

ISSR 和 RAPD 分子标记技术在不同君子兰品种遗传多样性上的应用

郑玉红, 钱美华, 李莹, 顾永华, 彭峰

(江苏省中科院植物研究所 南京中山植物园, 南京 江苏 210014)

摘要: 采用 ISSR 标记和 RAPD 标记技术研究了 15 个君子兰品种的遗传多样性。结果表明: 从 55 条寡聚核苷酸引物中筛选出 10 条简单重复序列引物, 共扩增出 65 条带, 平均每条引物扩增出 6.5 条带, 其中 5.4 条多态性带, 多态性比率为 81.95%; 从 55 条寡聚核苷酸引物中筛选出 11 条多态性引物, 共扩增出 47 条带, 平均每条引物扩增出 4.27 条带, 其中 32 条多态性带, 多态性比率为 67.88%。POPGEN 软件计算出君子兰品种间遗传距离为 0.1123~0.6330, 平均值为 0.3263。基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析将 15 个品种明显聚为二组, 国兰系列品种为一组, 日本兰系列品种组成另一组。

关键词: 君子兰; 品种; ISSR RAPD; 遗传变异

中图分类号: S 682.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0136-04

君子兰是石蒜科君子兰属多年生草本植物, 又称剑叶石蒜、大花君子兰等。原产南非, 根肉质纤维状, 叶基部形成假鳞茎, 叶形似剑, 长可达 45 cm, 互生排列, 全缘。伞形花序顶生, 每个花序有小花 7~30 朵, 多的可达 40 朵以上。花冠漏斗状, 直立, 黄或橘黄色。可全年开花, 以春夏季为主。果实成熟期 10 月左右。君子兰花、叶美观大方, 又耐阴, 宜盆栽室内摆设, 也是布置会场、装饰宾馆环境的理想盆花, 还有净化空气的作用和药用价值^[1]。

1828 年, Lindley 创建了君子兰属 (*Clivia*), 首先命名了垂笑君子兰 (*Clivia nobilis*); 君子兰的发现可追溯到 1774 年, 后传到欧洲; 但直到 1864 年, 才由德国植物学家 Regel 将其纳入君子兰属, 正式命名为 (*Clivia miniata*), 种加词的意思是朱红色的花。其后君子兰迅速成为广受欢迎的盆栽花卉, 至今已有近 160 a 的栽培历史。*Clivia nobilis* 在明治年代传入日本, 东京理工大学教授大久保三郎根据种加词 *nobilis* 的含义, 取名为君子兰, 又因为其花序下垂, 称垂笑君子兰, 又因其花大, 也称大花君子兰, 在我国沿用后者^[2]。君子兰在 20 世纪的 20~

30 年代分 2 个渠道传入中国。一是由德国传教士带入青岛, 君子兰在青岛也被称为德国兰, 因其叶片窄长, 后称它为青岛大叶; 二是由日本传入长春。当时作为珍贵花卉只供少数上层人物欣赏, 普通百姓根本看不到。1945 年后, 君子兰开始走入民间, 并被广泛栽培^[3]。目前我国已育成国兰系列君子兰品种数十个。

随着君子兰的广泛栽培, 对君子兰的研究也日益深入, 目前已涉及到形态解剖学^[4]、细胞学^[5-7]、生理学特性^[8]、病虫害防治^[9]、新品种培育^[10]、化学成分^[11] 及分子生物学^[12-14] 等多个方面。Ran 等^[6] 对君子兰属核糖体 5S rDNA 非转录区和 45S 内转录间隔区 (ITS) 序列进行了测定, 并采用荧光原位杂交的方法对核糖体 5S rDNA 基因的位置和分布进行了研究, 分析了君子兰属的系统发生和核型进化。Ran 等^[12] 采用 RAPD 标记对 4 种君子兰属植物及 32 株大花君子兰种源 (4 个野生居群和 10 个栽培品种) 开展了研究。研究表明君子兰栽培品种而后野生居群件的遗传变异相对较大; 来自德国的杂交品种“German hybrid”与来自新西兰的野生栽培类型和日本品种“Daruma”具有相同的起源; 它们与来自比利时的杂交品种“Belgian hybrid”起源不同。该研究首次对君子兰属种间和大花君子兰种内分子水平的变异进行了广泛的研究。庞赫等^[14] 研究了 PCR 反应体系的主要成分及退火温度对君子兰 ISSR 扩增结果的影响, 并对影响 PCR 的主要成分及退火温度进行筛选和优化, 确立了适合君子兰 ISSR-PCR 分析的最佳反应体系。现采用 RAPD 和 ISSR 标记对君子兰品种的遗传多样性进行研究, 为君子兰新品种选育提供分子生物学水平的

第一作者简介: 郑玉红 (1976-), 女, 河南潢川人, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物分子生物学。

通讯作者: 彭峰 (1957-), 男, 研究员, 现主要从事观赏植物和植物资源的研究和开发利用工作。E-mail: pfeng@vip.sina.com。

基金项目: 江苏省农业科技成果转化资助项目 (CC20092020)。

收稿日期: 2010-09-19

资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

15 个君子兰品种(表 1)的新鲜叶片。

表 1 用于 ISSR 和 RAPD 标记试验的君子兰品种

编号	品系	品种名
1	国兰系列	龙头立板(黄金脸)
2	国兰系列	圆头与立板杂交第三代
3	国兰系列	花脸大圆头
4	国兰水晶系列	圆头短叶
5	国兰系列	和尚大圆头
6	国兰系列	钢丝圆纹短叶立板
7	国兰系列	原生态短叶立板
8	国兰系列	短叶圆头
9	国兰系列	短叶圆头麻脸
10	国兰系列	立板短叶
11	国兰系列	晨星系列三代短叶
12	国兰系列	黄油匠短叶
13	日本兰	杂交圆头大麻脸
14	日本兰	杂交圆头和尚
15	日本兰	杂交黄短叶

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 采用北京莱博生物试验材料研究所生产的 DNA 提取试剂盒提取 DNA, DNA 溶解于灭菌双蒸水中, 低温(−20℃)贮藏, 备用。

1.2.2 PCR 扩增与检测 ISSR 的 PCR 扩增与检测: 在 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR, 反应条件参照周延清等^[13]方法, 稍加改进, 20 μL 的反应体系包括 1× Tag DNA 酶缓冲液(10 mm Tris-HCl, 50 mm KCl, 0.1% Trion x-100, pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 1 U Tag 酶, 50 ng 模板, 0.4 μM 引物, 各 0.4 mM 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。PCR 程序为: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72℃保温 7 min, 4℃保存。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖胶中电泳 1 h, 溴化乙锭(EB)染色, 凝胶成像系统拍照。RAPD 的 PCR 扩增与检测: 在 PE-9700 PCR 仪上进行 PCR, 反应条件参照改进的 Ran 等^[12]方法, 20 μL 的反应体系包括 1× Tag DNA 酶缓冲液(10 mm Tris-HCl, 50 mm KCl, 0.1% Trion x-100, pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 1 U Tag 酶, 50 ng 模板, 0.4 μM 引物, 各 0.4 mM 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。PCR 程序为: 95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 38℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72℃保温 7 min, 4℃保存。PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖胶中电泳 1 h, 溴化乙锭(EB)染色, 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 引物筛选 筛选上海生物工程有限公司设计生产的 ISSR 引物和 RAPD 引物各 55 个, 选取其中扩增条带丰富、信号强的 10 个引物简单重复序列进行 ISSR 扩增; 选取其中扩增条带丰富、信号强的 11 个寡聚核苷酸引物进行 RAPD 扩增。

1.2.4 数据分析 根据电泳图谱中 DNA 条带的有无将 ISSR 和 RAPD 扩增结果转化为二元数据(有带的量化为 1, 无带的量化为 0), 计算多态性。应用 POPGENE 软件^[16]采用 UPGMA 法对 2 个标记的数据进行联合分析, 计算品种的遗传距离和遗传相似系数, 并对样品间的亲缘关系进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ISSR 标记结果与分析

ISSR-PCR 扩增结果, 10 条引物共扩增出 65 个位点, 平均每条引物扩增出 6.5 个位点, 其中 54 个多态性位点, 多态百分率(Percentage of polymorphic sites, PPS)为 81.95%(表 2)。扩增条带大小集中在 1 500~500 bp 之间。其中引物 ISSR-56 扩增出的位点全部为多态性位点, 且扩增的位点数最多, 为 10 个, 图 1 显示了引物 ISSR-42 的扩增结果。

表 2 ISSR 的引物序列及扩增结果

引物	序列 (5'—3')	总位点数	多态性位 点数	多态位点 百分率/%
ISSR-4	(AC)8AG	7	6	85.71
ISSR-9	(CTC)6	6	5	83.33
ISSR-32	(AG)8AC	6	5	83.33
ISSR-33	(AG)8AT	7	5	71.43
ISSR-42	(AC)8CG	7	6	85.71
ISSR-52	(TC)8GA	5	4	80.00
ISSR-56	(AG)8TT	10	10	100
ISSR-58	(AG)8GA	6	4	66.67
ISSR-59	(AG)8GC	6	5	83.33
ISSR-63	(AG)8TG	5	4	80.00
平均		6.5	5.4	81.95

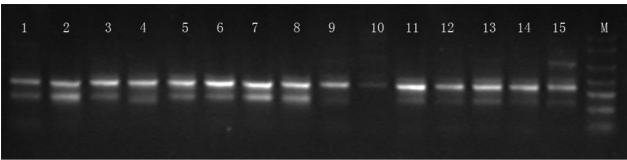


图 1 引物 ISSR-42 扩增的图谱

注: 样品编号同表 1, M: DNA ladder 下同。

2.2 RAPD 标记结果与分析

PAPD-PCR 扩增结果, 11 条引物共扩增出 47 个位点, 其中 32 个多态性位点, 平均每条引物扩增出 4.27 个位点, PPS 为 67.88%(表 3)。扩增产物大小集中在 2 000~500 bp 之间。其中引物 R10 扩增出的位点全部为多态性位点。引物 E17 扩增的位点数最少, 仅 2 个, 图 2 显示了引物 X03 的扩增结果。

2.3 君子兰品种的遗传多样性分析

15 个君子兰品种遗传距离和遗传相似系数见表 4。国兰系列原生态短叶立板和短叶圆头的遗传距离最近, 仅为 0.1123; 国兰系列圆头与立板杂交第三代和短叶圆头麻脸与日本兰杂交黄短叶的遗传距离最远, 均为

0.6330。15 个品种的平均遗传距离为 0.3263。基于遗传相似系数和遗传距离,UPGMA 法聚类分析,得到了 15 个君子兰品种的聚类图(图 2)。8 个居群明显聚为二类:国兰系列 12 个品种聚为一类;日本兰系列的 3 个品种聚为第二类。其中国兰系列的 12 个品种有氛围 3 个小类群,龙头立板单独成为一支;圆头短叶和黄油匠短叶聚为一类,其余品种聚为一类。

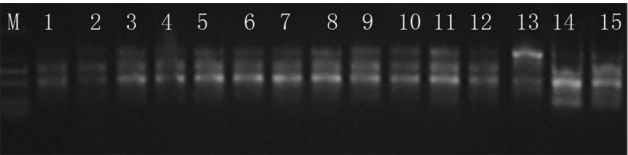


图 2 引物 X03 扩增的图谱

表 3 RAPD 的引物序列及扩增结果

引物	序列 (5' - 3')	总位点数	多态性位 点数	多态位点 百分率/%
AR19	CTGATCGCGG	5	4	80.00
C04	CCGCATCTAC	5	3	60.00
E17	CTACTGCCGT	2	1	50.00
N13	AGCGTCACTC	5	3	60.00
O07	CAGCACTGAC	3	1	33.33
Q20	TCGCCAGTC	6	4	66.67
R10	CCATTCCCCA	4	4	100
R14	CAGGATTCCC	4	3	75.00
S01	CTACTGGCT	3	2	66.67
T18	GATGCCAGAC	4	3	75.00
X03	TGCGCACTG	6	4	80.00
平均		4.27	2.91	67.88

表 4 15 个君子兰品种的遗传相似系数和遗传距离

pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	*****	0.6549	0.7345	0.7257	0.7434	0.7257	0.7257	0.7257	0.6726	0.6903	0.7345	0.7257	0.7080	0.6637	0.6991
2	0.4233	*****	0.7257	0.7522	0.7699	0.7168	0.7699	0.7522	0.7168	0.7345	0.6903	0.6814	0.6637	0.6726	0.5310
3	0.3085	0.3207	*****	0.7788	0.7965	0.8142	0.8142	0.8496	0.7257	0.7257	0.8053	0.7788	0.6903	0.6991	0.6283
4	0.3207	0.2847	0.2501	*****	0.8053	0.8053	0.8230	0.7876	0.6991	0.7522	0.7434	0.7168	0.8053	0.6549	0.6549
5	0.2966	0.2615	0.2276	0.2165	*****	0.7699	0.8584	0.8584	0.7522	0.7522	0.7965	0.7522	0.6991	0.6549	0.5841
6	0.3207	0.3329	0.2056	0.2165	0.2615	*****	0.8584	0.8230	0.7345	0.7522	0.8673	0.7345	0.6814	0.7434	0.6726
7	0.3207	0.2615	0.2056	0.1948	0.1527	0.1527	*****	0.8938	0.7876	0.7345	0.8673	0.6991	0.6637	0.6903	0.6372
8	0.3207	0.2847	0.1630	0.2388	0.1527	0.1948	0.1123	*****	0.7699	0.7522	0.8142	0.7522	0.6991	0.6549	0.6372
9	0.3967	0.3329	0.3207	0.3579	0.2847	0.3085	0.2388	0.2615	*****	0.7345	0.7257	0.6991	0.6991	0.6726	0.5310
10	0.3707	0.3085	0.3207	0.2847	0.2847	0.2847	0.3085	0.2847	0.3085	*****	0.6903	0.6637	0.6814	0.6018	0.5841
11	0.3085	0.3707	0.2165	0.2966	0.2276	0.1424	0.1424	0.2056	0.3207	0.3707	*****	0.7080	0.6195	0.6991	0.6106
12	0.3207	0.3836	0.2501	0.3329	0.2847	0.3085	0.3579	0.2847	0.3579	0.4099	0.3454	*****	0.7699	0.7257	0.7080
13	0.3454	0.4099	0.3707	0.2165	0.3579	0.3836	0.4099	0.3579	0.3579	0.3836	0.4789	0.2615	*****	0.7080	0.6903
14	0.4099	0.3967	0.3579	0.4233	0.4233	0.2966	0.3707	0.4233	0.3967	0.5079	0.3579	0.3207	0.3454	*****	0.7345
15	0.3579	0.6330	0.4647	0.4233	0.5377	0.3967	0.4507	0.4507	0.6330	0.5377	0.4933	0.3454	0.3707	0.3085	*****

注:样品编号同表 1;*****号上方为遗传相似系数 下方为遗传距离。

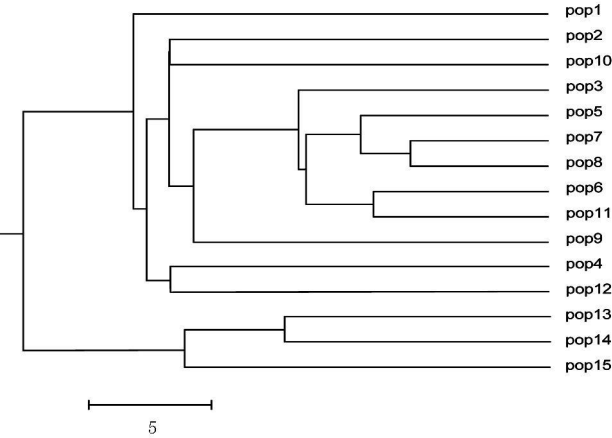


图 3 15 个君子兰品种基于遗传相似系数的聚类分类图

3 讨论

3.1 分子标记用于君子兰品种的遗传变异研究

采用 ISSR 标记对君子兰品种的遗传变异进行研究,10 条引物共扩增出 65 条带,平均每条引物扩增出 6.5 条带,其中 5.4 条多态性带,多态性比率为 81.95%;采用 RAPD 标记对君子兰品种的遗传变异进行研究,11 条引物共扩增出 47 条带,平均每条引物扩增出 4.27 条带,其中 32 条多态性带,多态性比率为 67.88%。可见,2 种标记均可检测出君子兰品种间较丰富的遗传变异,但比较起来,ISSR 标记扩增出的位点更多,检测到的多态性更丰富。使用的 10 条 ISSR 引物中,有 6 条是富含 (AG)_n 的引物,说明君子兰基因组中存在很多富含 (AG)_n 或 (TC)_n 的微卫星。RAPD 扩增时,引物 S01 仅扩增出 2 个位点,因此使用 RAPD 研究君子兰品种的遗传变异是需要筛选更多的引物以便检测出更丰富的遗传变异。

3.2 君子兰品种的遗传变异分析

采用 ISSR 标记研究君子兰品种间的遗传变异, 其多态性位点的百分率为 81. 95%, 接近于蝴蝶兰^[17] (*Phalaenopsis hybrid*) 品种间的 82%; 但远远低于菊花 (*Dendranthema × grandiflora*)^[18] 品种间的 92. 5% 和新疆红花 (*Canluumts tinctorius*)^[19] 品种间的 93. 77%; 采用 RAPD 标记研究君子兰品种的遗传变异, 其多态性位点的百分率仅为 67. 88%, 接近碗莲 (*Nelumbo nucifera*)^[20] 品种间的 70%; 但远远低于亚麻 (*Linum usitatissimum*)^[21] 品种间的 90. 49% 和红花^[19] 品种间 92. 31%。其遗传距离的平均值也仅有 0. 3263。君子兰由德国、日本传入我国并流传到民间后, 品种并不多, 仅有胜利、染厂、和尚、青岛大叶等。20 世纪 50~70 年代通过广大园艺工作者、花卉爱好者杂交选育, 精心培育出一批优良品种, 如圆头、黄技师、油匠、短叶、圆头短叶、圆头短叶和尚等, 这些品种统称为国兰, 也即长春君子兰^[22]。日本兰是 20 世纪 90 年代初期, 辽宁鞍山的君子兰爱好者从日本引进, 后经培育发展, 形成独具特色的新品种^[3]。可见君子兰国兰系列和日本兰系列品种存在较近的亲缘关系。经过相互间多次杂交形成的国兰系列和日本兰系列品种其遗传上的差异大大降低。这也是试验中多态性位点百分率不高的重要原因之一。因此, 在以后君子兰新品种培育的过程中, 有必要选择遗传变异较大的品种作为亲本, 一方面保护君子兰在遗传上的多样性, 同时也有利于获得更多优良的观赏性状。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 16 卷. 第 1 分册, 1985: 3-4.
[2] 中国君子兰协会. 中国君子兰[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 144.
[3] 谷颐. 君子兰品种的分类原则[J]. 中国种业, 2006(1): 53-54.
[4] Lukas Schreiber. Chemical composition of Casparian strips isolated from *Clivia miniata* Reg. roots: evidence for lignin[J]. Planta, 1996 199: 596-601.
[5] 李国泰. 君子兰染色体的核型分析[J]. 生物学通报, 2005, 40(8):

14-15.
[6] Ran Y, Hammett K, R W, Murray B G. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia*(Amaryllidaceae)[J]. Annals of Botany, 2001, 87: 823-830.
[7] Ran Y, Murray B G, Hammett K R W. Karyotype analysis of the genus *Clivia* by Giemsa and fluorochrome banding and in situ hybridization[J]. Euphytica, 1999 106: 139-147.
[8] 梁秀英, 魏长礼. 君子兰叶片光合特性的研究—叶绿素和酸含量变化[J]. 东北师范大学学报(自然科学版), 1993(4): 72-76.
[9] 董慧芳. 君子兰上粉蚧的发生和释放隐唇瓢虫防治试验[J]. 生物防治通报, 1993, 9(1): 12-14.
[10] 陈秀兰, 孙叶, 包建忠, 等. 君子兰辐射诱变育种研究初报[J]. 江苏农业科学, 2006(6): 226-228.
[11] 杨依磊, 尹建元, 孙宁, 等. 君子兰化学成分和药理研究进展[J]. 特产研究, 2010(1): 76-79.
[12] Ran Y, Murray B G, Hammett K R W. Evaluating genetic relationships between and within *Clivia* species using RAPDs[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90: 167-179.
[13] 汪琼, 王燕, 程水源, 等. 君子兰转化酶基因片段(CMCW1)的克隆和序列分析[J]. 园艺学报, 2004 31(2): 256-258.
[14] 庞赫, 郭太君, 胡志军, 等. 大花君子兰 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(2): 167-171, 176.
[15] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀地黄 ISSR 扩增条件优化的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(1): 6-11.
[16] Yeh F C, Yang R. 1994. POPGENE v 1. 31, download from <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
[17] 赵谦, 杜虹, 庄东红, 等. 14 个蝴蝶兰品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2008 28(2): 227-231.
[18] 缪恒彬, 陈发棣, 赵宏波. 85 个大菊品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2007 34(5): 1243-1248.
[19] 葛娟, 岳庆妮, 王蕾, 等. 用 RAPD 和 ISSR 法研究新疆红花主栽品种的遗传多样性[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(6): 1164-1170.
[20] 孔德政, 刘艺平, 杨秋生. 8 个碗莲品种的 DNA 指纹鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 147-150.
[21] Prashant Shekhar, Gupta Sangeeta, Srivastava Manoj et al. 基于 RAPD-PCR 标记的印度亚麻品种遗传多样性和指纹图谱分析[J]. 广西农业科学, 2010, 41(3): 201-206.
[22] 陈宣耀. 君子兰名家精品荟萃[M]. 沈阳: 辽宁科技出版社, 2008.

Application on the Genetic Diversity of Different Species of *Clivia miniata* by ISSR and RAPD Molecular Markers

ZHENG Yu-hong, QIAN Mei-hua, LI Ying, GU Yong-hua, PENG Feng

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing Botanical Garden, Mem. Sun Yat-Sen, Nanjing, Jiangsu 210014)

Abstract: Genetic and variance on 15 cultivars of *Clivia miniata* were studied by ISSR and RAPD marker. The results showed that the 65 loci were identified with 10 simple sequence repeat primers screened from 55 primers, out of which 54 were polymorphic and the percentage of polymorphic sites (PPS) was 81. 95%; with each primers 6. 5 bands were averagely amplified. 47 loci were identified with 11 oligodeoxynucleotides primers screened from 55 primers, out of which 32 were polymorphic and the PPS was 67. 88%; with each primers 4. 27 bands were averagely amplified. The Nei's genetic distance among the 15 cultivars calculated by POPGEN was 0. 1123~0. 6330 with an average of 0. 3263. Cluster analysis indicated that the 15 cultivars could be divided into 2 groups. The results provided molecular data for the breeding of new cultivars of *C. miniata*.

Key words: *Clivia miniata*; cultivar; ISSR; RAPD; genetic and variance