

中国墨兰品种遗传多样性的 AFLP 分析*

朱根发^{1,2}, 李冬梅¹, 郭振飞²

(1. 广东省农业科学院花卉研究所, 广东 广州 510640;

2. 华南农业大学生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要: 利用 AFLP 分析技术, 从 64 对 *Pst*I/*Mse*I 引物中筛选出 9 对多态性引物组合, 对来源于中国广东、福建、台湾的 42 个墨兰品种进行了遗传多样性和亲缘关系分析, 共扩增出 1 384 条带, 其中多态性带 1 333 条, 多态性率 96.3%。平均每对引物扩增带数 154 条、多态性带数 148 条。所有的品种均可区分, 其中 39 个品种具特征带或缺失带。墨兰品种间的遗传多样性丰富, 品种间的 Dice 相似系数 0.422 2~0.824 5, 平均相似系数 0.611 2。“达摩”系列芽变叶艺品种间的遗传多样性显著降低, 多态性率 76.6%, 平均相似系数 0.725 6。NTSYS2.10 聚类分析表明同一产地来源的品种基本上可聚在一起, 反映出了品种间的亲缘关系。

关键词: 墨兰; 兰科; 遗传多样性; AFLP; 芽变; 叶艺

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)03-0069-05

Genetic Diversity and Relationship of *Cymbidium sinense* Based on AFLP Markers

ZHU Genfa^{1,2}, LI Dongmei¹, GUO Zhenfei²

(1. Floricultural Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: AFLP analytic method was tested in the forty-two cultivars of *Cymbidium sinense* cultivars, originated from Guangdong, Fujian, and Taiwan provinces of China. Genomic DNA was extracted from the green leaves of *Cymbidium sinense* cultivars by the method of CTAB 9 pairs reproducible primers were selected from 64 pairs of primers. A total of 1 384 bands were observed, of which 1 333 bands (96.3%) were polymorphic. Each pair of primers produced 154 bands following amplification. The AFLP markers indicated that all cultivars were of different cultivar. 39 cultivars had their specific bands or deleted bands. The Dice coefficients amongst the cultivars ranged from 0.422 2 to 0.824 5, with an average value at 0.611 2. The polymorphic ratio of *C. sinense* ‘Da Mo’ with sport mutations is 76.6%. The Dice coefficients amongst the cultivars ranged from 0.616 4 to 0.824 5, with an average value at 0.725 6. According to the dendrogram using unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA), the cultivars were grouped into three main clusters. Cultivars with the same origin could be clustered together.

Key words: *Cymbidium sinense*; Orchidaceae; genetic diversity; AFLP; spot mutation; foliage variegation

* 收稿日期: 2008-08-05

基金项目: 广东省科技攻关重大专项资助项目(2003A2010401; 2006A2010401); 广东省农科院院长基金资助项目(2001-基金-24)

作者简介: 朱根发(1968年生), 男, 博士, 研究员; 通讯作者: 郭振飞; E-mail: zhfguo@scau.edu.cn

墨兰 *Cymbidium sinense* Willd. 为兰属 *Cymbidium* 植物之一, 主产于我国广东、广西、海南、福建、台湾、安徽、江西、贵州、云南和四川南部等地区, 也见于日本、越南、泰国、缅甸和印度东北部^[1]。墨兰是中国传统观赏兰花中较为庞大的家族, 早在南宋就有品种的记载, 栽培地域广阔, 爱好者众多, 目前已有园艺栽培品种达上千种^[2], 特别是 20 世纪 80 年代以来, 墨兰之风盛行, 涌现出大批下山驯化的墨兰新品种, 变异丰富, 不仅有红、黄、白、紫、绿、复色等花色, 而且有蝶瓣、梅瓣、水仙瓣、牡丹瓣、荷瓣等花形变异, 有各种各样的叶色、叶形 (叶艺) 变异^[3-4]。但对于其遗传背景和亲缘关系了解不多, 而且由于气候条件变化、土地资源开发以及野生兰花的过渡采挖, 野生兰花资源日渐枯竭, 通过研究栽培品种的遗传多样性, 可为兰花资源的保护提供策略。

分子标记技术已用于兰花亲缘关系分析和分类, 遗传多样性和保护遗传研究以及栽培品种间的亲缘或品种鉴定^[5-9]。本研究利用 AFLP 分子标记技术对来源于我国的墨兰栽培品种的遗传多样性进行分析, 并研究其亲缘关系, 为墨兰品种的鉴定及资源保护提供分子证据, 也为杂交育种的亲本选择提供依据。

1 材料与方法

供试 42 个墨兰品种见表 1, 其中 1-32 采集于中国花卉协会兰花分会国香苑, 33-42 采集于广东佛山市顺德区陈村镇。广东产品种 16 个、台湾产品种 24 个、福建产品种 2 个。基因组 DNA 提取采用 CTAB 法并加以改良^[4]。AFLP 扩增反应及数据分析按文献^[5]。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

从 64 对 *Pst*I/*Mse*I 引物中筛选出的多态性较好的 9 对引物 (表 2, 图 1), 对 42 个墨兰品种进行了 AFLP 扩增, 在 50~500 bp 内共扩增出 1 384 条带, 其中多态性带 1 333 条, 多态性率 96.3%。单引物对扩增的带数 141~166 条不等, 多态率 90.2%~100%, 平均每对引物扩增带数 154 条, 平均多态性带数 148 条 (表 2)。品种间区分率均达 100%。

2.2 芽变系列品种的多态性

通过芽变选育出的“达摩”叶艺系列品种的 AFLP 多态性明显, 但品种间的遗传多样性显著变

窄, 单引物对扩增多态率 62.7%~98.6%, 平均多态性率达 76.6% (表 2)。

表 1 供试墨兰品种及来源

Table 1 Cultivars of *Cymbidium sinense* used in the present study

编号	品种名	传统分类类型	来源	特有带 (缺失带)
Cs01	企剑白墨	素花	广东	11
Cs02	软剑白墨	素花	广东	26 (1)
Cs03	企剑黑墨	色花	广东	7 (1)
Cs04	黑了哥	色花	广东	5 (2)
Cs05	桃姬	色花	台湾	5
Cs06	樱姬	色花	台湾	1 (1)
Cs07	皇妃	色花	广东	4
Cs08	金鸟	色花	台湾	6
Cs09	新娘	色花	台湾	1
Cs10	南海梅	梅瓣	广东	4 (1)
Cs11	十八娇	荷型	台湾	5
Cs12	文山奇蝶	蝶瓣	台湾	2
Cs13	小梅	梅瓣	台湾	4
Cs14	珠海渔女	奇花	广东	10
Cs15	玉狮子	奇花	台湾	0
Cs16	大屯麒麟	奇花	台湾	0
Cs17	国香牡丹	奇花	台湾	2
Cs18	金嘴	叶艺	广东	1 (1)
Cs19	银边	叶艺	广东	1
Cs20	金银鼎	叶艺	广东	4
Cs21	大石门	叶艺	台湾	0
Cs22	达摩 1	矮种	台湾	2
Cs23	红龙	水晶	广东	6
Cs24	佛手	奇花	广东	2 (1)
Cs25	黄中王	叶艺	广东	1 (1)
Cs26	万代福	叶艺	台湾	4
Cs27	喜菊	奇花	台湾	2
Cs28	龙凤	叶艺	台湾	(2)
Cs29	阳明锦	色花	台湾	3
Cs30	小香	色花	广东	3
Cs31	龙梅	梅瓣	台湾	23
Cs32	徽州墨	色花	福建	7 (2)
Cs33	达摩 2	矮种	台湾	7 (1)
Cs34	缟艺达摩 1	矮种叶艺	台湾	5 (1)
Cs35	冠艺达摩	矮矮种叶艺	台湾	2
Cs36	缟艺达摩 2	矮种叶艺	台湾	3 (1)
Cs37	爪艺达摩	矮种叶艺	台湾	12
Cs38	缟艺达摩 3	矮种叶艺	台湾	5
Cs39	鹤艺达摩	矮种叶艺	台湾	7 (1)
Cs40	斑缟艺达摩	矮种叶艺	台湾	3
Cs41	盛世中华	叶艺	广东	4 (1)
Cs42	鹤之华	叶艺	福建	9 (1)

表 2 9 个引物组合对墨兰品种扩增的多态性

Table 2 Amplified results of *Cymbidium sinense* cultivars with 9 AFLP primer pairs

引物对	42 个品种的扩增结果			8 个达摩系列品种的扩增结果		
	扩增带数	多态性带数	多态性率/%	扩增带数	多态性带数	多态性率/%
<i>Pst</i> I GAC/ <i>Mse</i> I CTA	145	145	100	72	71	98.6
<i>Pst</i> I GAC/ <i>Mse</i> I CTT	159	153	96.2	103	77	74.8
<i>Pst</i> I GAG/ <i>Mse</i> I CAG	153	138	90.2	75	47	62.7
<i>Pst</i> I GAG/ <i>Mse</i> I CTC	154	151	98.1	88	61	69.3
<i>Pst</i> I GAG/ <i>Mse</i> I CTT	146	143	97.9	73	56	76.7
<i>Pst</i> I GAT/ <i>Mse</i> I CAG	141	136	96.4	98	74	75.5
<i>Pst</i> I CTG/ <i>Mse</i> I CAG	166	157	94.6	109	76	69.7
<i>Pst</i> I GTG/ <i>Mse</i> I CTG	157	154	98.1	101	83	82.2
<i>Pst</i> I GTT/ <i>Mse</i> I CAG	163	156	95.7	127	103	81.1
平均 Mean	154	148	96.3	94	72	76.6

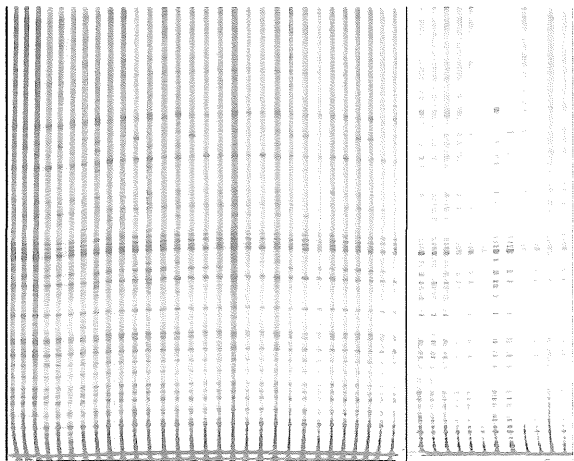


图 1 墨兰 AFLP 指纹图谱
(引物组合：*Pst*I GTG/*Mse*I CTG)

Fig. 1 Amplified results by using primer pair of
Pst I GTG/ *Mse*I CTG

2.3 遗传多样性与亲缘关系分析

墨兰种内品种间的遗传多样性丰富，品种间的 Dice 相似系数 0.422 2 ~ 0.824 5，平均相似系数 0.611 2。“达摩”系列品种间的相似系数较高，为 0.616 4 ~ 0.824 5，平均相似系数 0.725 6，说明具有较高的同源性。“冠艺达摩”和“缟艺达摩 3”的相似系数最高，达 0.824 5，亲缘关系最近；“玉狮子”与“喜菊”的相似系数次之，为 0.820 6，这两者均为台湾多瓣奇花品种，亲缘关系较近。“软剑白墨”与“缟艺达摩 2”的相似系数最小，说明品种间遗传距离较远。

2.4 聚类分析

基于 AFLP 扩增结果，用 NTSYS2.10 进行聚类分析，得到墨兰品种亲缘关系树状图（图 1），显示在 L0.63 处可将 42 个墨兰品种分为 3 大类。

第 1 类：包括 29 个品种，在 L0.68 处可分为 5 个亚类。第 1 亚类包括“企剑白墨”、“企剑黑墨”、“金嘴”和“珠海渔女”，均来自广东，前三者为广东传统当家品种；第 2 亚类包括“黑了哥”、“樱姬”、“金鸟”、“文山奇蝶”和“十八娇”，除“黑了哥”来自广东外，其余 4 个品种均来自台湾；第 3 亚类包括 13 个品种，其中 12 个品种来自台湾，广东传统品种之一“银边”也聚在此类；第 4 亚类 5 个品种、第 5 亚类 2 个品种，均是来自广东的品种。

第 2 类：只有“软剑白墨”1 个品种自成一类，来自广东。

第 3 类：包括 12 个品种，在 L0.67 处也可分成 3 个亚类。第 1 亚类，均为矮种墨兰，除“龙梅”外，均是来自台湾的“达摩”系列品种。第 2 亚类“徽州墨”为福建品种，第 3 亚类是来自福建和广东的品种。

从图 1 中可以看出，同一产地来源的品种基本上可聚在一起，说明彼此间具有一定的亲缘关系。

2.5 品种鉴定

不同的品种扩增出带数和带型不同，上述 9 对引物对所有的品种均可明显区分。42 个品种中，39 个品种找到特有带或缺失带，这些特有带或缺失带可作为该品种的特征带。不同品种拥有的特征带数存在差异（表 1），其中“软剑白墨”具有最多的特异带，而 2 个多瓣奇花品种“玉狮子”、“大屯麒麟”及线艺品种“大石门”却无特异带。

矮种“达摩”系列品种在聚类分析时均能聚类一起，但另一矮种“达摩 1”却远离此类，尽管其株型及叶形与“达摩 2”相似，但 AFLP 说明该品种并非“达摩”系列品种。

3 讨 论

3.1 AFLP 分子标记的墨兰品种的遗传多样性

中国墨兰的栽培历史可追溯到南宋朝, 1233 年赵时庚著的《金漳兰谱》描述的墨兰多为紫花, 称为紫兰。在清末欧金策所著的《岭海兰言》中描述的墨兰品种达 19 个, 分“白墨兰种”8 个品种和“黑墨兰种”11 个品种^[2]。可见当时赏兰的重点是香味, 花色比较单调。到 20 世纪 60 年代以后, 在台湾墨兰中发现蝶瓣、梅瓣和多瓣奇花品种, 花形变异的瓣型花成为品赏的重点。虽然早在 19 世纪中期发现了“金嘴”、“银边”等花叶品种(在中国兰花欣赏中称为“叶艺”, “线艺”), 但叶艺兰的赏玩热潮在 20 世纪 30 年代以后才出现。1973 年, 随着“达摩”的发现, 这种叶片呈现多种变化的矮种墨兰更将叶艺兰的玩赏推向了高潮。此后墨兰品赏的重点由叶艺向花艺双全转变^[2]。墨兰品种的选育方法主要依靠野生资源的驯化或芽变。本试验在取材时已考虑到墨兰品种的发展历史, 兼顾了供试品种的代表性和多样性。AFLP 分析的结果也表明, 几百年来通过野生墨兰驯化选育出的中国墨兰品种的遗传多样性仍较为丰富, 单引物对扩增多态率较高, 平均多态性率达 96.3%。与 Lee 等^[8]对春兰自交后代中叶片变异株经 RAPD 分析的结果相似, 46 株叶片变异株的多态性达 97.8%。但通过芽变选育出的系列品种间的遗传多样性则变窄, 平均多态性率达 76.5%, “达摩”品种间的平均相似系数达 0.725 6。

有研究表明, 兰属种内不同品种间的相似系数较高^[7-9]。文李等^[7]对 5 个墨兰品种和 3 个建兰品种进行了 RAPD 分析, 认为墨兰品种间的相似系数为 0.852~0.925, 平均为 0.855, 品种间的亲缘关系十分相近;。孙彩云等^[8]利用 RAPD 分析的结也果显示种内不同品种间的遗传多样性不高, 不同种的品种间遗传多样性不同, 春兰品种间的变异较高。Choi 等^[9]发现 4 个来自中国、日本和韩国的寒兰品种的相似系数为 0.794~0.829, 平均为 0.806。本研究认为, 墨兰种内品种间的遗传多样性丰富, 品种间的相似系数 0.422 2~0.824 5, 平均相似系数 0.611 2。其原因可能是, 前人研究分析的品种数量较少, 代表性不强。

3.2 AFLP 分子标记对墨兰品种亲缘关系的分析与分类

AFLP 标记每一引物组合检出的多态性带数最多, 重复性好, 作全基因组背景选择有明显的优

势, 适用于研究不同种质间的遗传关系以及亲子间的系谱分析, 也适合于发现体细胞无性系变异及鉴别芽变品种^[10]。有研究表明, AFLP 分子标记分析栽培变种或农家品种的亲缘关系时, 基本上能按地域分布聚类, 即同一产地来源的品种基本上能聚类一起^[11]。本研究结果也表明, 同一产地来源的品种基本上可聚在一起, 来源于广东、福建和台湾的品种可区别开来, 说明同一产地的品种具一定的亲缘关系; 支持“徽州墨”来源于福建的观点。但 AFLP 分子标记不能将来自广东和台湾的品种完全分隔成两类, 两者存在交叉, 可能由于海峡两岸之间由于频繁的交往导致墨兰品种之间存在基因的漂流。

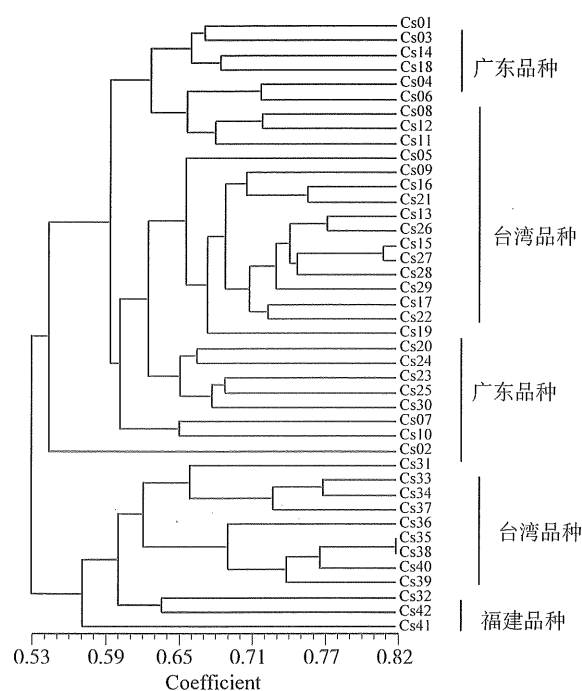


图 2 墨兰品种间相似系数 NTSYS2. 10 聚类的树状图
Fig. 2 The UPGMA clustering dendrogram of 42 cultivars of *Cymbidium sinense* based on AFLP markers

传统的中国墨兰分类分为素花、色花、梅瓣、蝶瓣、多瓣奇花、线艺、矮种、水晶等 8 大类^[2]。黄家平和戴思兰^[12]利用 37 个形态特征性状将 33 个春兰品种分为 5 个类型: 兜瓣型、竹叶瓣型、多花型、奇瓣型和素心瓣型。本试验 AFLP 结果表明, 单纯地根据花色、花型的划分是不科学的。“企剑白墨”与“软剑白墨”同为广东产素花品种, AFLP 聚类表明其亲缘关系较远, “软剑白墨”比“企剑白墨”更多特异带; 矮种“龙梅”虽可与矮种“达摩”系列品种聚类一起, 但另一矮种墨兰“达摩 1”却远离此类, 尽管本试验判别该品

种并非“达摩”系列品种。

3.3 墨兰叶艺品种的分子分析

在中国兰花的鉴赏中, 叶艺是重要的鉴赏类别, 其变化也很丰富。由叶尾向内表现变异的有“爪艺”、“覆轮艺”、“冠艺”、“鹤艺”、“水晶艺”; 从叶内表现变异的有“斑艺”、“缟艺”、“斑缟艺”; 以及由叶尾与叶内综合表现变异的“锦艺”、“宝艺”、“爪斑缟艺”等多种形态^[3], 在每种形态下又根据黄色或白色条纹的多少、分布, 又有不同的称谓。在墨兰品种中, “达摩”的叶艺变化最多, 自1973年首次发现以来, 已由绿叶品、中斑艺、爪艺进化到宝艺、中透艺、鹤艺等, 其芽变的频率极高, 出现了20~30种叶艺类型^[2-3], 包括本试验中的“达摩”系列品种。叶色变异在水稻中也有发生, 叶绿素突变或缺失类型的变异产生的原因有2个方面, 一是细胞核染色体的变异, 二是细胞质叶绿体DNA的变异, Nagato等认为水稻叶色变异是由多基因控制的可遗传变异^[13]。墨兰的染色体数通常为 $2n=40$, 吕复兵等^[14]在墨兰叶艺品种“金嘴墨兰”和“银边墨兰”中均发现其染色体数目为 $2n=41$, 说明有些叶艺品种存在染色体数目的变异。李冬梅等^[15]认为8个达摩芽变品种中存在RAPD多态性, 本研究通过AFLP分子标记分析也得到相似的结果。至于其高频率产生芽变的原因, 则需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 100-102.
- [2] 颜学亮, 何清正, 刘清涌. 中国墨兰[M]. 广州: 广东科技出版社, 2001: 209-215.
- [3] 李炳宏, 李勇毅, 石庆丰. 千禧兰香[M]. 台北: 橘子整合行销有限公司, 2001: 14-87.
- [4] 李冬梅, 朱根发, 叶庆生. 大花蕙兰基因组DNA提取及RAPD反应条件探索[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(1): 25-30.
LI Dongmei, ZHU Genfa, YE Qingsheng. Genomic DNA extraction and RAPD protocols for *Cymbidium hybridum* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2006, 14(1): 25-30.
- [5] 朱根发, 李冬梅, 郭振飞. 大花蕙兰遗传多样性及亲缘关系的AFLP分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 417-424.
ZHU Genfa, LI Dongmei, GUO Zhenfei. Genetic diversity and relationship of hybrid *Cymbidium* based on AFLP Marker[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(2): 417-424.
- [6] LEE J S, KIM B M, YU S O, et al. Analysis of phenotypic and genetic polymorphism of self pollinated seedling of Korean native *Cymbidium goeringii* [J]. Korean Journal of Horticulture Science and Technology, 2004, 22(4): 486-490.
- [7] 文李, 叶庆生, 王小菁, 等. 利用RAPD技术分析兰属品种间的亲缘关系[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 29-32.
WEN Li, YE Qingsheng, WANG Xiaoqing, et al. Analysis of relationship among *Cymbidium* cultivars using RAPD[J]. China Journal of Applied Environmental Biology, 2001, 7(1): 29-32.
- [8] 孙彩云, 张明永, 叶秀彝, 等. 中国兰属植物种间及品种间亲缘关系的RAPD分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1121-1124.
SUN Caiyun, ZHANG Mingyong, YE Xiulin, et al. Studies on relationship between species, cultivars of *Cymbidium* Using RAPD [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32(6): 1121-1124.
- [9] CHOI S H, KIM M J, LEE J S, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within species of oriental cymbidiums based on RAPD analysis[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 108: 79-85.
- [10] 祝军, 王涛, 赵玉军, 等. 应用AFLP分子标记鉴定苹果品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102-106.
ZHU Jun, WANG Tao, ZHAO Yujun, et al. Identification of apple varieties with AFLP molecular markers [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2000, 27(2): 102-106.
- [11] 王志峰, 孙日飞, 孙小镭, 等. 山东省黄瓜地方品种资源亲缘关系的AFLP分析[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 103-105.
WANG Zhifeng, SUN Rifei, SUN Xiaolei, et al. Studies on genetic relationship among local Cucumber germplasm of Shandong province by AFLP analysis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31(1): 103-105.
- [12] 黄家平, 戴思兰. 中国兰花品种数量分类初探[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 38-43.
HUANG Jiaping, DAI Silan. The numerical taxonomy of Chinese *Cymbidium* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1998, 20(2): 38-43.
- [13] 蔡光泽. 日本观赏水稻的育种及其栽培应用[J]. 西昌学院学报: 自然科学版, 2005, 19(1): 12-14.
CAI Guangze. Application of breeding and planting of ornamental rice in Japan [J]. Journal of Xichang College: Natural Science Edition, 2005, 19(1): 12-14.
- [14] 吕复兵, 朱根发, 王碧青, 等. 广东四个墨兰品种的核型研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(5): 423-428.
LU Fubing, ZHU Genfa, WANG Biqing, et al. Karyotypes of four *Cymbidium sinense* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2005, 13(5): 423-428.
- [15] 李冬梅, 朱根发, 叶庆生. 墨兰“达摩”芽变叶艺品种亲缘关系的RAPD分析[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 74-77.
LI Dongmei, ZHU Genfa, YE Qingsheng. The RAPD Analysis on the Genetic Relationships among Bud Mutant Rare Leaves Cultivars of *Cymbidium sinense* 'DaMo' [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2007, 28(3): 74-77.