

韩晓霞,章静钢,张鹏博,等. 基于 SSR 的铁皮石斛实生群体遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):90-93.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.022

基于 SSR 的铁皮石斛实生群体遗传多样性研究

韩晓霞¹, 章静钢², 张鹏博¹, 宗宇¹, 陈文荣¹, 郭卫东¹

(1. 浙江师范大学, 浙江金华 321004; 2. 浙江省金华市仙源山铁皮石斛种植基地有限公司, 浙江金华 321000)

摘要:铁皮石斛属于传统名贵中药,由于人们的过度采挖,其野生资源日益减少,遗传多样性遭到严重破坏,人工栽培是对石斛资源进行保护的有效措施之一。本研究采用 15 对 SSR 引物对 5 个实生群体的 100 株铁皮石斛进行了遗传多样性分析,以期检测群体之间和群体内部的遗传分化,确定纯化株系,为后期优良品种选育提供理论参考。结果表明,15 个位点共检测到 185 个等位基因,群体 B6 的等位基因数目最大,为 7.14 个;群体 B11 等位基因数最少,为 5.42 个;观察杂合度(H_o)最大的种群为 B6(0.376),群体 B10 最小(0.286)。近交系数(F_{is})最大值出现在群体 B10 中,为 0.241;群体 B6 近交指数最小,仅为 0.091。STRUCTURE 遗传结构分析发现 5 个石斛实生群体可能来自 2 个同源基因库。实生群体 B10 遗传背景单一,可以用于后续的铁皮石斛纯化育种,群体 B6 具有较高的杂合度,可以用作种间杂交的良好材料,有利于种间差异性状的整合。

关键词:铁皮石斛;SSR;实生群体;遗传多样性

中图分类号: S567.23+9.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0090-04

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)是兰科(Orchidaceae)石斛属植物,属于传统名贵中药,由于人们的过度采挖,铁皮石斛野生资源日益减少,已近枯竭,遗传多样性遭到严重破坏。1987 年铁皮石斛因数量锐减,被列入《国家重点保护野生药材物种名录》^[1-2]。铁皮石斛的人工栽培是对石斛资源进行保护的有效措施之一,虽然近几年人工栽培铁皮石斛取得了较大的进展,但由于种质混杂、盲目引种等原因,致使铁皮石斛质量和产量差异较大,扰乱了消费市场,阻碍铁皮石斛产业的正常、有序发展^[3-8]。因此,开展铁皮石斛种质资源和遗传多样性研究,对铁皮石斛优良品种的选育具有重要意义。

遗传多样性是生物多样性的基本组成元素,丰富的遗传多样性可以维持种群动态平衡,为物种的进化提供基本保障;评价一个物种的遗传多样性也是制定该物种科学保护策略的重要前提。前人在铁皮石斛遗传多样性研究方面取得了一定进展,沈洁等利用 RAMP 标记对 9 个野生居群的 112 株铁皮石斛进行了检测,结果表明,不同居群间存在丰富的遗传多样性,而且居群之间存在一定地域相关性^[9]。丁鸽等采用 RAPD 技术对 8 个铁皮石斛野生居群的遗传多样性和亲缘关系进行研究,发现引物 S412 可以有效鉴别 8 个野生居群;同样发现居群的地理分布与居群间的遗传关系呈现良好的正相关性^[10]。Li 等利用 AFLP 标记对 12 个铁皮石斛居群的遗传多样性进行研究,发现居群间分化系数变幅为 0.047 ~

0.578,居群间的遗传变异平均值为 26.97%^[11],研究结果支持将这 12 个铁皮石斛居群分为 3 大类群。Ding 等利用 SRAP 标记对铁皮石斛的 9 个野生种的 84 个植株进行研究,发现在物种水平上遗传多样性较高,而在居群水平上差异性较低^[12]。Shen 等利用 ISSR 标记技术将 8 个野生铁皮石斛居群区分开来,发现了 16 个具有特异性标记的 DNA 片段^[13]。谢明璐等利用开发的 SSR 标记成功对铁皮石斛种质进行了纯度鉴定^[14]。但是基于 SSR 的铁皮石斛遗传多样性研究仍鲜有报道,更缺乏对人工栽培铁皮石斛实生群体的遗传多样性分析,相关研究缺失不利于铁皮石斛优良品种的选育,会造成杂交亲本的盲目选择。

核基因 SSR 标记在真核生物基因组中分布非常普遍,由于其丰富的多态性和共显性遗传等特征,被广泛应用于种内和种群间遗传变异的分析。本研究利用 15 对 SSR 引物对铁皮石斛不同实生群体的遗传多样性进行了分析,主要目的在于:(1)评估石斛实生群体的近交系数,确定纯化株系;(2)检测石斛实生群体之间和群体内部的遗传分化;(3)为后期人工杂交育种提供理论参考。

1 材料与方法

在铁皮石斛实生苗群体中选取表观性状优良的 5 个群体,分别标记为 B4、B6、B10、B11、B12,每个群体随机选择长势较为一致的铁皮石斛 20 株,单株编号分别为 1~20,共 100 株用于遗传多样性分析。分别从 100 个单株上取健康幼嫩的叶片,带回实验室,置于 -80℃ 的超低温冰箱中备用。

1.1 DNA 提取

利用优化后的 CTAB 法^[15]进行 DNA 提取。从叶片中提取基因组总 DNA(图 1),每份样品使用 1 g 叶片。DNA 提取后使用 TE 缓冲液溶解,置于 -20℃ 的冰箱中备用。

1.2 PCR 扩增及测序

使用 15 对前人报道的、在石斛中扩增稳定、多态性好的

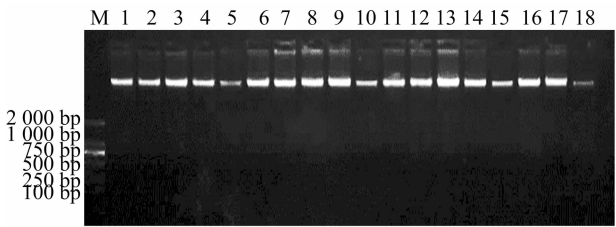
收稿日期:2015-05-02

基金项目:浙江省金华市科学技术局农业类重点项目(编号:2012-2-018)。

作者简介:韩晓霞(1993—),女,山西朔州人,硕士研究生,主要从事特色经济植物研究。E-mail:15268636679@163.com。

通信作者:宗宇,博士,讲师,研究方向为植物种质资源与遗传。

E-mail:yzong@jznu.cn。



M—2 000 bp marker; 1~3—B4群体; 4~7—B6群体; 8~11—B10群体, 12~15—B11群体; 16~18—B12群体。图2同。

图1 部分铁皮石斛样品 DNA 电泳检测结果

SSR 引物进行 PCR 反应(表 1)。引物由 Invitrogen(上海)公司合成,并合成 5'端经过荧光修饰(FAM 和 HEX 2 种荧光)的 M13 - Tail 通用引物(序列为: TGTAACGACGGC-CAGT)^[19]。PCR 体系为 20 μ L,各组分体积见表 2。

PCR 反应步骤及条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;随后是 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环后反应条件设置为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,12 个循环;最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。

表 1 SSR 引物序列及扩增长度范围

引物		序列(5'→3')	PCR 产物预期大小(bp)
F8 ^[16]	F	< FAM - M13 - Tail > CTTGATCGGGCCATCATT	132 ~ 160
	R	CTCTATCCGGCATA GTT	
F3 ^[16]	F	< HEX - M13 - TAIL > CTCACCAAATTTCTCCAC	146 ~ 200
	R	ATCCGGCATAATTAGGAG	
DOeSSR33 ^[17]	F	< FAM - M13 - TAIL > AAATCATCGCCGTGAGAC	161 ~ 210
	R	ACCAAGTACTCCCTGTATTC	
DOeSSR41 ^[17]	F	< FAM - M13 - TAIL > AACAAAGCTTTGTTTCCACTA	150 ~ 220
	R	GCTCAAAGTATAATGGCAGAG	
DOeSSR44 ^[17]	F	< HEX - M13 - TAIL > GATGTGCTGTTGTCTAGATT	135 ~ 180
	R	TAGATTGCTTGTTCAGGCTAC	
DOeSSR46 ^[16]	F	< HEX - M13 - TAIL > AATGTTGTGTTCTCTCTGTG	104 ~ 154
	R	AGCCCAATAGACAAGATAGGT	
DNeSSR37 ^[16]	F	< FAM - M13 - TAIL > ATGGGGAGGGTTGCAAATAT	152 ~ 234
	R	ACCGCTGCGTCCAGTAATCA	
DNeSSR86 ^[16]	F	< HEX - M13 - TAIL > AAGCAGCGGGAGGAGCAGAA	244 ~ 288
	R	ACATCGCAGTCATCAATGTAA	
DOeSSR112 ^[17]	F	< HEX - M13 - TAIL > GCTCCAGGTATTCTTTCTCG	242 ~ 270
	R	CTTCTGGGTTTCGCCTTT	
DOeSSR116 ^[17]	F	< HEX - M13 - TAIL > AATCTGATAAGAAGAGGTGGCT	138 ~ 160
	R	AAGGGCATTTGAAGAAGCA	
DOeSSR117 ^[17]	F	< FAM - M13 - TAIL > TTCACCTCCTCGCCAACT	112 ~ 148
	R	CTGCAACCCATTCAACCC	
DOeSSR123 ^[17]	F	< FAM - M13 - TAIL > AGTTCAGCCTAAAGACGAGC	230 ~ 349
	R	ATGGCAGTCACAGCCCTA	
BWH004 ^[18]	F	< HEX - M13 - TAIL > AGTACCTCTCGTAGGCGTT	149 ~ 169
	R	CTTGGACACCACTTGTCTAG	
BWH005 ^[18]	F	< HEX - M13 - TAIL > CTTACAGCACGGAGGACA	366 ~ 411
	R	CCAAGTCTGTCAGGAGAT	
BWH010 ^[18]	F	< HEX - M13 - TAIL > TGACTGAGGTGCAGAGGTTT	136 ~ 160
	R	GATGATGAGTATGAAGAGCC	
BWH013 ^[18]	F	< FAM - M13 - TAIL > CAAGGAAGGTGGGCTGTC	327 ~ 354
	R	AGATGTTGGAACGGAGGG	

表 2 SSR 引物的 PCR 反应体系

组分	体积(μ L)
Premix Taq(大连宝生物)	10.0
正向引物(10 mmol/L,上海生工)	0.1
反向引物(10 mmol/L,上海生工)	0.5
M13 - Tail(10 mmol/L,上海英骏)	0.4
DNA 模板(10 ~ 30 ng/ μ L)	1.0
双蒸水	8.0
总体积	20.0

PCR 反应结束后,取 4 μ L 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝

胶进行电泳检测(图 2),确认得到单一且长度正确的片段后,将 PCR 产物送至生工(上海)生物工程有限公司进行基因分型(图 3)。

1.3 数据处理

为尽可能避免基因分型过程中的偏差,确定等位基因大小后进行了 2 次人工校对。对于每个种群和 SSR 位点,使用 GenAlEx 6.501^[20] 计算等位基因个数(N_a)、有效等位基因个数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和近交系数(F_{is})。利用 FSTAT 2.9.3^[21] 计算经过香农多样性指数(I)。

利用 STRUCTURE 2.3.4 软件^[22] 计算同源基因库的数

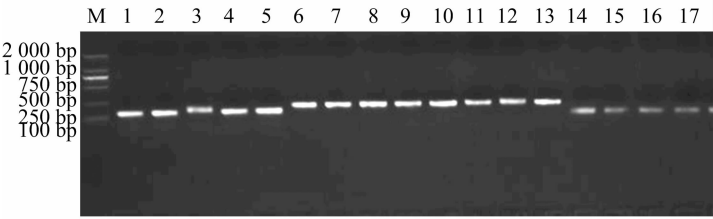


图2 部分铁皮石斛样品 SSR-PCR 扩增结果电泳图

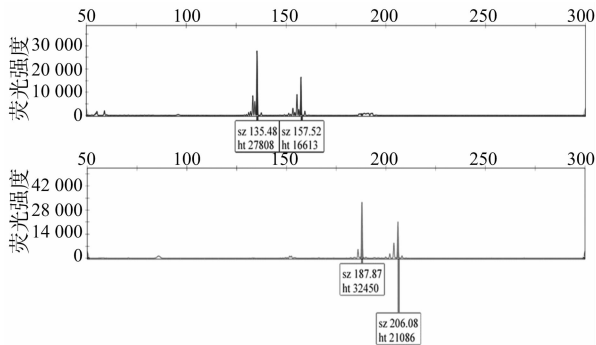


图3 部分铁皮石斛样品 SSR 基因分型的峰型

目,该方法利用贝叶斯概率统计将铁皮石斛个体或预定义的群体划分到 K 个支系中来解释其遗传结构。本研究,STRUCTURE 2.3.4 的运行选择混合模型和关联等位基因频率等参数配置,将同源基因库个数的赋值为 $1 \sim 8(N+3)$,每个 K 值进行 10 次重复计算来推测最佳的 K 值。每一次运行使用 200 000 个循环的马尔科夫链-蒙特卡洛模拟(MC-MC),初始收敛周期为 100 000;其他参数设为默认值。运行后结果上传到 STRUCTURE HARVESTER (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) 确定最佳 K 值,运行结束后利用 CLUMPP 软件处理对 10 次独立运行得到的分配系数进行均一化处理,然后使用 DISTRUCT 软件绘制计算结果。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多样性

15 对 SSR 引物共检测到 185 个等位基因,每个位点的等位基因数目从 2.3 个(DNeSSR86)到 22.6 个(DOeSSR41)不等,平均每个位点有 12.3 个等位基因。有效等位基因数从 1.3 个(DNeSSR86)到 9.2 个(DOeSSR41),平均值为 5.5 个。香农多样性指数最大值是 2.61(DOeSSR41),最小值是 0.31(DNeSSR86),平均值为 1.82。观察杂合度最大值是 0.756(DOeSSR44),最小值是 0.114(DNeSSR86),平均值为 0.604。期望杂合度最大值为 0.786(DNeSSR37),最小值为 0.169(DNeSSR86),平均值为 0.654。表明本研究中使用的 SSR 引物大部分多态性良好,可用于后续的群体遗传信息分析;其中引物 DOeSSR33、DNeSSR86、DOeSSR117 多态性显著低于其他引物(表 3)。

2.2 铁皮石斛群体的遗传多样性

对 5 个石斛实生群体进行遗传多样性分析,发现群体 B6 的等位基因数目最多,为 7.14 个,其次是群体 B12,为 6.50 个;群体 B4 和 B10 等位基因数均为 5.64 个;群体 B11 等位基因数最少,为 5.42 个;5 个实生群体的有效等位基因数存在一定的差异,以群体 B6 的有效等位基因数目最大,为 6.57

表 3 不同 SSR 位点的遗传多样性

引物	等位基因数	有效等位基因数	香农指数	期望杂合度	观察杂合度
F8	16.2	6.1	2.02	0.768	0.579
F3	11.1	4.5	1.71	0.711	0.726
DOeSSR33	5.5	2.4	1.06	0.576	0.332
DOeSSR41	22.6	9.2	2.61	0.704	0.723
DOeSSR44	14.2	7.1	2.09	0.784	0.756
DOeSSR46	13.0	6.8	2.23	0.673	0.742
DNeSSR37	13.5	7.3	2.04	0.786	0.707
DNeSSR86	2.3	1.3	0.31	0.169	0.114
DOeSSR112	13.2	5.8	2.10	0.650	0.734
DOeSSR116	12.2	3.1	1.52	0.622	0.284
DOeSSR117	7.0	3.4	1.34	0.644	0.530
DOeSSR123	15.7	8.1	2.43	0.775	0.637
BWH004	12.7	5.4	1.98	0.617	0.743
BWH005	12.4	5.1	1.76	0.739	0.745
BWH010	13.6	6.1	2.00	0.599	0.707

个,最小值虽然出现在群体 B11 中,但是与群体 B4 几乎没有差异(表 4)。观察杂合度最大的种群是 B6,为 0.376,群体 B12 略低于 B6,为 0.361;群体 B4、B11 没有显著差别,观察杂合度分别为 0.309、0.329;群体 B10 最小,仅为 0.286。期望杂合度表现出的趋势与观察杂合度相似,最大值和最小值分别出现在群体 B6 和群体 B11,群体 B6 为 0.654,群体 B11 为 0.514。分别对 5 个石斛种群的近交系数进行了计算。近交系数最大值出现在群体 B10 中,为 0.241;其次为群体 B4,为 0.168;群体 B6 近交指数最小,仅为 0.091。

表 4 石斛不同实生群体的遗传多样性

实生群体	平均等位基因数	有效等位基因数	观察杂合度	期望杂合度	近交系数
B4	5.64	4.84	0.309	0.537	0.168
B6	7.14	6.57	0.376	0.654	0.091
B10	5.64	5.02	0.286	0.569	0.241
B11	5.42	4.81	0.329	0.514	0.126
B12	6.50	5.14	0.361	0.621	0.177

2.3 铁皮石斛群体的遗传结构

为了进一步检验群体的遗传多样性信息,基于贝叶斯统计法对 5 个铁皮石斛实生群体进行了遗传结构分析。STRUCTURE 结果显示,对 5 个群体的 K 值范围设为 $1 \sim 8$,运行 10 次重复后,将 STRUCTURE 的运行结果上传到 STRUCTURE HARVESTER 并通过前人描述的方法确定最佳的 K 值,在 $K=2$ 处观察到 ΔK 的最大值(图 4),结果表明,5 个石斛实生群体可能来自 2 个同源基因库(图 5)。

从 STRUCTURE 结果中我们发现,除群体 B6 中的一些个体表现出较为明显的多源遗传背景外,其他 4 个群体种质纯

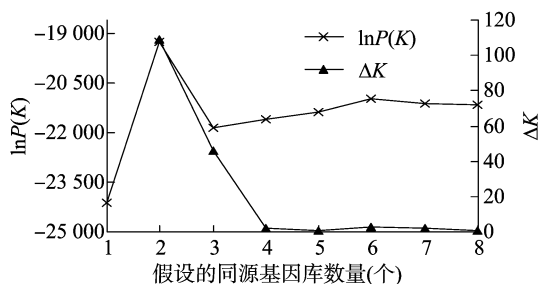


图4 依据STRUCTURE HARVESTER确定最佳的K值

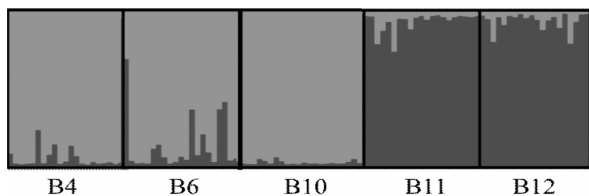


图5 STRUCTURE 计算结果为K=2时不同实生群体间的基因库

度较高,以群体 B10 遗传背景最为单一,与之前的杂合度、近交系数等遗传多样性参数保持一致。

3 结论与讨论

本研究采用 15 对微卫星引物对 5 个石斛实生群体共 100 个个体进行了 PCR 扩增,15 个位点共检测到 185 个等位基因,群体 B6 的等位基因数目最多,群体 B11 等位基因数最少,5 个石斛实生群体可能来自 2 个同源基因库。杂合度水平可以在很大程度上反映植物的遗传多样性^[23-24]。杂合度较低与石斛的繁育系统有关,铁皮石斛自交和杂交均可育,试验使用的实生种群来自于自交群体,但人工授粉失败或隔离措施不完善可能造成一些个体是开放式授粉形成的实生苗,这可能是导致 B6 群体杂合度高于其他群体的原因。

近交系数的取值为 $[-1, 1]$,负值表示群体种杂合个体较多,群体的形成可能受到了外源基因流的影响,并非自交育种过程中成功构建的群体。正值表明群体间的近交繁殖有所增加,对于自然群体来讲可能是因为群体大小的减小或人为的干预^[20]。本研究石斛实生群体为近亲或自交形成的种系,有较高的近交系数是正常现象,而且群体 B10 近交系数最大,表明其遗传背景较为单一,种质比其他实生群体更加纯化,这一点也能通过 B10 具有最小的观察杂合度得到佐证。

基于种质杂合背景,因遗传背景单一,实生群体 B10 可以用于后续的纯化选择,但是否属于石斛特征性状(石斛多糖、石斛碱含量等)还需进一步研究。与其他实生群体相比,群体 B6 具有较高的杂合度,可以用作石斛种间杂交的良好材料,有利于种间差异性状的整合。

参考文献:

- [1] 姚领爱,胡之璧,郑志仁,等. 铁皮石斛种质资源研究中的 DNA 条形码初探[J]. 上海农业学报,2012,28(1):49-54.
- [2] 张志勇,齐泽民,黄作喜. 铁皮石斛生物技术研究进展[J]. 核农学报,2014,28(4):605-610.
- [3] 斯金平,诸燕,朱玉球. 铁皮石斛人工栽培技术研究与应用进展[J]. 浙江林业科技,2009,29(6):66-70.
- [4] 郑希龙,蔡时可,邱道寿,等. 铁皮石斛种质资源研究进展[J].

广东农业科学,2011(增刊1):110-114.

- [5] 包英华. 铁皮石斛种质资源的鉴定与评价研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [6] 包英华,潘超美,白音,等. 铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(5):349-353.
- [7] 武荣花. 我国石斛属植物种质资源及其亲缘关系研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2007.
- [8] 张启香,方炎明. 铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结构观察[J]. 西北植物学报,2005,25(9):1761-1765.
- [9] 沈洁,徐慧君,袁英惠,等. 铁皮石斛野生居群基于 RAMP 标记的遗传多样性评价[J]. 药学报,2011,46(9):1156-1160.
- [10] 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]. 药学报,2005,40(11):1028-1032.
- [11] Li X E, Ding X Y, Chu B H, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP[J]. Genetica, 2008, 133(2):159-166.
- [12] Ding G, Zhang D Z, Ding X Y, et al. Genetic 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.
- [13] Shen J, Ding X Y, Liu D Y, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(3):420-422.
- [14] 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]. 药学报,2010,45(5):667-672.
- [15] Doyle J J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19:11-15.
- [16] Lu J J, Kan J Y, Ye S R, et al. Isolation and characterization of novel EST-SSRs in the showy dendrobium, *Dendrobium nobile* (Orchidaceae)[J]. Genet Mol Res, 2014, 13:986-991.
- [17] Lu J J, Suo N N, Hu X, et al. Development and characterization of 110 novel EST-SSR markers for *Dendrobium officinale* (Orchidaceae)[J]. American Journal of Botany, 2012: e415-e420.
- [18] Hou B W, Tian M, Luo J, et al. Genetic diversity assessment and *ex situ* conservation strategy of the endangered *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using new trinucleotide microsatellite markers[J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298(8):1483-1491.
- [19] Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(2):233-234.
- [20] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6:288-295.
- [21] Goudet J F. A computer program to calculate F-statistics (version 2.9.3)[J]. Journal of Heredity, 1995, 86:485-486.
- [22] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data[J]. Genetics, 2000, 155(2):945-959.
- [23] Gregorius H, Roberds J H. Measurement of genetical differentiation among subpopulations[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1986, 71:826-834.
- [24] Miller J C, Tanksley S D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80:437-448.