

基于 SSR 标记的百合资源遗传背景分析

韩嘉琪^{1,2}, 王海平², 宋江萍², 贾会霞², 张晓辉², 李森¹, 徐楚^{1,2}, 李芝洁², 阳文龙^{2*}

1 山西农业大学园艺学院, 山西 晋中 030801

2 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 蔬菜生物育种全国重点实验室, 北京 100081

韩嘉琪, 王海平, 宋江萍, 贾会霞, 张晓辉, 李森, 徐楚, 李芝洁, 阳文龙. 基于 SSR 标记的百合资源遗传背景分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1211-1224.

HAN Jiaqi, WANG Haiping, SONG Jiangping, JIA Huixia, ZHANG Xiaohui, LI Sen, XU Chu, LI Zhijie, YANG Wenlong. Genetic background of lily germplasm resources based on SSR markers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1211-1224.

摘要: 为研究百合(*Lilium* spp.)种质资源的遗传背景, 精准评价和筛选优异种质用于百合的遗传改良, 本研究采用简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)分子标记技术对来自我国 11 个省份的 62 份百合种质资源进行了遗传背景分析。结果表明, 83 对百合 SSR 引物中有 15 对引物具有多态性, 共扩增出 157 个等位基因位点, 每个位点的等位基因数为 5–19 个, 平均每个位点有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)为 4.162 8, 平均观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)和平均期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)分别为 0.228 2 和 0.694 1, 平均多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)为 0.678 8, 平均 Nei's 多样性指数(Nei's diversity index, H)和平均 Shannon 信息指数(Shannon's information index, I)分别为 0.694 1 和 1.594 9, 说明供试百合种质遗传多样性丰富。利用非加权配对算术平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)进行聚类分析, 可将 62 份种质分为 5 大类, 主成分分析将材料分为 3 个类群, 结合两种分析发现各类群存在一定地理相关性, 绝大多数来源相同的百合种质可聚为一类。群体结构分析将百合群体划分为 4 个类群和 1 个混合类群。上述研究结果为百合种质资源的精准鉴定和育种利用提供了一定的理论依据和基因资源。

关键词: 百合; 种质资源; 遗传背景; 简单序列重复(SSR)

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1200200); 农业农村部作物种质资源安全保存项目(2023NWB037)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1200200) and the Safe Preservation Project of Crop Germplasm Resources of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2023NWB037).

*Corresponding author. E-mail: yangwenlong@caas.cn

Received: 2023-12-15; Accepted: 2024-02-02; Published online: 2024-03-04

Genetic background of lily germplasm resources based on SSR markers

HAN Jiaqi^{1,2}, WANG Haiping², SONG Jiangping², JIA Huixia², ZHANG Xiaohui², LI Sen¹, XU Chu^{1,2}, LI Zhijie², YANG Wenlong^{2*}

1 College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

2 State Key Laboratory of Vegetable Biobreeding, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: To study the genetic background of lily (*Lilium* spp.) germplasm resources, and accurately evaluate and select excellent germplasm for genetic improvement of lily, we analyzed the genetic background of 62 lily germplasm accessions from 11 provinces of China by using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. The results showed that 15 out of 83 pairs of lily SSR primers were polymorphic. A total of 157 allelic loci were amplified, with the number of alleles per locus ranging from 5 to 19 and the average number of effective alleles per locus being 4.162 8. The average observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.228 2 and 0.694 1, respectively. The average polymorphic information content was 0.678 8. The average Nei's diversity index and Shannon's information index were 0.694 1 and 1.594 9, respectively, indicating that the tested lily germplasm had high genetic diversity. The 62 germplasm accessions were classified into 5 groups by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and into 3 groups by the principal component analysis. The two analyses revealed a geographic correlation among different groups. The majority of lily germplasm accessions from the same source tended to cluster together. The population structure analysis classified the lily accessions into 4 populations and 1 mixed population. The above results provide a theoretical basis and genetic resources for the precise identification and breeding of lily germplasm resources.

Keywords: lily; germplasm resources; genetic background; simple sequence repeat (SSR)

百合(*Lilium* spp.)是单子叶植物亚纲百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物的总称,为多年生球根草本植物。百合花色绮丽多彩,花姿高贵典雅,具有极高的观赏价值。部分百合鳞茎可食用,色白肉嫩,味道甘甜,是我国首批通过的药食同源性植物,其营养成分丰富,并含有多种活性物质,具有较高的药用、食用价值^[1]。

种质资源是研究物种起源、进化、培育新品种的重要物质基础^[2]。全世界有百合属植物 110 余种^[3],中国是世界上最重要的百合起源地之一,

孕育了丰富多样的百合种类,其悠久的历史 and 独特的地理环境为百合种质的生长提供了得天独厚的条件,我国分布着 56 个种 18 个变种,其中特有种 36 种^[4]。我国百合资源分布范围广,跨越不同气候带,野生百合种间自然生境差异较大^[5]。近年来,由于各种人类活动的破坏、保护意识的不足,导致百合野生资源被盲目采挖且生存环境遭到了破坏,一些百合种质资源濒临灭绝,遗传多样性大大降低。为避免这种趋势进一步发展,对百合种质资源遗传多样性进行深入研究,制定

科学系统的保护策略,合理开发和利用珍贵的百合种质资源,对其科学研究、新品种选育、中医药开发等具有重要意义。

DNA 分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段,在遗传研究中具有重要地位和巨大的应用潜力。利用 DNA 分子标记,能够更深入地了解生物个体之间以及种群之间的遗传差异,从而揭示基因组的多样性和遗传结构,为进一步研究遗传流动以及群体遗传结构提供有力的支持。DNA 分子标记是 DNA 水平上反映遗传多样性的重要指标,相比于表型鉴定,具有高效、准确、不易受环境因素影响等优点。各种分子标记技术已经在种质鉴定方面得到广泛应用,其中简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)分析技术具有在染色体上分布均匀;多态性丰富,等位基因数量多;呈共显性,能够区分纯合子和杂合子;分辨率高和易于检测等优点。已在百合上利用 SSR 分子标记分析遗传多样性,如周俐宏等^[6]利用 SSR 分子标记明确 60 份百合资源抗蚜差异及遗传关系;李介文等^[7]利用 11 对 SSR 标记对 69 份百合资源亲缘关系进行评价,并分析遗传相似性及其地域分布特点;Du 等^[8]利用 95 个 SSR 标记,对百合 69 个种及品种进行遗传多样性分析。上述研究为深入研究百合属植物的遗传多样性和种群遗传结构提供了一定的技术支撑和理论依据。

野生百合种质具有抗寒和抗病等优良特性,也是药食同源植物,具有较高的营养价值和药用价值,因此,野生百合种质对于百合优良品种的选育和遗传改良具有重要意义。然而在我国,对于野生百合资源的研究和利用仍然缺乏系统且深入的研究。本研究采用毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)技术基于 SSR 分子标记对 62 份来自中国 11 个省的百合种质资源进行遗传背景分析,旨在明确这些百合种质的遗传背景,及其

在不同生境、气候条件等生态因子下的基因交流情况,从而为百合属植物的深入研究、野生资源保护和创新利用提供理论依据和基因资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料来源及基本信息

供试的 62 份百合种质资源种植于国家多年生及无性繁殖蔬菜种质资源圃(表 1),将每个材料植株茎最上方的新鲜、幼嫩、叶脉较少的叶片取 3-4 片,用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取与检测

采用 CTAB 法^[9]提取上述百合样品的 DNA。用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,并将其置于-20 °C 冰箱保存备用。

1.3 SSR 引物的筛选

83 对 SSR 引物^[10-12]由北京六合华大基因科技有限公司合成。利用来源地不同的 8 份百合种质 DNA 为模板进行引物的初筛,选取多态性好、条带清晰、特异性强的引物用于复筛。第二轮将筛选扩增条带理想的 PCR 产物进行荧光引物 PCR,用扩增良好的荧光 PCR 产物进行 3 730xl DNA 分析仪(赛默飞世尔科技公司)检测,得到的数据利用 Genemapper 软件分析,根据分析结果,筛选出具有片段多态性的引物。复筛由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

1.4 SSR-PCR 扩增

SSR-PCR 扩增体系为 20 μL ,包括 1 μL 的 DNA (100 ng/ μL)、2 \times Taq Master Mix (北京天根生化科技有限公司) 10 μL 、上游引物(10 mmol/L) 1 μL 、下游引物(10 mmol/L) 1 μL , ddH₂O 7 μL 。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min; 然后进行 35 个循环,每个循环包括 94 °C 30 s 变性、适当的退火温度 30 s 退火和 72 °C 30 s 的延伸;最后进行 72 °C 5 min 的延伸,并在 4 °C 下保存 PCR 产物。为进行电泳分析,向扩增后的 PCR 产物

中加入 4 μ L 6 \times DNA loading buffer, 取 6 μ L 的混合液在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液

为 1 \times TAE 缓冲液, 利用 Bio-Rad 凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司)采集图像保存。

表 1 62 份百合种质资源基本信息

Table 1 Basic information of 62 lily germplasm resources

Number	Sample number	Resource garden number	Name	Latin name	Place of origin
1	AH-ly1	2021341605	Qingxiyeshengbaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui xuancheng jingxian
2	AH-ly2	P341023015	Yebaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui huangshan yixian
3	AH-ly3	P340124016	Yebaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui hefei lujiangxian
4	AH-ly4	P341004017	Yebaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui huangshan huizhouqu
5	AH-jd	P341525008	Manshuihebaihe	<i>L. lancifolium</i>	Anhui liuan huoshanxian
6	AH-ly5	P340225009	Yebaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui wuhu wuweishi
7	AH-ly6	2021348043	Xinggangbaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui chuzhou laianxian
8	AH-ly7	2021343511	Lingyangyebaihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Anhui chizhou qingyangxian
9	FJ-jd1	P350723110	Yeshengbaihe	<i>L. lancifolium</i>	Fujian nanping guangzhexian
10	FJ-ly1	P350125129	Yebaihe	<i>L. brownii</i> var. <i>viridulum</i>	Fujian fuzhou yongtaixian
11	GS-lz1	P620103015	Lanzhoubaihe	<i>L. davidii</i> var. <i>willmottiae</i>	Gansu lanzhou qilihequ
12	GS-lz2	P621124023	Mudantou	<i>L. davidii</i> var. <i>willmottiae</i>	Gansu dingxi lintaoxian
13	GS-lz3	P620802017	Kongdongbaihe	<i>L. davidii</i> var. <i>willmottiae</i>	Gansu pingliang kongdongqu
14	GS-jd	P623021039	Shandanhua(hong)	<i>L. lancifolium</i>	Gansu gannan lintanxian
15	GS-lz4	GS	Lanzhouzaipei baihe	<i>L. davidii</i>	Gansu lanzhou
16	HN-mz	2021417204	Maozhubaihe	Unknown	Henan nanyang xixiaxian
17	HN-gy	2022417202	Guangye baihe	Unknown	Henan nanyang xixiaxian
18	HN-sy	2022417203	Songye baihe	Unknown	Henan nanyang xixiaxian
19	HN-sd	SD	Shandan baihe	<i>L. pumilum</i>	Henan
20	HB-yc	YC	Yichang baihe	<i>L. leucanthum</i>	Hubei yichang
21	JL-dbt	2021226008	Dongbeitian baihe	Unknown	Jilin tonghua ji'an shi
22	JL-jd1	P220622028	Longdongjuandan baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jilin baishan jingyuxian
23	JL-jd2	P222403020	Baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jilin yanbian dunhuashi
24	JL-db	P220521072	Shan baihe	<i>L. distichum</i> Nakai	Jilin tonghua tonghuaxian
25	JL-jd3	P220622020	Zhangbaishantian baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jilin baishan jingyuxian
26	JL-jd4	P220621086	Xinfeng baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jilin baishan fusongxian
27	JL-jd5	2021225093	Xinganlunye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jilin liaoyuan dongfengxian
28	JL-yb	YB	Youban baihe	<i>L. concolor</i> var. <i>pulchellum</i>	Jilin
29	JL-m	M	Mao baihe	<i>L. dauricum</i>	Jilin
30	JS-jd1	2017321313	Ye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jiangsu
31	JS-jd2	2021532431	Ye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jiangsu
32	JS-jd3	YX	Yixing baihe	<i>L. lancifolium</i>	Jiangsu yixing
33	SD-pl	P370614024	Penglai baihe	Unknown	Shandong yantai penglaiqu
34	SD-qd	QD	Qingdao baihe	<i>L. tsingtauense</i>	Shandong qingdao
35	SX-jd	2021614011	Xunyangye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Shanxi ankang xunyangshi
36	YN-ly1	P532932029	Dongpo baihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan dali heqingxian

(待续)

(续表 1)

Number	Sample number	Resource garden number	Name	Latin name	Place of origin
37	YN-ly2	P532329024	Wuding baihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan chuxiong wudingxian
38	YN-ly3	P530324031	Luoping baihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan qujing luopingxian
39	YN-jd1	P530323025	Shizongye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan qujing shizongxian
40	YN-ly4	P532929009	Yunlongxinrong baihe	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan dali yunlongxian
41	YN-jd2	2021531851	Yuanmou baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan chuxiong yuanmouxian
42	YN-ly5	P530521016	Xundianye baihe	<i>L. brownii</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan baoshan shidianxian
43	YN-ly6	P532331028	Lufengyesheng baihe	<i>L. brownii</i> var. <i>viridulum</i>	Yunnan chuxiong lufengshi
44	YN-jd3	P530523020	Longlingyesheng baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan baoshan longlingxian
45	YN-jd4	P530381173	Xuanweigaoshan baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan qujing xuanweishi
46	YN-jd5	P533423049	Lari baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan diqing weixixian
47	YN-jd6	2021532501	Yulongludian baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan lijiang yulongxian
48	YN-jd7	2021532447	Yulongshigu baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan lijiang yulongxian
49	YN-jd8	2021532449	Yongshengdaping baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan lijiang yongshengxian
50	YN-zhd	ZHD	Zihuadian baihe	<i>L. bakerianum</i>	Yunnan
51	YN-mh	MH	Meihong baihe	<i>L. amoenum</i>	Yunnan
52	YN-dl	DL	Dali baihe	<i>L. taliense</i>	Yunnan
53	YN-dhh	DHH	Danhuanghua baihe	<i>L. sulphureum</i>	Yunnan
54	YN-hld	HLD	Huanguadian baihe	<i>L. bakerianum</i>	Yunnan
55	YN-bhd	BHD	Baihuadian baihe	<i>L. bakerianum</i>	Yunnan
56	YN-fhd	FHD	Fenhuadian baihe	<i>L. bakerianum</i>	Yunnan
57	YN-jd9	Y	Ye baihe	<i>L. lancifolium</i>	Yunnan
58	YN-mj	MJ	Mojiang baihe	<i>L. henrici</i>	Yunnan
59	YN-jb	JB	Jianbei baihe	<i>L. lophophorum</i>	Yunnan
60	YN-kbbz	KBBZ	Kaiban baozi	<i>L. apertum</i>	Yunnan
61	ZJ-jd1	P330502004	Taihu baihe	<i>L. lancifolium</i>	Zhejiang huzhou wuxingqu
62	ZJ-jd2	2018333647	Baihe	<i>L. lancifolium</i>	Zhejiang taizhou huangyanqu

19, 20, 28, 29, 32, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 and 60 were introduced from the Beijing Lily Germplasm Resource Garden.

1.5 SSR 荧光标记毛细管电泳检测

引物复筛采用四重荧光毛细管电泳法, 4 种荧光标记引物 6-FAM、HEX、TAMRA 和 ROX 对 62 份百合样品进行 PCR 扩增, 将 HiDi 与 GS500 的内标按 130 : 1 混合, 配成 mix; 取 10 μ L 的 mix 加入 96 孔反应板, 每个孔内加入 0.5 μ L 样品模板, 使用离心机 4 000 r/min 瞬时离心, 用金属浴加热器将混合板加热至 95 $^{\circ}$ C 并保持 5 min, 然后迅速移至 -20 $^{\circ}$ C; 冷却后取出混合板, 4 000 r/min 离心并进行解冻和混匀; 随后使用 3730xl DNA 分析仪进行毛细管电泳以检测样品

的特性(该步骤由北京擎科生物科技股份有限公司完成)。

1.6 数据处理与分析方法

将毛细管电泳结果文件导入 Genemarker 分析软件进行基因型数据的读取, 分别输出 Excel 基因型原始数据和 PDF 分型峰图文件。利用 GenAIex 6.502 软件计算, 获得各 SSR 位点的等位基因数(number of alleles per locus, N_a), 有效等位基因数(effective number of allele, N_e), 观测杂合度(observed heterozygosity, H_o), 期望杂合度(expected heterozygosity, H_e), 以及 Shannon

信息指数(Shannon's information index, I)。利用 Popgene 32 软件获得 Nei's 基因多样性指数 (Nei's diversity index, H)。利用 Powermarker v3.25 软件计算获得多态信息含量(polymorphism information content, PIC)和遗传距离, 并利用 MEGA 7.0 软件的算术平均值的非加权配对算术平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)进行聚类分析和绘制聚类树状图, 使用 tree visualization by one table (TVBOT)在线进行美化。

利用 Structure 2.3.4 软件对 62 份百合种质资源进行群体结构分析, 并计算遗传相似性权重值(genetic similarity weight value, Q)。参数设置如下: 将群体数(true number of populations, K)设定范围为 2-8, 设置马尔科夫链蒙特卡洛值(number of Markov Chain Monte Carlo, MCMC)开始时的不作数迭代(length of burn-in period)次数为 10 000 次, 不作数迭代后的 MCMC 值(number of MCMC reps after burn-in)设为 100 000 次, K 值重复次数为 15, 最佳 K 值的选定以最大似然值为原则^[13]。结果利用 STRUCTURE Harvester 在线软件

(<https://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>)进行计算^[14], 绘制最佳群体类群数目图和群体遗传结构图。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选和多态性检测

将提取的 62 份百合样品 DNA 以分子量标准 DNA Marker III (M)为参照, 经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示(图 1), 大部分 DNA 电泳条带带型完整, 个别样品有轻微降解, DNA 总质量较好, 可以满足后续 SSR-PCR 扩增要求。

本研究采用 83 对 SSR 引物, 选取 8 个不同来源地的百合种质 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测初步筛选出条带清晰且有较强的多态性和特异性的引物 40 对。复筛利用毛细管电泳对 8 个样品和 40 对初筛引物进行 PCR 扩增, 最终筛选出 15 对能稳定扩增出清晰条带, 且具特异性和多态性的引物, 分别是 A1、A7、B2、B8、B9、C5、C11、C18、C27、C33、C36、C43、C47、C48 和 C49 (表 2)。

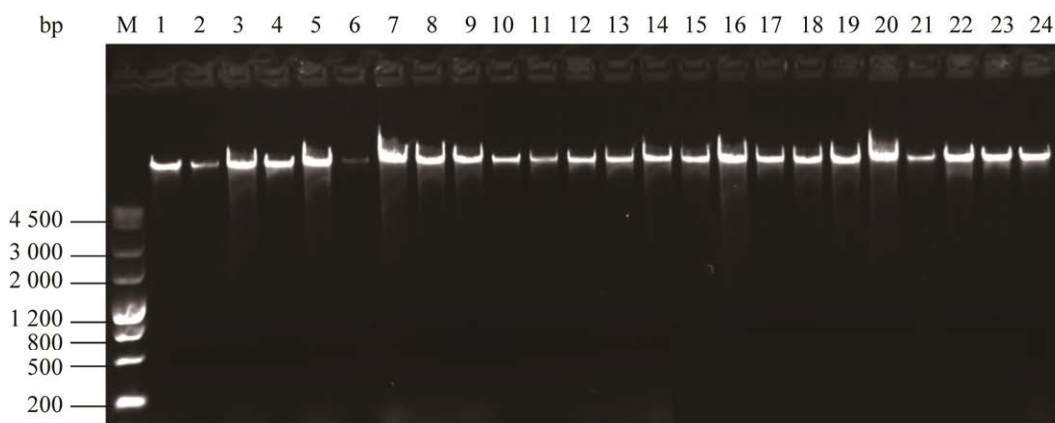


图 1 部分百合资源 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果 M: DNA Marker III; 1-24: 部分百合资源的 DNA

Figure 1 The result of agarose gel electrophoresis detection of partial lily resource DNA. M: DNA Marker III; 1-24: DNA of partial lily resources.

2.2 百合种质资源遗传多样性水平分析

根据 62 份百合资源 SSR 扩增产物的毛细管电泳结果,可以得到各位点上等位基因的片段大小。为更深入地了解百合种质资源之间的遗传差

异,采用 Popgene 32 软件计算 15 对引物的多态性信息(表 3)。以 A1、C11、C36、C49 引物为例,在 4 个百合资源上的扩增产物毛细管电泳图(图 2),可见这 4 对引物有较高的多态性。

表 2 具多态性的 15 对 SSR 引物信息

Table 2 Information of 15 pairs of SSR primers with polymorphism

Locus	Repeat sequence	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Fluorophores
A1	(CGG) ₄ (GGA) ₄	GTGTCTGAAGGGTGCAAATG	GTCATCTAGCTCGTGAGCCC	FAM
A7	(TA) ₅	TTCTAGCTAAAAACAAACCAACCC	CTAGCAATGTGGGTGTTAAACTTG	FAM
B2	(AACCT) ₆	CTCCTTCCCCAGAAAACCA	TGACTAAAATGAAGAGGACGG	FAM
B8	(CCG) ₃	GATCCGAAGGACCCGTTAAG	AACAACCTACAGGGCGAGGGT	FAM
B9	(GGC) ₃	GAAGAGCTCCGCCAGTTG	TTCCGATCCCCATCATTGC	FAM
C5	(TCC) ₅	GAGGCTTCTAATAGCCGCTTAAC	TTGATGAGTCTCCTGACGAAGAT	HEX
C11	(CTG) ₄	CACAATCTCTGCTACCAGAACAAA	TATCCCGTTATCCTTGAGATAGGA	HEX
C18	(CGCCGA) ₃	GGGTAAGTGCTCTGTAAAGGATTG	TATATCTCAACAGATCCCCATTCA	HEX
C27	(CCG) ₄	ATTAGAAGAATACGATGAATCCGC	GTAGGGAAAGACAGGAGAGTGTTC	ROX
C33	(CAG) ₆	GTCTTTAAACCTCAGGCAACAAGT	AGGACCTTGAACATATGTCTGTGA	ROX
C36	(CGC) ₅	TTTTTATCTCCTCGAGACTGATCC	ATCTTTCTCTGCTGGTTCTCAATT	ROX
C43	(GGC) ₅	GAGATCGATTAGGGTTTTTCGACTA	ATCGTGATCAACCCCTTCTG	ROX
C47	(TCCTCG) ₃ (TCC) ₇	GTCTCTCCTTCCCCATACCCTA	AGTACAGCGAGGATCCGTACAT	TAMRA
C48	(CT) ₆	TTCGCATTTACTCTGAATCAAAAA	TTTCTCTCTCCTCTCTCACTCCTC	TAMRA
C49	(ATGGG) ₄	ATAAGTGGTGGTGGAAATCATTCT	TCAGATCTCCAATACTGCTCTGTC	TAMRA

表 3 SSR 位点多态性信息

Table 3 Polymorphism information of SSR loci

Locus	N_a	N_e	H_o	H_e	I	PIC	H
A1	6	1.564 1	0.082 0	0.360 7	0.689 2	0.343 0	0.360 7
A7	6	2.218 8	0.233 3	0.549 3	1.091 7	0.540 1	0.549 3
B2	14	3.842 0	0.114 8	0.739 7	1.799 3	0.722 1	0.739 7
B8	12	4.690 6	0.150 0	0.786 8	1.830 3	0.773 8	0.786 8
B9	10	4.454 2	0.322 6	0.775 5	1.654 3	0.739 7	0.775 5
C5	5	2.979 8	0.080 6	0.664 4	1.262 8	0.612 6	0.664 4
C11	8	3.766 8	0.129 0	0.734 5	1.515 5	0.689 6	0.734 5
C18	13	4.925 3	0.230 8	0.797 0	1.870 8	0.809 5	0.797 0
C27	5	1.657 5	0.000 0	0.396 7	0.742 4	0.392 4	0.396 7
C33	12	4.826 1	0.629 0	0.792 8	1.957 1	0.774 8	0.792 8
C36	16	5.519 0	0.403 2	0.818 8	2.102 9	0.801 5	0.818 8
C43	19	8.107 9	0.326 9	0.876 7	2.439 1	0.877 5	0.876 7
C47	14	6.306 8	0.442 6	0.841 4	2.136 6	0.830 6	0.841 4
C48	11	5.763 1	0.209 7	0.826 5	1.902 5	0.803 1	0.826 5
C49	6	1.819 7	0.067 8	0.450 4	0.929 5	0.471 4	0.450 4
Mean	10.466 7	4.162 8	0.228 2	0.694 1	1.594 9	0.678 8	0.694 1

N_a : Number of alleles per locus; N_e : Effective number of allele; H_o : Observed heterozygosity; H_e : Expected heterozygosity; I : Shannon's information index; PIC: Polymorphism information content; H : Nei's diversity index.

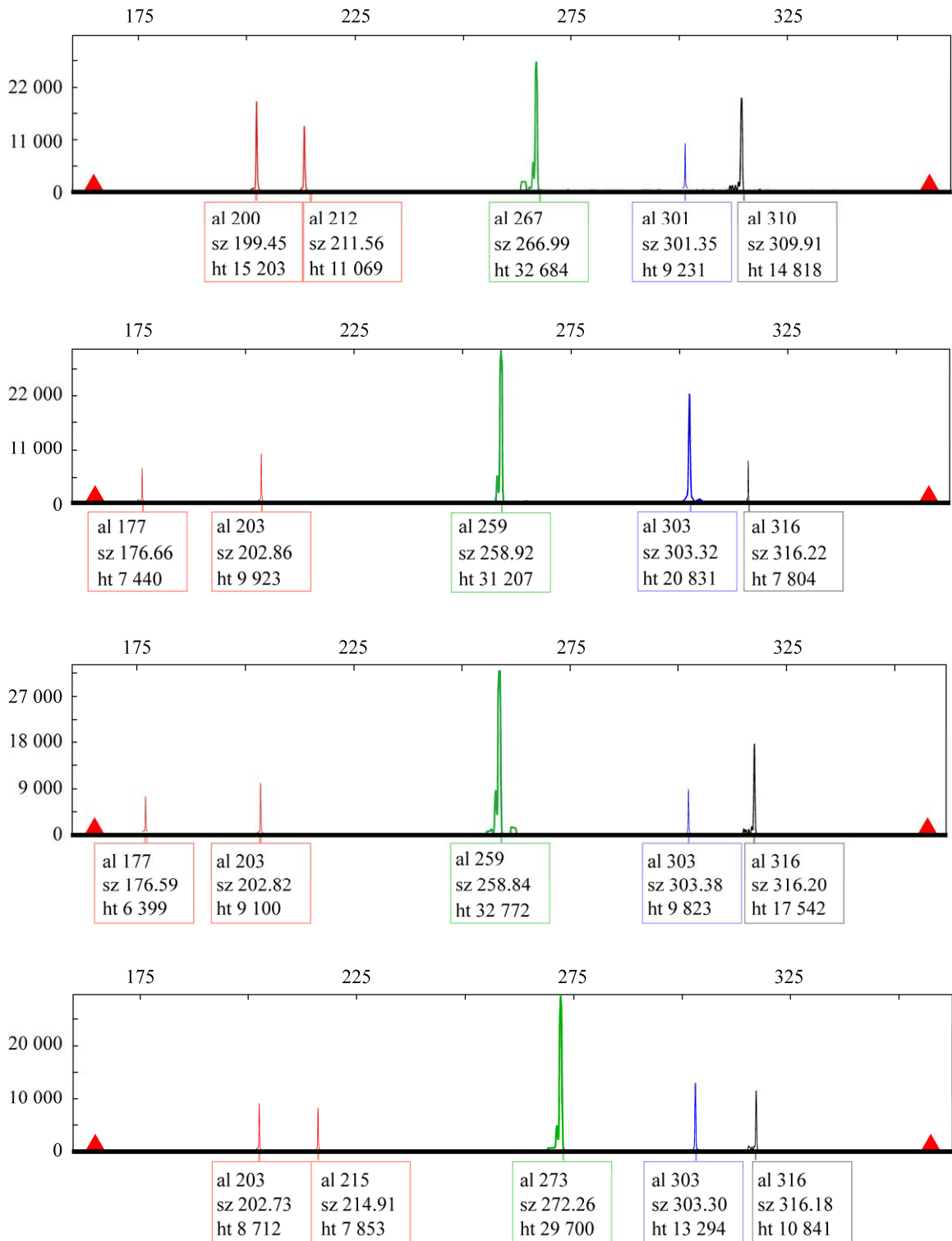


图 2 引物 A1、C11、C36、C49 在不同样品中的毛细管电泳图 Tamra 黑色: C49; Rox 红色: C36; Hex 绿色: C11; Fam 蓝色: A1

Figure 2 Capillary electrophoresis patterns of primers A1, C11, C36, and C49 in different samples. Tamra black: C49; Rox red: C36; Hex green: C11; Fam blue: A1.

2.3 百合种质资源亲缘关系分析

2.3.1 聚类分析

基于 Nei's 的遗传距离评估方法,采用聚类分析软件 MEGA 7.0 的 UPGMA 算法对 62 份百合资源进行聚类分析,构建树状聚类图。从结果来看,通过使用 15 对 SSR 引物可将 62 份百合资源进行有效区分(图 3)。为了后续更好地比较不同组群间的差异,按此可将 62 个样品划分为 5 个类群(图 3),第 I 类(图 3 中浅绿所示)是最大的类群,有 34 份材料,占全部供试材料的 54.8%,包含来自云南的 10 份、吉林的 9 份、甘肃的 5 份、江苏的 3 份、浙江的 2 份、安徽的 2 份和河南的 3 份,地理来源较为广泛。第 I 类群可将其再分为 4 个亚群,第 1 亚群有龙东卷丹百合(JL-jd1)、太湖百合(ZJ-jd1)、宜兴百合(JS-jd3)、漫水河百合(AH-jd)、浙江百合(ZJ-jd2)、东北甜百合(JL-dbt)、山百合(JL-db)、长白山甜百合(JL-jd3)、山丹百合(HN-sd)以及 7 份野生百合资源;第 2 亚群有松叶百合(HN-sy)、崆峒百合(GS-lz3)、兰州百合(GS-lz1)、牡丹头(GS-lz2)以及 11 份野生百合资源;第 3 亚群包含有斑百合(JL-yb)、兴安轮叶百合(JL-jd5);第 4 亚群包含毛百合(JL-m)。

第 II 类(图 3 中黄色所示)有 10 份材料,包含来自安徽的 5 份、福建的 2 份、云南的 1 份、山东的 1 份、河南的 1 份,其中有蓬莱百合(SD-pl)、野百合(YN-jd9)以及 8 份野生百合资源;第 III 类(图 3 中红色所示)有 9 份材料,其中 8 份来自于云南,1 份来自于山东,包括青岛百合(SD-qd)、紫花滇百合(YN-zhd)、玫红百合(YN-mh)、大理百合(YN-dl)、黄绿滇百合(YN-hld)、白花滇百合(YN-bhd)、粉花滇百合(YN-fhd)、墨江百合(YN-mj)和开瓣豹子(YN-kbbz),第 III 类群主要聚集滇百合变种;第 IV 类(图 3 中紫色所示)有 8 份材料,百合种质来

自于云南、湖北、陕西,包含了宜昌百合(HB-yc)、淡黄花百合(YN-dhh)、尖被百合(YN-jb)以及 4 份野生百合;第 V 类(图 3 中蓝色所示)有 1 份材料,来自于安徽黄山徽州区,跟其他资源距离最远,该资源还需要进一步的研究确定。

聚类分析结果表明,来源地相同的百合资源并不完全聚类于同一类群,如来自于安徽、河南、山东和云南的百合种质分布于不同的类群中。同种类的百合聚集于同一分支,如龙东卷丹百合、太湖百合、漫水河百合和宜兴百合等均为卷丹百合聚集于第 I 类群的第 1 亚群中。通过聚类分析可以看出不同种类百合的亲缘关系远近,卷丹、山丹、兰州百合、有斑百合和毛百合等亲缘较近,而这些种质资源与青岛百合、野百合、滇百合、宜昌百合和淡黄花百合等亲缘关系较远。

2.3.2 主成分分析

为了更好地分析百合种质资源间的遗传关系,采用 GenAlEx 6.502 软件对供试材料的 SSR 分子标记检测结果进行了主成分分析,以第 1 主成分和第 2 主成分作为二维坐标系构建二维主成分分析图,对供试材料间亲缘关系进行比较分析(图 4),根据供试材料在图中的分布分为 3 个类群。主成分 1 解释率为 16.02%,主成分 2 解释率为 11.47%。

第 I 类群包含最多的供试材料,41 份种质在图中的分布比较广泛,出现在所有象限中,尤其是在第 1 象限和第 2 象限中分布相对集中,其中包括聚类分析第 IV 类群的 8 份种质、第 III 类群的 9 份种质以及第 I 类群的 24 份种质。第 II 类群包括 11 份种质,主要分布于第 3 象限,涵盖了聚类分析的第 II 和第 V 类群的全部种质。第 III 类群主要分布于第 4 象限,共聚集 10 份种质,包含

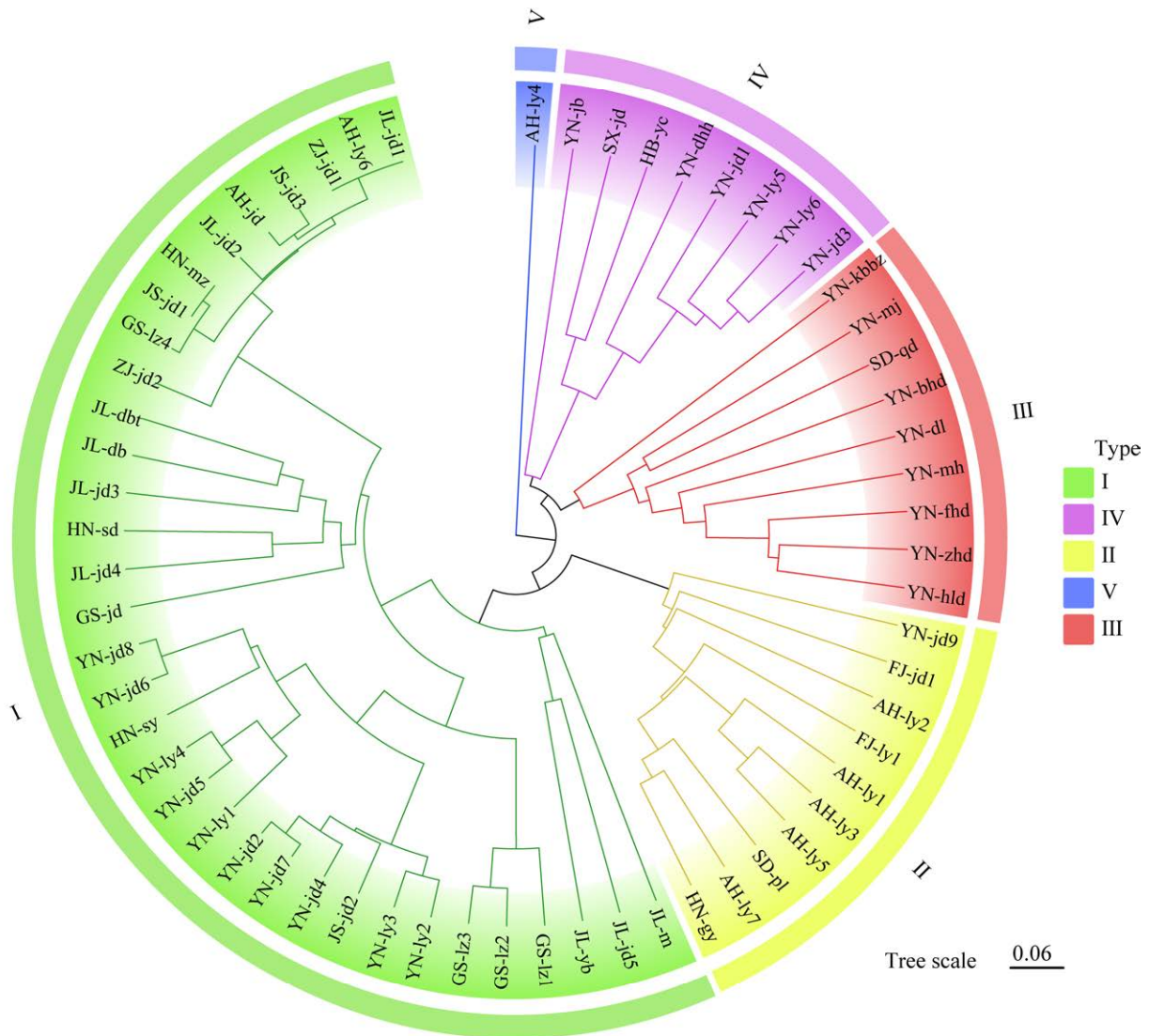


图3 基于遗传距离的62份百合资源的UPGMA聚类分析

Figure 3 Clustering dendrogram of 62 lily germplasm resources using UPGMA method based on genetic distance.

聚类分析类群I的10份种质。

主成分分析能够直观反映出供试材料间的亲缘关系^[15], 根据二维图可以看出62份种质在各个象限均有分布, 表明供试材料遗传多样性较为丰富, 拥有广阔的遗传背景, 其中聚集的百合种质资源表明其遗传背景相似, 亲缘关系较近。

2.4 百合种质资源群体结构分析

利用Structure 2.3.4软件对62份百合种质资源进行群体结构分析, 将Mean Ln P(K)和Delta K设为纵坐标, K值(K=2-8)为横坐标, 制作双y轴图(图5)。Mean Ln P(K)随着K值的增加而不断变化, 在K=4、K=8处均有峰值。Delta K随K值不断变化, 当K=4时出现明显峰值可确定为最佳分类数,

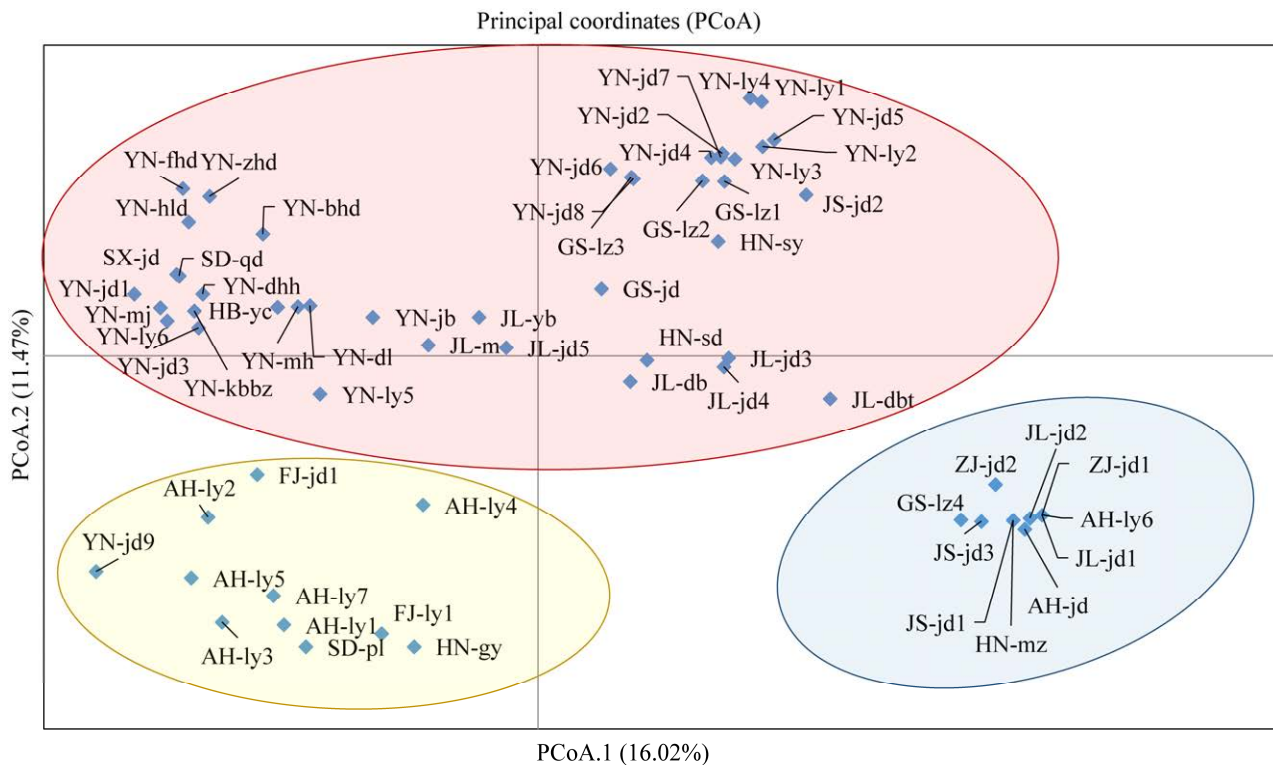


图 4 62 份百合种质资源 SSR 标记主成分分析的二维散点图

Figure 4 Two-dimensional scatter diagram of principal component analysis of SSR markers in 62 lily germplasm resources.

表明 62 份百合种质资源可分为 4 种类群, 计作 G1、G2、G3、G4。对 62 份供试材料的所属种群概率分布 Q 值进行统计(表 4), 统计结果显示, 在 62 份材料中有 56 份材料的 $Q \geq 0.5$, 占比为 90.32%, 将其划分到相应的 4 个种群中, 说明大部分种质个体遗传成分相对单一; 进一步结合 Q 值统计和种群结构图(图 6)可知, G1 种群(图 6 中红色所示)包括 11 份种质, G2 种群(图 6 中绿色所示)包括 6 份种质, G3 种群(图 6 中蓝色所示)包括 26 份种质, G4 种群(图 6 中黄色所示)包括 13 份种质。其余 6 份材料(19, 21, 25, 26, 14, 24)的 $Q < 0.5$, 占比为 9.68%, 来源于吉林、甘肃、河南等地, 其中 4 份材料来自于吉林。由于这 6 份材料具有复杂的混合来源, 无法将其划分到上述的种群中, 因此将这 6 份材料定为混合种群 G5。

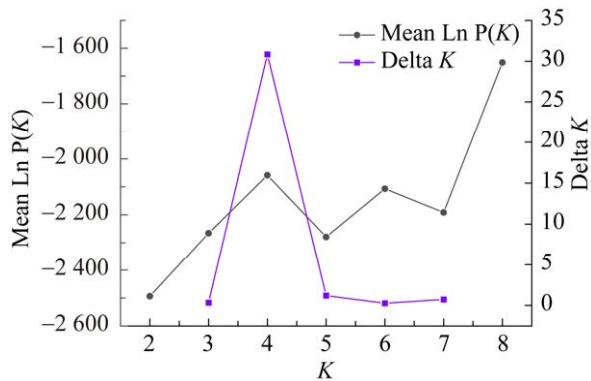


图 5 利用 STRUCTURE 软件检测百合种质资源最佳群体类群数目(K)

Figure 5 Detection of the number of optimal population taxa (K) of lily germplasm resources using STRUCTURE software.

表 4 62 份百合种质资源种群结构

Table 4 Population structure of 62 lily germplasm resources

Number	Q probability distribution values				Population	Number	Q probability distribution values				Population
	Q1	Q2	Q3	Q4			Q1	Q2	Q3	Q4	
1	0.994 0	0.002 0	0.002 0	0.002 0	G1	32	0.002 0	0.335 0	0.660 0	0.003 0	G3
2	0.962 3	0.003 7	0.007 3	0.026 7	G1	33	0.987 3	0.002 3	0.002 7	0.007 7	G1
3	0.993 3	0.002 0	0.002 0	0.002 7	G1	34	0.004 7	0.002 7	0.002 0	0.990 7	G4
4	0.993 0	0.002 3	0.002 3	0.002 3	G1	35	0.005 3	0.562 3	0.026 3	0.406 0	G2
5	0.002 0	0.333 0	0.663 3	0.001 7	G3	36	0.002 0	0.002 0	0.986 7	0.009 3	G3
6	0.994 0	0.002 0	0.002 0	0.002 0	G1	37	0.002 0	0.056 1	0.939 6	0.002 3	G3
7	0.002 0	0.333 0	0.663 3	0.001 7	G3	38	0.003 0	0.090 7	0.902 0	0.004 3	G3
8	0.975 7	0.002 7	0.003 0	0.018 7	G1	39	0.002 0	0.660 0	0.002 3	0.335 7	G2
9	0.912 7	0.002 0	0.012 7	0.072 7	G1	40	0.002 0	0.002 3	0.993 0	0.002 7	G3
10	0.983 3	0.005 3	0.005 0	0.006 3	G1	41	0.004 3	0.004 0	0.987 7	0.004 0	G3
11	0.002 3	0.002 7	0.990 3	0.004 7	G3	42	0.002 3	0.682 3	0.011 7	0.303 7	G2
12	0.002 3	0.002 7	0.992 3	0.002 7	G3	43	0.002 0	0.660 3	0.002 3	0.335 3	G2
13	0.008 0	0.010 3	0.977 0	0.004 7	G3	44	0.002 0	0.663 3	0.002 0	0.332 7	G2
14	0.299 0	0.010 0	0.266 6	0.424 3	G5	45	0.004 7	0.004 0	0.985 7	0.005 7	G3
15	0.002 3	0.335 7	0.659 0	0.003 0	G3	46	0.002 0	0.015 3	0.980 0	0.002 7	G3
16	0.002 0	0.332 7	0.663 3	0.002 0	G3	47	0.017 3	0.004 0	0.968 3	0.010 3	G3
17	0.925 7	0.019 3	0.051 7	0.003 3	G1	48	0.003 7	0.003 3	0.990 3	0.002 7	G3
18	0.011 7	0.010 0	0.975 0	0.003 3	G3	49	0.011 3	0.002 0	0.982 7	0.004 0	G3
19	0.444 8	0.031 4	0.481 1	0.042 7	G5	50	0.002 3	0.016 0	0.005 3	0.976 3	G4
20	0.006 7	0.340 3	0.004 7	0.648 3	G4	51	0.004 0	0.008 0	0.004 0	0.984 0	G4
21	0.163 2	0.182 8	0.457 4	0.196 5	G5	52	0.012 7	0.003 0	0.004 0	0.980 3	G4
22	0.002 0	0.333 0	0.663 3	0.001 7	G3	53	0.003 3	0.655 3	0.003 0	0.338 3	G2
23	0.002 0	0.331 7	0.664 3	0.002 0	G3	54	0.003 0	0.003 3	0.002 3	0.991 3	G4
24	0.227 9	0.087 4	0.276 7	0.408 0	G5	55	0.014 7	0.002 0	0.077 9	0.905 4	G4
25	0.084 7	0.157 0	0.441 7	0.316 7	G5	56	0.002 3	0.004 0	0.003 0	0.990 7	G4
26	0.211 8	0.122 5	0.404 6	0.261 0	G5	57	0.989 0	0.004 7	0.002 0	0.004 3	G1
27	0.332 0	0.003 7	0.035 0	0.629 3	G4	58	0.008 7	0.003 0	0.002 0	0.986 3	G4
28	0.319 7	0.004 0	0.013 3	0.663 0	G4	59	0.016 0	0.008 3	0.009 0	0.966 7	G4
29	0.310 7	0.009 0	0.008 0	0.672 3	G4	60	0.066 0	0.006 7	0.005 0	0.922 3	G4
30	0.002 0	0.332 3	0.663 7	0.002 0	G3	61	0.002 0	0.333 0	0.663 3	0.001 7	G3
31	0.005 3	0.041 7	0.949 3	0.003 7	G3	62	0.005 7	0.323 3	0.666 0	0.005 0	G3

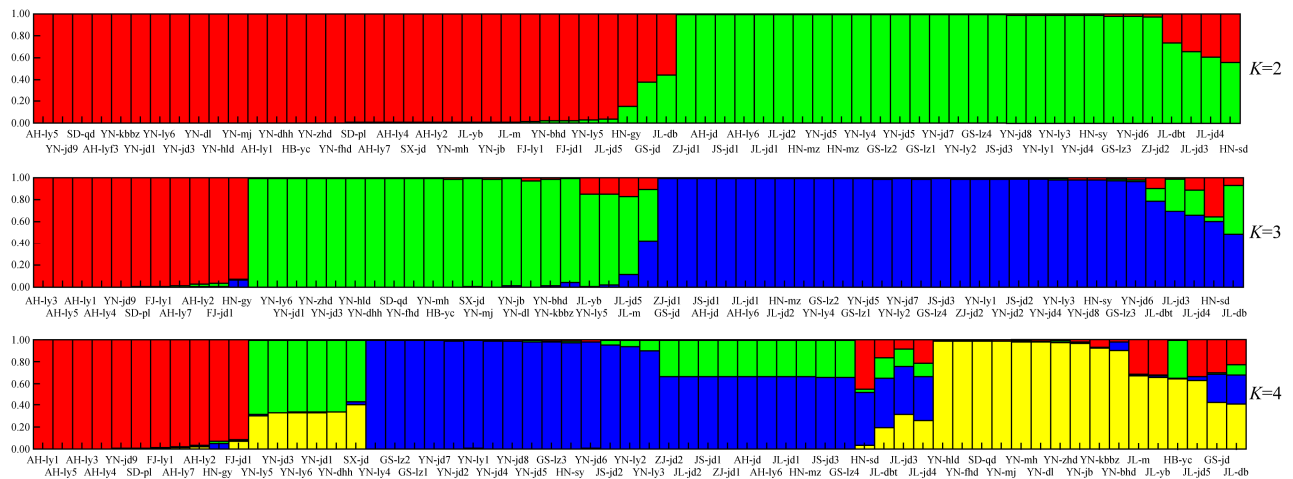


图 6 基于 STRUCTURE (K=2、3、4) 确定的百合种质资源群体遗传结构图

Figure 6 Population genetic structure of lily germplasm resources determined based on STRUCTURE software (K=2, 3, 4).

3 讨论

SSR 标记是共显性标记,其扩增位点具有丰富的多态性,能在分子水平上揭示种质间的遗传多样性^[16]。本研究用 83 对 SSR 引物进行 2 次筛选,最终利用筛选出来的 15 对引物对 62 份百合种质进行了遗传多样性分析,结果发现,15 对引物在 62 份样品中共检测到 157 个等位基因位点,平均每个位点观测等位基因数(N_a)为 10.466 7,高于 SSR 引物来源文献的 7.2、3.45、9.37。本研究获得的 PIC 平均值为 0.678 8 ($PIC > 0.5$),高于戚佳裕^[10]的 PIC 平均值 0.61 及葛亮^[11]SSR 的 PIC 平均值 0.55,低于周艳萍^[12]的 PIC 平均值 0.78,具有高 PIC 值的 SSR 标记有利于对位点多态性进行预估,其中,12 对引物具有高度多态性,3 对引物具有中度多态性,百合 SSR 引物总体表现出了较高的多态性,与前人的研究结果一致。Shannon 信息指数(I)的变化范围为 0.689 2–2.439 1,均值为 1.594 9,高于戚佳裕^[10]基于 43 份百合材料的 1.37 及周艳萍^[12]基于 240 份百合材料的 1.29,表明供试百合材料遗传多样性比较丰富。

平均期望杂合度可以反映群体的遗传一致性程度,本研究中 62 份百合种质的期望杂合度平均值为 0.694 1,遗传一致性低,有丰富的遗传多样性。供试材料间的遗传距离可以直观反映出种质间的遗传多样性,刘冬云^[17]利用 SSR 分子标记分析山丹百合居群遗传多样性,结果表明野生山丹百合种质可以分为 5 类,在一定遗传距离下具有相似性。本研究利用 UPGMA 方法进行聚类分析,将 62 份百合种质分为 5 大类,主成分分析将其分为 3 个类群,结合聚类分析和主成分分析发现各类群存在一定的地理相关性,但来源地相同的百合种质并不会完全聚类于同一类群。同种类的百合聚集于同一分支,如吉林卷

丹百合、太湖百合、漫水河百合、宜兴百合等均作为卷丹百合,在聚类分析中聚集于第 I 类群的第 1 亚群。未被聚集在一起的百合种质说明其亲缘关系较远。

群体结构分析基于划分依据 $Q > 0.5$,将群体划分为 4 个种群和 1 个混合种群。在群体遗传结构图中个体所属种群可以通过观察竖条颜色来确定,且不同的颜色代表来源不同的血统,本研究的群体结构图中,部分竖条有 2–4 种颜色。G3 (图 6 中蓝色区域)中 62、23、30、61、5、7、22、16、32、15 号这 10 份百合种质竖条内有 2 种颜色,且这 10 份种质来源广泛,暗示这些百合种质为适应不同环境可能发生了基因交流,或是不同种群之间发生了杂交。

本研究对 62 份百合种质资源进行遗传多样性分析,发现供试材料具有较高的遗传多样性水平,这些结果为百合种质资源的进一步研究和育种利用提供了一定的理论依据和基因资源。

REFERENCES

- [1] 李玉帆,明军,王良桂,袁素霞,刘春,王莹,梁云,冯慧颖,徐雷锋. 百合基本营养成分和活性物质研究进展[J]. 中国蔬菜, 2012(24): 7-13.
LI YF, MING J, WANG LG, YUAN SX, LIU C, WANG Y, LIANG Y, FENG HY, XU LF. Research progress on basic nutritional and bioactive substances of lily[J]. China Vegetables, 2012(24): 7-13 (in Chinese).
- [2] 缪黎明,王神云,邹明华,李建斌,孔李俊,余小林. 园艺作物核心种质构建的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5): 791-800.
MIAO LM, WANG SY, ZOU MH, LI JB, KONG LJ, YU XL. Review of the studies on core collection for horticultural crops[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(5): 791-800 (in Chinese).
- [3] AVERYANOV L, TANAKA N, NGUYEN K. New species-*Lilium procumbens* and its allies in the flora of Vietnam[J]. Taiwanania, 2016, 61(1): 1-7.
- [4] 杜运鹏. 我国百合属植物资源评价及抗病基因同源序列(RGA)的研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2014.

- DU YP. Collection and evaluation of *Lilium* spp. in China (Liliaceae) and the research on resistance gene analog (RGA)[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2014 (in Chinese).
- [5] 杜方. 百合属的起源、分类及资源多样性[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(4): 68-79.
- Du F. Origin, classification and resource diversity of the genus *Lilium*[J]. Journal of China Agricultural University, 2023, 28(4): 68-79 (in Chinese).
- [6] 周俐宏, 石慧, 杨迎东, 崔玥晗, 杨盼盼, 徐雷锋, 明军. 百合资源抗棉蚜性鉴定及遗传多样性分析[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(6): 24-33.
- ZHOU LH, SHI H, YANG YD, CUI YH, YANG PP, XU LF, MING J. Identification of resistance to *Aphis gossypii* Glover and genetic diversity analysis of lily resources[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2021, 52(6): 24-33 (in Chinese).
- [7] 李介文, 杜云鹏, 贾桂霞, 张冬梅. 我国部分百合野生资源的亲缘关系及其分布特点[J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(10): 74-82.
- LI JW, DU YP, JIA GX, ZHANG DM. Genetic relationship analysis and distribution characteristics of some wild *Lilium* species native to China[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(10): 74-82 (in Chinese).
- [8] DU F, JIANG J, JIA HM, ZHAO XY, WANG WH, GAO QK, MAO WH, WU Y, ZHANG L, GRIERSON D, XIA YP, GAO ZS. Selection of generally applicable SSR markers for evaluation of genetic diversity and identity in *Lilium*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 61: 278-285.
- [9] ALLEN GC, FLORES-VERGARA MA, KRASYNANSKI S, KUMAR S, THOMPSON WF. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. Nature Protocols, 2006, 1: 2320-2325.
- [10] 戚佳裕. 百合转录因子 SSR 分子标记开发及其在杂交子代遗传分析中的应用[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2021.
- QI JY. Development of SSR molecular markers for transcription factors in lily and their application in genetic analysis of hybrid progeny[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [11] 葛亮. 基于转录组信息的百合 SSR 标记开发及种质分子鉴定研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2012.
- GE L. Development of SSR markers based on transcriptome and their application in germplasm identification of *Lilium*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese).
- [12] 周艳萍. 百合遗传多样性和亲缘关系的研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2020.
- ZHOU YP. Studies on genetic diversity and genetic relationship of *Lilium*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [13] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [14] EARL DA, VONHOLDT BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method[J]. Conservation Genetics Resources, 2012, 4(2): 359-361.
- [15] 吕伟, 韩俊梅, 任果香, 文飞, 王若鹏, 刘文萍. 山西芝麻种质资源 SSR 遗传多样性及群体结构分析[J]. 核农学报, 2021, 35(7): 1495-1506.
- LYU W, HAN JM, REN GX, WEN F, WANG RP, LIU WP. Genetic diversity analysis of sesame germplasm resources in Shanxi with SSR markers[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(7): 1495-1506 (in Chinese).
- [16] 梁燕, 韩传明, 孙超, 王翠香, 鲁世殿, 闵旭峰. 基于 SSR 标记的核桃种质资源遗传多样性与遗传结构分析[J]. 北方园艺, 2022(9): 47-54.
- LIANG Y, HAN CM, SUN C, WANG CX, LU SD, MIN XF. Genetic diversity and genetic structure analysis of walnut germplasm resources based on SSR markers[J]. Northern Horticulture, 2022(9): 47-54 (in Chinese).
- [17] 刘冬云. 野生山丹种质资源遗传多样性及利用研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2011.
- LIU DY. Study on genetic diversity and utilization of wild Shandan germplasm resources[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2011 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)