• 药材与资源 •

铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究

苑 鹤[1]，林二培[1]，朱 波[1]，俞巧仙[2]，斯金平[1*]

1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地 天然药物研究开发中心，浙江 临安 311300
2. 浙江森宇药业有限公司，浙江 义乌 322000

摘 要：目的 了解铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性，为种质资源的保护与新品种的选育提供基础。**方法** 利用 RAPD 分子标记对浙江义乌、天台、建德、武义，云南麻栗坡、勐海的 14 个居群的铁皮石斛和 1 个居群的紫皮石斛进行遗传多样性分析。**结果** 从 225 个 RAPD 引物中筛选出 15 个引物，对 105 个铁皮石斛和 3 个紫皮石斛样本进行 PCR 扩增，共扩增出 138 条带，其中 133 条为多态性条带，多态性条带比率（PPB）为 96.38%；14 个铁皮石斛居群的多态位点（PPL）在 10.79%～76.26%，平均为 45.32%。**结论** 全国主产区人工栽培的铁皮石斛遗传多样性丰富，铁皮石斛种质的亲缘关系远近与其地理种源具有显著的相关性，与栽培地点无关。

关键词：铁皮石斛；栽培居群；RAPD；遗传多样性；PCR 扩增

中图分类号：R282.7 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2011)03 - 0566 - 04

Genetic diversity in cultivated populations of *Dendrobium officinale*

YUAN He[1]，LIN Er-pei[1]，ZHU Bo[1]，YU Qiao-xian[2]，SI Jin-ping[1]

1. A Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Research and Development Center for Natural Medicine, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, China
2. Zhejiang Senyu Pharmaceutical Co., Ltd., Yiwu 322300, China

Abstract: Objective To investigate the genetic diversity in cultivated populations of *Dendrobium officinale*, providing the basis for the protection of germplasm resources and breeding of new varieties. **Methods** A molecular marker RAPD was used to analyze the genetic diversity of 14 populations of *D. officinale* and a population of *D. devoninum* from Yiwu, Tiantai, Jiande, Wuyi in Zhejiang Provinces and Malipo, Menghai in Yunnan Provinces. **Results** Fifteen primers screened from 225 RAPD primers were used in the PCR amplification of 105 samples of *D. officinale* and 3 samples of *D. devoninum*; And 138 bands were generated among which 133 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic bands (PPB) was 96.38%; The percentage of polymorphic loci (PPL) for 14 populations of *D. officinale* ranged from 10.79% to 76.26% was 45.32% (mean). **Conclusion** Cultivated *D. officinale* of main producing places in whole country is rich in genetic diversity. Genetic relationship of *D. officinale* has a obvious correlation with its geography provenance, but nothing to do with the cultivation place.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; cultivated populations; RAPD; genetic diversity; PCR amplification

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是我国传统名贵中药材，具有滋阴清热、益胃生津、润肺明目、抗癌防老等功效[1]。由于生态破坏与过度开采，野生铁皮石斛已濒临灭绝，石斛人工栽培技术与种质资源研究已被药学工作者所关注。在种质资源方面，目前多局限于石斛属植物种间及部分野生铁皮石斛种质资源的遗传多样性的研究[2-6]。为了铁皮石斛产业的可持续发展，本课题组从 20 世纪 90 年代开始系统地研究了铁皮石斛种质资源形态特征、化学成分、抗病性、抗寒性及 DNA 分子标记等遗传多样性，并应用于新品种的选育[7-8]。本实验着重研究了基于 RAPD 标记的铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性，为铁皮石斛种质资源的保护与新品种的选育提供基础。

收稿日期：2010-05-20

基金项目：浙江省重大科技专项资助项目(2009C12059)

作者简介：苑 鹤（1984—），女，河北保定人，硕士研究生，从事药用植物遗传育种。Tel: 15024430737 E-mail: yuanhe1001@126.com

***通讯作者** 斯金平 Tel: 13868004019 E-mail: lssjp@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

2008 年 11 月至 2010 年 2 月，收集浙江义乌、天台、建德、武义、临安、庆元、湖州、桐庐、云南麻栗坡、勐海等全国铁皮石斛栽培骨干基地的种质资源（表 1），并保存在浙江农林大学智能温室铁皮石斛种质资源圃。全部样品经浙江农林大学楼炉焕教授鉴定，1～14 号居群的样本为铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo，15 号为紫皮石斛 *D. devonianum* Paxton。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取法 取铁皮石斛和紫皮石斛的新鲜嫩叶，采用改良 CTAB 硅珠法提取基因组 DNA，

表 1 供试材料和来源

Table 1 Sources of tested materials

居群编号	种 源	主要形态特征	生长特性	样本号
浙江 A1	浙江雁荡山	茎紫色，节间黑色，茎杆上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	1～19
浙江 A2	浙江雁荡山	茎绿色，节间黑色，茎杆上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	20～27
浙江 A3	浙江×云南	茎紫色，茎杆中间粗壮，基部细小	易倒伏，第 2 年冬天叶子落光，抗寒性差	28～34
浙江 A4	浙江四明山	茎紫色，茎杆细长，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	35～48
浙江 B5	浙江×云南	茎紫色，茎杆细短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	49～52
浙江 C6	浙江武义	茎紫色，茎杆细短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	53～61
浙江 D7	浙江天台	茎紫色，茎杆粗长，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	62～67
浙江 E8	浙江庆元	茎紫色，茎杆细短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	68～72
浙江 F9	浙江桐庐	茎紫色，茎杆粗短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	73～78
浙江 G10	云南×浙江	茎紫色，茎杆细长，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	79～81
浙江 H11	贵州荔波	茎紫色，茎杆粗短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	82～91
云南 A12	云南麻栗坡	茎紫色，茎杆细长，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	92～96
云南 B13	云南麻栗坡	茎紫色，茎杆中间粗壮，基部很细	易倒伏，第 2 年冬天叶子落光，抗寒性差	97～98
云南 C14	云南广南	茎紫色，茎杆粗短，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	99～105
云南 D15	云南勐海	茎紫色，茎杆细长，上下粗细相近	不易倒伏，第 2 年基部叶子变黄，部分落下，抗寒性好	106～108

用 NanoDrop 微量分光光度计（ND—1000）测定质量分数和浓度，并采用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.2 引物的筛选 引物筛选包括初筛和复筛。分别用 1 个和 3 个模板对 225 个引物进行初筛和复筛，从中选择出扩增条带清晰且呈多态性的引物用于实验样品的扩增。

1.2.3 PCR 扩增和产物检测 PCR 反应体系组成：模板 DNA，引物，*Taq* DNA 聚合酶，dNTP，Mg^{2+}，缓冲液。反应总体积为 20 μL。扩增程序为 95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，37 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 90 s，循环 40 次；72 ℃延伸 7 min。在 Perkin—Elmer9700 扩增仪上进行扩增。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并用 BF 凝胶成像系统（GelDocTM，Bio-Rad）拍照。

1.2.4 数据统计及分析 同一引物，同一位点，根据扩增产物的有(1)无(0)得到二元资料，形成 0、1 矩阵。用 NTsys2.10e 软件进行分析，计算遗传相似系数，并利用系统分析软件 PopGen 32 计算居群 Nei's 基因多样性（gene diversity，*H*）和 Shannon's 信息指数（information index，*I*），按类平均数方法（UPGMA）进行聚类，得到 UPGMA 系统树。

2 结果与分析

2.1 DNA 多态性分析

用筛选出的 15 个引物对铁皮石斛的 105 个样品和紫皮石斛的 3 个样品进行 RAPD 扩增，共获得 138 条 DNA 扩增带，平均每条引物扩增出 9.3 条带，扩增片段大都分布于 200～3 000 bp。其中 133 条为多态性条带，多态性条带比率（PPB）为 96.3%。每个引物检测到的多态性条带有 8.9 条。结果见表 2。

2.2 个体和居群间的遗传关系分析

利用 NTsys2.10e 软件对所有个体进行聚类分析，紫皮石斛的 3 个个体全部聚在一起，与铁皮石斛区别明显，表明种内的遗传一致度大于种间。铁皮石斛多数居群个体聚在一起，而一些居群的个别个体与其他居群的个体交联在一起，表明人工栽培的铁皮石斛种质资源表现出丰富的遗传多样性与明显的区域性，*H* 和 *I* 表型指数（表 3）证明了这一点，聚类结果见图 1。

利用 PopGen32 软件分析得到的居群聚类结果见图 2，整个群体可划分为三大类：紫皮石斛明显与其他居群分开，紫皮石斛与铁皮石斛存在明显的差异，表现较远的亲缘关系，相似系数 0.56。浙江栽培的铁皮石斛居群除浙江 G10、浙江 H11 外全部聚在一起，云南栽培的居群聚在一起。浙江 G10 居群、浙江 H11 居群与云南人工栽培 A12、B13、C14 聚在一起，是因为浙江 H11 种质来源于贵州，地理位置与云南相邻；浙江 G10 居群与云南人工栽培的居群聚在一起，是因为该种质原产地并非来自浙江，而可能与云南种质有关。结果表明，铁皮石斛种内地理位置相近的种质遗传基础相对接近，与丁

表 2 引物序列及其扩增结果

Table 2 Primers sequences and their amplification

引物编号	序列 5’-3’	总条带数	多态性条带数	PPB/%
S10	CTGCTGGGAC	8	7	87.5
S43	AAAGCTGCGG	10	10	100
S48	CTGACGTCAC	11	11	100
S89	CCGAATTCCC	8	8	100
S122	GAGGATCCCT	10	10	100
S123	CCTGATCACC	11	11	100
S125	CCGAATTCCC	8	8	100
S128	GGGATATCGG	8	8	100
S154	TGCGGCTGAG	10	9	90.0
S197	TGGGGACCAC	6	4	66.7
37	AGGGAACGAG	10	10	100
99	ACGGCGTATG	9	9	100
137	ACGACCGACA	11	11	100
181	CCCGGCATAA	11	11	100
189	TGAGCCTCAC	7	6	85.7

表 3 各个居群内部遗传多样性分析

Table 3 Analysis of genetic diversity within all populations

居群	采样数	*Na*	*Ne*	*H*	*I*	PPB/%
浙江 A1	19	1.762 6	1.452 4	0.263 9	0.394 1	76.26
浙江 A2	8	1.618 7	1.440 3	0.246 2	0.359 2	61.87
浙江 A3	7	1.374 1	1.255 6	0.145 1	0.213 1	37.41
浙江 A4	14	1.669 1	1.403 4	0.232 6	0.346 4	66.91
浙江 B5	4	1.107 9	1.066 4	0.038 6	0.057 8	10.79
浙江 C6	9	1.539 6	1.338 2	0.194 8	0.289 2	53.96
浙江 D7	6	1.539 6	1.355 2	0.203 1	0.300 1	53.96
浙江 E8	5	1.381 3	1.266 0	0.148 4	0.217 3	38.13
浙江 F9	6	1.431 7	1.302 2	0.168 0	0.245 7	43.17
浙江 G10	3	1.402 9	1.277 2	0.155 5	0.228 6	40.29
浙江 H11	10	1.575 5	1.364 2	0.208 9	0.309 8	57.55
云南 A12	5	1.374 1	1.241 3	0.139 1	0.206 4	37.41
云南 B13	2	1.122 3	1.086 5	0.050 7	0.074 0	12.23
云南 C14	7	1.446 0	1.276 5	0.158 7	0.236 5	44.60
云南 D15	3	1.330 9	1.243 7	0.135 8	0.197 5	33.09

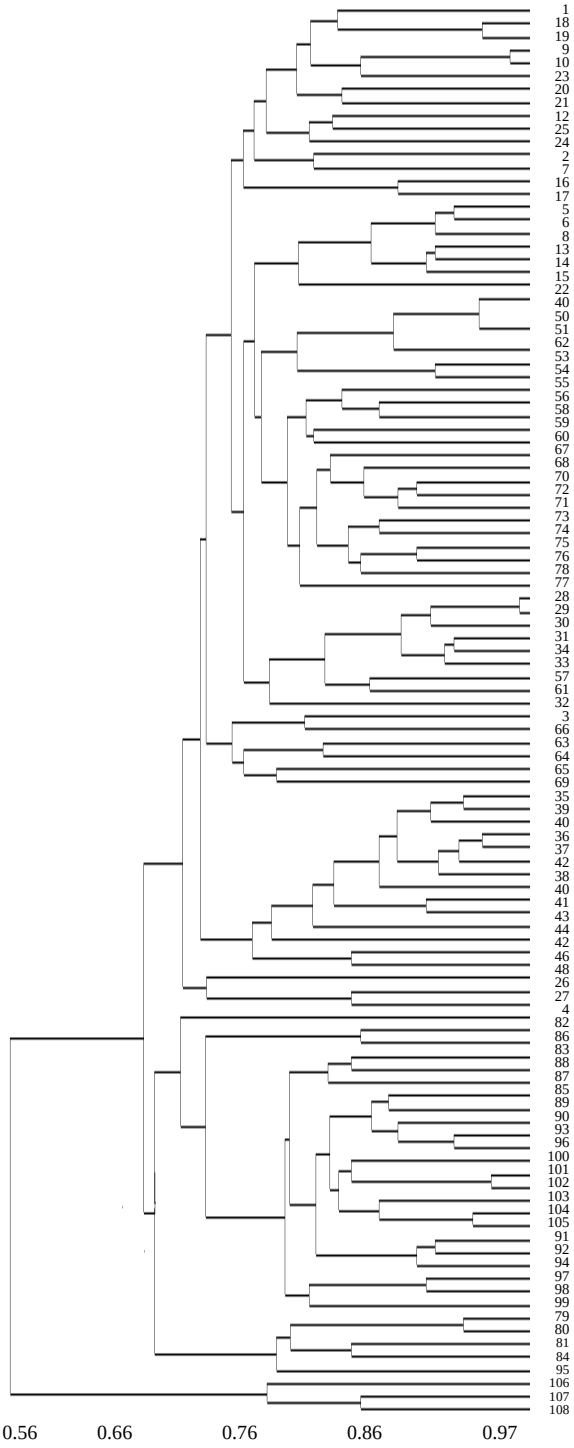

图 1 铁皮石斛和紫皮石斛 108 个个体聚类图

Fig. 1 Dendrogram of 108 individuals in *D. officinale* and *D. devonianum*

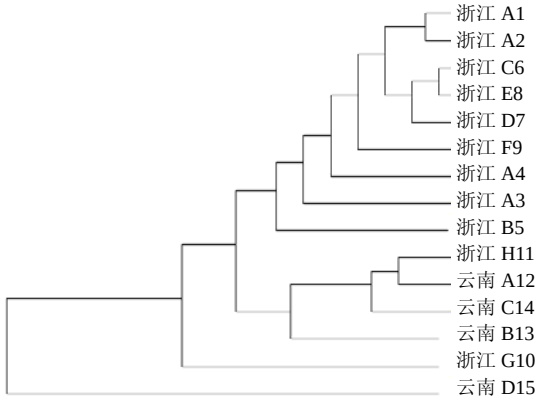

图 2 15 个居群 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram among 15 populations

鸽等[5]对铁皮石斛野生居群的遗传多样性研究一致。利用 NTsys2.10e 软件对所有个体进行聚类分析的结果与利用 PopGen32 软件分析得到的居群聚类结果一致。

2.3 遗传分化分析

根据总的基因多样性（H_t）和群体内遗传多样性（H_s）计算不同群体的分化水平（G_{st}）。第一分支和第二分支两个群体间 G_{st} 为 0.097 7，表明总的遗传变异中有 9.77%的变异存在于群体间，群体内的遗传变异为 90.23%。第一分支人工栽培铁皮石斛各居群 H_t 为 0.278 4，H_s 为 0.182 3，G_{st} 为 0.345 2。第二分支人工栽培铁皮石斛各居群 H_t 为 0.235 9，H_s 为 0.142 6，G_{st} 为 0.395 6。从表 4 中可以看出，浙江 A2 产地的栽培铁皮石斛遗传多样性最丰富，为 0.245 1，而浙江 B5 产地的栽培铁皮石斛遗传变异最小，为 0.043 2。

表 4 不同群体的遗传分化分析

Table 4 Genetic differentiation of different populations

类 型	样本数	H_t	H_s	G_{st}
第一分支	78	0.278 4±0.032 3	0.182 3±0.014 9	0.345 2
浙江 A1	19	0.241 1±0.035 0	0.000 0	1.000 0
浙江 A2	8	0.245 1±0.042 8	0.000 0	1.000 0
浙江 A3	7	0.136 2±0.035 3	0.000 0	1.000 0
浙江 A4	14	0.196 3±0.034 9	0.000 0	1.000 0
浙江 B5	4	0.043 2±0.015 8	0.000 0	1.000 0
浙江 C6	9	0.189 4±0.038 8	0.000 0	1.000 0
浙江 D7	6	0.211 4±0.042 8	0.000 0	1.000 0
浙江 E8	5	0.148 5±0.038 5	0.000 0	1.000 0
浙江 F9	6	0.155 1±0.035 8	0.000 0	1.000 0
第二分支	27	0.235 9±0.036 2	0.142 6±0.013 9	0.395 6
浙江 G10	3	0.161 9±0.040 2	0.000 0	1.000 0
浙江 H11	10	0.161 9±0.038 3	0.000 0	1.000 0
云南 A12	5	0.148 5±0.039 6	0.000 0	1.000 0
云南 B13	2	0.061 2±0.027 0	0.000 0	1.000 0
云南 C14	7	0.153 9±0.034 2	0.000 0	1.000 0
云南 D15	3	0.147 1±0.044 1	0.000 0	1.000 0

3 结论

全国主产区人工栽培的铁皮石斛居群具有丰富的遗传多样性，其中最高的浙江 A1 居群 PPB 为 76.26%，H 为 0.263 9，I 为 0.394 1。由于生态环境的破坏与过度开采，野生资源濒临灭绝，人工栽培的铁皮石斛居群具有丰富的遗传多样性，对于铁皮石斛基因资源的保护和优良品种的选育具有重要的意义。

通过对不同种质资源的铁皮石斛进行聚类分析，14 个居群分为两个大支：I 支包括浙江栽培的 9 个居群（A1-F9），II 支包括浙江栽培的 2 个居群（G10-H11）和云南栽培的 3 个居群（A12-D15），其中 H11 居群种源并非来自浙江，G10 居群种源来源于贵州。研究结果表明：铁皮石斛居群间亲缘关系与地理种源有显著的相关性，种质资源地理位置相近的铁皮石斛其遗传基础较近。

全国主产区铁皮石斛在相似系数 0.659 0 处全部聚在一起，与近缘种紫皮石斛存在明显区别。利用分子标记技术对铁皮石斛进行深入的研究，如利用扩增片段长度多态性（AFLP）技术开展石斛属种间和铁皮石斛种内分子遗传多样性分析，获得多态性条带，经扩增、克隆和测序，筛选出部分序列设计成特异性探针可望用于铁皮石斛的真伪与优劣的鉴别。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部.2010.

[2] 彭 锐, 李泉森, 李隆云. 石斛的分子生物学鉴定—基于 RAPD 分析 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(4): 437-440.

[3] 包英华, 白 音, 王文全, 等. 美花石斛种质资源的RAPD分子鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(05): 1034-1035.

[4] 王慧中, 卢江杰, 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.

[5] 丁 鸽, 丁小余, 沈 洁, 等. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别 [J]. 药学学报, 2005, 40(11): 1028-1032.

[6] 金 波, 蒋福升, 施 宏, 等. 石斛属野生种质资源的遗传多样性 RAPD 分析 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1700-1702.

[7] 斯金平, 诸 燕, 朱玉球. 铁皮石斛人工栽培技术研究与应用进展 [J]. 浙江林业科技, 2009, 29(6): 66-70.

[8] 管惠娟, 张 雪, 屠凤娟, 等. 姚新生.铁皮石斛化学成分的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1873-1876.