

## 建兰 38个品种的 RAPD 分析

胡 薇<sup>1</sup>, 黄儒珠<sup>1\*</sup>, 潘晓华<sup>1</sup>, 李锦凤<sup>2</sup>, 孙 端<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>福建师范大学生命科学学院, 福州 350108; <sup>2</sup>中国兰协建兰样品园, 福建上杭 364200; <sup>3</sup>福建省林业检查总站, 福州 350003)

**摘 要:** 应用 RAPD 标记对建兰 38 个品种的遗传多样性和亲缘关系进行分析。用筛选的 18 个 10 bp 随机引物对其 DNA 进行 PCR 扩增, 共扩增出 116 个位点, 其中多态位点 103 个, 多态位点比率占 88.79%, 表明建兰 38 个品种具有丰富的遗传多样性。38 个品种间的遗传距离为 0.0420 ~ 0.5385 (均值 0.2902)。基于 RAPD 标记的建兰 38 个品种的 UPGMA 聚类结果支持将建兰分为彩心和素心两个变种, 以及素心多由彩心变异而来的传统分类观点。研究发现: 引物 S153 - 650 bp 位点是 ‘闽西鱼鱿’、‘鱼鱿大贡’、‘鱼鱿’和 ‘银边鱼鱿’ 的特异标记, 引物 S38 - 1 200 bp 位点是 ‘十六罗汉’ 和 ‘鱼鱿’ 的特异标记, 引物 S38 - 800 bp 位点缺失是 ‘马耳四季’ 的特异标记。

**关键词:** 建兰; 品种; 遗传多样性; 聚类分析; RAPD

中图分类号: S 682.31 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 02-0289-06

## RAPD Analysis of Thirty-eight *Cymbidium ensifolium* Cultivars

HU Wei<sup>1</sup>, HUANG Ru-zhu<sup>1\*</sup>, PAN Xiao-hua<sup>1</sup>, LI Jin-feng<sup>2</sup>, and SUN Duan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; <sup>2</sup> Cymbidium ensifolium Garden, Chinese Cymbidium Association, Shanghang, Fujian 364200, China; <sup>3</sup> The General Inspection Station of Forestry of Fujian Province, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** DNA from thirty-eight *Cymbidium ensifolium* cultivars was examined using polymerase chain reaction (PCR) to determine the efficiency of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in genetic diversity and genetic relationship. A total of 116 RAPD markers, 88.79% of which were polymorphic, were produced from 18 arbitrary primers of 10 bp. Genetic distances among the cultivars were estimated based on the amount of band sharing and ranged from 0.0420 - 0.5385 with an average of 0.2902. Unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) of genetic distances estimates grouped ‘suxin’ cultivars and ‘caixin’ cultivars together with each other, and ‘suxin’ cultivars diverged from ‘caixin’ cultivars, thereby agreeing with known traditional classification information. Four cultivars, ‘Minxi Yuchen’, ‘Yuchen Dagong’, ‘Yuchen’ and ‘Yinbian Yuchen’ could be distinguished from all the rest based only on the S153 - 650 bp fragment, and ‘Shiliu Luohan’ and ‘Yuchen’ based only on the S38 - 1 200 bp fragment. ‘Ma’er Siji’ could be differentiated from all the rest by lack of the S38 - 800 bp fragment.

**Key words:** *Cymbidium ensifolium*; cultivar; genetic diversity; cluster analysis; RAPD

中国兰花 (Chinese cymbidium) 通常是指兰科 (Orchidaceae) 兰属 (*Cymbidium*) 植物中的部分地生种, 如春兰、蕙兰、建兰、墨兰和寒兰等。建兰 (*Cymbidium ensifolium*) 有很高的观赏和经济价值, 是最早出口的国兰之一。由于自然群体杂交和人工栽培选育的结果, 建兰存在着较大的遗传分化和种间类型, 遗传多样性高, 传统的分类方法往往难以区分种及品种。

收稿日期: 2007 - 07 - 12; 修回日期: 2007 - 12 - 04

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (B0410007)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: biohuang@fjnu.edu.cn)

国内外应用 RAPD 标记对兰属植物种及品种的遗传多样性、亲缘关系以及品种鉴定等方面的研究已有报道。例如,孙彩云等 (2005) 应用 RAPD 标记对中国兰属的 28 个原生种和部分种的不同品种及杂交种的亲缘关系进行分析;谢伟等 (2005) 对兰属 7 个种的 9 个品种进行 RAPD 鉴定和亲缘关系分析;梁红健等 (1996) 用 RAPD 标记对中国兰属的 5 个种 19 个品种的亲缘关系进行探讨;王健等 (2006) 对 16 种有香和无香春兰的基因组 DNA 进行 RAPD 标记,发现引物 BA0088 对春兰的扩增产物中有一特异条带 (370 bp) 可能与春兰香味性状有关。Obara-Okeyo 和 Kako (1998) 对 36 个大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 栽培品种的遗传多样性进行 RAPD 分析。

作者集中对建兰 38 个品种进行 RAPD 标记,旨在为建兰遗传多样性研究、分类鉴定和亲缘关系分析,以及资源的保护和开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试建兰 38 个品种取自福建省龙岩市上杭县古田镇中国兰协建兰样品园 (1~24 号) 和连城县朋口镇福建兰花基地 (25~38 号),其中 20~30 号为彩心品种,其余为素心品种 (表 1)。建兰 38 个品种中除 21 号 ‘娇鹤’、24 号 ‘飞天’ 和 30 号 ‘宝岛胭脂’ 引种自中国台湾省外,其余均为福建地产兰。

表 1 供试 38 个建兰品种

Table 1 Thirty-eight *Cymbidium ensifolium* cultivars

编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar
1	龙岩素 Longyansu	20	金边丫兰 Jinbian Yalan
2	闽西鱼鲛 Minxi Yuchen	21	娇鹤 Jiaohe
3	铁骨素 Tiegusu	22	黄袍 Huangpao
4	古田如意素 Gutian Ruyisu	23	四季大青 Siji Daqing
5	长汀素 Changtingsu	24	飞天 Feitian
6	十六罗汉 Shiliu Luohan	25	十八学士 Shiba Xueshi
7	十三太保 Shisan Taibao	26	梅花山大荷 Meihuashan Dahe
8	龙岩十八开 Longyan Shibakai	27	立叶剑蕙 Liye Jianhui
9	武夷素 Wuyisu	28	银边四季 Yinbian Siji
10	古蛟素 Gujiaosu	29	马耳四季 Ma'er Siji
11	鱼鲛大贡 Yuchen Dagong	30	宝岛胭脂 Baodao Yanzhi
12	尤溪素 Youxisu	31	连城素 Lianchengsu
13	永福素 Yongfusu	32	建荷素 Jianhesu
14	鱼鲛 Yuchen	33	玉女素 Yun'nu
15	金丝马尾 Jinsi Mawei	34	大叶铁骨素 Daye Tiegusu
16	金嘴龙岩素 Jinzui Longyansu	35	荷花素 Hehuasu
17	银边大贡 Yinbian Dagong	36	麒麟四季 Qilin Siji
18	伞斑龙岩素 Sanban Longyansu	37	永安素 Yong'ansu
19	铁骨银针 Tiegu Yinzhen	38	银边鱼鲛 Yinbian Yuchen

### 1.2 方法

用手术剪剪取建兰嫩叶 0.2 g, 置研钵中, 加 2 mL SDS 高盐提取介质 [100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris (pH 8.0), 50 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0), 500 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 2% SDS, 2% β-巯基乙醇] 和少量石英砂, 迅速研磨, 匀浆移至 2 mL 的 Eppendorf 管中, 带回实验室, 置 -18℃ 冰箱保存。

DNA 提取及质量检测按胡薇等 (2004) 的方法进行。

以提取的 DNA 为模板, 用 RAPD 引物 (10 bp) 在 B D-RAD GENE CYCLER PCR 仪上进行 RAPD 扩增反应。

反应体系: 总体积 20  $\mu\text{L}$ , 含 40 ng 基因组 DNA, 1.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物, 2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP, 1 U *Taq* DNA 聚合酶及其 Buffer。扩增程序: 94 预变性 200 s, 94 变性 30 s, 37 复性 60 s, 72 延伸 120 s, 循环 42 次; 最后 72 延伸 5 min。

取 10  $\mu\text{L}$  反应产物, 上样于 1.2% 琼脂糖凝胶, 在 3  $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$  电场中电泳, 溴乙锭染色后在 WD-9403C 型紫外分析仪上检测并拍照记录。

试验所用 DNA Marker,  $\text{MgCl}_2$ 、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶及其 Buffer 购自大连宝生物工程有限公司。引物及其他试剂购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.3 数据处理

根据电泳结果, 记录清晰可重复的 DNA 电泳条带, 对同一引物的扩增产物, 迁移率相同的条带记为一个位点, 扩增阳性记为 1, 阴性记为 0。采集的数据输入 Excel 2000, 建立表征数据矩阵。计算多态位点比率 (percentage of polymorphic loci, PPL)。运用 DPS v3.01 软件计算建兰 38 个品种间的 Nei & Li (1979) 遗传距离, 并进行 UPGMA 聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 遗传多样性分析

用筛选的 18 个 10 bp 随机引物 (表 2), 对 38 个建兰品种的 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物分子量介于 350 ~ 2 500 bp 之间。

图 1 为引物 S1408 的扩增结果。18 个引物共扩增出 116 个位点, 其中多态位点 103 个, 多态位点比率为 88.79%。可见, 建兰 38 个品种间具有丰富的遗传多样性。

表 2 用于建兰品种 RAPD 分析的引物及其序列

Table 2 The primers and their sequence			
引物	序列 5' 3'	引物	序列 5' 3'
Primer	Sequence 5' 3'	Primer	Sequence 5' 3'
S21	CAGGCCCTTC	S50	GGTCTACACC
S29	GGGTAAACGCC	S68	TGGACCGGTG
S31	CAATCGCCGT	S114	ACCAGGTTGG
S32	TCGCGCATAG	S153	CCCGATTTCGG
S36	AGCCAGCGAA	S156	GGTGACTGTG
S38	AGGTGACCGT	S157	CTACTGCCGT
S39	CAAACGTCGG	S158	GGACTGCAGA
S43	GTCGCCGTCA	S159	ACGGCGTATG
S45	TGAGCGGACA	S1408	GTTACGGACC

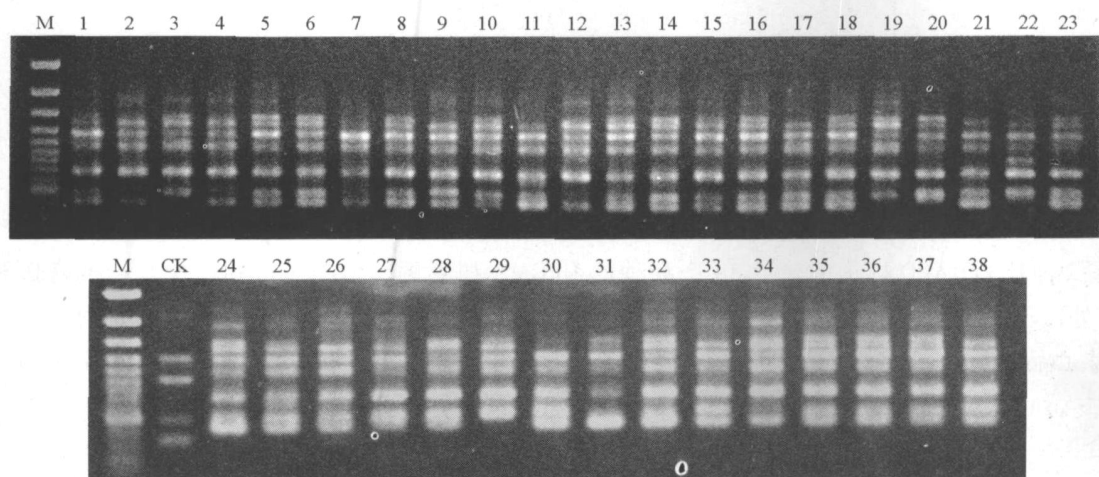


图 1 引物 S1408 对建兰 38 个品种总 DNA 的 RAPD 扩增结果

M. 100 bp DNA ladder; 1 ~ 38 分别为 1 ~ 38 号样本总 DNA 的 RAPD 扩增结果; CK 对照。

Fig. 1 RAPD amplification products generated from primer S1408

M. 100 bp DNA ladder; 1 - 38. No. 1 - 38 *C. ensifolium* cultivar, respectively; CK Control

## 2.2 品种间的亲缘关系

运用 DPS v3.01 数据处理软件计算的建兰 38 个品种间的 Nei & Li (1979) 遗传距离值为 0.042017 ~ 0.538462 (均值 0.29024), 其中 11 个彩心品种间的遗传距离为 0.253012 ~ 0.6 (均值 0.426506), 27 个素心品种间的遗传距离为 0.051546 ~ 0.454545 (均值 0.253046)。建兰 38 个品种中, 金丝马尾 (15号) 与金嘴龙岩素 (16号) 的遗传距离最小 (0.042017), 四季大青 (23号) 与梅花山大荷 (26号) 的遗传距离最大 (0.538462)。供试的建兰 38 个品种间的遗传分化较大, 且彩心品种间的遗传分化大于素心品种间的遗传分化。

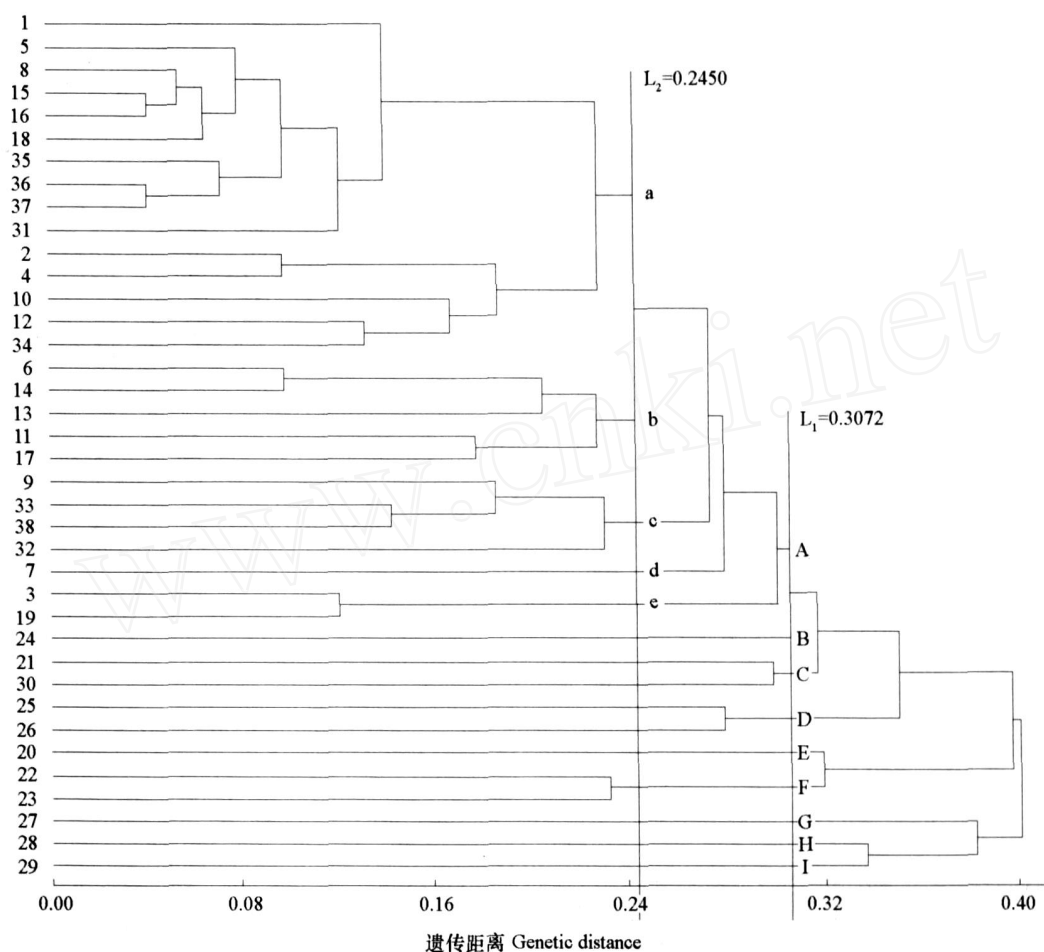


图 2 基于 RAPD 标记的建兰 38 个品种的 UPGMA 树系图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of the thirty-eight *C. ensifolium* cultivars based on RAPD marker

图 2 为基于 RAPD 标记的建兰 38 个品种的 UPGMA 树系图。由图 2 可知, 在遗传距离 0.3072 ( $L_1$ ) 处, 建兰 38 个品种可聚为 9 组。其中 A 组为建兰素心品种, 其余 8 组均为彩心品种, 且建兰 27 个素心品种是先聚为 A 组后再与其它 8 组 11 种彩心品种相聚, 这与严楚江 (1964) 将建兰分为彩心建兰 (*var. ensifolium*) 和素心建兰 (*var. susin*) 2 个变种, 以及素心多由彩心变异而来的分类观点相吻合。

素心建兰品种 A 组中, 在遗传距离 0.2450 ( $L_2$ ) 处, 又可分为 a、b、c、d 和 e 5 亚组 (图 2)。由铁骨素 (3 号) 和铁骨银针 (19 号) 组成的 e 亚组, 是最早从彩心建兰分支出来的素心品种。且铁骨素和铁骨银针与其余素心品种间的遗传距离均大于距离均值 (0.253046), 这表明 e 亚组除色素基因与彩心品种有本质上的区别外, 同彩心品种的亲缘关系最近。其它 4 亚组与彩心品种的亲缘关系

由近及远为: 单独由十三太保 (7号) 组成的 d亚组; 其次是 c亚组的 4个品种: 武夷素 (9号)、玉女素 (33号)、银边鱼魮 (38号) 和建荷素 (32号); 再次是由十六罗汉 (6号)、鱼魮 (14号)、永福素 (13号)、鱼魮大贡 (11号) 和银边大贡 (17号) 组成的 b亚组; 余下的 15个素心品种组成与彩心品种亲缘关系最远的 a亚组。

11个彩心建兰品种, 在遗传距离 0.3072 ( $L_1$ ) 处聚为 8组 (图 2)。其中, 原产于台湾的飞天 (24号) 单独聚为 B组在遗传距离 0.3072处与素心品种 A组相聚后, 与同产于台湾的娇鹤 (21号) 和宝岛胭脂 (30号) 组成的 C组相聚, 这表明建兰素心品种与台湾地产的 3个彩心品种亲缘关系密切; 其它除十八学士 (25号) 与梅花山大荷 (26号)、黄袍 (22号) 与四季大青 (23号) 两两分别聚为 D和 F组外, 余下的 4种均独自归类: 金边丫兰 (20号) 归 E组, 立叶剑蕙 (27号) 归 G组、银边四季 (28号) 归 H组、马耳四季 (29号) 归 I组。由此可见, 建兰彩心品种较素心品种具有更丰富的遗传多样性, 这符合建兰的生态型和栽培表征: 野生建兰多为彩心, 栽培品种多为素心。

### 2.3 RAPD 标记的特异性

研究发现, 供试建兰 38个品种中, 闽西鱼魮 (2号)、鱼魮大贡 (11号)、鱼魮 (14号) 和银边鱼魮 (38号) 在引物 S153 - 650 bp 位点有扩增产物, 其余品种均无扩增; 十六罗汉 (6号) 和鱼魮 (14号) 在引物 S38 - 1 200 bp 位点有扩增产物, 其余品种均无扩增; 马耳四季 (29号) 在引物 S38 - 800 bp 位点无扩增产物, 其余品种均有扩增。另外, 在供试的建兰 11个彩心品种中, 原产于台湾的娇鹤 (21号)、飞天 (24号) 和宝岛胭脂 (30号) 在引物 S157 - 900 bp 位点有扩增产物, 其余 8种均无扩增; 在供试的建兰 27个素心品种中, a亚组的 15个素心品种 (1、5、8、15、16、18、35、36、37、31、2、4、10、12、34号) 在引物 S38 - 1 100 bp 位点有扩增产物, 其余 12种均无扩增。这些特异位点扩增产物的有无可以作为品种鉴定的依据和传统分类的补充。

## 3 讨论

筛选的 18个随机引物对建兰 38个品种的 RAPD 标记结果说明, 建兰品种间具有丰富的遗传多样性, 且彩心品种较素心品种遗传分化高。因此, 在建兰种质资源保护和开发利用时, 更应重视保护野生彩心建兰品种。

基于 RAPD 标记的建兰 38个品种的 UPGMA 聚类结果, 支持严楚江 (1964) 将建兰分为彩心和素心两个变种, 以及素心多由彩心变异而来的观点。然而, 吴应祥 (1993) 认为素心建兰多由彩心变异而来的观点是不合适的。迄今为止, 有关建兰花色变化的研究尚未见详细的报道。Liew 等 (1998) 从 *B. n. headia finaysoniana* 的 cDNA 文库中克隆出 3个花青素生物合成的关键酶——查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 基因, 许华欣和黄鹏林 (1999) 研究发现白花红唇蝴蝶兰约有 11个 CHS 基因, 红花朵丽蝶兰约有 7个 CHS 基因。建兰不仅有单色、复色花, 还有斑点、线条花, 其花色变化十分丰富。那么, 建兰花色是否也是多基因控制的, 有哪些基因参与调控, 机制如何等方面的研究有待进一步深入。

RAPD 标记特异位点扩增产物的有无可以作为品种鉴定的依据和传统分类的补充。Obara-Okeyo 和 Kako (1998) 应用 RAPD 标记引物 OPA5 - 370 bp 位点扩增产物的缺失可以把 ‘Green Meadom’ 从所有 36个大花蕙兰 (*C. hybridum*) 栽培品种中鉴别出来。梁红健等 (1996) 报道利用 RAPD 特异性条带的有无可以区分种和品种, 如 Ch1. 12 - 120 bp 位点的扩增产物是建兰种的特异标记, Ch1. 9 - 700 bp 和 Ch1. 13 - 550 bp 位点的扩增产物是台兰种的特异标记。位点 Ch1. 9 - 560 bp、Ch1. 3N - 1 900 bp 和 Ch1. 12 - 350 bp 分别是广西春兰、四川春兰和双飞燕 3个春兰品种的特异标记。本研究中, 位点 S153 - 650 bp 的扩增产物可作为闽西鱼魮 (2号)、鱼魮大贡 (11号)、鱼魮 (14号) 和银边鱼魮 (38号) 4个建兰珍品 的特异标记; 位点 S38 - 1 200 bp 的扩增产物可作为十六罗汉 (6号) 和鱼魮

(14号)的特异标记;位点 S38 - 800 bp扩增产物的缺失可作为马耳四季 (29号)的特异标记。

建兰分为彩心与素心两个变种的传统分类得到本研究的支持。然而,由于自然群体杂交和人工选育的结果,建兰品种间的关系错综复杂,传统分类学有明确定论的为数甚少。建兰名品鱼魮 (14号)被认为是铁骨素 (3号)的一种变异 (吴应祥, 1993),两者亲缘关系应该十分密切。但在本研究中,鱼魮与铁骨素的遗传距离 (0.333333)大于均值 (0.29024),表明两者的亲缘关系并不密切;再有鱼魮系列的4个品种:闽西鱼魮 (a亚组)、鱼魮大贡 (b亚组)、鱼魮 (b亚组)和银边鱼魮 (c亚组)虽处于不同的进化分支,但却有共同的特异标记位点 S153 - 650 bp。而鱼魮 (14号)与十六罗汉 (6号)的遗传距离 (0.099099)较小,且有共同的特异标记位点 S38 - 1 200 bp;供试的建兰11个彩心品种中,原产于台湾的娇鹤 (21号)、飞天 (24号)和宝岛胭脂 (30号)亲缘关系密切,且共有特异标记位点 S157 - 900 bp。这些结果还有待于建兰的经典分类方法和分子生物学的进一步研究。

## References

- Hu Wei, Sun Duan, Pan Xiao-hua, Huang Ru-zhu. 2004. Fast extraction of DNA in *Cymbidium ensifolium*. Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition, 20 (1): 118 - 120. (in Chinese)
- 胡 薇, 孙 端, 潘晓华, 黄儒珠. 2004. 建兰 DNA的快速提取. 福建师范大学学报: 自然科学版, 20 (1): 118 - 120.
- Liang Hong-jian, Liu Min, Zhong Zhi-yu, Wu Ying-xiang, Li Wen-bin. 1996. Identification and classification of Chinese cymbidium with RAPD. Acta Horticulturae Sinica, 23 (4): 365 - 370. (in Chinese)
- 梁红健, 刘 敏, 钟志宇, 吴应祥, 李文彬. 1996. 中国部分兰花品种 RAPD分析. 园艺学报, 23 (4): 365 - 370.
- Liew C F, Loh C S, Goh C J, Lin S H. 1998. The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavono14-reductase cDNA in the orchid, *Bomheadia finlaysoniana*. Plant Sci, 135: 161 - 169.
- Obara-Okeyo P, Kako S. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica, 99 (2): 95 - 101.
- Sun Cai-yun, Zhang Ming-yong, Ye Xiu-lin, Liang Cheng-ye, Xia Kuai-fei. 2005. Studies on relationship between species, cultivars of *Cymbidium* using RAPD. Acta Horticulturae Sinica, 32 (6): 1121 - 1124. (in Chinese)
- 孙彩云, 张明永, 叶秀琳, 梁承邨, 夏快飞. 2005. 中国兰属植物种间及品种间亲缘关系的 RAPD 分析. 园艺学报, 32 (6): 1121 - 1124.
- 王 健, 乐超银, 谢 伟, 梁 薇, 林 直, 郭政宏. 2006. 兰花香味相关基因的 RAPD 分子标记. 江苏农业科学, 5: 78 - 79.
- 吴应祥. 1993. 中国兰花. 第2版. 北京: 中国林业出版社.
- Xie Wei, Yue Chao-yin, Lin Zhi, Cheng Fan, He Zheng-quan, Yao Wei. 2005. Genetic relationship analysis of *Cymbidium* cultivars using RAPD. Jiangsu J Agr Sci, 21 (4): 369 - 373. (in Chinese)
- 谢 伟, 乐超银, 林 直, 程 凡, 何正权, 姚 伟. 2005. 兰属品种的 RAPD 鉴定和亲缘关系分析. 江苏农业学报, 21 (4): 369 - 373.
- 许华欣, 黄鹏林. 1999. 蝴蝶兰苯基苯乙烯酮合成酶 cDNA 之选殖及分析. 中国园艺, 45: 19 - 35.
- 严楚江. 1964. 厦门兰谱. 福州: 福建科学技术出版社.