

云南莲瓣兰主栽品种SSR指纹图谱的构建和遗传差异分析

黄永艺^{1a*}, 唐敏^{1a*}, 张志荣², 李枝林^{1a}, 毕玉芬^{1b**}

(1. 云南农业大学, a. 园林园艺学院; b. 动物科学技术学院, 昆明 650201; 2. 中国科学院昆明植物研究所西南野生生物种质资源库, 昆明 650204)

摘要: 为了解云南莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)的遗传多样性, 利用 SSR 技术对 32 个莲瓣兰主栽品种进行遗传变异分析, 并构建莲瓣兰栽培品种的指纹图谱。结果表明, 筛选出的 12 对多态性高、稳定性好的引物共检测到 95 个等位基因, 每对引物检测到 4~18 个等位基因, 有效等位基因数(N_E)为 61.489, 平均有效等位基因数(N_A)为 5.124, Shannon 信息指数(I)和多态性信息含量(PIC)分别为 0.806~2.624 和 0.789~0.953。12 对引物中, 以引物 SSR03 的等位基因数、 N_E 、观测杂合度、 I 和 PIC 最高。32 个品种在 12 对引物上都具有不同的特异性条带, 可以彼此区别。从 12 对引物中筛选出 3 对核心引物 SSR02、SSR03 和 SSR12 构建了莲瓣兰主栽品种 SSR 分子指纹图谱, 这 3 对核心引物组合即可鉴定 32 个莲瓣兰栽培品种。这为莲瓣兰的品种鉴定、遗传多样性分析和分子育种研究提供理论基础和技术支持。

关键词: 莲瓣兰; 遗传多样性; SSR; 指纹图谱

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.03.002

Construction of SSR Fingerprint and Genetic Variance Analysis on *Cymbidium tortisepalum* Cultivars in Yunnan Province

HUANG Yong-yi^{1a*}, TANG Min^{1a*}, ZHANG Zhi-rong², LI Zhi-lin^{1a}, BI Yu-fen^{1b**}

(1a. College of Horticulture and Landscape; 1b. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: In order to understand the genetic diversity of *Cymbidium tortisepalum*, the fingerprints of 32 *C. tortisepalum* cultivars were constructed by SSR. The results showed that there were 95 alleles were detected by selected 12 pairs of primers, the number of alleles selected by one primers ranged from 4 to 18, and the number of mean alleles (N_A) and effective alleles (N_E) were 61.489 and 5.124, respectively. The Shannon information index (I) and polymorphism information content values (PIC) of 32 cultivars ranged from 0.806 to 2.624, and 0.789 to 0.953, respectively. Among 12 pairs of primer, the primer SSR03 was the highest in N_A , N_E , observed heterozygosity (H_O), I and PIC . All of 32 cultivars had different specific bands by 12 pairs of primer. The SSR molecular fingerprints of 32 cultivars were built by 3 core pairs of primers, including SSR02, SSR03 and SSR12. All of 32 cultivars could be distinguished each other by combined primers of SSR02 + SSR03 + SSR123. These would provide theoretical

收稿日期: 2014-09-28 接受日期: 2015-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260487)资助

作者简介: 黄永艺(1986~), 男, 在读硕士, 主要从事观赏植物资源利用与创新。E-mail: huangyongyi_2008@yeah.net; 唐敏(1979~), 女, 在读博士, 主要从事植物种质资源研究工作。E-mail: tangminyn@163.com

* 对本文贡献等同, 并列第一作者

** 通信作者 Corresponding author. E-mail: biyufenynd@sina.com

basis and technical support for studying in the identification of *C. tortisepalum* cultivars, genetic diversity analysis and molecular breeding.

Key words: *Cymbidium tortisepalum*; Genetic diversity; SSR; Fingerprint

莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)别名小雪兰、卑亚兰、菅草兰^[1],是兰科(Orchidaceae)兰属植物,兰科植物在全世界约有730多属21500余种^[2-3]。莲瓣兰、春兰(*C. goeringii*)、蕙兰(*C. faberi*)、建兰(*C. ensifolium*)、墨兰(*C. sinense*)、寒兰(*C. kanran*)、春剑(*C. goeringii* var. *longibracteatum*)被称为七大中国兰^[4]。莲瓣兰作为传统滇兰主栽品种,在滇西北一带有近半个世纪多的栽培驯化历史^[5],具有独特的观赏价值。莲瓣兰栽培品种繁多,由于育种原始材料遗传基础局限于已存在的品种资源中,加之其异花授粉和长期的选择育种,造成品种间形态差异微小,同种异名现象较严重,在市场交易中受到很多困扰和造成经济纠纷。目前莲瓣兰栽培品种主要通过叶鞘、叶宽、花部主要特征等表现性状进行鉴定,而其形态表现易受环境、栽培基质等因素影响,且在开花时期才能进行有效鉴定,故鉴定周期长,辨别困难,因此亟需快速有效的鉴定方法。

SSR简单重复序列(Simple sequence repeat),又称为微卫星(Microsatellite),是指在真核生物基因组中存在1~6个碱基可变次数的串联重复DNA序列^[6]。SSR标记具有数量丰富,分辨率高,稳定性和重复性好的特点,且其数据分析自动化程度高,扩增产物片段易判读及赋值,满足品种SSR指纹图谱构建工作的要求^[7],因此,被国际植物新品种权保护联盟(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)指定为构建品种DNA指纹数据库的首选标记^[8-9]。

近年来,基于分子标记技术对国兰的遗传多样性分析及DNA指纹图谱构建的研究已有报道^[10-12],但利用SSR标记技术构建莲瓣兰品种DNA指纹图谱及应用研究尚未见报道。本研究从自行开发的春兰^[13]及莲瓣兰^[14]引物中筛选出12对稳定性好、多态性丰富的SSR引物,构建莲瓣兰主栽品种SSR分子指纹图谱,旨在为莲瓣兰品种分子快速鉴定、亲缘关系分析提供技术支持,为构建国产莲瓣兰主栽品种的DNA指纹数据库奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2011年至2012年采集32个具有较高经济价值的莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)主要栽培品种(表1),采集地点在大理兰国花业有限责任公司温室内。采集的莲瓣兰嫩叶用保鲜袋封存后置于硅胶干燥盒中带回中国科学院昆明植物研究所西南野生生物种质资源库标本馆-80℃冷贮保存待用。

1.2 叶片总DNA的提取

参照改良的CTAB法^[15]提取莲瓣兰的基因组DNA。将新鲜叶片材料剪碎用液氮冷却后快速研磨,在研磨时加入适量PVP(抗氧化),然后加入预热的4×CTAB提取液在65℃温浴60 min,用等体积的氯仿-异戊醇(24:1)抽提2次,上清液加70%体积的异丙醇沉降DNA。提取的DNA在1×TAE缓冲液下用1.0%的琼脂糖凝胶(加溴化乙锭,EB)进行电泳和检测。

1.3 PCR-SSR反应扩增

筛选的12对SSR引物信息见表2。PCR反应体系为20 μL,包括9.2 μL双蒸水,9.2 μL 2×mix反应体系,0.3 μL的双向引物,0.8 μL的模板DNA;反应条件:95℃预变性3 min;然后94℃40 s,53℃~59℃40 s,72℃60 s,共35个循环;最后72℃延伸7 min。

1.4 毛细管电泳检测

PCR产物利用QIAxcel全自动电泳系统(QIAGEN Inc., USA),选择参数OM700-3.5s进行毛细管电泳分型。电泳结果输出后在QIAxcel Biocalculator进行片段长度读取和预处理,然后将片段长度数据输出到Excel。

1.5 数据分析

SSR数据在Excel中编辑为GenAlEx 6.41^[16]

表 1 供试材料

Table 1 List of materials tested

编号 No.	品种 Variety	花型 Flower type	花部特征 Flower characteristics
C01	中意蝶 Zhongyidie	蝶花 Butterfly	副瓣蝶化 Butterfly lateral calyx
C02	天姿梅 Tianzimei	瓣型花 Petaline	梅瓣花 Plum blossom flap
C03	万寿锦荷 Wanshoujinhe	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C04	梁祝 Liangzhu	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C05	满江红 Manjianghong	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C06	云鹤梅 Yunhemei	瓣型花 Petaline	梅瓣花 Plum blossom flap
C07	恨天高 Hentiangao	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C08	碧龙奇蝶 Bilongqiqie	蝶花 Butterfly	捧瓣内蝶 Inner butterfly lateral petal
C09	黄金海岸 Huangjinhaian	奇花 Peculiar	多舌 Multi-tongue
C10	滇荷 Dianhe	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C11	滇梅 Dianmei	瓣型花 Petaline	梅瓣花 Plum blossom flap
C12	奇花素 Qihuasu	奇花 Peculiar	六出 Six flaps
C13	红舌头 Hongshetou	色花 Colorful	红舌 Red tongue
C14	高品素 Gaopingsu	色花 Colorful	白花素心 White-flower pure heart
C15	太白素 Taibaisu	素花 Pure	白花素心 White-flower pure heart
C16	白雪公主 Baixuegongzhu	素花 Pure	白花素心 White-flower pure heart
C17	云溪蝶 Yunxidie	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C18	碧玉素 Biyusu	素花 Pure	绿花素心 Green-flower pure heart
C19	玉兔 Yutu	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C20	朱丝玉荷 Zhusiyuhe	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C21	翠晶红轮 Cuijinhonglun	色花 Colorful	复色花 Complex color
C22	馨海蝶 Xinghaidie	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C23	雁南飞 Yannanfei	奇花 Peculiar	少瓣奇花 Lake flap peculiar
C24	心心相印 Xinxinxiangyin	色花 Colorful	红舌 Red tongue
C25	赵氏梅 Zhaoshimei	瓣型花 Petaline	梅瓣花 Plum blossom flap
C26	映山红 Yingshanhong	色花 Colorful	红花 Red flower
C27	粉荷 Fenhe	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C28	汗血宝马 Hanxuebaoma	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal
C29	天女散花 Tiannüsanhua	奇花 Peculiar	树形奇花 Tree type peculiar
C30	荷之冠 Hezhiguan	瓣型花 Petaline	荷瓣花 Lotus flap
C31	国色天香 Guosetianxiang	奇花 Peculiar	牡丹瓣 Peony flap
C32	大唐凤羽 Datangfengyu	蝶花 Butterfly	捧瓣全蝶 Fully-butterfly lateral petal

输入格式, 导入或打开宏文件进行数据分析和格式转换, 统计每个位点的等位基因数(Number of alleles, N_A)、有效等位基因数(Effective number of alleles, N_E)、观察杂合度(Observed heterozygosity, H_O)、期望杂合度(Expected heterozygosity, H_E)和 Shannon 信息指数(Shannon's information index, I)^[17], SSR

位点多态性信息含量(Polymorphism information content, PIC), 采用 Anderson 等^[18]的简化公式计算: $1 - \sum P_{ij}^2$, P_{ij}^2 表示为标记 i 的第 j 个带型出现的频率。

1.6 SSR指纹图谱构建

以所分析的 SSR 引物名称为前缀, 该标记在某

表 2 SSR 引物

Table 2 SSR primers tested

引物 Primer	正向引物 (5'~3') Forward primer	反向引物 (5'~3') Reverse primer	重复单元 Repeat motif	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
SSR01*	TCTGTCGCTTGCCTACTTT	GCCCTATGCTGGTCTACG	(AG) ₂₂	JN054646
SSR02*	TTGGGAGACGAGTAGGTG	CTGTGAGATCGGCTGAAT	(AG) ₁₂	KJ636209
SSR03*	GGGCTGCTCTTCCACTTC	CGCCACCGTTACCTTCAT	(AG) ₂₂	KJ636210
SSR04*	GTGTTCCATGTTAGCTGGTC	TGCTACAATCCCACTCCC	(AG) ₁₆	JN054648
SSR05*	GGAACAAGTGGGCTTCAC	CCTTGCCAGCTTAGTCTCC	(AG) ₄ AA(AG) ₁₃	JN054656
SSR06*	GCTCTGCTCATTCCCTCT	GTAACCAAGAATTTCAACAT	(AC) ₁₀	JN054642
SSR07*	GTCTTCTCCTTCTCCCTC	CTTCTGGCTCTTCTTCACT	(CT) ₁₄	JN054647
SSR08#	GAACCGCAATCTCATACT	ATTCGCCAGTTGTTATTC	(CT) ₁₆	HM161448
SSR09#	CCGTCGCTTTCTTGCTTC	GCCGCTGATTCTGGTGTT	(AG) ₁₁	HM161442
SSR10#	GAGTAAGCAGGGATGTCG	AGCGGGAACTATTGAAGG	(TC) ₁₃ (GT) ₈	HM161446
SSR11*	TAATGGAATGATGCGTAG	CAGTAATTGGACCCTAAC	(GA) ₁₀ (CA) ₇ (AC) ₆	JN054639
SSR12*	CTGAGCATCGACCAGTCA	GTGGAGGAATACAACAGACA	(CA) ₈ TA(CA) ₁₁	KJ636211

#: 来自春兰; *: 来自莲瓣兰。

#: From *Cymbidium goeringii*; *: From *C. tortisepalum*.

样品上扩增带的分子量为后缀,得到每个样品在某个标记的带型编号。将产生的引物带型编号进行综合排序,串联各个带型编号,构建该品种的 SSR 指纹图谱。

所提取的 DNA 纯度较高。经 TE 溶液溶解,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见 DNA 的主带清晰,条带整齐,无降解及明显的拖尾现象(图 1)。这表明所提取的 DNA 的质量、纯度较高,完全满足后续的 SSR-PCR 反应的要求。

2 结果和分析

2.1 莲瓣兰基因组DNA的提取

使用改良的 CTAB 法提取莲瓣兰栽培品种的基因组 DNA,用 Nanodrop 紫外分光光度计检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8 左右,表明

2.2 SSR位点多态性分析

利用 12 对引物对 32 个莲瓣兰栽培品种基因组 DNA 进行扩增,结果表明,12 对引物共扩增出 95 个等位基因(表 3),单个引物的等位基因数为 3~18 个,引物的平均等位基因数为 7.917,有效等位

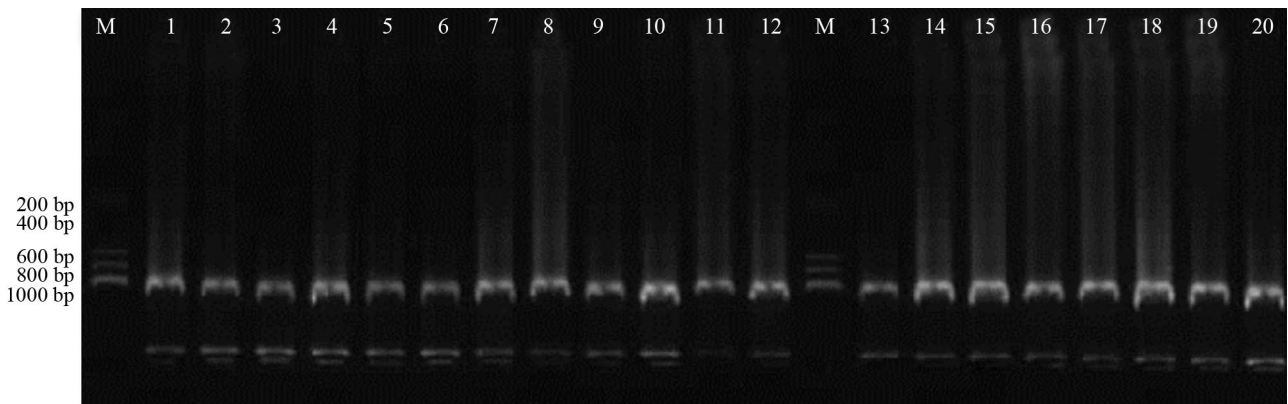


图 1 莲瓣兰栽培品种基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳。M: 标准分子量; 1~20 代表表 1 中的 C01~C20。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA in *Cymbidium tortisepalum* cultivars. M: DL 1000 standard Marker; 1-20 present C01-C20 in Table 1.

基因数是 1.954~11.571, 平均为 5.124, 这表明 12 对引物均具有较好的扩增效果。引物 SSR03 扩增的等位基因数最多, 达 18 个, 等位基因数位点最少的引物是 SSR11, 只有 3 个。扩增的有效等位基因数最多的是引物 SSR12, 多达 11.571 个, 最少的是引物 SSR06, 为 1.954。观测杂合度和期望杂合度分别为 0.094~0.774 和 0.488~0.914, 平均分别为 0.379 和 0.732。Shannon 信息指数和多态性信息含量分别为 0.806~2.624 和 0.789~0.953。12 对引物中,

引物 SSR03 的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、Shannon 信息指数和多态性信息含量值最高, 而引物 SSR06 和 SSR11 的最低。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及毛细管电泳分析

莲瓣兰 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳初步检测后, 再经过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 拍照留像后选择条带清晰, 杂带少的扩增产物进行毛细管电泳。从图 2 和图 3 可知, 引物 SSR03 的扩增效率高, 扩增

表 3 12 对 SSR 引物扩增信息

Table 3 Amplification by 12 pairs of primer

引物 Primer	TM (°C)	长度 Length (bp)	<i>n</i>	N_A	N_E	H_O	H_E	<i>I</i>	<i>PIC</i>
SSR01	57	186~218	25	7	5.411	0.160	0.815	1.805	0.888
SSR02	65	177~233	32	14	7.728	0.750	0.871	2.272	0.943
SSR03	63	103~151	31	18	11.174	0.774	0.911	2.624	0.953
SSR04	60	179~223	30	7	4.489	0.300	0.777	1.636	0.894
SSR05	63	137~181	32	7	4.511	0.625	0.778	1.667	0.899
SSR06	54	187~205	30	4	1.954	0.100	0.488	0.866	0.819
SSR07	58	138~178	30	5	3.333	0.267	0.700	1.387	0.863
SSR08	54	224~280	32	6	2.663	0.313	0.625	1.245	0.874
SSR09	59	310~336	32	4	3.205	0.469	0.688	1.225	0.849
SSR10	55	127~139	31	6	3.343	0.290	0.701	1.412	0.879
SSR11	58	185~233	32	3	2.107	0.094	0.525	0.806	0.789
SSR12	61	150~206	27	14	11.571	0.407	0.914	2.545	0.939
合计 Total			364	95	61.489	4.549	8.793	19.490	10.589
平均 Mean			30.333	7.917	5.124	0.379	0.732	1.624	0.882

TM: 退火温度; *n*: 样本数; N_A : 等位基因数; N_E : 有效等位基因数; H_O : 观察杂合度; H_E : 期望杂合度; *I*: Shannon 信息指数; *PIC*: SSR 位点多态性信息含量。

TM: Annealing temperature; *n*: Number of samples; N_A : Number of alleles; N_E : Effective number of alleles; H_O : Observed heterozygosity; H_E : Expected heterozygosity; *I*: Shannon's information index; *PIC*: Polymorphism information content.

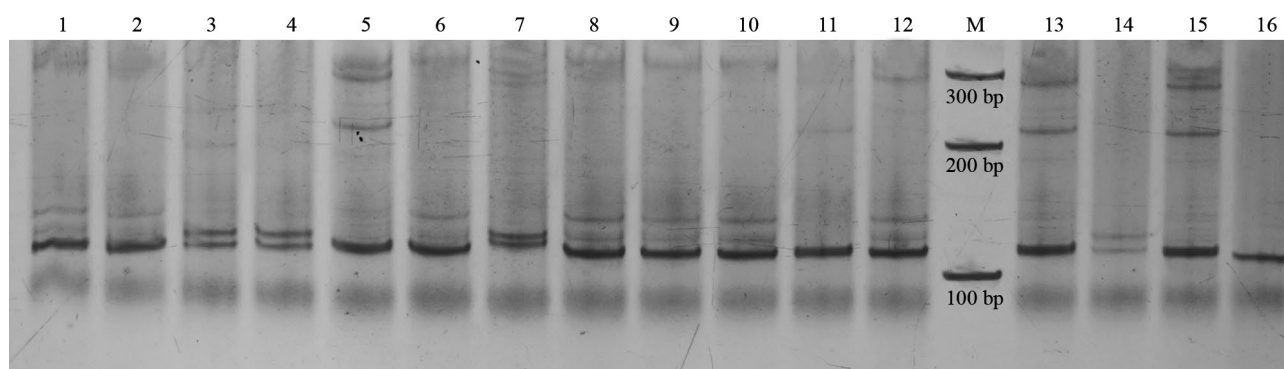


图 2 引物 SSR03 对莲瓣兰栽培品种的 PCR 扩增产物。M: 标准分子量; 1~16 为 C1~C16 品种。

Fig. 2 PCR amplification of *Cymbidium tortisepalum* cultivars by primer SSR03. M: DL 1000 standard Marker; 1~16 are cultivars from C1 to C16.

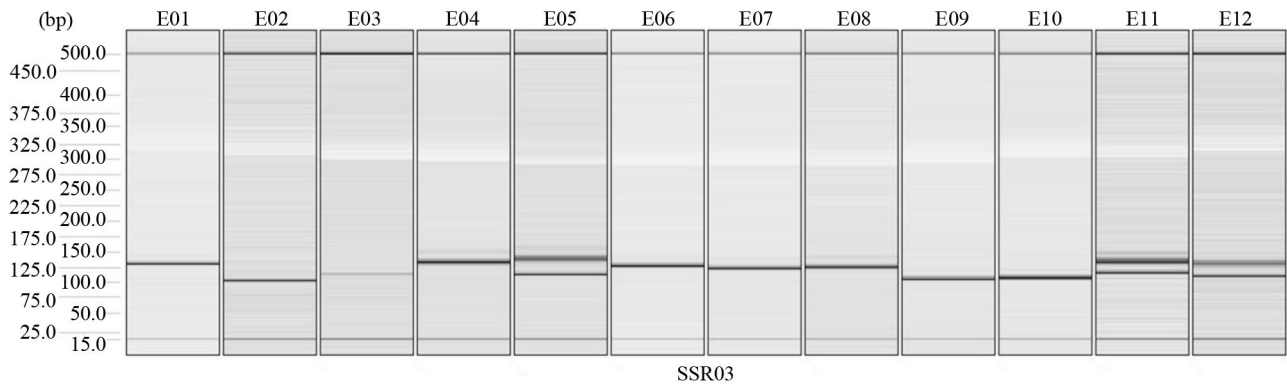


图3引物 SSR03 对 12 个莲瓣兰栽培品种 PCR 扩增产物的电泳分型图。E01~E12 代表品种 C21~C32。

Fig. 3 Electrophoresis classification of PCR amplified products of 12 *Cymbidium tortisepalum* cultivars by primer SSR03. E01–E12 stand for cultivars C21–C32.

表 4 莲瓣兰主栽品种的特征引物及其带型

Table 4 Specific primers and bands of *Cymbidium tortisepalum* cultivars

品种 Cultivar	特征引物 Specific primer	特异性条带 Specific bands	品种 Cultivar	特征引物 Specific primer	特异性条带 Specific bands	品种 Cultivar	特征引物 Specific primer	特异性条带 Specific bands
C1	SSR01	210,218	C12	SSR03	127,141	C22	SSR08	234,234
	SSR09	320,324		SSR13	164,164		C23	SSR02
	SSR10	185,195	C13	SSR02	203,233	SSR03		105,105
	SSR12	168,176		SSR03	117,129	SSR06	197,197	
C2	SSR02	189,205		SSR05	145,165		SSR08	256,280
	SSR05	153,171	C14	SSR10	185,203	C24	SSR02	197,207
C3	SSR03	129,131		SSR01	206,210		SSR03	111,131
	SSR12	164,186	SSR02	203,207	SSR05	171,177		
C4	SSR03	111,127	SSR03	121,131	C25	SSR03	105,145	
	SSR12	186,200	SSR05	135,153		C26	SSR12	162,168
C5	SSR02	195,203		SSR09	320,336		C27	SSR03
	SSR03	113,125		SSR12	154,186	SSR07		150,170
C6	SSR03	113,121	C15	SSR02	199,203		SSR12	200,200
	SSR09	324,336		SSR03	111,135	C28	SSR02	201,201
C7	SSR02	197,203	C16	SSR03	111,135			SSR03
	SSR03	111,111		SSR04	181,209		SSR07	138,144
C8	SSR03	103,129	C17	SSR02	211,211	C29	SSR02	207,211
	SSR06	193,197		C18	SSR02		203,213	SSR03
	SSR07	158,170	SSR03		111,115	SSR10	211,233	
	SSR12	168,182	C19	SSR02	207,207	SSR12	186,190	
C9	SSR02	189,207		SSR03	111,151	C30	SSR02	207,217
	SSR03	113,141	SSR05	135,135	SSR03		119,129	
	SSR12	154,154	SSR09	330,336	SSR12		178,186	
C10	SSR03	117,127	C20	SSR04	223,223	C31	SSR03	129,141
	SSR06	178,197		SSR05	145,145		SSR07	138,138
	SSR08	278,278	SSR12	176,176	SSR10	185,233		
	SSR11	216,218	C21	SSR02	193,199	C32	SSR03	129,145
SSR12	176,182	SSR03		103,103	SSR04		201,209	
C11	SSR03	117,117	C22	SSR03	113,139	SSR05	135,159	
	SSR12	190,200		SSR07	144,144	SSR07	170,170	

谱带具有比较好的多态性,杂带条数少,可用于后续指纹图谱构建分析。

2.4 SSR指纹图谱分析

采用 12 对 SSR 引物对 32 个莲瓣兰主栽品种进行指纹分析,结果表明,所采用的引物均为特征引物,32 个品种在 12 对引物中都具有不同的特异性条带(表 4),以特征引物的特异性条带可与其他品种区分开。特征引物 SSR02 在 天姿梅(C02)、满江红(C05)、黄金海岸(C09)等 16 个品种有特异条带。SSR03 在 万寿锦荷(C03)、梁祝(C04)、满江红(C05)等 26 个品种上都具有特异性条带。SSR12 在 中意蝶(C01)、万寿锦荷(C03)、梁祝(C04)等 15 个品种上都具有特异性条带。C17(云溪蝶)、C25(赵氏梅)、C26(映山红)等 3 个品种分别在 SSR02、SSR03、SSR12 引物上扩增出唯一的特异性条带,条带值分别为 211/211、105/145、162/186。可见,

这 3 对引物扩增的多态性丰富且特异性条带较多,涵盖了 32 个莲瓣兰主栽品种,在品种指纹图谱鉴定中可优先选择。

2.5 指纹图谱构建

根据各对引物扩增的等位基因数、扩增谱带及特异性条带,最终从 12 对引物中筛选出 3 对多态性丰富的核心引物。将这 3 对核心引物组合后进行鉴定,构建莲瓣兰主栽品种的 SSR 分子指纹图谱(表 5),仅用引物 SSR03 可以区分万寿锦荷(C03)、梁祝(C04)、满江红(C05)等 27 个品种,增加引物 SSR02,则可鉴别 29 个品种。但中意蝶(C01)、朱丝玉荷(C20)、映山红(C26)等 3 个品种用引物 SSR03 和 SSR02 不能区分,但 SSR12 引物能扩增出不同的特异性带型,即采用 3 对引物组合(SSR02 + SSR03 + SSR12)可将 32 个莲瓣兰品种完全区分开(表 5)。

表 5 32 个莲瓣兰栽培品种的 SSR 指纹图谱

Table 5 Fingerprint of 32 *Cymbidium tortisepalum* cultivars based on SSR markers

品种 Cultivar	指纹图谱 Fingerprint	品种 Cultivar	指纹图谱 Fingerprint
C1	SSR02-203,209/SSR03-111,121/SSR12-168,176	C17	SSR02-211,211/SSR03-127,127/SSR12-178,178
C2	SSR02-189,205/SSR03-129,129/SSR12-178,178	C18	SSR02-203,213/SSR03-111,115/SSR12-186,186
C3	SSR02-205,213/SSR03-129,131/SSR12-164,186	C19	SSR02-207,207/SSR03-111,151/NULL
C4	SSR02-205,205/SSR03-111,127/SSR12-186,200	C20	SSR02-207,213/SSR03-129,129/SSR12-176,176
C5	SSR02-195,203/SSR03-113,125/SSR12-206,206	C21	SSR02-193,199/SSR03-103,103/SSR12-150,150
C6	SSR02-201,211/SSR03-113,121/NULL	C22	SSR02-203,209/SSR03-113,139/SSR12-186,186
C7	SSR02-197,203/SSR03-111,111/SSR12-156,156	C23	SSR02-197,205/SSR03-105,105/SSR12-150,150
C8	SSR02-205,213/SSR03-103,129/SSR12-168,182	C24	SSR02-197,207/SSR03-111,131/SSR12-156,156
C9	SSR02-189,207/SSR03-113,141/SSR12-154,154	C25	SSR02-205,205/SSR03-105,145/SSR12-172,172
C10	SSR02-203,203/SSR03-117,127/SSR12-176,182	C26	SSR02-203,211/NULL/SSR12-162,168
C11	SSR02-205,213/SSR03-117,117/SSR12-190,200	C27	SSR02-203,211/SSR03-123,127/SSR12-200,200
C12	SSR02-205,205/SSR03-127,141/SSR12-164,164	C28	SSR02-201,201/SSR03-117,139/NULL
C13	SSR02-203,233/SSR03-117,129/SSR12-172,172	C29	SSR02-207,211/SSR03-113,129/SSR12-186,190
C14	SSR02-203,207/SSR03-121,131/SSR12-154,186	C30	SSR02-207,217/SSR03-119,129/SSR12-178,186
C15	SSR02-199,203/SSR03-111,135/SSR12-154,162	C31	SSR02-205,213/SSR03-129,141/SSR12-168,168
C16	SSR02-201,211/SSR03-113,135/NULL	C32	SSR02-205,205/SSR03-129,145/NULL

NULL: 无扩增。

NULL: No amplification.

3 讨论

3.1 莲瓣兰栽培品种的遗传多样性

在筛选出的12对SSR引物中,3对引物(SSR02、SSR03、SSR12)扩增出的等位基因数均大于或等于14个。从期望杂合度、Shannon信息指数、多态性信息含量来看,云南莲瓣兰栽培品种具有较高的遗传分化和遗传多样性。这可能是因为云南莲瓣兰的栽培和利用历史悠久,引种实践极为频繁,造成育种材料和种质资源的遗传基础复杂;莲瓣兰是异花授粉植物,选择变异与无性扩繁是新品种选育的主要途径,导致其品种具有较大的异质性。这也与贾琳等^[19]的研究结果一致,即莲瓣兰的遗传变异主要来自于居群内部,且具有丰富的遗传多样性。

3.2 莲瓣兰种质资源指纹库的构建

本研究中,32个莲瓣兰栽培品种都能够扩增出特异性谱带。但是随着品种数量的增多,原来在某一对引物上具有特异性条带的品种,有可能不是唯一的,即其它的品种在该引物上同样具有相同的特异性条带。这是因为特异性条带是相对的,只对于固定的有限的样品有效^[20]。因此,需要进行大量的引物筛选工作,应用更多的多态引物构建莲瓣兰种质资源指纹库。

3.3 SSR标准指纹图谱可用于品种的鉴定

用核心引物组合法^[21]构建植物的SSR标准指纹图谱,已被广泛用于植物的品种鉴定,并可实现准确快速鉴定^[22]。本研究采用核心引物组合法构建了莲瓣兰SSR标准指纹图谱,不但将32个莲瓣兰栽培品种区分开来,还为莲瓣兰主栽品种的准确快速鉴定提供了条件。对规范莲瓣兰市场行为和资源的保护提供了技术支撑。但由于本研究参试的品种和引物数量有限,还需要进一步增加品种材料及引物数量,并引入标准验证体系,不断完善莲瓣兰品种快速鉴定指纹图谱模型。

参考文献

- [1] Du P D, Cribb P J. The Genus *Cymbidium* [M]. London, Portland, Oregon: Christopher Helm Timber Press, 1988: 1–204.
- [2] Wu Y X. Chinese *Cymbidium* [M]. Beijing: Chinese Forestry

Press, 1993: 1–64.

吴应祥. 中国兰花 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 1–64.

- [3] Chen X Q, Ji Z H. The Orchids of China [M]. Beijing: Chinese Forestry Press, 1998: 11–90.
陈心启, 吉占和. 中国兰花全书 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 11–90.
- [4] Liu Z J, Chen X C, Ru Z Z. *Cymbidium* in China [M]. Beijing: Science Press, 2006: 238–269.
刘仲建, 陈心超, 茹正忠. 中国兰属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 238–269.
- [5] Xue R G, He S X, Li Z G, et al. A review of conservation status of *Cymbidium tortisepalum* and the utilization [J]. For Invent Plann, 2007, 32(3): 94–97.
薛润光, 和寿星, 李兆光, 等. 莲瓣兰保育现状与开发利用 [J]. 林业调查规划, 2007, 32(3): 94–97.
- [6] Freeland J R, Kirk H, Petersen S. Molecular Ecology [M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2005: 11–464.
- [7] Ma L, Liu H Z, Lu X Z, et al. Molecular identity of 130 *Brassica napus* varieties [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2013, 35(3): 231–239.
马琳, 刘海珍, 陆徐忠, 等. 130份甘蓝型油菜种质分子身份证的构建 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 231–239.
- [8] Ma L Y, Kong D C, Liu H B, et al. Construction of SSR fingerprint on 36 Chinese jujube cultivars [J]. Acta Hort Sin, 2012, 39(4): 647–654.
麻丽颖, 孔德仓, 刘华波, 等. 36份枣品种SSR指纹图谱的构建 [J]. 园艺学报, 2012, 39(4): 647–654.
- [9] UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction “BMT Guidelines” (proj. 9) [C]. Geneva: UPOV, 2007: 2–4.
- [10] Sai L, Zhu L Q. Analysis on *Cymbidium kanran* with SRAP markers [J]. Sci Agri Sin, 2010, 43(15): 3183–3190.
赛黎, 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): 3183–3190.
- [11] Liang H J, Liu M, Zhong Z Y, et al. Identification and classification of Chinese *Cymbidium* with RAPD [J]. Acta Hort Sin, 1996, 23(4): 365–370.
梁红健, 刘敏, 钟志宇, 等. 中国部分兰花品种RAPD分析 [J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 365–370.
- [12] Wang H Z, Wang Y D, Zhou X Y, et al. Analysis of genetic diversity of 14 species of *Cymbidium* based on RAPDs and AFLPs [J]. Acta Biol Exp Sin, 2004, 37(6): 482–486.
王慧中, 王玉东, 周晓云, 等. 兰属14种植物遗传多样性RAPD及AFLP分析 [J]. 实验生物学报, 2004, 37(6): 482–486.
- [13] Huang J L, Zeng C X, Li H T, et al. Isolation and characterization

- of 15 microsatellite markers from the spring orchid (*Cymbidium goeringii*) (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot*, 2011, 98(4): e76–e77.
- [14] Tang M, Zeng C X, Bi Y F, et al. Microsatellite markers for the Chinese endangered and endemic orchid *Cymbidium tortisepalum* (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot*, 2012, 99(1): e11–e13.
- [15] Doyle J J, Dolye J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19(1): 11–15.
- [16] Peakall R, Smouse P E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. *Mol Ecol Note*, 2006, 6(1): 288–295.
- [17] Shannon C E, Weaver W. *The Mathematical Theory of Communication* [M]. Urbana: University of Illinois Press, 1949: 1–144.
- [18] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181–186.
- [19] Jia L, Shi Y D, Yu H, et al. Genetic diversity of *Cymbidium tortisepalum* by DALP [J]. *Guihaia*, 2012, 32(6): 822–827. 贾琳, 史云东, 虞泓, 等. 莲瓣兰DALP遗传多样性研究 [J]. 广西植物, 2012, 32(6): 822–827.
- [20] Ai C X, Qin Z H, Tao J H, et al. SSR Fingerprints and genetic variations of the 32 persimmon major cultivars [J]. *Acta Bot Boreal-Occid Sin*, 2011, 31(11): 2185–2191. 艾呈祥, 秦志华, 陶吉寒, 王长君. 32个柿主栽品种SSR图谱构建及遗传变异分析 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(11): 2185–2191.
- [21] Lou Z R, Li F F, Cai L H. Molecular systematics of China native nonastringent persimmon based on random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Hort Sin*, 1996, 26(5): 297–301. 罗正荣, 李发芳, 蔡礼鸿. 部分中国原产甜柿种质的分子系统学研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 297–301.
- [22] Chen H Y, Sun Z D, Sun R F, et al. AFLP molecular markers was applied in identification of precious varieties of *Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f. [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2007, 23(2): 70–73. 陈惠云, 孙志栋, 孙日飞, 等. AFLP分子标记技术在名贵春兰鉴别中的应用 [J]. 农业生物技术科学, 2007, 23(2): 70–73.