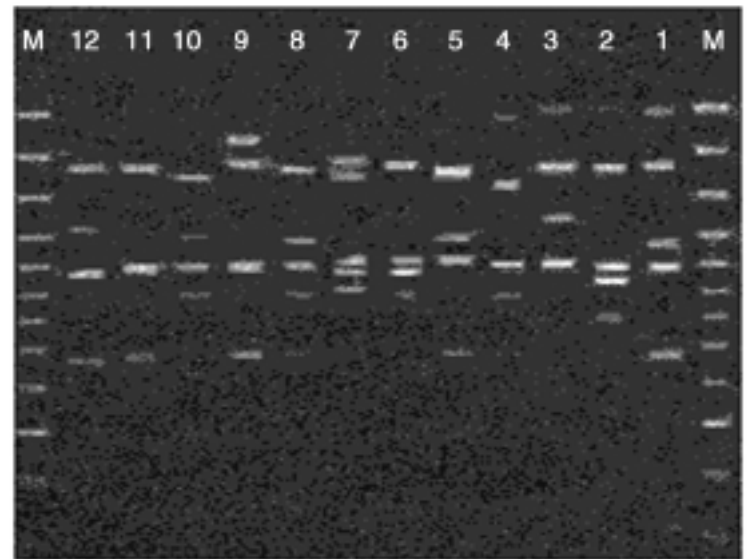


图 2 ISSR 扩增结果 (引物 ISSR-05)

Fig. 2 ISSR amplification products using primer ISSR-05

表 3 ISSR 引物序列及扩增结果

Table 3 ISSR primer sequences and amplified results

引物名称 Primer	引物碱基序列 Primer sequence	谱带 总数 <i>Nb</i>	多态谱 带数 <i>Npb</i>	多态谱带 比例 (%) <i>PPB (%)</i>
ISSR-03	5' ACACACACACACACTT 3'	10	9	90.0
ISSR-04	5' ACACACACACACACAG 3'	8	7	87.5
ISSR-05	5' ACACACACACACACTG 3'	9	7	77.8
ISSR-23	5' ACACACACACACACTA 3'	6	6	100.0
ISSR-30	5' TGTGTGTGTGTGTGTGTC 3'	7	6	85.7
ISSR-44	5' ACACACACACACACGA 3'	8	8	100.0
ISSR-45	5' ACACACACACACACGC 3'	6	6	100.0
ISSR-47	5' ACACACACACACACGT 3'	8	8	100.0
ISSR-59	5' AGAGAGAGAGAGAGGC 3'	5	5	100.0
Total		67	62	
Mean		7.4	6.9	92.5

### 2.3 聚类及遗传关系分析

利用 TFPGA 软件, 分别对 RAPD 及 ISSR 扩增所得条带进行分析, 得到长筒石蒜 12 个变异类型的遗传距离 (D) 矩阵 (表 4, 5)。遗传距离越大, 变异类型间的遗传关系也就越远。在遗传距离矩阵的基础上, 利用非加权配对算术平均法 (UPGMA) 得到长筒石蒜不同变异类型的聚类图 (图 3, 4)。

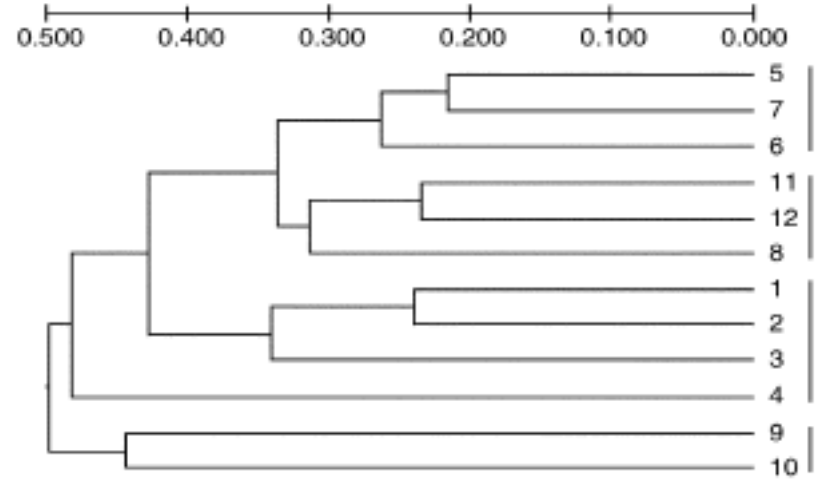
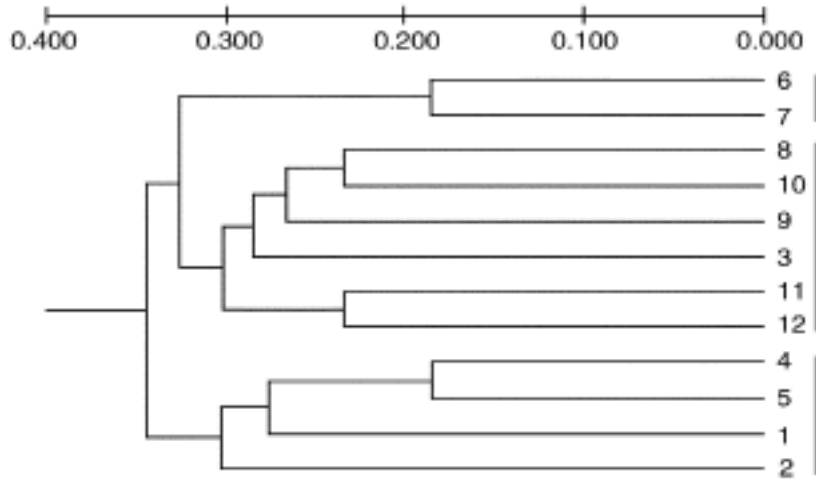


图 3 长筒石蒜 12 个不同变异类型的 RAPD 聚类图

图 4 长筒石蒜 12 个不同变异类型的 ISSR 聚类图

Fig . 3 Dendrogram of 12 *Lycoris longituba* varieties by RAPD

Fig . 4 Dendrogram of 12 *Lycoris longituba* varieties by ISSR

表 4 基于 RAPD 扩增的遗传距离

Table 4 Genetic distance based on RAPD amplification

No .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	*****											
2	0.3548	*****										
3	0.4318	0.3735	*****									
4	0.2834	0.3008	0.3365	*****								
5	0.2663	0.2495	0.3926	0.1849	*****							
6	0.3185	0.3365	0.3365	0.2329	0.2495	*****						
7	0.4120	0.4318	0.2834	0.2834	0.3735	0.1849	*****					
8	0.4120	0.4318	0.3185	0.2495	0.3008	0.2834	0.2663	*****				
9	0.4120	0.3926	0.2834	0.2495	0.3008	0.2495	0.3008	0.2663	*****			
10	0.3365	0.3185	0.2495	0.2834	0.3365	0.3185	0.4120	0.2329	0.2663	*****		
11	0.3365	0.3548	0.2834	0.2167	0.3365	0.2495	0.3365	0.3008	0.3008	0.2663	*****	
12	0.4120	0.4726	0.3548	0.3185	0.3735	0.3926	0.4937	0.2663	0.3735	0.2663	0.2329	*****

注：1 ~ 12 为样品的编号

表 5 基于 ISSR 扩增的遗传距离

Table 5 Genetic distance based on ISSR amplification

No .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	*****											
2	0.2397	*****										
3	0.4220	0.2607	*****									
4	0.4435	0.5000	0.5000	*****								
5	0.4670	0.3497	0.3973	0.3761	*****							
6	0.3545	0.3732	0.4220	0.3545	0.2534	*****						
7	0.3545	0.3042	0.3042	0.3980	0.2157	0.2729	*****					
8	0.4205	0.4733	0.5274	0.3761	0.3129	0.3335	0.3335	*****				
9	0.5938	0.5000	0.6144	0.7082	0.4670	0.3980	0.3980	0.5158	*****			
10	0.5938	0.6451	0.7787	0.4435	0.4205	0.4911	0.4435	0.3335	0.5938	*****		
11	0.3980	0.4733	0.4133	0.5411	0.2927	0.3545	0.3129	0.2927	0.4435	0.4911	*****	
12	0.5411	0.5274	0.5274	0.5411	0.3335	0.3980	0.3545	0.3335	0.3980	0.4435	0.2344	*****

注：1 ~ 12 为样品的编号

### 3 讨论

#### 3.1 遗传多样性评价

本研究的 RAPD 和 ISSR 标记都可以扩增出其各自的多态性带谱，检测出长筒石蒜种质遗传多样性。对于 RAPD 分析，12 个 RAPD 引物共扩增出 77 个条带，平均每个引物扩增出 6.4 个条带，其中有 53 条为多态，多态条带比率 (PPB) 为 68.8%，平均每个 RAPD 引物可获得 4.4 个多

态条带。对于 ISSR 分析，9 个 ISSR 引物共扩增出 67 个条带，平均每个引物扩增出 7.4 个条带，其中有 62 条为多态，多态条带比率 (PPB) 为 92.5%，平均每个 ISSR 引物可获得 6.9 个多态条带。这表明 RAPD 和 ISSR 两种标记系统都能产生各自有效的多态性带，但多态性水平及检测水平各有不同，从多态条带比率、平均多态条带上看，ISSR 标记均高于 RAPD 标记。这可能是由于

ISSR引物含有重复序列,与它结合的靶序列在DNA复制过程中存在滑动和不均等交换现象,使它们在不同品种或个体之间的重复次数差异较大,易引起引物结合位点和两结合位点之间的片段长度差异(Bruford, 1996)。这一结果与Qian等(2001)和Mattioni等(2002)的一致。

### 3.2 长筒石蒜遗传关系分析

由于石蒜属植物在自然状态下极易杂交,因此形成了各种各样的变异类型(Hsu等, 1994)其核型也有变异(周守标等, 2004)。长筒石蒜是可育种,在其分布区域内还存在中国石蒜、忽地笑及石蒜,会进行种间及种内杂交,形成不同的变异类型。对长筒石蒜野生资源的开发利用,特别是对于长筒石蒜的人工培育,必然要考虑依据形态划分的不同种类能否稳定遗传。从RAPD聚类图来看,白色,粉红色和黄色种类分别被聚在一起,只有3、5两个例外。从ISSR聚类图来看,同样花色一致的种类也分别聚在一块,也只有9、10例外,单独聚在一起。因此,依据花色区分的3种类型,基本上聚在一起,表明其亲缘关系较近。当然,这只是初步研究,还需要进行后续的观察及筛选。不过可以推测,在未来的长筒石蒜种质资源利用中,其可以作为品系进行开发。

### [参 考 文 献]

- 鲍海鸥, 陈波红, 2000. 石蒜属植物资源的开发利用 [J]. 中国野生植物资源, 19 (5): 31—32
- Ajibades SR, Weeden NF, Chite SM, 2000. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus vigna [J]. *Euphytica*, 111: 47—55
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, *et al*, 1996. A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting [J]. *Genome*, 39: 1205—1209
- Blair MW, Panaud O, Mccouch, 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 98: 780—792
- Bruford MW, 1996. Microsatellites and their application to conservation genetics. Smith TB, Wayne RK. Molecular genetic approaches in conservation [M]. Oxford: Oxford University Press, 237
- Fang DQ, Krueger RR, Roose ML, 1998. Phylogenetics relationships among selected *Citrus* gemplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 123 (4): 612—617
- Hsu PS, Kurita S, Yu ZS, 1994. Synopsis of the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae) [J]. *SIDA*, 16 (2): 301—331
- Huang JC, Sun M, 2000. Genetic diversity and relationships of sweet-potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 100: 1050—1060
- Mattioni M, Casasoli M, Gonzalez M, *et al*, 2002. Comparison fo ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1064—1070
- Milligan BG, 1998. Total DNA Isolation [A]. In: Hoelzel ed. Molecular Genetic Analysis of Population [M]. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 29—64
- Moreno, Martin JP, Oritiz JM, 1998. Inter simple sequence repeat PCR for characterization of closely related *Grapevine* gemplasm [J]. *Euphytica*, 101: 117—125
- Qian W, Ge S, Hong DY, 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 440—449
- Qiao AM (乔爱民), Liu PY (刘佩瑛), Lei JJ (雷建军), 1998. RAPD analysis of sixteen varieties of mustard [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 40 (10): 915—921
- Rogers SO, Bendich AJ, 1988. Extraction of DNA from plant tissues [J]. *Plant Mol Biol Manual*. A6: 1—10
- Wang L (王丽), Yang J (杨娟), Guo J (郭晶), *et al*, 2005. Genetic structure and differentiation of *Psathyrostachys huashnica* populations detected with RAPD markers [J]. *Acta Ecolog Sin* (生态学报), 25 (4): 719—726
- Welsh J, McClelland M, 1990. Genome fingerprinting using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 8: 7213—7218
- Williams JG, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 18: 6531—6535
- Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H, 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns [J]. *Theor Appl Genet*, 91: 439—447
- Zhang L (张露), Cai YM (蔡友铭), Zhu GQ (诸葛强), *et al*, 2002. Analysis of the inter-species relationships on *Lycoris* (Amaryllidaceae) by use of RAPD [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 29 (10): 915—921
- Zhou SB (周守标), Qin WH (秦卫华), Yu BQ (余本祺), *et al*, 2004. Karyotype studies on *Lycoris raeliata* from two populations in Anhui Province [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26 (4): 421—426
- Zietkiwica E, Rafalshi A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 20: 176—183
- Zou YP (邹喻苹), Ge S (葛颂), Wang XD (王晓东), 2001. Molecular Marker of Systematic & Evolutionary Botany [M]. Beijing: Science Press