



苏宇静,姚文敏,陈兆贵.利用 ISSR 分子标记鉴定蝴蝶兰不同种资源的遗传多样性[J].黑龙江农业科学,2021(12):62-67.

# 利用 ISSR 分子标记鉴定蝴蝶兰不同种资源的遗传多样性

苏宇静,姚文敏,陈兆贵

(惠州学院 生命科学学院,广东 惠州 516007)

**摘要:**为有效利用蝴蝶兰种质资源,促进蝴蝶兰新品种选育,本研究以不同的蝴蝶兰品种为研究对象,利用 ISSR 分子标记技术,通过 DNA 提取,优化 ISSR-PCR 扩增体系及聚类分析探究 18 种蝴蝶兰的遗传多样性。结果表明:8 条 ISSR 引物经 ISSR-PCR 共扩增出 61 条条带,多态性条带为 52 条,平均多态性比率为 86.0%。蝴蝶兰样品在遗传相似系数 0.736 水平上可分为三大类群,且第一大类群在 0.760 处可划分为两个类群。18 种蝴蝶兰样品之间的相似系数为 0.625 0~0.938 3,平均遗传相似系数为 0.784 2,表明资源之间的遗传多样性适中,品种间差异不大。

**关键词:**蝴蝶兰;分子标记;ISSR;遗传多样性

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 是常见的观赏花卉,是兰科蝴蝶兰属多年生草本植物。蝴蝶兰的花型奇异且优美,类似蝶形,花期较长、花的颜色也丰富多彩,有“兰花皇后”的称号,具有较高的观赏价值和经济价值<sup>[1]</sup>。

1994 年,Zietkiewicz 等<sup>[2]</sup>创建了简单重复序列间扩增技术 (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR),它是一种利用微卫星序列为引物,进行多位点 PCR 扩增的技术<sup>[3-5]</sup>。ISSR 具有 RAPD 技术的优点,可重复性高、灵敏度高、DNA 模板浓度小以及引物扩增多态性较高等<sup>[6-8]</sup>。

分子标记技术广泛应用于研究各种植物的多样性,是一种重要的评价遗传多样性的技术<sup>[9]</sup>。ISSR 技术用于密花豆、红麻、红三叶、蒙顶甘露和野生菰等植物的遗传多样性分析,并广泛应用于亲缘关系鉴定、遗传关系和种质鉴定,在植物的分子育种领域中具有重要作用<sup>[10-15]</sup>。何荆洲等<sup>[16]</sup>利用 ISSR 分子标记技术分析了 36 个蝴蝶兰品种的遗传关系。谢启鑫等<sup>[17]</sup>对蝴蝶兰种质资源遗传多样性进行了 ISSR 分析。赵谦<sup>[18]</sup>综述了 ISSR 标记在植物遗传分析中的应用研究。谢琳丹<sup>[19]</sup>基于 ISSR 技术和观赏性变异特性对蝴蝶兰

杂交亲本进行筛选。蹇黎<sup>[20]</sup>综述了 ISSR 技术和 SRAP 标记技术在兰花植物种质资源研究中的应用现状。

本研究应用 ISSR 分子标记技术分析南方地区蝴蝶兰品种遗传多样性,以期能够为蝴蝶兰大规模育种与培育提供参考,为开发新的蝴蝶兰杂交品种奠定基础,从而满足市场对蝴蝶兰的需求,更有效地利用种质资源,并为选育新的蝴蝶兰品种提供参考依据<sup>[21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 18 种不同的蝴蝶兰品种,由惠州农业工程职业学院兰花基地提供。将取得的蝴蝶兰嫩叶分别剪成 3 份,放置标有记号的密封袋中,趁新鲜转入 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及检测 采用略有改动的 CTAB 法提取蝴蝶兰 DNA<sup>[22-23]</sup>,并通过微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 的浓度及纯度。

1.2.2 ISSR 引物的筛选 11 条引物均由湖南艾瑞克生物有限公司合成,筛选出扩增条带清晰、多态性较好且结果稳定的引物。

1.2.3 ISSR-PCR 退火温度的优化 ISSR14 等 11 个引物的模板均为 1 号蝴蝶兰样品,设置退火温度为 46,48,50,52,54 和 56 ℃ 共 6 个温度梯度,循环数为 35,进行梯度试验。

收稿日期:2021-09-09

基金项目:惠州市科技计划项目(2018SC04208)。

第一作者:苏宇静(1999—),女,本科生,从事植物学研究。  
E-mail:YujingSu0911@163.com。

通信作者:陈兆贵(1973—),男,博士,教授,从事作物遗传育种研究。E-mail:chenzg1973@126.com。

表 1 蝴蝶兰品种名称

样品编号	名称
1	甜格格
2	大财主
3	粉燕子
4	粉红天使
5	黛玉
6	光芒四射
7	福乐之星
8	蒙娜丽莎
9	朝日
10	日本姑娘
11	优雅
12	香橙
13	劳伦斯
14	大金橘
15	金蝶
16	富乐夕阳
17	大辣椒
18	黄金美人

1.2.4 ISSR-PCR 扩增程序 PCR 反应体系:样品总体积 25  $\mu\text{L}$  (含 *Taq* 酶 12.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ 、引物 1  $\mu\text{L}$  和蝴蝶兰样品 DNA 1  $\mu\text{L}$ )。

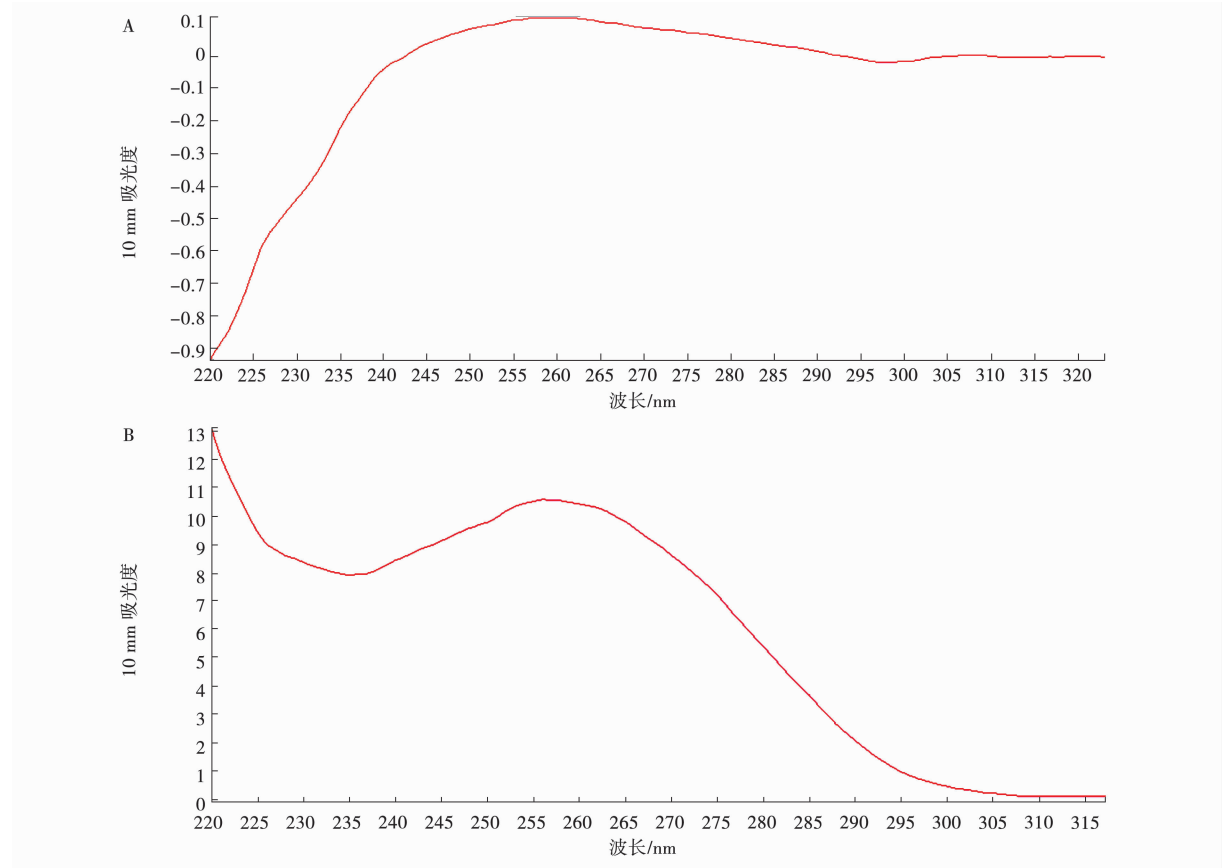
PCR 扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$ ,预变性 7 min,(94  $^{\circ}\text{C}$ ,变性 45 s,退火温度需根据试验确定,复性 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$ ,延伸 2 min)35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$ ,延伸 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$ ,保存。

1.2.5 数据分析 ISSR-PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,人工读取 ISSR-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳条带数,分子量标准为 Trans2K \* Plus II DNA Marker,对重复性较好的扩增条带按有带记为“1”,无带记为“0”,记录电泳结果并制作包含每个引物条带数的 Excel 0-1 矩阵。应用 NTSYS-pc2.10 软件处理数据,聚类分析采用非加权类平均法(UPGMA),根据所获得的遗传相似系数建立聚类树状图。

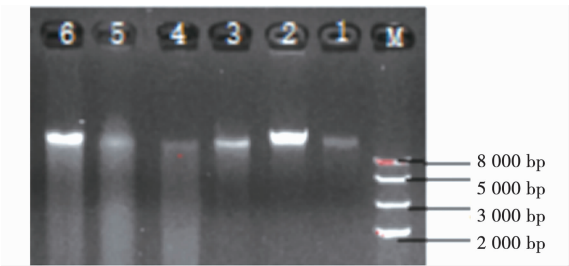
2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量分析

以 6 号样品为例,图 1 表明,采用 CTAB 法提取的蝴蝶兰 DNA 较试剂盒提取法浓度高,且在 260 nm 处具有峰值。将 CTAB 法提取部分样品的 DNA 在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳上进行电泳分离(图 2)。电泳显示,DNA 电泳条带明显,表明 DNA 未降解,可用于接下来的 ISSR 分析。



A. 试剂盒提取法;B. CTAB 提取法。  
图 1 6 号样品 DNA 浓度



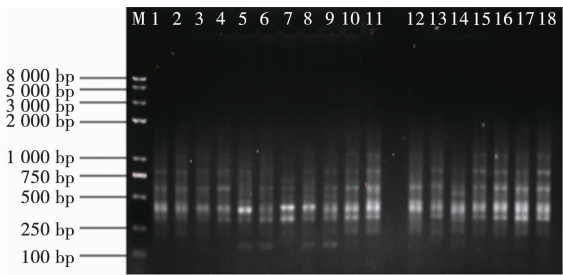
M. Marker 8 000;泳道 1~6. 代表甜格格、大财主、粉燕子、  
粉红天使、黛玉和光芒四射。

图 2 1.5%琼脂糖凝胶检测 DNA 纯度电泳图

2.2 ISSR 分子标记体系的建立与优化

2.2.1 ISSR 引物的选择 采用 ISSR 分子标记技术通用引物,共选取 10 个 UBC 系列引物以及通用引物 ISSR14,以提取的 18 种蝴蝶兰样品的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。

以出带情况、稳定性和多态性为原则,共筛选出 8 个引物进行蝴蝶兰样品遗传多样性分析,分别为 ISSR14、UBC815、UBC825、UBC827、UBC835、UBC855、UBC856 和 UBC868。



M. Marker 8 000;泳道 1~18. 1~18 号蝴蝶兰样品。

图 3 引物 UBC835 扩增结果

2.2.2 退火温度的确定 ISSR 引物最优退火温度如表 2 所示,以 1 号样品 DNA 为模板时 UBC827 引物为例,UBC827 理论退火温度为 52.87℃。由图 4 可看出,扩增退火温度<52℃时,条带较为模糊,且条带显示不完全,当温度升高时,扩增的特异性逐渐升高,条带较为明显;当温度≥54℃时,部分条带清晰度降低。

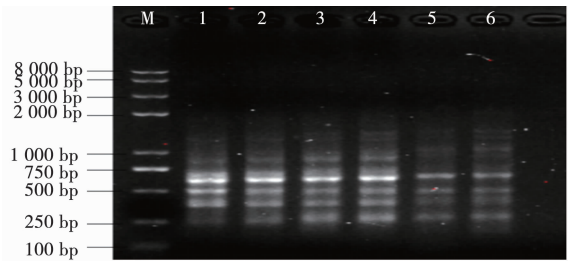
2.3 ISSR 不同引物扩增多态性分析

由表 3 可知,8 条引物共扩增出 61 条稳定性和清晰度好的条带,52 条特异性条带,条带多态性比率为 86.0%。每个引物能够扩增出来的平均条带是 7.6 条,大小在 100~2 000 bp 之间。由图 5 和图 6 可明显观察到,同一种蝴蝶兰样品在不

同引物中或同一个引物在不同样品中扩增出的条带总数及清晰度有差异。

表 2 ISSR 分子标记引物及最优退火温度

引物编号	序列(5'~3')	理论退火 温度/℃	最优退火 温度/℃
ISSR14	BDBACAACAACAACAACA	48.11	55
UBC815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	46.89	54
UBC817	CTCTCTCTCTCTCTCTA	45.34	50
UBC825	ACACACACACACACACT	51.71	54
UBC827	ACACACACACACACACG	52.87	52
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYG	50.57	55
UBC848	CACACACACACACACARG	52.68	46
UBC855	ACACACACACACACACYT	53.44	50
UBC856	ACACACACACACACACY	53.13	50
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	44.07	53
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	43.65	50

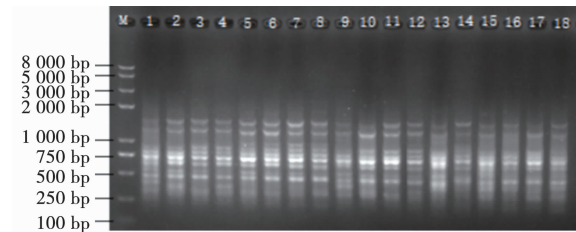


M. Marker 8 000;泳道 1~6. 退火温度分别为 46,48,50,  
52,54 和 56℃。

图 4 UBC827 引物不同退火温度扩增结果

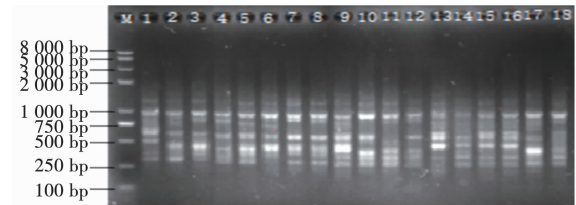
表 3 8 个有效 ISSR 引物的扩增结果

引物编号	扩增带数/条	多态性条带/条	多态性比率/%
ISSR14	9	8	88.8
UBC815	6	6	100.0
UBC825	5	4	80.0
UBC827	6	5	83.3
UBC835	7	6	85.7
UBC855	8	8	100.0
UBC856	8	6	75.0
UBC868	12	9	75.0
总数	61	52	-
平均	7.6	6.5	86.0



M, Marker 8 000;泳道 1~18, 1~18 号蝴蝶兰样品。

图 5 引物 UBC868 扩增结果



M, Marker 8 000;泳道 1~18, 1~18 号蝴蝶兰样品。

图 6 引物 ISSR14 扩增结果

2.4 聚类分析

由表 4 可以看出,18 种蝴蝶兰材料的相似系

数主要分布在 0.625 0~0.938 3 之间,蝴蝶兰品种间的平均遗传相似系数为 0.784 2。其中蝴蝶兰样品 2 号和 3 号之间的相似系数最大,为 0.938 3,而 13 和 14 号蝴蝶兰样品之间的相似系数最小,为 0.625 0,表明在 18 个蝴蝶兰品种间,大财主与粉燕子的亲缘关系最接近,而劳伦斯与大金橘的亲缘关系较远。

根据 UPGMA 聚类方法进行聚类分析,得到 18 种蝴蝶兰样品的 ISSR 聚类图(图 7),从图 7 可知,以 0.736 为阈值,蝴蝶兰样品材料分为三大类群。第一大类群包括 16 个材料,分别为 1 号、15 号、18 号、16 号、13 号、2 号、3 号、4 号、17 号、6 号、7 号、8 号、10 号、11 号、5 号、12 号样品。第二大类群仅含 9 号样品,第三大类群仅包含 14 号样品,表明朝日和大金橘各自与其它蝴蝶兰品种的遗传信息差异较大。

表 4 18 种蝴蝶兰材料的遗传相似系数

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1.0000																	
2	0.8333	1.0000																
3	0.8235	0.9383	1.0000															
4	0.8372	0.9268	0.9157	1.0000														
5	0.7711	0.8354	0.8750	0.8395	1.0000													
6	0.7865	0.8471	0.8605	0.8966	0.8333	1.0000												
7	0.8506	0.8675	0.9048	0.8471	0.8293	0.8636	1.0000											
8	0.8276	0.8675	0.8810	0.8706	0.8780	0.8864	0.9302	1.0000										
9	0.7901	0.7273	0.7179	0.7595	0.7105	0.7561	0.7250	0.7250	1.0000									
10	0.8372	0.8780	0.8675	0.8333	0.7654	0.7816	0.8471	0.8471	0.7342	1.0000								
11	0.8172	0.8764	0.8889	0.8571	0.7955	0.8298	0.8696	0.8696	0.6977	0.8791	1.0000							
12	0.7750	0.8158	0.8571	0.7949	0.8000	0.7407	0.8101	0.7848	0.6849	0.8205	0.8235	1.0000						
13	0.8148	0.7273	0.7179	0.7595	0.6579	0.7317	0.7250	0.7000	0.7297	0.7342	0.6977	0.6849	1.0000					
14	0.7042	0.7164	0.7353	0.7246	0.6970	0.6389	0.6857	0.6857	0.6875	0.6667	0.6579	0.7937	0.6250	1.0000				
15	0.8916	0.7595	0.7500	0.7654	0.7179	0.7143	0.7805	0.7805	0.7368	0.7654	0.7727	0.7467	0.8158	0.7273	1.0000			
16	0.8372	0.7073	0.7229	0.7381	0.6667	0.7586	0.7529	0.7294	0.7089	0.7857	0.7912	0.6923	0.7089	0.6667	0.8148	1.0000		
17	0.7711	0.9114	0.8750	0.8889	0.7949	0.8333	0.8293	0.8537	0.7105	0.8395	0.8409	0.7467	0.6842	0.6970	0.6923	0.7654	1.0000	
18	0.8506	0.7711	0.7857	0.8235	0.7073	0.7500	0.7907	0.7907	0.7750	0.8000	0.8043	0.7342	0.7500	0.7143	0.8049	0.8000	0.7805	1.0000

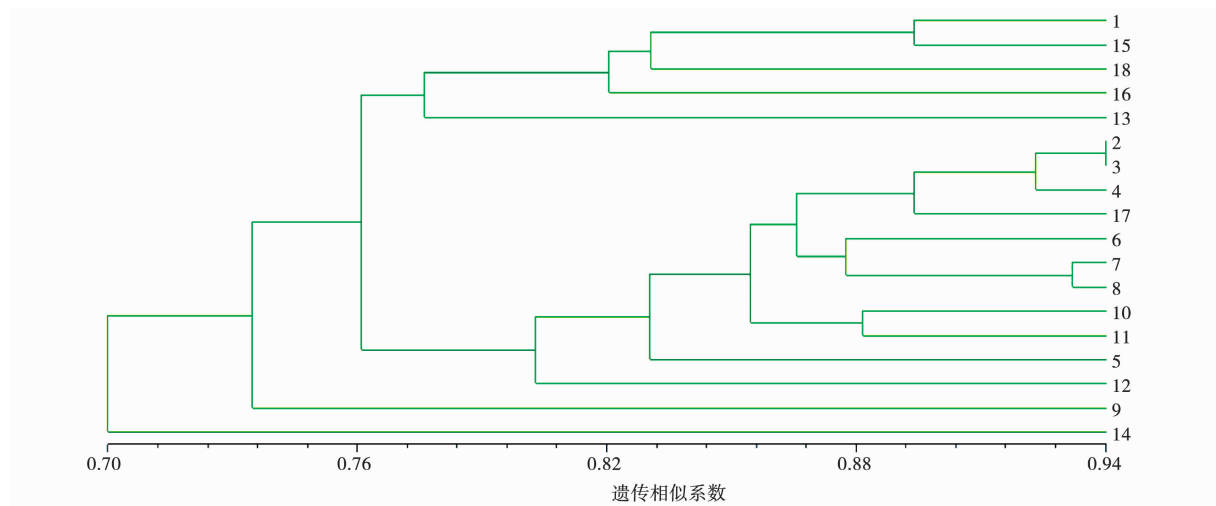


图 7 18 种蝴蝶兰材料的遗传多样性聚类图

### 3 讨论

本试验选取的引物扩增多态性比率最高的是 UBC815 与 UBC855, 与何荆洲等<sup>[16]</sup>研究结果一致; 而其确定的 UBC827 退火温度为 50 ℃, 这与本研究所得最优退火温度为 52 ℃ 的结果有所出入, 推测由于品种多样性, 引物用于扩增不同品种时所需的最优退火温度有所差异。

李佐等<sup>[24]</sup>和孙汝斌<sup>[25]</sup>等都报道了分子标记技术用于研究兰花品种遗传多样性。谢琳丹<sup>[19]</sup>运用 ISSR 分子标记技术鉴定蝴蝶兰品种遗传信息, 并筛选出合适的杂交亲本。本试验聚类分析结果表明, 18 种蝴蝶兰之间的遗传相似系数较高, 推测在育种和遗传过程中基因组未发生明显改变。18 种蝴蝶兰样品中, 大财主与粉燕子的亲缘关系最接近; 推测二者的遗传背景相似, 遗传分化较小, 可能来源于同一种系<sup>[9]</sup>。相反, 样品朝日和大金橘分别独属于一个类别, 表明在遗传水平上, 与其他蝴蝶兰品种有较大的差异<sup>[26]</sup>。资源利用的基础之一是遗传多样性<sup>[10]</sup>。朝日与大金橘和其他品种相似系数均较小, 亲缘关系较远, 遗传分化较大, 可作为选育新蝴蝶兰品种的亲本, 为开发新的蝴蝶兰品种提供新的选择<sup>[27]</sup>。

本试验是基于 ISSR 分子标记探究蝴蝶兰的遗传多样性, 后续更深入探究分子标记在遗传多样性研究中的作用和更直观了解品种的遗传多样性, 丰富研究材料, 应用多种分子标记技术进行共同研究奠定基础<sup>[18,20]</sup>。

### 4 结论

基于本研究的试验结果, 可证实 ISSR 分子标记技术可用于蝴蝶兰不同品种间的遗传多样性分析, 鉴定 18 种蝴蝶兰的遗传相似性, 并为蝴蝶兰分子育种和选育新品种提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 张果, 赵玉安, 刘晓鹏, 等. 国内蝴蝶兰育种技术的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(9): 86-92.
- [2] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [3] JUNG W S, CHUNG I M, KIM S H, et al. Direct shoot organogenesis from *Lycium chinense* Miller leaf explants and assessment of genetic stability using ISSR markers[J]. Agronomy, 2021, 11(3): 503.
- [4] IBRAHIM E A. Genetic diversity in Egyptian bottle gourd genotypes based on ISSR markers[J]. Ecological Genetics and Genomics, 2021, 18: 100079.
- [5] LIU J, LI X M, LIU Y Q, et al. Evaluation of genetic diversity and development of core collections of industrial brewing yeast using ISSR markers[J]. Archives of Microbiology, 2020, 203(3): 1-8.
- [6] 段义忠, 王海涛, 张格格, 等. 基于 ISSR 分子标记的孑遗濒危植物四合木遗传结构分析[J]. 植物研究, 2021, 41(3): 466-473.
- [7] 覃芳, 史艳艳, 邹蓉, 等. 闹羊花 ISSR-PCR 反应体系建立及优化[J]. 北方园艺, 2020(21): 96-102.
- [8] 孟珊, 狄佳春, 苏彩霞, 等. 江苏省扁豆地方种质资源遗传多样性评价[J/OL]. 植物遗传资源学报: 1-18[2021-04-01]. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210302002>.

- [9] 陆婷,陈少瑜,吴涛,等.迪庆州核桃种质资源的遗传多样性与遗传结构[J].西部林业科学,2021,50(2):71-77.
- [10] 吴国林.基于 ISSR 和 SSR 标记的鄱阳湖流域野生菰种质资源遗传多样性研究[D].南昌:江西农业大学,2014.
- [11] 孟丽娟,赵桂琴.红三叶 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].草原与草坪,2015,35(2):21-26.
- [12] 黄亚芳.蒙顶甘露 ISSR-DNA 指纹图谱的初步构建[D].雅安:四川农业大学,2015.
- [13] 荣广天.密花豆种质资源 ISSR 分析[D].长沙:中南林业科技大学,2016.
- [14] 李建军,霍光,唐慧娟,等.60 份红麻种质资源 ISSR 和 RAPD 的聚类分析[J].中国麻业科学,2015,37(6):273-279.
- [15] 彭丽娟,牟柯澧,张健伟,等.基于 SSR 及 ISSR 标记的菜豆遗传多样性分析[J/OL].分子植物育种:1-15[2021-05-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210318.1438.024.htm>.
- [16] 何荆洲,卢家仕,卜朝阳,等.36 个蝴蝶兰品种遗传关系的 ISSR 分析[J].广东农业科学,2014,41(21):140-143.
- [17] 谢启鑫,缪南生,宋小民,等.蝴蝶兰种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].西北植物学报,2010,30(7):1331-1336.
- [18] 赵谦.ISSR 标记在植物遗传分析中的应用研究[D].汕头:汕头大学,2008.
- [19] 谢琳丹.应用 ISSR 技术和观赏性状变异特性筛选蝴蝶兰杂交亲本[D].福州:福建农林大学,2014.
- [20] 蹇黎.ISSR 和 SRAP 标记技术在兰花植物种质资源研究中的应用[J].北方园艺,2011(23):190-192.
- [21] 薄璇,侯艳霞,常宁,等.红掌分子标记技术应用研究进展[J].中国果菜,2020,40(9):56-60.
- [22] 陈雅琦,苏楷淇,李春杰,等.醉马草 DNA 提取方法的对比与优化[J].草学,2020(5):32-38.
- [23] CHEN W H,JIANG Z Y,HSU H F,et al.Silencing of *FOR-EVER YOUNG FLOWER*-like genes from *Phalaenopsis orchids* promotes flower senescence and abscission[J].Plant and Cell Physiology,2021,62(1):111-124.
- [24] 李佐,陈和明,肖文芳,等.蝴蝶兰 GENOMIC-SSR 与 EST-SSR 分子标记遗传差异性分析[C]//杜永臣.中国园艺学会 2015 年学术年会论文摘要集.北京:园艺学报编辑部,2015.
- [25] 孙汝斌.分子标记技术在蝴蝶兰研究中的应用[J].品牌(下半月),2014(10):278.
- [26] 崔学强,唐璇,黄昌艳,等.基于 ISSR 标记的卡特兰种质资源遗传多样性分析[J].西南农业学报,2020,33(7):1383-1388.
- [27] 户帅雅,李斌奇,陈孝丑,等.红掌遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析[J].福建农业学报,2020,35(1):20-27.

## Identify of Genetic Diversity in *Phalaenopsis* by ISSR Markers

SU Yu-jing, YAO Wen-min, CHEN Zhao-gui

(Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China)

**Abstract:** In order to make effective use of *Phalaenopsis* germplasm resources and promote the breeding of new varieties of *Phalaenopsis*, this study investigated the genetic diversity of 18 varieties of *Phalaenopsis* by using ISSR molecular marker technology, extracting DNA, optimizing ISSR-PCR amplification system and clustering analysis. These results showed that 61 bands were amplified from 8 ISSR primers by ISSR-PCR, and 52 bands were polymorphic, with an average polymorphism ratio of 86.0%. The samples of *Phalaenopsis* were divided into three groups at the level of genetic similarity coefficient 0.736, and the first group could be divided into two groups at 0.760. The similarity coefficient between the 18 species of *Phalaenopsis* was 0.625 0-0.938 3, and the average genetic similarity coefficient was 0.784 2, indicating that the genetic diversity among the species was moderate, and there was little difference among the varieties.

**Keywords:** *Phalaenopsis*; molecular markers; ISSR; genetic diversity

## 著作权使用声明

本刊已许可中国知网、维普网、万方数据等知识服务平台以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。

《黑龙江农业科学》编辑部