

ISSR 和 SRAP 标记技术在兰花植物种质资源研究中的应用

蹇黎

(毕节学院 地理与生命科学系, 贵州 毕节 551700)

摘要:分子标记技术在兰花种质资源的亲缘关系鉴定与遗传多样性分析、分子遗传图谱的构建与目的性状基因的标记定位、基因库的构建和基因克隆、辅助育种选择及品种纯度鉴定等研究领域被广泛利用与推广。现从简单重复序列间扩增(Inter-simple sequence repeat, ISSR)和相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记技术的基本原理、方法、特点以及在兰花植物种质资源的遗传育种中的应用现状和前景进行了综述与探讨。

关键词:ISSR; SRAP; 兰科植物; 应用

中图分类号:Q 943 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)24-0190-03

兰花(orchid)一般是指具有观赏价值兰科(Orchidaceae)植物的总称,是有花植物中最大科之一^[1-3]。中国是兰属植物资源分布中心之一,野生兰花资源和栽培兰花资源极为丰富,几乎遍及全国各地,共有173属1200余种,占总兰科植物的1/6^[4]。兰花不仅具有观赏价值,而且还具有很高药用价值和经济价值。但不同的兰科植物的形态特征及生物特征具有很大的差异,再加上兰花植物资源的保护研究以及资源的有效合理利用与推广未实现高效一体化,因此,解决这些问题必须借助于先进的研究技术与方法。

分子标记是继形态学标记、生物化学标记以及细胞学标记之后发展起来的一种直接反应遗传物质DNA水平多态性的一种遗传标记,具有基因组变异丰富、标记数量多、目标基因的表达不受生物的发育阶段及环境影响、检测手段方便快捷、成本较低等特点,已成为资源系统鉴定与种质资源育种研究的最高效的手段之一。ISSR(Inter-simple sequence repeat,简单重复序列间扩增)和SRAP(相关序列扩增多态性,Sequence-related amplified polymorphism)都是基于PCR标记系统的一种新型的显性分子标记技术。ISSR是在微卫星基础上发展起来^[5],结合了简单重复序列(Single sequence repeat, SSR)标记技术和随机引物扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记技术的优点,其引物不但能在种间

通用,而且更能揭示物种间的多态性,其检测手段非常方便快捷。SRAP综合了RAPD和AFLP的高效、重复性好、便于目标基因的克隆与测序等诸多优点^[6]。ISSR和SRAP标记技术现已广泛应用于兰花种质资源的亲缘关系鉴定与遗传多样性分析、分子遗传图谱的构建与目的性状基因的标记定位、基因库的构建和基因克隆以及育种辅助选择与品种的纯度鉴定等方面的研究。现从以上几方面来综述ISSR与SRAP分子标记技术在兰花植物种质资源研究中的应用现状,并对其资源更合理高效的保护和利用进行探讨。

1 ISSR 与 SRAP 原理及特点

ISSR与SRAP分子标记技术是检测种质资源间(内)的基因片段差异性最高效、最理想的遗传标记方法。

1.1 ISSR 分子标记

ISSR分子标记是在微卫星基础上发展起来的一种显性遗传标记,结合了SSR和RAPD标记的优点,是在不用知道SSR两端的碱基序列的基础上添加2~4个随机核苷酸,在PCR反应过程中,此引物既保证了锚钉序列的位点的退火温度,也可以减少其它靶点的退火几率,对基因组片段的差异进行检测,其扩增产物在经过电泳分析进行多态性分析。ISSR标记技术具有其引物可在种间通用、稳定性好、多态性高、无需知道SSR靶标序列信息、重复性好、易操作、快捷方便、成本低等诸多优点。不足之处在于不同引物及不同材料间PCR扩增反应最佳条件可能也不尽相同;很难区分显性纯杂合基因型。目前,许多兰花品种均建立和优化了各自最适的ISSR-PCR反应体系。

1.2 SRAP 分子标记

SRAP分子标记是一种结合了RAPD、AFLP、RFLP等分子标记优点并克服其缺点的PCR标记系统

作者简介:蹇黎(1978-),女,博士,副教授,研究方向为生物化学与分子生物学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770903);贵州省教育厅自然科学研究资助项目(2007082)。

收稿日期:2011-09-26

的显性新型标记,是通过独特的双引物(17 bp 上游引物和 18 bp 下游引物)设计对启动子或内含子区域进行特异扩增,其引物具有通用性。该标记是建立在不同种质资源的启动子、内含子与间隔区长度的不同而致使其种间和种内表现出明显的多样性。SRAP 分子标记具有多态性高、重复性好、易操作、快捷方便、成本低、在基因组中分布均匀、易对特定序列进行测序与相关基因的克隆等诸多优点。

2 ISSR 与 SRAP 技术的应用

ISSR 与 SRAP 分子标记技术与其它分子技术及传统的常规遗传标记相比较而言,更具有诸多优点,现今在兰花种质资源的研究中得以广泛应用。

2.1 遗传多样性研究

植物遗传多样性一般是指种间或种内的不同个体的遗传差异之和,是物种生存适应与发展进化的基本特征及物种长期进化演变的产物。研究物种的遗传多样性可以了解与其生长环境之间的关系,采取科学高效的措施保护濒危物种遗传资源基因,认识生物多样性的起源与进化,同时也根据资源的 DNA 指纹图谱和各个目标性状间的多样性,使其植物种质资源更能合理高效的利用。赵谦等^[7]采用 ISSR 标记技术分析了 14 个蝴蝶兰品种间的遗传关系,结果显示,14 个引物共扩增出 179 条带,其中多态性条带 147 条,多态性条带比率为 82%,表明品种间存在着丰富的遗传多样性。郑玉红等^[8]利用 ISSR 和 RAPD 分子标记技术在不同君子兰品种遗传多样性的应用,结果表明,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,多态百分率为 81.95%。吴振兴等^[9]对兰属(*Cymbidium*)植物 ISSR 遗传多样性分析,15 个引物共扩增出 836 条带,其中有 227 条多态带,多态百分比为 27.2%。孙小琴等^[10]采用 ISSR 分子标记对江西省寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)的遗传多样性进行了分析,12 条 ISSR 引物共得到 123 个位点,其中多样性条带为 97 位点(多态性条带百分率为 78.9%)。高丽等^[11]采用 ISSR 对湖北野生春兰资源遗传多样性分析,11 个引物共检测到 127 个位点,其中 112 个为多态位点,占 88.19%,表明春兰具有丰富的遗传变异。马佳梅等^[12]利用 ISSR 对西双版纳地区流苏石斛遗传多样性分析,12 个引物共检测出 117 个位点,其中 105 个为多态性位点,多态性比率为 89.74%。Wang H Z 等^[13]利用 ISSR 对春兰的遗传变异及品种的鉴定,19 种 ISSR 引物共检测出 239 个位点,多态性比率为 99.16%。Lu J J 等^[14]利用 ISSR 对 151 个墨兰品种的遗传多样性和群居结构进行分析,18 个引物共扩增出 14 478 条带纹,每种引物在所有材料间均遗传多样性,比率为 100%。赖望英^[15]利用 SRAP 分析了大花蕙兰植物学形态特征及遗传多样性,结果表明,29 对 SRAP 引物组合共扩增出 428 条谱带,其中 421 条为多态带,多态性比例为 98.3%。周艳

霞等^[16]利用 SRAP 标记分析文心兰部分种质资源的遗传多样性,19 个引物组合,共产生 277 条多态性条带,平均每个引物组合产生 14.6 个多态性条带。何俊蓉等^[17]对 13 个国兰品种遗传关系进行 SRAP 分析,表明 57 对 SRAP 引物,共扩增出 746 条带,其中有 738 个多态性位点,总的位点多态性比率为 98.9%,平均每对引物组合产生的位点数为 13 个位点。任羽等^[18]利用 SRAP 技术对海南省 9 种石斛种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行了分析,18 对多态性引物共获得 285 条多态性带,平均每个引物产生 15.8 个多态性条带。蹇黎等^[19]对寒兰品种类型的 SRAP 分子鉴定,表明 11 对引物共扩增出 586 条带纹,其中 504 条为多态性,比率为 86.01%。樊洪泓等^[20]利用 SRAP 和 RAPD 2 种分子标记技术对 9 份石斛种质进行遗传多样性研究,表明 40 对 SRAP 引物组合共扩增条带 1 977 条,多态性比率为 90.2%。

2.2 亲缘关系及系统分类研究

ISSR 和 SRAP 分子标记技术能有效的确定兰科植物种植资源间的亲缘关系及品种间的遗传距离,进而可以划分杂交种优势群,提高兰花育种效率。严华等^[21]对 38 种国兰亲缘关系进行 ISSR 标记技术分析,表明遗传相似系数为 0.58 时,供试材料可以分为 2 组。赵谦等^[7]利用 ISSR 在 14 个蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用,鉴定了 22 个蝴蝶兰品种/品系在遗传距离 $L=0.254$ 处可分为 8 个组,品种间的遗传相似系数范围在 0.734~0.936 间,证实部分蝴蝶兰品种间存在显著的遗传分化。李敏等^[22]利用 ISSR 技术分析 16 个蝴蝶兰品种的亲缘关系,表明来源于不同地域的 16 个品种在遗传距离 $L=0.2225$ 处可分为 2 个类群。Wang H Z 等^[23]利用 ISSR 技术对 31 个密花石斛进行系统学和分子鉴定分析,可将供试材料分为 6 组群。Wang H Z 等^[13]利用 ISSR 技术对春兰的遗传多样性及亲缘关系进行分析鉴定了品种间的亲缘关系远近。蹇黎等^[19]利用 SRAP 分子对寒兰品种类型进行了亲缘关系分析。樊洪泓等^[20]利用 SRAP 和 RAPD 2 种分子标记技术对 9 份石斛种质进行遗传多样性及亲缘关系研究。任羽等^[18]利用 SRAP 技术对海南省 9 种石斛种质资源的遗传多样性及亲缘关系进行了分析。杨春勇等^[24]利用 ISSR 标记对人工栽培的石斛进行了遗传多样性分析和亲缘关系分析。

2.3 品种及种质资源鉴定

ISSR 标记技术和 SRAP 技术能快速高效的对兰花品种及种质资源进行鉴定。沈颖等^[25]用 ISSR 技术对 9 种石斛属植物进行鉴定分析,7 个引物能扩增出多态性带纹,其中 UBC807 和 UBC864 具有多态性比率最高,均可以将所有的品种区分。杜富荣等^[26]用 ISSR 标记分析不同地区紫茎泽兰群的遗传变异,12 条引物能有效将所有材料区分开。周艳霞等^[27]对文心兰种质的 SRAP 分析,19 个引物能有效将品种区分。

2.4 遗传图谱的构建

通过构建兰花植物种质资源的遗传图谱来显示其特异基因或遗传标记的相对位置,为系统研究兰花资源基因组和特异基因的定位克隆提供理论依据。利用 ISSR 技术和 SRAP 技术构建兰花 DNA 指纹图谱已得到广泛应用。张芬等^[28]利用 SRAP 建立兰花指纹图谱。赵谦等^[7]利用 ISSR 在 14 个蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用,构建了材料的指纹图谱,并检测出 19 条品系特异性条带,扩增片段大小变幅在 200~1 700 bp 之间,其中 4 747 得到的品系特异带纹最多。吴振兴等^[9]利用 ISSR 对兰属植物构建了指纹图谱,扩增的总带纹变幅 15~81 个不等,其中 UBC811 扩增的多态性带数最多(26 条),UBC827 扩增的带纹数最少(1 条)。

3 结语

目前,虽然兰科植物种质资源的保护和育种技术在不断的发展,新的兰花品种也在不断的育成,但这仍不能满足国内外花卉市场的需求。在兰花植物种质资源研究方面,随着分子标记技术的完善与发展,该技术不但能够准确的鉴定、评价和发掘兰科植物种质资源的优异特异性状基因,加快兰花品种的培育、兰花特异基因的克隆、资源的遗传多样性及亲缘关系的鉴定,还能够高效合理的利用和创新优质种质资源,改良其花色、香、型等多种农艺性状来丰富兰花种质资源的遗传基础。综上所述,ISSR 和 SRAP 分子标记技术均具有操作简便、重复性强、引物通用、多态性好及成本低等诸多优点,但只是应用到部分兰科植物种质资源遗传多样性及亲缘关系等方面的基础研究。因此,只有将分子标记技术融入到育种中才能培育出观赏价值高和药用性状强的优质优良新品种。

参考文献

- [1] Dressler R L. How many orchid species[J]. Selbyana, 2005, 26: 155-158.
- [2] 许东生. 中国寒兰名品赏培[M]. 1 版, 北京: 中国林业出版社, 2003: 4-20.
- [3] 吴应祥. 中国兰花[M]. 2 版, 北京: 中国林业出版社, 1993: 26-64.
- [4] 刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 等. 中国兰属植物[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1-20.
- [5] Ziedewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [6] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to

- mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
- [7] 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.
- [8] 郑玉红, 钱美华, 李莹, 等. 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[J]. 北方园艺, 2010(23): 136-139.
- [9] 吴振兴, 王慧中, 施农农, 等. 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析[J]. 遗传, 2008, 30(5): 627-632.
- [10] 孙小琴, 李恩香, 贾文杰, 等. 寒兰基因组 DNAISSR-PCR 反应条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(29): 14044-14046.
- [11] 高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 250-257.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Lu J J, Hu X, Liu J J, et al. Genetic diversity and population structure of 151 *Cymbidium sinense* cultivars[J]. Journal of Horticulture and Forestry, 2011, 3(4): 104-114.
- [15] 赖望英. 大花蕙兰植物学形态特征及遗传多样性的 SRAP 分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [16] 周艳霞, 尹俊梅, 任羽, 等. 文心兰种质遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 热带农业科学, 2009, 29(7): 43-46.
- [17] 何俊蓉, 孙淑霞, 刘菲, 等. 13 个国兰品种遗传关系的 SRAP 分析[J]. 分子植物育种, 2011, 86(9): 103-109.
- [18] 任羽, 尹俊梅, 杨光穗. 海南石斛属植物亲缘关系的 SRAP 分析[J]. 热带作物学报, 2008, 29(6): 767-770.
- [19] 蹇黎, 朱利泉. 寒兰品种类型的 SRAP 分子鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3184-3190.
- [20] 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(4): 627-632.
- [21] 严华, 张冬梅, 罗玉兰, 等. 38 种国兰亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 736-741.
- [22] 李敏, 王尧峰, 明凤. 用 ISSR 分子标记技术分析 16 个蝴蝶兰品种的亲缘关系研究[J]. 中国农业科技导报, 2010(1): 60-65.
- [23] Wang H Z, Feng S G, Lu J J, et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Sci. Hort, 2009, 122(3): 440-447.
- [24] 杨春勇, 李学兰, 王云强, 等. 人工栽培石斛的 ISSR 标记分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 148-152.
- [25] 沈颖, 徐程, 万小风, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用[J]. 中草药, 2005, 36(3): 423-427.
- [26] 桂富荣, 郭建英, 万方浩. 用 ISSR 标记分析不同地区紫茎泽兰种群的遗传变异[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(1): 41-48.
- [27] 周艳霞, 尹俊梅, 任羽, 等. 文心兰种质遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 热带农业科学, 2009, 29(7): 43-46.
- [28] 张芬, 李达, 吕长平, 等. 兰花 SRAP 指纹图谱的构建[J]. 湖南农业科学, 2011(2): 129-132.

The Application of ISSR and SRAP Technique in *Cymbidium* Plants Resource Research

JIAN Li

(College of Geography and Life Science, Bijie University, Bijie, Guizhou 551700)

Abstract: The applications of molecular markers in the construction of molecular genetic map, related species, genetic diversity and molecular marker-assisted selection, origin and evolutionary relationship research etc in *Cymbidiums* plant resource were reviewed. The rules and its application of ISSR and SRAP methods in the Genetics and Breeding of orchid's plants resource were discussed.

Key words: ISSR; SRAP; *Cymbidium*; application