

林榕燕, 叶秀仙, 钟淮钦, 等. 基于 SRAP 分子标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (5): 469—473.
LIN R Y, YE X X, ZHONG H Q, et al. Genetic Diversity of *Dendrobium* Germplasms Accessed by SRAP Markers [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (5): 469—473.

基于 SRAP 分子标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析

林榕燕, 叶秀仙, 钟淮钦, 林 兵, 黄敏玲*

(福建省农业科学院作物研究所/福建省农业科学院花卉研究中心/
福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 为合理利用石斛兰种质资源, 用 SRAP 分子标记技术对 48 份石斛兰种质资源的遗传多样性进行分析。结果显示: 筛选得到的 14 对石斛兰 SRAP 引物共扩增出 159 个条带, 其中多态性条带数为 155 个, 各引物的多态性比率为 90.00%~100.00%, 多态性信息含量为 0.718~0.903, 表明石斛兰 SRAP 的多态性信息含量较为丰富。聚类分析结果发现 48 个石斛兰品种间的遗传距离在 0.15~0.97, 在遗传距离为 0.83 处可将 48 个石斛兰品种分为 7 大聚类群, 说明供试的石斛兰品种间具有十分丰富的遗传多样性。

关键词: 石斛兰; SRAP; 多态性; 遗传多样性

中图分类号: S 682.31

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2018) 05—469—05

Genetic Diversity of *Dendrobium* Germplasms Accessed by SRAP Markers

LIN Rong-yan, YE Xiu-xian, ZHONG Huai-qin, LIN Bing, HUANG Min-ling*

(Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Flower Research Center, Fujian
Academy of Agricultural Sciences/Fujian Engineering Research Center for Characteristic
Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: SRAP molecular markers were used to access the genetic diversity of 48 *Dendrobium* germplasms. Using 14 pairs of selected primers, 159 bands were amplified. Of the bands, 155 were polymorphic. The polymorphism rate was 90%—100% per primer, and the information content in the markers ranged abundantly from 0.718 to 0.903. Cluster analysis showed the genetic distances among the 48 cultivars to be 0.15—0.97. At the distance of 0.83, the germplasms could be classified into 7 groups. The results showed a rich genetic diversity among the germplasms.

Key words: *Dendrobium*; SRAP; polymorphism; genetic diversity

石斛兰 *Dendrobium*, 是兰科石斛属多年生草本植物。其花姿优雅, 花色鲜艳, 花期长, 观赏价值极高, 与卡特兰、蝴蝶兰、万代兰并列为观赏兰花的“四大天王”^[1]。石斛兰不仅是重要的切花和盆栽园艺品种, 部分石斛兰品种同时也是珍贵的中药材^[2], 其中金钗石斛、铁皮石斛、马鞭石斛及其近似种还被收录在《中国药典》中。在中药及观赏花卉产业, 对品种准确的鉴定显得尤为必要, 这是保证药用石斛安全性和观赏石斛新品种选育的重要前提^[3]。但是由于石斛兰的产地不同, 用途广泛,

存在着同名异物和同物异名的现象, 仅仅依靠形态学鉴定是不够的, 因此需要借助更为准确稳定的方法对不同品种石斛兰进行有效的鉴定。

随着分子生物学技术的发展, 分子标记技术因其方法相对简便、多态性高且不受生长环境影响等众多优点, 成为目前种质资源鉴定的高效技术手段之一^[4]。序列相关扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 标记是一种通过独特的引物设计对开放阅读框 (Open readings frames, ORFs) 进行扩增的新型分子标记, 吸收

收稿日期: 2018-01-22 初稿; 2018-04-02 修改稿

作者简介: 林榕燕 (1990—), 女, 研究实习员, 主要从事花卉生物技术研究 (E-mail: lryyan@163.com)

* 通讯作者: 黄敏玲 (1960—), 女, 研究员, 主要从事花卉品种选育与生物技术研究 (E-mail: huangml618@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1026-8); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-2-9); 福建省农业科学院青年开放基金项目 (2015QN-4); 福建省农业科学院科技创新团队 PI 项目 (2016PI-39)

了 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等分子标记的优点,具有操作过程简单、扩增条带清晰、结果稳定、重复性高等特点^[5],目前已广泛应用于国兰^[6]、杂交兰^[7]、甘薯^[8]、红花属^[9]、花椒^[10]、芸薹属^[11]等多种植物种质鉴定、重要性状标记、遗传多样性及遗传图谱构建等研究中。在石斛属植物中也有 SRAP 分子标记被利用的研究报道,如铁皮石斛及其相似种的鉴定分析^[12]、经辐射后的石斛兰组培苗的检测分析^[13]、不同来源地铁皮石斛的遗传变异和保护研究^[14],但有关该标记应用于石斛兰种质资源多样性的研究还相对较少。本研

究利用 SRAP 分子标记对包括药用石斛和观赏石斛在内的 48 份品种资源进行分析,以期从分子水平确定石斛兰种质资源亲缘关系,为石斛兰品种鉴定、品种保护及后期的杂交育种提供理论依据,从而推动石斛资源更深层的开发利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 48 份石斛兰品种(表 1)来源于福建省农业科学院作物研究所兰花种质资源圃。

表 1 供试材料
Table 1 Materials tested

编号	品种名	编号	品种名	编号	品种名	编号	品种名
1	鼓槌石斛	13	肿节石斛	25	黄贝壳石斛	37	霍山石斛
2	流苏石斛	14	黄喉石斛	26	秋石斛 D2015117	38	秋石斛-三亚阳光
3	铁皮石斛	15	黄橙石斛	27	密花石斛	39	秋石斛-水晶
4	铜皮石斛	16	曲轴石斛	28	扭瓣石斛	40	秋石斛-出水芙蓉
5	金钗石斛	17	檀香石斛	29	剑叶石斛	41	秋石斛-画眉
6	秋石斛 D46	18	血喉石斛	30	亮叶石斛	42	秋石斛-樱桃红
7	晶帽石斛	19	麝香石斛	31	报春石斛	43	秋石斛-红粉佳人
8	蜂腰石斛	20	本斯石斛	32	董黑毛石斛	44	秋石斛 D2015114
9	玫瑰石斛	21	叉唇石斛	33	澳洲石斛	45	秋石斛 D2015121
10	球花石斛	22	红蜻蜓石斛	34	兜唇石斛	46	秋石斛-TretesMoon
11	长苏石斛	23	金果石斛	35	重唇石斛	47	秋石斛 D2015127
12	秋石斛 D2015129	24	红灯笼石斛	36	秋石斛 D2015123	48	秋石斛 D2015128

1.2 试验方法

1.2.1 石斛兰叶片 DNA 的提取 选取各份供试材料的新鲜叶片约 0.5 g,采用改良 CTAB 法^[15]进行总 DNA 的提取,提取完成后,利用分光光度计法检测其浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,产物于-20℃条件下保存备用。

1.2.2 石斛兰 SRAP-PCR 扩增 参考 Budak 等^[16]的引物,由 10 条正向引物和 10 条反向引物,随机组成 100 对引物组合。PCR 反应体系的总体积为 25 μL,其中含有 100 ng·μL⁻¹的模板 DNA 1.0 μL,10 μmol·L⁻¹的上、下游引物各 1.0 μL,含 Mg²⁺ 的 Buffer 2.5 μL,2.5 mmol·L⁻¹的 dNTPs 2.0 μL,5 U·μL⁻¹的 *Taq* 聚合酶 0.25 μL,ddH₂O 17.25 μL。PCR 扩增程序参照钟淮钦等^[7]的研究,采用变温复性反应程序。程序结束后,利用 2.5%琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,观察电泳图谱并拍照保存。

1.3 数据分析

根据电泳图谱,利用人工方法进行 DNA 条带数的统计,在相同迁移位置上有扩增条带的标记为 1,无条带的则记为 0,并构建原始数据矩阵。应用 NTSYS- pc2.10e 软件进行聚类分析,获得聚类图;利用 EXCEL 软件计算引物的多态性比率和多态性信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 石斛兰 SRAP 标记引物的筛选

将提取获得的 48 份石斛兰品种 DNA 稀释至相同浓度备用,并随机选择其中的 2 份样本进行 100 对 SRAP 引物的初步筛选,筛选出 32 对能扩增出明显条带的引物。而后,利用 48 份石斛兰品种 DNA 样本进行 SRAP 引物的进一步筛选,以明确初步筛选引物对其他石斛兰品种的可用性。结果发现,在 32 对初筛选引物中有 14 对引物的扩增条

带清晰且多态性丰富。图 1 为引物组合 Me1+Em8 的扩增结果。

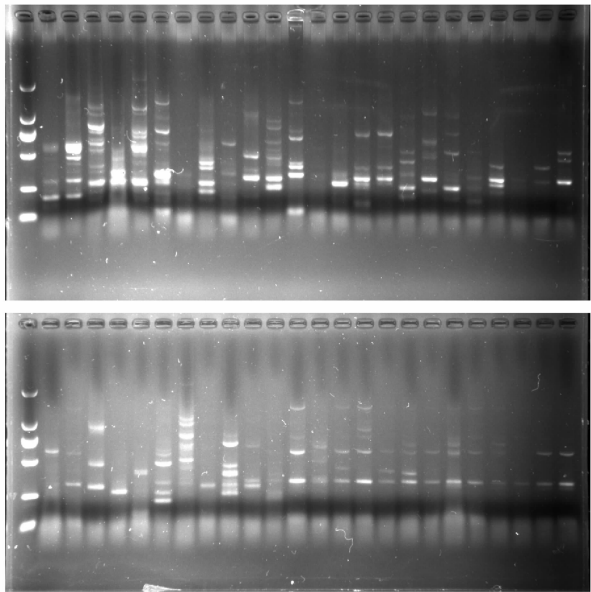


图 1 引物 Me1+Em8 在 48 个石斛兰品种中的扩增
Fig. 1 Amplified Me1+Em8 primers of 48 *Dendrobium* cultivars

2.2 SRAP 标记的多态性分析

对筛选出来的 14 对 SRAP 引物在 48 份石斛兰种质资源中的扩增结果进行分析发现（表 2），在所有供试材料中共获得 159 个条带，平均每对引物扩增 11.4 个条带；获得多态性条带数为 155 个，引物组合 Me1+Em8 扩增的多态性条带数最多，为 15 个，紧随其后的是引物组合 Me1+Em2 的 14 个多态性条带和引物组合 Me3+Em4 的 13 个多态性条带，而引物组合 Me3+Em6 仅扩增到 7 个多态性条带，平均每对引物扩增到 11.1 个多态性条带。各引物的多态性比率分布为 90.00%~100.00%，除了引物组合 Me4+Em2、Me7+Em2、Me10+Em2 及 Me10+Em8 外，其他引物组合的多态性比率均为 100.00%。对 14 对 SRAP 引物的多态性信息含量分析结果显示，其分布范围为 0.718~0.903，每对引物平均多态性信息含量为 0.828，引物组合 Me6+Em10 的多态性信息含量最高，而引物组合 Me4+Em2 的多态性信息含量最低（表 2）。以上结果表明石斛兰 SRAP 的多态性信息含量较为丰富。

表 2 石斛兰 SRAP 标记多态性分析
Table 2 Information on SRAP markers in *Dendrobium*

引物名	引物序列	总条带	多态性条带	多态性比率/%	多态性信息含量
Me1+Em2	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	14	14	100.00	0.900
Me1+Em3	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'	9	9	100.00	0.829
Me1+Em8	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'	15	15	100.00	0.884
Me2+Em1	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'	9	9	100.00	0.840
Me2+Em10	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'	12	12	100.00	0.880
Me3+Em4	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'	13	13	100.00	0.900
Me3+Em6	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'	7	7	100.00	0.779
Me4+Em2	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	13	12	92.31	0.718
Me6+Em6	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'	11	11	100.00	0.868
Me6+Em10	5'-TGAGTCCAAACCGGTAA-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTAG-3'	12	12	100.00	0.903
Me7+Em2	5'-TGAGTCCAAACCGGTCC-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	10	9	90.00	0.730
Me8+Em5	5'-TGAGTCCAAACCGGTGC-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'	11	11	100.00	0.839
Me10+Em2	5'-TGAGTCCAAACCGGCTT-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'	12	11	91.67	0.798
Me10+Em8	5'-TGAGTCCAAACCGGCTT-3'; 5'-GACTGCGTACGAATTCTG-3'	11	10	90.91	0.724

2.3 48 份石斛兰品种资源的聚类分析

以 EXCEL 中记录的 0, 1 型数据为基础，利用 NTSYS- pc2.10e 软件，构建 48 份石斛兰品种资源的聚类图（图 2）。结果显示，48 份石斛兰品

种间的遗传距离为 0.15~0.97，其中，秋石斛 D2015127 品种和秋石斛 D2015128 品种的亲缘关系最近。

在遗传距离为 0.83 处，48 个石斛兰品种分为

7 大聚类群: 第 I 类包括 13 个品种, 有鼓槌石斛、流苏石斛、铁皮石斛、细茎石斛、金钗石斛、霍山石斛、晶帽石斛、肿节石斛、黄喉石斛、蜂腰石斛、玫瑰石斛、球花石斛及血喉石斛, 这些品种中包括了几种较为常见的药用石斛; 第 II 类包括 3 个品种, 有红蜻蜓石斛、金果石斛和红灯笼石斛; 第 III 类有 4 个品种, 为檀香石斛、麝香石斛、叉唇石斛、本斯石斛; 第 IV 类含 4 个品种, 其中有黄橙石斛、曲轴石斛、澳洲石斛、董黑毛石斛; 第 V 类有 15 个品种, 秋石斛 D46、长苏石斛、秋石斛 D2015129、秋石斛 D2015123、秋石斛-三亚阳光、秋石斛-水晶、秋石斛-出水芙蓉、秋石斛-画眉、秋石斛-樱桃红、秋石斛-红粉佳人、秋石斛 D2015121、秋石斛 D2015114、秋石斛-TretesMoon、秋石斛 D2015127、秋石斛 D2015128、黄贝壳石斛、秋石斛 D2015117 及亮叶石斛; 第 VI 类为报春石斛、兜唇石斛和重唇石斛; 第 VII 类为密花石斛、扭瓣石斛和剑叶石斛。

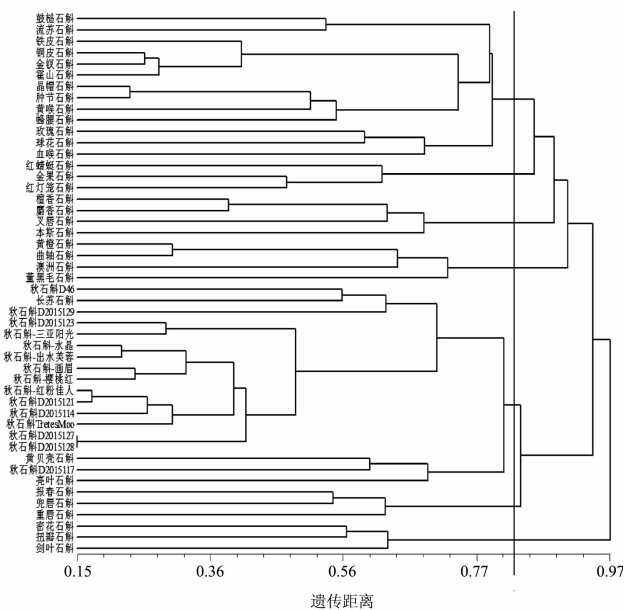


图 2 48 份石斛兰品种聚类分析

Fig. 2 Cluster profile of 48 *Dendrobium* cultivars

3 讨论与结论

遗传多样性是生物多样性的核心内容, 是生命进化和物种分化的基础, 为研究物种的遗传基础、品种鉴定、亲本优选等提供理论依据。石斛兰除了具有观赏价值外, 部分品种还兼具高药用价值和经济价值, 了解该种质资源的遗传多样性, 不仅能够缓解目前交易市场中商品石斛品种混乱的现象, 还能推动石斛资源更深层的开发利用和保护, 具有现

实的指导意义。

分子标记由于能够直接反映基因组 DNA 间的差异, 且不受环境的限制, 具有多态性高、共显性等特点, 从而在石斛属植物中得到广泛应用。徐蕾等^[17]利用 SSR 标记对 36 份来自不同产地的铁皮石斛进行遗传多样性分析, 结果表明 SSR 标记的多态位点百分率为 97.19%, 中国铁皮石斛品种具有较高的遗传多样性。宋爽等^[18]利用 ISSR 和 AFLP 两种分子标记对 51 个药用石斛材料进行遗传多样性研究, 其中 ISSR 标记的多态条带比率高达 100%, AFLP 标记的多态性比率达 99.52%, 二者均能有效地将研究材料分开, 均适用于石斛植物的遗传多样性研究。张杨等^[19]的研究表明 RAPD 分子标记的多态性比率为 93.81%, 且该技术能够较好地分子水平方面反映金钗石斛、铁皮石斛和齿瓣石斛这 3 种石斛属植物的遗传背景和亲缘关系。周丽等^[20]采用 SRAP 标记分析了包括黔西南州野生铁皮石斛在内的 23 种相关种类石斛的遗传多样性, 结果显示多态性位点占比 97.32%, 且聚类分析结果与植物学形态分类结果统一。樊洪泓等^[21]将 SRAP 技术应用于药用石斛的遗传多样性及亲缘关系的研究中, 证明了其有效性。本研究利用 SRAP 分子标记对 48 份石斛兰品种资源的遗传多样性进行分析, 结果显示, 筛选得到的 14 对引物共扩增出 159 个条带, 其中多态性条带为 155 个, 多态性比率为 97.5%, 平均每对引物扩增到 11.1 个多态性条带, 平均引物多态性信息含量为 0.828。由此可见, 在石斛兰的遗传多样性研究中, SRAP 标记具有较为丰富的多态性信息含量。此外, 聚类分析结果显示, 48 份石斛兰品种间的遗传距离变化范围在 0.15~0.97, 说明供试的石斛兰品种间具有十分丰富的遗传多样性, 也表明利用 SRAP 标记进行石斛兰种质资源遗传多样性的分析是完全可行的。

本研究结果还表明, SRAP 标记能够较好地将供试的 48 份石斛资源区分开。48 份样品聚类分析结果显示, 晶帽石斛与肿节石斛的亲缘关系较近, 铜皮石斛与金钗石斛的亲缘关系较近, 报春石斛与兜唇石斛的亲缘关系较近, 这与《中国植物志》中的分类结果相吻合。在遗传距离为 0.83 处, 48 个石斛兰品种可以分为 7 大聚类群。在第 I 聚类群中, 相较于铁皮石斛, 霍山石斛与金钗石斛和铜皮石斛的亲缘关系更近, 这一结论与樊洪泓等^[21]的研究结果一致; 第 V 聚类群中包含了供试材料中的大部分秋石斛品种, 秋石斛是花期在秋天的热带洋

兰的统称,大部分品种是以蝴蝶石斛为亲本育成的杂交品种,与其他石斛的遗传距离较远,说明 SRAP 的分类结果与种质资源的遗传背景有一定的相关性。第Ⅲ聚类群中,檀香石斛和麝香石斛均有紫红色花和浓郁香气;第Ⅳ聚类群中的黄橙石斛、曲轴石斛和董黑毛石斛的花瓣分别为金黄色、橘黄色和淡黄色,为黄色系;第Ⅵ聚类群中报春石斛、兜唇石斛和重唇石斛的花瓣分别为淡玫瑰色、淡紫红色以及淡粉红色,为红色系;说明 SRAP 的分类结果与种质资源的花色、花香等特性相关。上述结果说明 SRAP 可以较准确地从分子水平反映出 48 份石斛兰种质资源的遗传差异,表明将 SRAP 标记应用于石斛兰种质遗传多样性分析效果良好。

参考文献:

- [1] 吴高杰. 石斛兰离体培养条件优化及其离体培养物的 microRNA 研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [2] 陈慧玲, 刘宗坤, 杨彦伶, 等. 基于层次分析法的药用石斛种质资源评价 [J]. 西南林业大学学报, 2017, 37 (1): 82—87.
- [3] 李杰, 章金辉, 朱根发, 等. 石斛属植物种质资源鉴定及指纹图谱应用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(16): 63—68.
- [4] 林榕燕, 钟淮钦, 黄敏玲, 等. 文心兰 EST-SSR 标记的开发及其在遗传多样性分析中的应用 [J]. 分子植物育种, 2016, 14 (11): 3113—3119.
- [5] 王志清, 刘继永, 李昌禹, 等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析细辛资源遗传多样性与亲缘关系 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16 (5): 1035—1044.
- [6] 唐源江, 曹雯静, 吴坤林. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (9): 1795—1806.
- [7] 钟淮钦, 林榕燕, 黄敏玲, 等. 杂交兰种质资源遗传多样性的 SRAP 分析 [J]. 福建农业学报, 2016, 31(11): 1193—1197.
- [8] 刘中华, 林志坚, 李华伟, 等. 甘薯蔓割病抗性相关 SRAP 标记的获得 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (6): 639—644.
- [9] MOKHTARI N, RAHIMMALEK M, TALEBI MAJID, et al. Assessment of genetic diversity among and within *Carthamus* species using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2013, 299 (7): 1285—1294.
- [10] FENG S J, TANG T X, LIU Z S, et al. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated *Zanthoxylum* germplasms based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2015, 62 (8): 1193—1204.
- [11] ZHANGX J, CHEN H Y, CHANNA S A, et al. Genetic diversity in Chinese and exotic *Brassica rapa* L. accessions revealed by SSR and SRAP markers [J]. *Brazilian Journal of Botany*, 2017, 40 (4): 973—982.
- [12] 李杰, 王再花. 人工栽培铁皮石斛与其相似种的 SRAP 分子标记分析 [J]. 中国农学通报, 2016, 32 (25): 79—83.
- [13] 任羽, 潘丙成, 陆顺教, 等. $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射石斛兰组培苗的 SRAP 分析 [J]. 中国农学通报, 2016, 32 (31): 85—89.
- [14] DING G, ZHANG D Z, DING X Y, et al. VGenetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2008, 276 (3—4): 149—156.
- [15] POREBSKI S, BAILEY G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15 (1): 8—15.
- [16] BUDAK H, SHEARMAN R C, PARMAKSIZ I, et al. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108 (2): 328—334.
- [17] 徐蕾, 刘莉, 彭少丹, 等. 利用 SSR 标记研究铁皮石斛的遗传多样性 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (7): 1616—1622.
- [18] 宋爽, 周洋帆, 刘正杰, 等. 利用 ISSR 和 AFLP 标记分析石斛种质资源的遗传多样性 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2016, 31 (4): 688—695.
- [19] 张杨, 陈志宽, 赖育波, 等. 应用 RAPD 分子标记技术探讨 3 种石斛属植物的种间关系 [J]. 亚热带植物科学, 2014, 43 (2): 123—126.
- [20] 周丽, 王苑, 王兴益, 等. 黔西南州铁皮石斛资源特性及 SRAP 标记 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34 (9): 1950—1956.
- [21] 樊洪泓, 李廷春, 邱婧, 等. 药用石斛遗传多样性的 SRAP 标记研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (1): 6—10.

(责任编辑: 黄爱萍)