

胡利娟,贾元,田忠静,等. 基于 ISSR 标记的 29 种石斛遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):76-80.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.013

# 基于 ISSR 标记的 29 种石斛遗传多样性分析

胡利娟, 贾元, 田忠静, 冯群, 刘杰, 朱斌

(贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要:**遗传多样性分析可为野生植物的开发与保护提供科学依据。采集贵州地区的 29 份石斛资源,通过简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeats,简称 ISSR)标记对其进行遗传多样性和亲缘关系分析,从 16 条引物中筛选出 13 条多态性稳定的 ISSR 引物进行扩增。结果表明,13 条引物共扩增出 214 个条带,其中多态性条带数为 212 个,多态性比例为 99.07%,平均每个引物扩增的条带数为 16.46 条。随后利用非加权平均距离法(UPGMA)对其进行聚类分析,结果显示,29 份石斛材料的遗传相似系数为 0.678~0.804。在遗传相似系数为 0.715 处,可以把 29 种石斛植物划分为 10 个类群,从而证明所取石斛材料的遗传多样性十分丰富。

**关键词:**石斛;ISSR 分子标记;遗传多样性;亲缘关系

**中图分类号:** S567.23<sup>+</sup>9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0076-05

石斛属(*Dendrobium*)是兰科(Orchidaceae)的大属之一,属附生兰类多年生草本植物。全球约有 1 500 多种石斛属植物,主要分布于亚洲、欧洲、大洋洲等地<sup>[1]</sup>,中国现共有 76 种石斛属植物,主要产区分布于四川、云南、广西和贵州等省份的原始森林以及安徽、浙江等省份<sup>[2]</sup>。大多数石斛具有药用

和观赏价值,目前发现的药用石斛有 39 种,具有润肺生津、活血化瘀、治疗心血管疾病等功效<sup>[3]</sup>。由于石斛种类繁多,历代本草著作称之为医工难辨的种类<sup>[4]</sup>。随着人们对药用及观赏石斛需求量的不断扩大和森林砍伐等多方面的影响,野生石斛属植物资源面临枯竭,已经成为濒危植物<sup>[5]</sup>。近年来,由于人们对药用石斛需求量的加大,石斛种植面积不断增加,选育优良石斛品种供生产使用尤为重要。

为了更好地利用药用石斛种质资源,更准确地了解石斛种质资源的类型及亲缘关系,对石斛资源进行遗传多样性及亲缘关系分析显得尤为重要<sup>[6]</sup>。目前应用于石斛属植物种质资源鉴定和亲缘关系研究的分子生物学方法主要有随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA,简称

收稿日期:2019-08-17

基金项目:贵州省科学计划项目联合基金[编号:QKHLHZ(2017)7368];贵州师范大学大学生创新创业训练计划[编号:2018520165];贵州省科技计划[编号:(2019)3001]。

作者简介:胡利娟(1997—),女,贵州盘县人,主要研究方向为油菜种质资源。E-mail:hulj0911@163.com。

通信作者:朱斌,博士,副教授,主要从事油菜种质资源创新及远缘杂交研究。E-mail:zhugg130@126.com。

即 2 个菌株抗原表位可能并未改变,这为猪丹毒丝菌基因工程亚单位疫苗打下了坚实的基础<sup>[9]</sup>。

## 参考文献:

[1] 卢琴,李明波,彭先文,等. 猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因的生物信息学分析[J]. 动物医学进展,2015,36(9):23-27.

[2] 曹文尧,李江伟,吕芳等. 丹毒丝菌 *SpaA* 基因免疫保护区的克隆与功能研究[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(7):496-500.

[3] 吾鲁木汗·那孜尔别克,张磊,何翠等. 猪丹毒丝菌天然 *SpaA* 和重组 *SpaA-N* 免疫保护效果的评价[J]. 微生物学报,2010,50(3):367-372.

[4] 林琳,江斌,吴胜会,等. 猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 中国兽医学报,2013,33(8):1232-1236.

[5] 冷非凡,罗文,李渊利,等. 嗜铁钩端螺旋菌中铁硫簇相关蛋白的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(12):5296-5303.

[6] 吾鲁木汗·那孜尔别克,刘祝祥,李科,等. 猪丹毒丝菌 C43311 株 *SpaA* 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达[J]. 微生物学报,2008,48(2):207-212.

[7] 张焕容. 副猪嗜血杆菌抗原性研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(7):91-94.

[8] 朱业培,王玮,吕青裴,等. 超高压协同温度处理对过敏原 Bosd6 抗原性及二级结构的影响[J]. 南京农业大学学报,2016,39(4):668-672.

[9] 李伟杰,赵耘,康凯,等. 红斑丹毒丝菌 *SpaA* 抗原基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测[J]. 中国兽医学报,2011,31(11):1631-1634,1639.

RAPD)、限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, 简称 RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, 简称 AFLP)、简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeats, 简称 ISSR)等<sup>[7-9]</sup>。ISSR 技术是由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkewicz 等发展起来的一种基于微卫星(SSR)序列的分子标记技术,与 SSR 相比,用于 ISSR 的引物不需要预先的 DNA 测序,而是用半随机引物进行扩增,可获得丰富的多态性<sup>[10]</sup>。ISSR 标记的特点是数量丰富、广泛分布于整个基因组、具有较多的等位性变异与共显性标记、可鉴别出杂合子和纯合子、试验的重复性较好等。本研究选用 29 种石斛材料,采用 ISSR-PCR 分子标记研究其遗传多样性,并创建亲缘关系图谱进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

本研究共选用 29 种石斛材料(表 1),其中 27 种为石斛属,1 种为石豆兰属,1 种为钗子股属,目前统一种植于贵州师范大学生命科学学院四楼实验室。

试验试剂:十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、Tris、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、盐酸、无水乙醇等,均购自贵州凯信生物科技有限公司;2 × Taq Master Mix (Dye),含有 0.1 U/μL Taq DNA 聚合酶、3 mol/L 氯化镁和 40 μmol/L dNTPs,购自北京康为世纪生物科技有限公司;ISSR 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

试验仪器:ETC811PCR 仪(东胜创新生物科技有限公司);DYY-8C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);DYCP-31E 型电泳槽(北京六一生物科技有限公司);K8360 凝胶成像分析系统(北京科创锐新生物科技有限公司);离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

从实验室栽培的石斛植株上取幼嫩叶片,参考 CTAB 法<sup>[11]</sup>并加以调整,用于提取植物基因组 DNA。调整后的方法如下:剪取 0.1 kg 石斛的幼嫩叶片(新鲜叶片也可)放置于研钵中,加入 750 μL 2% (质量分数)CTAB 水溶液进行研磨,将叶片充分研磨后转移到 1.5 mL 离心管中,65 °C 水浴 60 min (其间每 20 min 摇匀 1 次),取出离心管冷却到室

表 1 29 份石斛植物材料的相关信息

编号	种名	拉丁名	采集地点
1	铁皮石斛	<i>D. officinale</i>	贵州荔波
2	密花石斛	<i>D. densiflorum</i>	贵州贞丰
3	蜻蜓石斛	<i>D. pulchellum</i>	贵州晴隆
4	剑叶石斛	<i>D. acinaciforme</i>	贵州望谟
5	线叶石斛	<i>D. aurantiacum</i>	贵州惠水
6	黄贝壳石斛	<i>D. polythum</i>	贵州兴义
7	钗子股	<i>Luisia morsei</i>	贵州罗甸
8	串珠石斛	<i>D. falconeri</i>	贵州玉屏
9	反瓣石斛	<i>D. ellipsophyllum</i>	贵州普安
10	球花石斛	<i>D. thyrsiflorum</i>	贵州毕节
11	杓唇石斛	<i>D. moschatum</i>	贵州大方
12	红牙刷石斛	<i>D. secundum</i>	贵州安龙
13	扭瓣石斛	<i>D. tortile</i>	贵州赤水
14	蜂腰石斛	<i>D. parishii</i>	贵州兴义
15	石豆兰	<i>Bulbophyllum radiatum</i>	贵州荔波
16	喉红石斛	<i>D. christyanum</i>	贵州贞丰
17	肿节石斛	<i>D. pendulum</i>	贵州赤水
18	翅梗石斛	<i>D. trigonopus</i>	贵州赤水
19	虎牙石斛	<i>D. monticola</i>	贵州大方
20	赤水金钗石斛	<i>D. nobile</i>	贵州遵义
21	杯鞘石斛	<i>D. gratiosissimum</i>	贵州贞丰
22	灯笼石斛	<i>D. amabile</i>	贵州赤水
23	铜皮石斛	<i>D. monilliforme</i>	贵州赤水
24	报春石斛	<i>D. primulinum</i>	贵州晴隆
25	天官石斛	<i>D. aphyllum</i>	贵州遵义
26	尖刀唇石斛	<i>D. heterocarpum</i>	贵州兴仁
27	黑毛石斛	<i>D. williamsonii</i>	贵州惠水
28	鼓槌石斛	<i>D. chrysotoxum</i>	贵州贞丰
29	大龟背石斛	<i>D. aggregatum</i>	贵州赤水

温,在通风橱内通风状态下加入 750 μL 苯酚 + 三氯甲烷 + 异戊醇(体积比为 25 : 24 : 1)的混合液,上下颠倒摇匀,置于离心机中 12 000 r/min 离心 15 min,轻轻取出,取上清液 500 μL 于新的试管中,向上清液中加入 1 000 μL 冰的无水乙醇沉淀 DNA (无水乙醇在提取 DNA 前先置于 -20 °C 冰箱中冻存一段时间),在 -20 °C 条件下放置 20 min 或更长时间(放置时间的长短可根据 DNA 的析出程度调节,若 DNA 析出较多,则不用在 -20 °C 条件下长时间放置)。DNA 析出后,置于离心机中 8 000 r/min 离心 5 min 去除上清液,沉淀用 50% 乙醇清洗 3 次,第 3 次清洗时乙醇不倒出,放置过夜,第 2 天离心后倒掉上清液乙醇,放置于室温下晾干或置于通风橱中风干,至 DNA 沉淀呈透明状,再加入 200 μL 无菌

去离子水溶解 DNA,溶解后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 引物的筛选

ISSR 引物是根据杨立昌等公布的引物序列<sup>[11-12]</sup>合成的,从生工生物工程(上海)股份有限公司合成的 16 个引物中筛选出 13 个扩增条带清晰、稳定、多态性较好的引物用于 29 份石斛材料种质资源遗传多样性的分析。

### 1.4 ISSR-PCR 扩增

ISSR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。参考 ISSR 反应体系<sup>[13]</sup>并加以改进,改进后的  $22\text{ }\mu\text{L}$  反应体系如下:  $4\text{ }\mu\text{L}$  DNA,  $1\text{ }\mu\text{L}$  引物,  $8\text{ }\mu\text{L}$  Mix(含有氯化镁、dNTP、*Taq* 酶、反应缓冲液),  $9\text{ }\mu\text{L}$  超纯水。

PCR 扩增程序:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $7\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ , 退火  $45\text{ s}$  [退火温度依据不同引物而定(表 2)],  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $2\text{ min}$ , 共 45 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性  $7\text{ min}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 PCR 扩增产物。

表 2 ISSR 引物序列及其扩增条带数

引物	引物序列 (5'→3')	退火温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	扩增条带数 (条)
ISSR-1	ACACACACACACACCG	54	21
ISSR-2	ACACACACACACACCA	54	16
ISSR-3	ACACACACACACACCT	53	18
ISSR-5	ACACACACACACACGA	54	18
CTC4Rca	CTCCTCCTCCTCAC	45	12
CTC4Rcb	CTCCTCCTCCTC	45	18
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAC	45	13
UBC827	ACACACACACACACG	53	16
UBC848a	CACACACACACACAAG	51	18
UBC848b	CACACACACACACATG	51	15
UBC899	CATGGTGTGGTCATTGTCCA	53	20
UBC900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	54	18
T3B	AGGTCGGGGTTCGAATCC	59	11

### 1.5 电泳

用  $1\times$  TAE 缓冲液配制 1.5% 琼脂糖凝胶,将凝胶放置于含有  $1\times$  TAE 缓冲液的电泳槽中,使缓冲液没过凝胶表面约  $2\text{ mm}$ 。PCR 产物上样量为  $18\text{ }\mu\text{L}$ ,使用 Super DNA marker 标定扩散片段长度,在  $90\text{ V}$  电压下电泳  $90\text{ min}$ ,再置于凝胶成像系统上观察,检测 ISSR-PCR 电泳谱带。

### 1.6 数据统计

按照电泳图谱中同一位置上 DNA 条带的有无进行统计,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,构

成 0/1 矩形图,用 NTSYS 2.10 软件 SHAN 程序中的非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,简称 UPGMA)对样品进行聚类分析,构建 29 种石斛材料的亲缘关系树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物的选择

本研究用 16 个引物对 29 种石斛材料的基因组 DNA 进行预试验扩增,并对 16 个引物进行筛选,获得 13 个多态性较好的引物,然后用筛选出的 13 个引物对 29 种石斛材料进行扩增。从表 3 看出,扩增条带数最多的是引物 ISSR-1,扩增出 21 个条带,扩增条带最少的是引物 T3B,只扩增出 11 个条带。

表 3 13 个 ISSR 引物的扩增结果

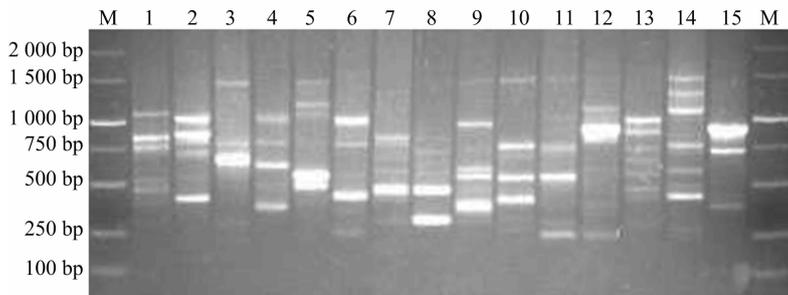
引物	总扩增位点数 (条)	多态性位点数 (条)	多态性比例 (%)
ISSR-1	21	21	100.00
ISSR-2	16	16	100.00
ISSR-3	18	18	100.00
ISSR-5	18	18	100.00
CTC4Rca	12	12	100.00
CTC4Rcb	18	18	100.00
UBC811	13	13	100.00
UBC827	16	16	100.00
UBC848a	18	18	100.00
UBC848b	15	15	100.00
UBC899	20	20	100.00
UBC900	18	17	94.44
T3B	11	10	90.91
总计	214	212	99.07

### 2.2 ISSR-PCR 扩增结果

根据对凝胶成像系统拍照结果的分析得到 0/1 矩阵图(本文未列出)。由图 1 和图 2 可以看出,电泳共检测出 214 个扩增条带,其中多态性条带数为 212 个,多态性比例为 99.07%,平均每条引物扩增的条带数为 16.46 条,说明供试样品具有较高的多态性。

### 2.3 遗传相似性及亲缘关系

由图 3 可以看出,13 条引物能将 29 种石斛材料分开,遗传相似系数(GS)变化范围为  $0.678\sim 0.804$ ,表明供试样品有较近的亲缘关系。在遗传相似系数 0.715 处,可以将石斛材料分为 10 个大组,每个大组又分为不同的小组:第 1 组,包含 7 种石



1~15 对应表 1 中编号为 1~15 的石斛材料。图 2 同  
图 1 引物 ISSR-2 对石斛的 PCR 结果

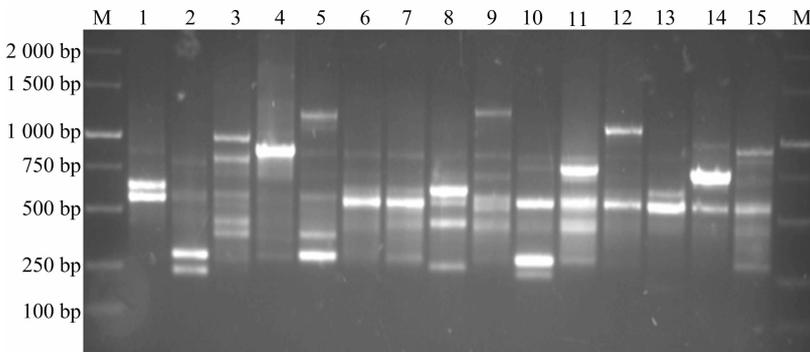


图 2 引物 ISSR-5 对石斛的 PCR 结果

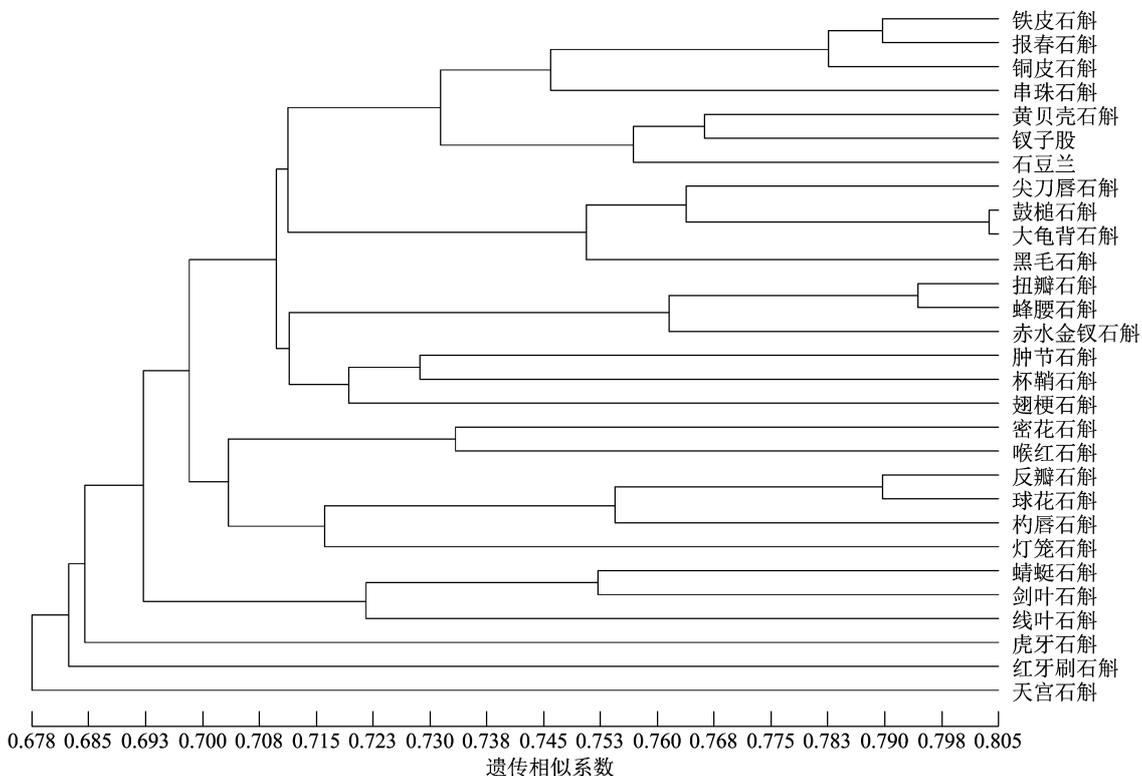


图 3 29 种石斛的 UPGMA 聚类结果

斛,分别是铁皮石斛、报春石斛、铜皮石斛、串珠石斛、黄贝壳石斛、钗子股、石豆兰,说明该大组内 7 种

石斛的亲缘关系比较近,其中铁皮石斛与报春石斛的遗传相似系数达到 0.790,在 29 种石斛植物中,

这2种石斛的遗传相似系数排第3;第2组,包含4种石斛,分别是尖刀唇石斛、鼓槌石斛与大龟背石斛、黑毛石斛,其中鼓槌石斛、大龟背石斛的遗传相似系数为0.800,是29种石斛材料中亲缘关系最近的2种;第3组,包含3种石斛,分别是扭瓣石斛、蜂腰石斛、赤水金钗石斛,其中扭瓣石斛与蜂腰石斛的遗传相似系数为0.795,在29种石斛材料中,是除了鼓槌石斛与大龟背石斛之外遗传相似系数最高、亲缘关系最近的2种石斛;第4组,包含3种石斛,分别是肿节石斛、杯鞘石斛、翅梗石斛;第5组,包含2种石斛,分别是密花石斛、喉红石斛;第6组,包含4种石斛,分别是反瓣石斛、球花石斛、杓唇石斛、灯笼石斛,其中反瓣石斛与球花石斛的遗传相似系数为0.790,亲缘关系也非常近;第7组,包含3种石斛,分别是蜻蜓石斛、剑叶石斛、线叶石斛;第8组,包含虎牙石斛;第9组,包含红牙刷石斛;第10组,包含天宫石斛。从聚类分析结果可以看出,虎牙石斛、红牙刷石斛、天宫石斛这3种石斛与其他26种石斛的亲缘关系较远。

### 3 讨论

石斛属植物分布在中国秦岭淮河以南诸省,其中云南、广西、台湾、贵州为分布中心<sup>[14]</sup>。根据传统的分类方法,石斛属植物可以分成不同的组别,《中国植物志》将中国石斛的74个种划分为12个组<sup>[15]</sup>,其中药用石斛有39种,并且有的石斛种类仅从茎、叶等形态上无法加以区分<sup>[16]</sup>。因此,分子标记也被应用于石斛的分子鉴定中。DNA分子标记不受环境因素的影响,能直接反映基因组DNA之间存在的差异<sup>[17]</sup>。现代分子标记不仅可用于石斛植物的分子鉴定,还能全面揭示不同石斛种群的遗传多样性和亲缘关系。本研究选用29种石斛为样本,采用13条引物分析不同石斛品种资源的遗传多样性,结果显示,微卫星位点多态性比例达到99.07%,表明石斛的遗传多样性极其丰富。在所选择的13条引物中,有的引物扩增条带数较多,如引物ISSR-1的扩增条带数为21条,引物UBC899的扩增条带数为20条。但也有部分引物的扩增条带数较少,如引物T3B、CTC4Rca、UBC811分别只扩增出了11、12、13条条带,可见不同石斛有着复杂的遗传背景。

本研究中石斛的ISSR分子标记聚类分析结果

与传统的分类结果基本相同,但也存在差异,可能与分析过程中取样的多少、基因组DNA的提取方法、PCR扩增体系的异同等有关。自然环境因子的复杂多样性也可能是造成这种差异的原因。随着科学技术的不断发展,越来越多的分子生物学方法被应用于石斛属植物种质资源的鉴定和亲缘关系的研究中,如RAPD、RFLP、AFLP等。在今后的研究中,应进一步采用多种分子生物学方法对同一石斛属植物材料的遗传多样性及亲缘关系进行分析。

### 参考文献:

- [1] Dressler R L. Phylogeny and classification of the Orchid family[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- [2] 刘静, 何涛, 淳泽. 分子标记技术在石斛属植物中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(6): 855-862.
- [3] 陈晓梅, 郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 70-75.
- [4] 包雪生, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 1-40.
- [5] 孔琼, 袁盛勇, 薛春丽, 等. 云南野生石斛ISSR-PCR分析[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1242-1245.
- [6] 李永清, 江金兰, 叶炜, 等. 37份药用石斛种质资源亲缘关系的ISSR分析[J]. 福建农业学报, 2015, 30(2): 131-135.
- [7] 张婷, 徐璐珊, 王峥涛, 等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似中的PCR-RFLP鉴别研究[J]. 药学学报, 2005, 40(8): 728-733.
- [8] 冯夏莲, 何承忠, 张志毅, 等. 植物遗传多样性研究方法概述[J]. 西南林学学报, 2006, 26(1): 69-74.
- [9] 王慧中, 应奇才, 施农农, 等. 利用RAPD分析13种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系[J]. 中草药, 2006, 37(4): 588-592.
- [10] 曾民, 郭鸿彦, 胡学礼, 等. 大麻研究中的分子标记应用[J]. 中国麻业科学, 2007, 29(4): 189-191.
- [11] 杨立昌, 邓辉, 乙引, 等. 药用石斛ISSR分子标记研究[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1841-1844.
- [12] 杜明凤, 李明军, 陈庆富. 淫羊藿属植物PCR-RFLP遗传多样性研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 562-567.
- [13] 李盛清, 张传博, 乙引, 等. 石斛ISSR-PCR体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 37-39.
- [14] 李琴, 杨彦伶, 彭婵, 等. 药用石斛研究进展[J]. 农学学报, 2018, 8(10): 61-64.
- [15] 吉占和. 中国植物志(第十九卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 67-146.
- [16] 张智, 霍立业. 霍山石斛营养器官的解剖结构[J]. 安徽农业大学学报, 1995, 22(3): 301-304.
- [17] 莫建梅, 刘莺燕, 李庆国, 等. “龙头凤尾”铁皮石斛基因鉴别及复方胶囊降血糖研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 182-185.