

47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析

白 坚 胡 旭 周淑婷 王慧中
(杭州师范大学生命与环境科学学院 杭州 310036)

摘要: 为了揭示建兰(*Cymbidium ensifolium*)品种的遗传多样性和亲缘关系,为建兰种质资源的有效利用和开发提供依据,本研究采用 SRAP(sequence-related amplified polymorphism)分子标记技术对来自四川、台湾、广东的 47 个建兰品种的遗传多样性进行分析,应用 NYSYS 软件对 SRAP-PCR 结果进行聚类分析。结果从 88 对引物中筛选获得 12 对特异性强、稳定性好的引物进行 SRAP 分析,共扩增出 188 条带纹,其中 147 条为多态性位点,平均每组引物扩增出 12 条多态性带。聚类分析表明 47 个品种可以分为 4 个类群:第 I 群由来自四川的 3 个品种组成;第 II 群的 23 个品种中有 18 个来自四川、3 个来自广东、2 个来自台湾;第 III 群的 12 个品种中有 11 个品种源于台湾,1 个源于四川;第 IV 群仅有 1 个来自四川,其他品种均来自台湾。结果表明,由于人工驯化造成了建兰品种遗传背景的混乱,而 SRAP 分子标记技术能有效地分析建兰品种的遗传多样性和亲缘关系。

关键词: 建兰; SRAP; 聚类分析; 遗传多样性

Genetic Diversity of 47 *Cymbidium ensifolium* Varieties Assessed by SRAP Markers

BAI Jian, HU Xu, ZHOU Shu-ting, WANG Hui-zhong
(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

Abstract: In order to reveal the genetic diversity and relationships of *Cymbidium ensifolium* varieties and provide evidence for utilization and exploitation of germplasm resources of *C. ensifolium*, sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was used to analyze the genetic relationship among the 47 varieties, which derived from Sichuan, Taiwan, and Guangdong. The software NTSYS was applied to analyze the results of SRAP-PCR. A total of 188 DNA bands was amplified using 12 specific and stable primers selected from 88 primers, 147 of which was polymorphic. The average number of polymorphic DNA bands amplified by each primer was 12. Clustering analysis revealed that these 47 varieties were divided into four groups. Group I consisted of 3 varieties from Sichuan. In group II, 18 varieties came from Sichuan, 3 varieties from Guangdong Province, and the remaining 2 varieties from Taiwan. In 12 varieties of group III, eleven varieties came from Taiwan, and only one originated from Sichuan. In the last group, 9 varieties were included, 8 of which came from Sichuan and 1 variety originated from Taiwan. These result indicate that domestication causes confusion in the genetic backgrounds of *C. ensifolium*. However, SRAP can be applied to study the genetic diversity and relationship of *C. ensifolium* effectively.

Key words: *Cymbidium ensifolium*; SRAP; Cluster analysis; Genetic diversity

兰科(Orchidaceae)植物拥有 25000 多个种,是 *ensifolium*) 又名四季兰,属于兰科兰属多年生草本开花植物中最大的家族之一。建兰(*Cymbidium* 植物,因其具有耐热、开花早和花香淡雅等特点而深

收稿日期:2011-11-16 修回日期:2011-12-25

基金项目:国家自然科学基金(31070298、30870180);浙江省重大科技专项(2008C12081);杭州市属高校重点实验室科技创新项目(20080432T06);浙江省大学生科技创新活动计划项目(2010R421003);生物科学国家特色专业本科科技创新项目;浙江省科技创新团队基金

作者简介:白坚 杭州师范大学生物技术系 08 级本科生。E-mail: baijian199822@163.com

通讯作者:王慧中 博士 教授。主要从事植物系统生物学研究。E-mail: whz62@163.com

受广大消费者的喜爱,正因如此建兰在亚洲各地分布十分广泛^[1]。

我国建兰的栽培历史十分悠久,品种丰富,在上千年的栽培历史中,由于许多建兰品种的名称是根据人们的不同喜好而命名的,因此出现了同种异名、同名异种的现象。和鉴定春兰的传统方法一样^[2],建兰以辨别花和叶的形态特征为传统的鉴定手段,在园艺上把建兰分为奇花、色花、叶艺 3 类,其中奇花可分为许多亚类,如梅瓣、荷瓣、水仙瓣、蝶瓣等,色花由素心、彩花两种类型组成,叶艺则是根据建兰叶的不同颜色和形状而划分的^[3]。而在人工驯化过程中,只有极少的优良的花叶形状被保留下来,产生了许多例如对建兰的分类不清、种质资源鉴定困难等问题,因此,传统的鉴定方法已不能较为系统地鉴定建兰品种间的亲缘关系。基于以上的原因,遗传背景和多样性分析对建兰的育种、选择优良性状有着重要的意义。

分子标记技术是一种能够精确、快速鉴定物种之间亲缘关系的重要手段,目前,很多分子标记技术已经成功应用于兰属植物遗传多样性的研究当中,例如 RFLP、RAPD、AFLP 等^[4-6]。相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等^[7]博士于 2001 年在

芸薹属植物中开发出来的,是一种基于 PCR 的新型分子标记技术。SRAP 技术的基本原理是通过设计的引物对 ORFs(open reading frames)进行扩增,上游引物长 17bp,对外显子进行特异扩增,下游引物长 18bp,对内含子区域、启动子区域进行特异扩增,因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性。目前,该标记已经成功应用于多种植物中^[8-12],但在建兰品种的遗传多样性分析中未见报道。

本试验采用 SRAP 分子标记技术,对 47 个建兰品种进行了遗传多样性分析,并建立其亲缘关系的系统进化树,为建兰品种的分子鉴定和遗传育种提供信息。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为 47 个建兰品种(表 1),来源于 3 个地区,其中 24 个(1-24)品种来自四川,20 个(25-44)品种源自台湾,3 个品种源于广州(45-47)。其中叶艺 8 种,色花 14 种(素心 4 种、未分类的 10 种),奇花 25 种(蝶瓣 9 种、荷瓣 2 种、梅瓣 7 种、未分类的 7 种)。

表 1 47 个建兰品种名称

Table 1 Names of 47 *Cymbidium ensifolium* varieties in this study

编号 No.	品种名称 Varieties	园艺种类 Horticultural type	编号 No.	名称 Varieties	园艺种类 Horticultural type	编号 No.	品种名称 Varieties	园艺种类 Horticultural type
1	龙飞凤舞	叶艺	17	四季文山蝶	奇花(蝶瓣)	33	日月宝	叶艺
2	龙蝶	叶艺	18	翠玉牡丹	奇花	34	大宝岛仙女	奇花
3	火烈鸟	叶艺	19	彩凤蝶	奇花(梅瓣)	35	四季玉妃	色花
4	峨嵋山奇蝶	奇花	20	冠山蝶	奇花(蝶瓣)	36	辉煌奇蝶	奇花(蝶瓣)
5	千佛金顶	奇花(蝶瓣)	21	朝天梅荷	奇花(梅瓣)	37	萨摩锦	色花
6	四季华光蝶	奇花(蝶瓣)	22	黄梅	奇花(梅瓣)	38	市长虹	色花
7	五岳麒麟	叶艺	23	四季凤蝶	奇花(蝶瓣)	39	宝岛胭脂	色花
8	芽黄素	色花(素心)	24	青山玉泉	色花(素心)	40	娇鹤	色花
9	四季金鸟	奇花	25	晶荷奇蝶	奇花(蝶瓣)	41	彩虹	色花
10	红梅	奇花	26	四季文汉	奇花(蝶瓣)	42	金荷	色花
11	晶荷	奇花(荷瓣)	27	绿梅	奇花(梅瓣)	43	地荷	色花
12	中山梅	奇花(梅瓣)	28	凤	叶艺	44	香蕉叶	叶艺
13	宝岛金龙	奇花	29	水红花	色花	45	观音素艺	色花(素心)
14	白梅	奇花(梅瓣)	30	复兴奇蝶	奇花(蝶瓣)	46	金丝马尾	色花(素心)
15	复色大荷	奇花(荷瓣)	31	宝岛金龙	奇花	47	金丝马尾爪	叶艺
16	盖卉梅	奇花(梅瓣)	32	绿嘴鸟	色花			

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取与定量 用改良的 CTAB 法提取建兰基因组 DNA,并将其母液保存于 -20°C 中。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果显示 47 个品种的基因组 DNA 均可用于 PCR。

1.2.2 引物筛选 对 88 对引物组合(表 2)进行筛选,以期扩增得到重复性好、扩增条带清晰且多态性丰富的引物组合。

表 2 SRAP 引物序列

Table 2 SRAP Primer Sequence

序号 No.	序列 (5'-3') Sequence	序号 No.	序列 (5'-3') Sequence
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCGTACGAATTCAA
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em8	GACTGCGTACGAATTCTG
		em9	GACTGCGTACGAATTCTGA
		em10	GACTGCGTACGAATTCAG
		em11	GACTGCGTACGAATTCCA

1.2.3 PCR 扩增分析 PCR 反应体系为 (25 μl): 18 μl 重蒸水 2.5 μl 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 1 μl dNTP (2.5 mmol/l) 1 μl 引物 (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) 0.5 μl Taq 聚合酶 (5U/ μl) 1 μl DNA 模板 (100ng/ μl)。

PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 1min 35°C 复性 1min 72°C 延伸 1min,共 5 个循环; 94°C 变性 1min 50°C 复性 1min 72°C 延伸 1min,共 30 个循环; 72°C 延伸 10min 4°C 保存。

1.2.4 SRAP 扩增产物的检测 SRAP-PCR 扩增产物与 6 \times Loading Buffer(40% 蔗糖、0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯青 FF) 混匀后,取 6 μl 样品用于 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,缓冲液为 1 \times TBE。参照 Sanguinett 等^[13]的方法对凝胶进行银染,用数码相机拍照记录。

1.3 数据的统计分析

电泳图谱中的条带根据迁移率进行携带,有条带的记为 1,无条带的记为 0。通过 NTSYS-pc2.02 软件的 UPMGA 法计算建兰各个品种之间的遗传相似系数,并绘出聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

共筛选得到 12 对重复性好、扩增条带清晰且多态性丰富的引物组合(表 3),为 me1 em3,me1 em4,me2 em6,me2 em10,me3 em5,me3 em7,me4 em6,me5 em5,me5 em11,me6 em4,me6 em8,me7 em5。

表 3 筛选获得的 SRAP 引物组合

Table 3 Selected SRAP Primers for analysis

序号 No.	正向引物 (5'-3') Forward primers	反向引物 (5'-3') Reverse primers
1	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTGAC
2	TGAGTCCAAACCGGATA	GACTGCGTACGAATTTGA
3	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTGCA
4	TGAGTCCAAACCGGAGC	GACTGCGTACGAATTCAG
5	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTAAC
6	TGAGTCCAAACCGGAAT	GACTGCGTACGAATTCAA
7	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTGCA
8	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTAAC
9	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACGAATTCCA
10	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTTGA
11	TGAGTCCAAACCGGTAA	GACTGCGTACGAATTCTG
12	TGAGTCCAAACCGGTCC	GACTGCGTACGAATTAAC

2.2 SRAP 标记的多态性分析

利用筛选得到的 12 对引物对 47 个建兰品种的基因组 DNA 进行扩增,结果显示,各个样品均能扩增出重复性好、清晰且多态性丰富的条带,图 1 为 47 个建兰品种经引物 me3 em5 扩增在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳所得到的图谱。12 对引物共扩增得到 188 条清晰带纹,平均每条引物扩增出 16 条,其中多态性位点 147 个,占扩增位点的 78.2%,表明 SRAP 标记在建兰的品种中具有丰富的多态性,能很好地揭示建兰品种间的亲缘关系。

2.3 品种亲缘关系的聚类分析

基于 SRAP 的扩增结果,用 UPGMA 聚类分析方法进行分析,得到 47 个建兰品种亲缘关系图(图 2)。从聚类结果可以看出,47 个建兰品种可以分为四大类,第 I 类由来自四川的 3 个品种组成(1、12、13)。第 II 类有 23 个品种,其中 18 个来自四川、3 个来自广东、2 个来自台湾,根据园艺上的分类,又可以将其分为 II a(奇花)和 II b(叶艺、色花)两个亚类。第 III 类有 12 个品种,其中 11 个品种源于台湾、1 个源于四川。第 IV 类有 9 个品种,有 1 个来自四川,其他品种均来自台湾。

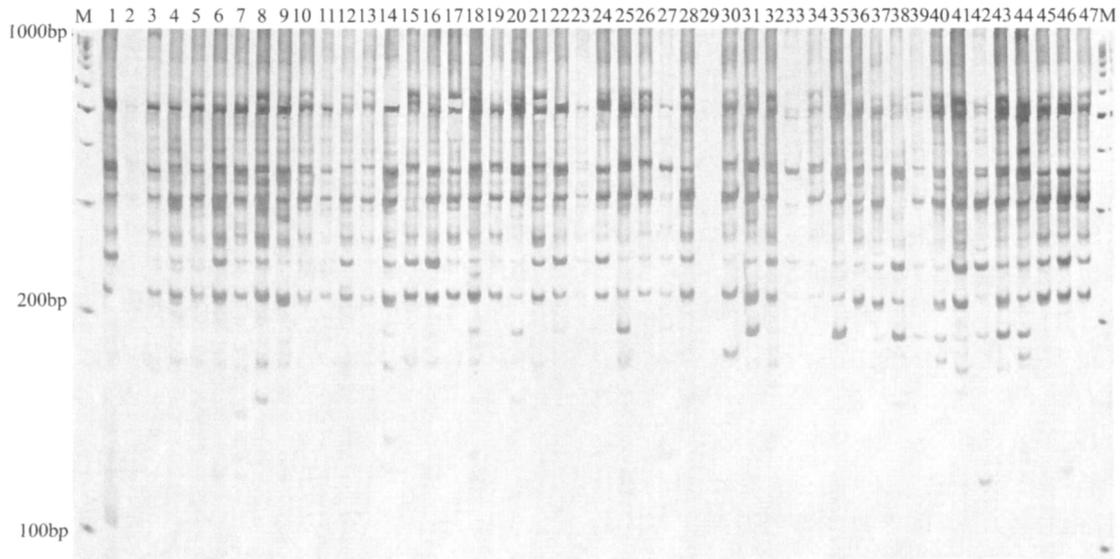


图 1 47 个建兰品种的 me3 em5 扩增产物的 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 PCR products of 47 *Cymbidium ensifolium* varieties with the primer pair me3 and em5 on a 6% polyacrylamide gel

M:100bp DNA Marker, 1-47: 47 个建兰品种

1-47: 47 *C. ensifolium* varieties

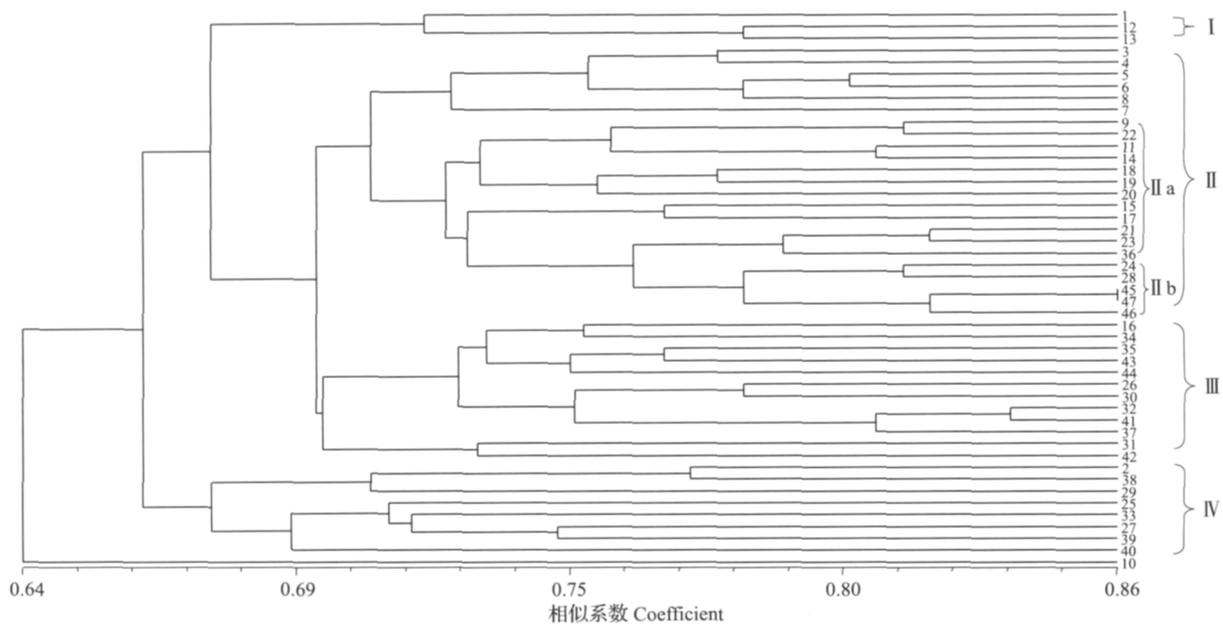


图 2 47 个建兰品种的 SRAP 遗传关系聚类图

Fig. 2 Dendrogram based on SRAP markers for 47 *Cymbidium ensifolium* varieties

聚类分析结果表明,来自于相同地区的建兰品种的亲缘关系较近,但也存在着来源于不同地区的品种亲缘关系较近的现象,如在第Ⅲ类和第Ⅳ类中,源于四川的盖卉梅(16,Ⅲ)、龙蝶(2,Ⅳ)与台湾的大宝岛仙女(34,Ⅲ)、市长虹(38,Ⅳ)亲缘关系较近。若从园艺分类上划分,16号和34号、2号和38号都不属于同一种园艺类型。说明不同地区的建兰品种之间的遗传距离差距虽然比较远,但由于人工驯化,来源于不同地区的优良品种间的杂交现象还

是存在的。在第Ⅱ类中,根据园艺学的分类,虽然可以将一大部分的品种进行归类,但此方法还是存在着一定的缺陷,而SRAP分子标记技术能够较好地反映建兰品种之间的亲缘关系。

3 讨论

建兰因其有着耐热、开花早、香味淡雅等特点,深受广大消费者喜爱,具有十分重要的经济价值。为了繁育出更为优良的品种,在人工驯化的过程中,

种内杂交、种间杂交造成了建兰品种在分类上的混乱,致使无法区分建兰各品种的地理来源和遗传背景。这可以用来解释聚类结果,在 24 个来源于四川的品种中,有 21 个品种分布在第 I 类(3 个)和第 II 类(18 个)中,而来源于台湾的有 19 个品种分布在第 III 类(11 个)和第 IV 类(8 个)中,来自于广东的 3 个品种 45、46、47 则可被归类到 II b 亚类中。

在建兰品种培育的过程中,不同品种拥有相同的命名现象是致使建兰分类混乱的另外一个重要原因,例如来源于四川的 13 号和台湾的 31 号,二者都被命名为宝岛金龙,但 SRAP 聚类分析结果表明,这两个品种的亲缘关系甚远,虽然二者在花的形态特征上有着相似之处,但由于地理隔离而拥有不同的遗传背景。

在漫长的选育过程中,建兰品种单个性状的突变往往会产生新的品种,因此,新的品种与原来的品种的遗传关系十分接近。在 47 个品种中,41、47 号品种分别为 32、46 号的突变种。聚类结果表明,SRAP 分子标记技术能准确地反映亲缘关系较近的品种,绿鸟嘴(32)和彩虹(41)的亲缘关系相似系数为 84%,金丝马尾(46)和金丝马尾爪(47)为 82%,此结果与 Wang 等^[3]用 ISSR 分子标记技术分析 85 个建兰品种报道的结果相似。

在园艺上,建兰品种主要依据花和叶的部分形态特征进行分类,有很大的局限性。相关研究表明,一个决定花器官发育的等位基因的突变可以导致花的颜色和形状的改变^[14]。同时,在兰科植物中,如果其他基因插入到控制花颜色的基因当中,也会导致花颜色的改变^[15]。因此,对内含子区域、启动子区域进行特异扩增的 SRAP 分子标记技术能够比传统的鉴定方法更为有效地鉴定建兰品种的遗传背景和品种间的亲缘关系。

同时,随着建兰市场需求的不断扩大,建兰的野生品种破坏严重,野生资源稀缺。因此,建兰种质资源的开发与保护显得尤为重要。本研究利用 SRAP 分子标记技术对 47 个建兰品种的遗传背景进行了分析,结果表明不同来源地的建兰品种之间的亲缘关系距离较远,因此,对地方建兰品种种质资源的保护对保持建兰品种遗传多样性具有同

样重要的作用。此结果较好地揭示了建兰品种之间的亲缘关系,但每一种技术都有着一定的局限性,因此在后续的工作中将结合其他手段对其进一步探索,为建兰种质资源的利用与保护奠定更坚实的基础。

参考文献

- [1] Nash N. Flavour of the month, *Cymbidium ensifolium* [J]. *Orchids*, 1997, 9: 972-974
- [2] Wang H Z, Wu Z X, Lu J J, et al. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Genetica*, 2009, 136: 391-399
- [3] Wang H Z, Lu J J, Hu X, et al. Genetic variation and cultivar identification in *Cymbidium* [J]. *Plant Syst Evol*, 2011, 293: 101-110
- [4] Obara-Okeyo P, Fujii K, Kako S. Isozyme variation in *Cymbidium* species (Orchidaceae) [J]. *Hort Sci*, 1998, 33: 133-135
- [5] Obara-Okeyo P, Kako S. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers [J]. *Euphytica*, 1998, 99: 95-101
- [6] 王慧中,王玉东,周晓云,等. 兰属 14 种植物遗传多样性 RAPD 及 AFLP 分析[J]. *实验生物学报*, 2004, 37(6): 482-486
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple RCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461
- [8] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168-180
- [9] Ferriol M, Pic B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271-282
- [10] 王凤涛,简瑞明,欧阳宏雨,等. 利用 SRAP 标记分析河南小麦栽培品种的遗传多样性[J]. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(4): 517-521
- [11] 曾兵,张新全,范彦,等. 鸭茅种质资源遗传多样性的 SRAP 研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 709-715
- [12] 马红勃,赖莹英,许旭明,等. 基于 SRAP 标记的大花蕙兰种质资源遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(4): 551-556
- [13] Sanguinetti C J, DiasNeto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17: 915-919
- [14] Liu J J, Ekramoddoullah A K M, Podila G K. A MADS-box gene specifically expressed in the reproductive tissues of red pine (*Pinus resinosa*) is a homologue to floral homeotic genes with C-function in angiosperms [J]. *Physiol Mol Bio Plants*, 2003, 9: 197-206
- [15] Hieber A D, Mudalige-Jayawickrama R G, Kuehnle A R. Color genes in the orchid *Oncidium goweryi*: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross [J]. *Planta*, 2006, 223: 521-531