

不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析

卢家仕^{1,2,3}, 卜朝阳^{1*}, 吕维莉², 苏建睦³, 黄昌艳¹, 李春牛¹

1. 广西农业科学院花卉研究所, 广西 南宁 530007

2. 广西农业科学院 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西 南宁 530007

3. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004

摘要: 目的 对 24 份不同产地石斛属样品的遗传多样性和亲缘关系进行分析。方法 采用 ISSR 分子标记技术和非加权平均距离法 (UPGMA) 对 24 份石斛属样品进行遗传多样性和聚类分析。结果 从 100 条 ISSR 引物中共筛选出 6 条多态性稳定、清晰的引物, 24 份石斛样品共扩增出 847 个 DNA 片段, 平均每个引物扩增出 141 个 DNA 片段, 其多态性为 100%。结论 24 份不同产地石斛样品被划分为 6 个类群, 遗传多样性非常丰富。

关键词: 石斛属; 种质资源; ISSR 分子标记; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0-0

ISSR analysis on genetic diversity of germplasm resources in *Dendrobium* SW. from different habitats

LU Jia-shi^{1,2,3}, BU Zhao-yang¹, LV Wei-li², SU Jian-mu³, HUANG Chang-yan¹, LI Chun-niu¹

1. Flower Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

3. College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity and genetic relationship of 24 plant samples in *Dendrobium* SW. from different habitats. **Methods** The molecular marker technique of inter-simple sequence repeat (ISSR) and unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) were used to study the genetic diversity and cluster analysis of 24 samples. **Results** Six primers with stable and clear diversity were sieved from 100 ISSR primers. DNA fragments (847) were amplified from 24 samples, and 141 DNA fragments were amplified from each primer in average, with 100% of polymorphic bands. **Conclusion** The 24 samples in plants of *Dendrobium* SW. from different habitats are divided into six groups and the genetic diversity is very abundant.

Key words: *Dendrobium* SW.; germplasm resources; ISSR molecular marker; genetic diversity; genetic relationship

石斛属 *Dendrobium* SW. 植物是兰科 (Orchidaceae) 多年生草本植物, 我国有 76 种 2 变种, 具有药用价值和观赏价值^[1-2]。药用石斛有 39 种, 有润肺生津、活血化瘀、治疗心血管疾病等功效^[3-4]。药用石斛除来自石斛属植物外, 石仙桃属、金石斛属和石豆兰属的植物也被当作石斛使用^[5]。仅从茎、叶等形态上无法完全区别石斛^[6-9]。随着分子标记的发展, RFLP、AFLP、RAPD、AP-PCR、SRAP 和 SSR 标记已用于石斛资源研究和评价^[10-20], 但存在缺点, 如 RFLP 需同位素放射; AFLP

需酶切和连接; RAPD 和 AP-PCR 稳定性、重复性不够好等。

ISSR 是在 1994 年建立的一种分子标记技术^[21], 具有操作简单、多态性和重复性好等优点, 已被广泛应用于遗传多样性、亲缘关系等研究。而用 ISSR 研究石斛的报道较少, 多数是研究少数品种或几个居群间的鉴别^[22-27]。本研究用 ISSR 从品种间的居群间分析 24 份石斛样品的遗传多样性和亲缘关系, 并结合传统分类分析, 从而更好地保护和利用石斛资源, 因此具有重要的研究意义。

收稿日期: 2012-07-08

基金项目: 农业部热带作物种质资源保护项目 (12RZZY-39); 广西科技攻关项目 (桂科攻 1222009-4); 广西农科院项目 (201014, 2011YZ11, 2012GW03)

作者简介: 卢家仕 (1976—), 男, 广西灵山人, 助理研究员, 博士研究生, 从事植物生理及分子生物学研究。E-mail: lujiashi@126.com

*通讯作者 卜朝阳 Tel: (0771)3276924 E-mail: yangnv@126.com

1 材料与仪器

1.1 材料

石斛样品主要从云南的文山、河口、西双版纳，海南三亚及广西的玉林、桂平、乐业等地方采集，统一种植于广西农业科学院花卉研究所玻璃温室资源圃里。材料的品种及来源详见表 1。供试材料由广西农业科学院花卉研究所卜朝阳研究员和广西中医药研究院黄云峰副研究员共同鉴定。

1.2 仪器

Grant GR150 水浴锅；Eppendorf Bio Photometer RNA/DNA 浓度电度测定仪；Biometra TProfessional PCR 仪；Eppendorf MixMate PBC—11 5353 混匀仪；MIKRO 220R 2205 冷冻离心机；BIO—RAD EN 61010—1 电泳仪；北京市六一仪器厂生产的DYCP—31DN 型电泳槽；Firereader XS D—56—26.M 凝胶成像系统。

表 1 材料来源表

Table 1 Sources of materials

编号	种名	来源	编号	种名	来源
1	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	广西玉林	13	短棒石斛 <i>D. capillipes</i>	云南西双版纳
2	铁皮石斛	广西桂平	14	鼓槌石斛	云南文山
3	铁皮石斛	云南河口	15	钩状石斛 <i>D. aduncum</i>	云南河口
4	铁皮石斛	云南文山	16	细叶石斛 <i>D. hancockii</i>	云南文山
5	铁皮石斛	云南河口	17	球花石斛 <i>D. thyrsiflorum</i>	云南文山
6	广东石斛 <i>D. wilsonii</i>	广西乐业	18	滇桂石斛 <i>D. guangxiense</i>	云南西双版纳
7	铜皮石斛 <i>D. moniliforme</i>	云南文山	19	蝴蝶石斛 <i>D. phalaenopsis</i>	海南三亚
8	金钗石斛 <i>D. nobile</i>	云南河口	20	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	云南文山
9	金钗石斛	云南文山	21	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	云南文山
10	金钗石斛	云南文山	22	美花石斛 <i>D. loddigesii</i>	云南文山
11	金钗石斛	云南文山	23	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	云南文山
12	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	云南西双版纳	24	铁皮石斛	云南河口

2 方法

2.1 总 DNA 的提取

取新鲜叶片参考CTAB法^[28]并加以改进提取植物总DNA。方法改进如下：在研钵中加少量的PVP，剪取约 0.5 g 叶片加适量液氮迅速研磨成粉末；将粉末转入 2.0 mL 离心管中，加入经 65 °C 预热的 800 μL 2% CTAB 提取缓冲液混匀；在 65 °C 下温育 40 min，期间每隔 10 min 摇动 1 次；取出离心管冷却到室温，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液到新离心管中，加入等体积氯仿-异戊醇（24：1），翻转混匀；10 000 r/min 离心 10 min，取上清液到新离心管中；再加入等体积的酚-氯仿-异戊醇（25：24：1）混匀；10 000 r/min 离心 10 min，取上清液于新离心管；加 2/3 体积经-20 °C 预冷的异丙醇沉淀DNA；10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀用 70% 乙醇分别洗涤 2 次。室温风干后DNA溶于 100 μL 1 倍的TE中，加入 1 μL 10 mg/mL RNase 溶液，37 °C 处理 1 h 后，用 1% 琼脂糖电泳检测DNA的质量，用紫外分光光度法检测DNA的纯度和质量浓度，质量浓度调整为 30 ng/μL

用于ISSR分子标记技术分析，-20 °C 贮存备用。

2.2 引物的合成与筛选

ISSR 引物的合成根据加拿大哥伦比亚大学（University of British Columbia, UBC）公布的引物序列（http://www.biotech.ubc.ca/ser_vices/naps/primers.html），由上海杰瑞生物工程有限公司合成，共 100 条，从中筛选出 6 条扩增产物条带清晰、多态性较好的引物用于 24 份石斛种质资源遗传多样性分析。

2.3 ISSR 反应体系及程序

参考ISSR反应体系^[29]稍加改进：采用 20 μL PCR 反应体系，包含 2.0 μL 10× 缓冲液，0.4 μL dNTPs（10 mmol/L），0.4 μL Taq DNA Polymerase（2.5 U/μL），1 μL 引物，1 μL（30 ng/μL）DNA 模板，其余用超纯水补足至 20 μL。扩增程序：94 °C 预变性 7 min；接下来 40 个循环（94 °C、45 s，53 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 2 min）；72 °C 延伸 10 min；最终贮存于 4 °C。PCR 扩增在 Biometra TProfessional PCR 仪上完成。ISSR 扩增产物以 2 000 bp Ladder Plus Marker 为相对分子质量标记，每个产物加入 3.3

μL的有核酸染料的6×缓冲液充分混匀,取8 μL在2.0%琼脂糖凝胶上电泳,电泳缓冲液为1×TAE,电压为120 V,电泳45 min后在凝胶成像系统上观察、拍照,检测ISSR-PCR条带。

2.4 数据处理

ISSR-PCR 扩增产物用 Word 2003 按条带的有无分别统计条带。有条带记为“1”,无条带记为“0”。把得到的“0,1”分布矩阵导入软件 NTsys 2.10 e,用 DICE 法计算遗传相似系数,用 UPGMA 法进行聚类分析,构建树状聚类图。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取结果

基因组DNA经1%的琼脂糖电泳检测,结果显示,各个泳道均出现一条清晰的DNA条带,无蛋白质和RNA污染,无拖尾现象(图1)。紫外分光光度法检测所有DNA的 A_{260}/A_{280} 均在1.78~1.83,质量浓度在280~340 ng/μL,说明改良的CTAB法提取的DNA纯度较高,质量浓度较均匀,符合实验的要求。

3.2 引物筛选扩增结果

本实验用100条ISSR引物对3份石斛属植物

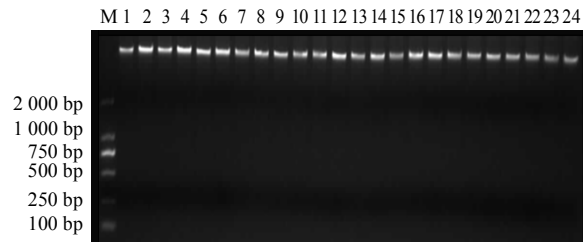


图1 CTAB法提取的24份石斛样品的DNA电泳图

Fig. 1 DNA electrophoresis of 24 germplasm resources in *Dendrobium* SW. by CTAB method

材料基因组DNA进行预扩增来筛选引物,获得6条扩增效果较理想的引物(表2)。用这6条引物对所有24份材料进行扩增检测。结果显示,扩增出稳定的多态性条带共847条,每个引物在石斛的基因组DNA中扩增出103~186个DNA片段,平均每个引物扩增出141.17条DNA片段。其多态性为100%,说明石斛属植物间的异质性较高,遗传基础差异较大,石斛的遗传多样性非常丰富。其中引物UBC900扩增的条带最多(186条),图2、3分别是引物UBC840和UBC899的扩增结果。

3.3 遗传相似系数与聚类结果分析

用6对引物组合扩增的847个ISSR标记数据,

表2 6个ISSR引物的扩增结果

Table 2 Amplification of six ISSR primers

引物编号	引物序列	总扩增位点 / 个	多态性扩增位点 / 个	多态性比率 / %
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	103	103	100
UBC 827	ACACACACACACACACG	108	108	100
UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	170	170	100
UBC 864	ATGATGATGATGATGATG	104	104	100
UBC 899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	176	176	100
UBC 900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	186	186	100
共计		847	847	600
平均		141.17	141.17	100

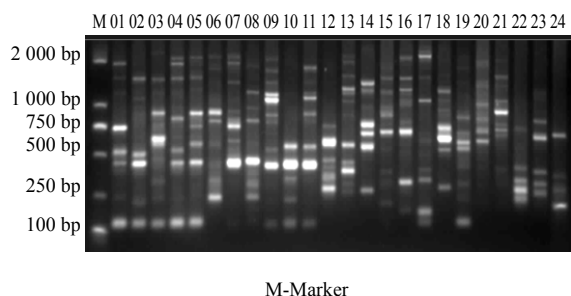


图2 UBC 840 引物对24份石斛样品的ISSR扩增结果
Fig. 2 ISSR amplification of 24 plant samples from *Dendrobium* SW. using primer UBC 840

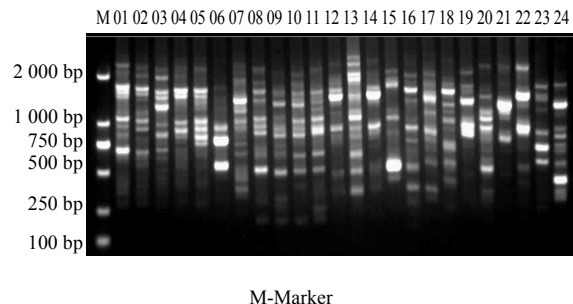


图3 UBC899引物对24份石斛样品的ISSR扩增结果
Fig. 3 ISSR amplification of 24 plant samples from *Dendrobium* SW. using primer UBC899

用 NtSYS 2.10e 软件计算各个品种资源的遗传相似系数，利用 UPGMA 聚类分析方法构建 24 份石斛属植物的亲缘关系系统树，见图 4。由图可见，6 对 ISSR 引物遗传在相似系数 0.119~0.545 能将 24 份石斛属材料完全分开。在相似系数 0.196 处，24 份石斛属品种资源被分为 6 个类群。每个类群又分为不同的小组。云南文山的流苏石斛单独成为一类群，与其他 5 个类群的相似系数最远，为 0.119；云南文山铁皮石斛（4 号）与云南河口铁皮石斛（5 号）相似系数最近，为 0.545。

第 I 类群包括 7 个种，由 6 种铁皮石斛和 1 种铜皮石斛组成。第 II 类群包括 4 个种，都由金钗石斛组成。第 III 类群包括 3 个种，由 2 个鼓槌石斛和 1 个细茎石斛组成。第 IV 类群包括 4 个种，由广东石斛、钩状石斛、滇桂石斛和蝴蝶石斛组成。第 V 类群包括 5 个种，由球花石斛、美花石斛、细叶石斛、短棒石斛和束花石斛组成。第 VI 类群单独由云南文山的流苏石斛组成。

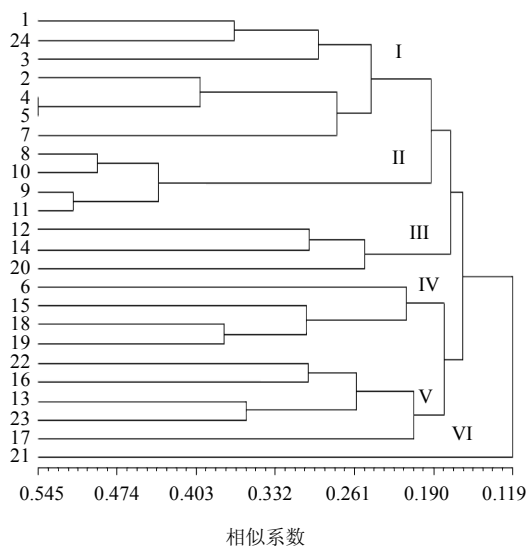


图 4 24 份石斛样品的 UPGMA 聚类树状图

Fig. 4 UPGMA dendrogram of 24 samples in *Dendrobium* SW.

4 讨论

在传统分类中，吉占和^[30]曾把我国石斛属的 57 个种划分为 9 个组，分别是剑叶组、圆柱叶组、禾叶组、心叶组、基肿石斛组、草叶组、黑毛组、顶叶组和大花石斛组。《中国植物志》^[31]把我国石斛属的 74 个种划分为 12 个组，分别是禾叶组、顶叶组、石斛组、心叶组、瘦轴组、叉唇组、距囊组、黑毛组、草叶组、基肿组、剑叶组和圆柱叶组。

如图 4 所示，第 I 类群中，6 个铁皮石斛都聚

合为一类，且亲缘关系较近，尤其是云南文山、河口的两个铁皮石斛亲缘关系最近；第 II 类群 4 个种都是云南河口、文山的金钗石斛，两两聚合后合为一类群；第 I、II 类群聚为一组，都属于石斛组，这与传统的分类一致。第 III 类群 3 个种中，2 个是鼓槌石斛，属于顶叶组，1 个是细茎石斛，属于石斛组，这组聚合与传统的分类不一致。I、II、III 类群聚为一大组。

第 IV 类群 4 个种中，滇桂石斛、蝴蝶石斛、钩状石斛与广东石斛，石斛组与瘦轴组的钩状石斛聚为一类，这与传统的分类不一致，有待进一步的研究。第 V 类群 5 个种中，4 个属于石斛组，两两聚合后再与属于顶叶组的球花石斛聚在一起，这点与传统分类不一致。第 IV、V 类群聚合到一起，然后与 I、II、III 类群聚到一起，成为一大类群。最后与第 VI 类群组成总的聚类树状图。结果说明，亲缘关系的远近与石斛的来源相关性不大，但与品种相关性较大。如第 I 类群 6 个铁皮石斛中，3 个来自云南河口、1 个来自云南文山 1 个、2 个来自广西，它们并没有单独按来源地聚类分组，而有一定的交叉。第 II 类群 4 个金钗石斛较好地聚为一类，但并不是完全按来源地分类，先是两个文山的先聚合，再是文山的和河口的聚合，最后 4 个再聚合到一起。

ISSR 分子标记的聚类分析结果与传统的分类方法基本一致，但有少数几个存在一定的差异，这可能跟石斛属长期异花授粉和自然选择及遗传背景有关。本研究用 ISSR 分子标记分析 24 份石斛属品种资源的遗传多样性，有较多的引物扩增不出条带，如 UBC862、UBC886；有些引物扩增条带不多不清晰，如 UBC812、UBC825；有的引物部分扩增出条带，但少数几个没有出条带，如 UBC836、UBC899；精选 6 条引物（表 2）扩增出 847 条 DNA 片段，其多态性为 100%。原因是筛选的引物多态性好，品种间的基因组位点多，遗传差异较大，具有很高的遗传多样性，说明我国的石斛属品种资源非常丰富。有研究认为，SSR 序列的进化率比大多数其他类型的 DNA 都高，容易出现高度变异，因此 ISSR 标记可检测出基因组许多位点的差异而表现出较高的多态性^[32]。

我国的石斛种质资源非常丰富，但因其药用价值较高、观赏性强、社会需求量大，加上石斛的繁殖力底且要求的生态环境较高，人类过度的采挖，导致很多名贵的石斛资源濒临灭绝，如野生铁皮石

斛。现在很多的石斛种质资源得到收集,通过传统的形态标记,细胞学研究结合现在的 ISSR 等分子标记,把同名异种、同种异名或不同地方来源的品种资源进行客观的种质鉴定、弄清它们之间的遗传变化及亲缘关系,构建相应遗传图谱并进行相应的分子辅助育种,从而更好地指导科研和实践生产工作,更好地开发、利用和保护我国石斛属植物种质资源。

致谢:广西中医药研究院黄云峰老师鉴定部分样本。

参考文献

- [1] 陈心启. 中国兰科植物彩色图鉴 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
- [2] 王雁, 李振坚, 彭红明. 石斛兰——资源生产应用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
- [3] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [4] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 复旦大学出版社, 2001.
- [5] 刘静, 何涛, 淳泽. 分子标记技术在石斛属植物中的应用研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 855-862.
- [6] 张智, 霍立业. 霍山石斛营养器官的解剖结构 [J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22(3): 301-304.
- [7] 黎明, 苏金乐, 武荣花, 等. 铁皮石斛营养器官的解剖学研究 [J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(2): 125-129.
- [8] 唐树梅, 陈雪华, 饶义平. 养分胁迫条件下石斛兰叶片表面结构的电镜观察 [J]. 电子显微学报, 1999, 18(5): 503-506.
- [9] 管燕红, 李海涛, 王云强, 等. 齿瓣石斛和铁皮石斛的显微比较 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 1869-1871.
- [10] 张婷, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究 [J]. 药学学报, 2005, 40(8): 728-733.
- [11] 虞泓, 和锐, 倪念春, 等. 石斛属 4 种植物的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 808-810.
- [12] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 13 种石斛属植物遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(3): 205-210.
- [13] 白音, 包英华, 王全文, 等. 国产石斛属植物亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1569-1574.
- [14] 丁鸽, 丁小余, 沈洁, 等. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别 [J]. 药学学报, 2005, 40(11): 1028-1032.
- [15] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 558-592.
- [16] 金波, 蒋福升, 施宏, 等. 石斛属野生种质资源的遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1700-1702.
- [17] 罗远华, 余志金, 莫光武, 等. 石斛兰品种遗传变异的 RAPD 检测 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(25): 11889-11891.
- [18] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 石斛属几种植物遗传关系的 SRAP 和 RAPD 比较分析 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 627-631.
- [19] 金波, 蒋福升, 余静, 等. 铁皮石斛的 SCAR 标记研究 [J]. 中药材, 2010, 33(3): 343-346.
- [20] 谢明璐, 侯北伟, 韩丽, 等. 珍稀铁皮石斛 SSR 标记的开发及种质纯度鉴定 [J]. 药科学报, 2010, 45(5): 667-672.
- [21] Ziekienicz E, Rafashl A, Labuda D. Genome fingerprinting by Simple Sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [22] 苑鹤, 林二培, 朱波, 等. 铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 566-569.
- [23] 马佳梅, 殷寿华. 西双版纳地区流苏石斛遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 云南植物研究, 2009, 31(1): 35-41.
- [24] 邓辉, 陈乃富, 李耀亭, 等. 霍山产 3 种药用石斛及其杂交优势种的 ISSR-PCR 分子标记鉴别 [J]. 种子, 2009, 28(2): 43-45.
- [25] 武荣花, 王雁, 彭镇华, 等. 我国石斛属部分植物的 ISSR 标记分析 [J]. 种质资源, 65-69.
- [26] 沈颖, 徐程, 万小凤, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 423-427.
- [27] 包英华, 白音, 田新波, 等. 束花石斛种质资源的 ISSR 分析 [J]. 广西植物, 2008, 28(4): 447-450.
- [28] 莫鹏巧. 部分苏铁种类亲缘关系的 ISSR 分析及分类学研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2008.
- [29] 王天菊, 白德胜, 何龙飞, 等. 不同来源花生品种的 ISSR 分析及亲缘关系研究 [J]. 花生学报, 2011, 40(2): 7-12.
- [30] 吉占和. 中国石斛属的初步研究 [J]. 植物分类学报, 1980, 18(4): 427-449.
- [31] 吉占和, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [32] Fang D Q, Roose M L, Krueger R R, *et al.* Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 211.