

## 金钗石斛居群遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建

赵秋菊<sup>1,2,3</sup>, 崔学强<sup>1#</sup>, 邓杰玲<sup>1</sup>, 黄昌艳<sup>1</sup>, 欧美景<sup>2,3</sup>, 李红燕<sup>2,3</sup>, 张自斌<sup>1\*</sup>

1. 广西壮族自治区农业科学院花卉研究所, 广西 南宁 530007

2. 广西大学林学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

3. 广西大学林学院, 广西 南宁 530004

**摘要:**目的 探讨不同地区金钗石斛 *Dendrobium nobile* 居群间的遗传多样性及遗传分化关系。方法 基于引物结合位点间扩增 (inter-primer binding site, iPBS) 分子标记对广西 5 个县共 35 份金钗石斛进行遗传关系、遗传多样性和种群间遗传分化分析, 并构建能区分 35 份金钗石斛种质的 DNA 指纹图谱。数据分析使用 NTSYS-pc 2.10e 统计软件计算遗传相似系数并构建聚类分析图谱, 采用 Popgene 1.32 软件计算遗传多样性指数与居群遗传分化系数。结果 8 条 iPBS 引物共扩增出 158 条条带, 多态性条带为 143 条, 多态条带百分率 (percentage of polymorphic bands, PPB) 为 90.51%; 在遗传距离 0.70 处, 35 份种质分为 7 大类群, 居群在分子水平上出现明显分化; 遗传相似系数 (genetic similarity coefficient,  $G_s$ ) 变化范围为 0.559 0~0.975 9, 变幅为 0.416 9; 平均观测等位基因数 (observed number of alleles,  $N_a$ )、平均有效等位基因数 (effective number of alleles,  $N_e$ )、Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index,  $H_e$ )、Shannon 多样性信息指数 (Shannon information index,  $I$ ) 分别为 1.898 7、1.505 0、0.300 7、0.454 2, 居群间存在丰富遗传多样性; 基因多样性 (total genetic diversity,  $H_t$ )、各居群基因分化系数 (gene diversity within population,  $H_s$ )、居群间遗传分化系数 (coefficient of gene differentiation,  $G_{st}$ ) 分别为 0.299 8、0.214 9、0.283 0, 居群间遗传变异占总变异的 28.30%, 居群内的遗传变异占总变异的 71.70%, 遗传变异主要来源于居群内部; 基因流 (gene flow,  $N_m$ ) 为 1.266 5, 居群间存在较高水平的基因交流。引物 2219 和 2399 可单独鉴别出 35 份种质, 试验基于引物 2399 的“0, 1”矩阵构建 35 份种质的指纹图谱, 此图谱可为金钗石斛品种的分类与鉴定提供参考。结论 金钗石斛居群间遗传多样性较丰富, 总变异主要来源于居群内变异, 居群间存在较高水平的基因交流。揭示了金钗石斛种质间的遗传关系及其居群遗传多样性, 为野生金钗石斛种质的保护工作的开展奠定基础。

**关键词:** 金钗石斛; 遗传多样性; 遗传分化; DNA 指纹图谱; iPBS 标记

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6434-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.024

## Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction of *Dendrobium nobile* populations

ZHAO Qiu-ju<sup>1,2,3</sup>, CUI Xue-qiang<sup>1</sup>, DENG Jie-ling<sup>1</sup>, HUANG Chang-yan<sup>1</sup>, OU Mei-jing<sup>2,3</sup>, LI Hong-yan<sup>2,3</sup>, ZHANG Zi-bin<sup>1</sup>

1. Flower Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China

3. College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China

**Abstract:** **Objective** To explore the relationship between genetic diversity and genetic differentiation among populations of *Dendrobium nobile* in different regions. **Methods** Inter-primer binding site (iPBS) molecular markers were used to analyze the genetic relationship, genetic diversity and genetic differentiation among populations of 35 *D. nobile* from five counties in Guangxi, and construction of DNA fingerprints that can distinguish 35 germplasms. Data analysis used the NTSYS-pc 2.10e statistical

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2020GXNSFBA297021); 广西农业科学院基本科研业务专项项目 (桂农科 2023YM115); 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21220056); 广西农业科学院基本科研业务专项项目 (桂农科 2021YT133)

作者简介: 赵秋菊 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为兰科植物分子育种。E-mail: zqj2452961785@163.com

\*通信作者: 张自斌, 博士研究生, 副研究员, 从事兰科植物育种研究。E-mail: candou154@126.com

#共同第一作者: 崔学强 (1991—), 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为兰科植物分子育种。E-mail: yncuixueqiang@126.com

software to calculate the genetic similarity coefficient of *D. nobile* and construct the cluster analysis fingerprint, the genetic diversity index and population genetic differentiation coefficient were calculated with Popgene 1.32 software. **Results** Eight primers were used for PCR amplification of 35 germplasms, the results showed that a total of 158 bands were amplified by eight primers, of which 143 were polymorphic, and the percentage of polymorphic bands (PPB) was 90.51%. At the genetic distance of 0.70, 35 *Dendrobium nobile* germplasms could be divided into seven groups, and five populations showed obvious differentiation at the molecular level. The genetic similarity coefficient ( $G_s$ ) ranged from 0.559 0 to 0.975 9 with the variable amplitude of 0.416 9. The results showed that the average observed number of alleles ( $N_a$ ) was 1.898 7, the average effective number of alleles ( $N_e$ ) was 1.505 0, the Nei's gene diversity index ( $H_e$ ) was 0.300 7, and Shannon information index ( $I$ ) was 0.454 2. It indicated that there was abundant genetic diversity among populations of *Dendrobium nobile*. Total gene diversity ( $H_t$ ) was 0.299 8, gene diversity within population ( $H_s$ ) was 0.214 9, and the coefficient of gene differentiation ( $G_{st}$ ) was 0.283 0. The inter-population genetic variation accounted for 28.30% of the total variation, and the intra-population genetic variation accounted for 71.70% of the total variation, it showed that the genetic variation mainly came from within the population. The gene flow ( $N_m$ ) among populations was 1.266 5, indicating that there was frequent gene exchange among populations. Research was found that primers 2219 and 2399 could identify 35 germplasms separately. In this study, DNA fingerprints of 35 germplasms were constructed based on the "0, 1" matrix of primer 2399, This DNA fingerprint can provide a reference for the classification and identification of *D. nobile* varieties. **Conclusion** Genetic diversity among populations of *D. nobile* was rich, total variation was mainly derived from intra-population variation, and there was a high level of gene exchange among populations. The results revealed the genetic relationship and population genetic diversity among *D. nobile* germplasms, which laid a foundation for the protection of wild *D. nobile* germplasm.

**Key words:** *Dendrobium nobile* Lindl.; genetic diversity; genetic differentiation; DNA fingerprint; inter-primer binding site molecular maker

石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 俗称金钗石斛, 为多年生附生型兰科 (Orchidaceae) 草本植物<sup>[1]</sup>, 是石斛属中最重要且最具代表性的植物之一。石斛属植物对生长环境要求较高, 多分布于热带、亚热带地区, 在我国主要分布在广西、云南、贵州、四川等省份<sup>[2]</sup>, 其中, 以贵州赤水的金钗石斛最为出名。金钗石斛花色丰富艳丽, 花姿优美, 极具观赏价值。除此之外, 金钗石斛还是一种重要的药用石斛, 历届版本的《中国药典》均将其收录在册, 《神农本草经》更是将金钗石斛列为上品, 药用价值可见一斑。金钗石斛全株皆可入药, 其植株中含有多糖、联苄苯、石斛碱和黄酮类等多种物质<sup>[3]</sup>, 具有降血糖、调血脂、消炎、抗衰老、抗肿瘤等功效<sup>[4]</sup>。但由于金钗石斛经济价值较高, 人为挖采活动日益猖獗, 野生金钗石斛资源急剧下降, 种质资源的保育工作尤为重要。

石斛属内种间遗传多样性丰富, 近年来石斛杂交新种的不断增多更加剧了石斛属植物从外观上难以区分的问题, 甚至小部分石斛存在异物同名、同物异名的情况<sup>[5]</sup>, 石斛属植物的鉴定工作受到一定限制。随着分子生物学的发展, 分子标记技术为石斛种质资源的鉴定提供了有效手段。引物结合位点间扩增 (inter-primer binding site, iPBS) 分子标记

是一类基于 LTR 序列反转录转座子开发的新型分子标记技术<sup>[6]</sup>, 它是以 PCR 技术为基础, 以反转录转座子为保守位点设计引物, 对基因组 DNA 进行扩增的分子标记。具有操作简单、高效, 技术成本低, 多态性丰富等优点<sup>[7]</sup>, 比常规的分子标记更具优势<sup>[8]</sup>, 相对于其他基于反转录转座子开发的标记有效性更高<sup>[9]</sup>, 可广泛应用于动植物种质鉴定工作中。先前研究表明, iPBS 标记的扩增多态性高于简单重复序列间扩增 (inter-simple sequence repeat, ISSR)<sup>[10]</sup>, 同时使用成本低于简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 标记, 比扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 标记更易于操作<sup>[11]</sup>。该标记在石斛属植物研究中已得到初步应用, 崔学强等<sup>[12]</sup>利用 iPBS 标记对 48 份石斛兰种质进行种质鉴定和遗传多样性分析, 种质间遗传基础较宽, 具有较丰富的遗传多样性, DNA 指纹图谱可成功区分出 48 个石斛兰种质; 曾艳华等<sup>[13]</sup>基于 iPBS 标记对广西乐业县的野生春兰进行遗传多样性研究, 81 份种质展现出丰富的遗传多样性, 种质间基因交流频繁。因此, iPBS 标记是鉴别种质, 研究物种遗传关系、遗传多样性, 构建指纹图谱的有效方法。但目前未见将 iPBS 分子标记应用于金钗石斛种质资源鉴定的相关研究报道。

广西地处亚热带,气候温暖、热量丰富、降水丰沛,得天独厚的气候条件与地理环境造就了野生石斛资源非常丰富<sup>[2]</sup>。过往研究多集中于金钗石斛的药用价值,在遗传学等方面却缺乏研究,了解群体间遗传结构及其遗传多样性,便于制定有效的保护策略。本研究利用 iPBS 分子标记对取自广西不同县份的金钗石斛居群进行种质资源鉴定以及遗传多样性分析,并构建 35 份金钗石斛种质的 DNA 指纹图谱,鉴别居群间遗传关系,揭示居群的遗传多样性,以期为金钗石斛野生种质资源的鉴定与保护提供科学依据。

表 1 金钗石斛居群取样点地理位置信息

Table 1 Geographical location information of sampling point of *D. nobile* populations

| 居群编号  | 采样点  | 经度 (E)  | 纬度 (N) | 海拔/m    | 样本数 |
|-------|------|---------|--------|---------|-----|
| JX1~5 | 广西靖西 | 106°42' | 23°13' | 730~740 | 5   |
| NP1~7 | 广西那坡 | 105°83' | 23°39' | 800     | 7   |
| DB1~7 | 广西德保 | 106°62' | 23°32' | 540~600 | 7   |
| LZ1~8 | 广西龙州 | 106°85' | 22°34' | 500~700 | 8   |
| TD1~8 | 广西天等 | 107°14' | 23°08' | 450~650 | 8   |

## 1.2 主要试剂与仪器

EasyPure® Genomic DNA Kit 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司), 2×Easy Taq® PCR SuperMix(康为世纪生物技术有限公司), Tra-ns® 2K DNA Maker(北京全式金生物技术有限公司), 50×TAE 缓冲液(国拓生物技术有限公司), 琼脂粉(上海生工生物工程有限公司)。

H1650-W 型常温离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司), GEL DOCXR 全自动凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司), TC-96/G/H(b)C 型 LifeECO 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司), HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), UV-5500(PC)型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 基因组 DNA 的提取和检测

供试样品基因组 DNA 提取采用 EasyPure® Genomic DNA Kit 试剂盒提取,提取的 DNA 用 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用紫外分光光度计检测其浓度和纯度,提取的 DNA 用 TE 缓冲液稀释浓度至 20 ng/μL,置于-20℃条件下保存备用。

## 1 材料与试剂、仪器

### 1.1 材料

35 份金钗石斛植物样采集于广西壮族自治区靖西市、那坡县、龙州县、天等县和德保县 5 个不同地理种群(表 1),经广西壮族自治区农业科学院花卉研究所张自斌副研究员鉴定为石斛 *D. nobile* Lindl.,在各样点采集样本时需间隔一定距离(30 m 以上),避免克隆株影响研究结果,群体编号分别为 JX、NP、DB、LZ、TD。剪取植株幼嫩的健康叶片,装入密封袋并做好标记,保存于冰盒中,及时带回实验室,液氮速冻,保存于-80℃冰箱中,用于基因组 DNA 的提取。

### 2.2 引物筛选及 iPBS-PCR 扩增

本实验引物选用 Kalendar 于 2010 年发表的 83 条引物<sup>[6]</sup>,从每个样地中随机选取 2 份 DNA 作为样本对 iPBS 引物进行初步筛选,从合成引物中选取扩增条带清晰,稳定性强,多态性高的引物对供试样品 DNA 进行 PCR 扩增。扩增反应总体积为 20 μL,包含 10 μL 2×Easy Taq® PCR SuperMix, 8 μL 无菌水, 1 μL 引物, 1 μL 模板。iPBS-PCR 扩增程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 48℃(不同引物的退火温度见表 2)退火 45 s, 72℃2 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, PCR 扩增产物用 2.0%琼脂糖凝胶进行电泳检测,扩增产物置于 4℃冰箱保存。

### 2.3 数据统计与分析

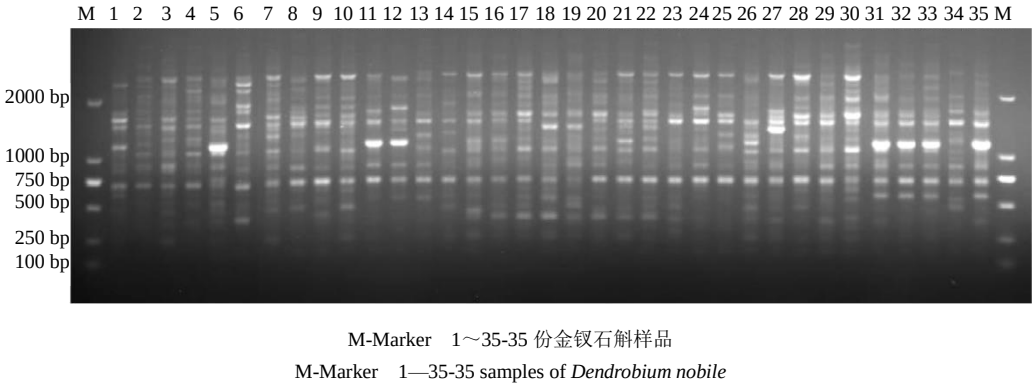
观察扩增产物电泳图谱,统计清晰的 DNA 条带,同一迁移位置上,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,经 EXCEL 软件构建原始“0/1”二元矩阵。利用 NTSYS-pc 2.10e 统计软件进行数据分析,采用 SHAN Clustering 程序进行算数平均数不加权对组法(UPGMA)聚类分析,构建树状聚类图,并用 DICE 法计算供试材料间的遗传相似系数。使用 Popgene 1.32 软件计算金钗石斛居群相关遗传多样性参数:平均观测等位基因数(observed number

of alleles,  $N_a$ )、平均有效等位基因数 (effective number of alleles,  $N_e$ )、Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index,  $H_e$ ) 以及 Shannon 多样性信息指数 (shannon information index,  $I$ ) 及遗传分化参数: 基因多样度 (total genetic diversity,  $H_t$ )、各居群基因分化系数 (gene diversity within population,  $H_s$ )、总居群基因分化系数 (coefficient of gene differentiation,  $G_{st}$ )、居群间基因流 (gene flow,  $N_m$ )、遗传一致度和无偏遗传距离, 分析其亲缘关系的远近。观察聚类结果, 从 8 条引物中筛选出可单独鉴别 35 份金钗石斛种质的引物, 根据该引物的原始“0/1”矩阵, 构建 DNA 指纹图谱。

表 2 引物序列及 iPBS-PCR 扩增结果

Table 2 Sequences of primer and results of iPBS-PCR amplification

| 引物   | 引物序列 (5'-3')       | 退火温度/℃ | 总条带数  | 多态性条带数 | PPB/%  |
|------|--------------------|--------|-------|--------|--------|
| 2081 | GCAACGGCGCCA       | 50     | 18    | 17     | 94.44  |
| 2219 | GAACCTATGCCGATACCA | 44     | 21    | 17     | 80.95  |
| 2224 | ATCCTGGCAATGGAACCA | 50     | 22    | 18     | 81.82  |
| 2232 | AGAGAGGCTCGGATACCA | 51     | 18    | 18     | 100.00 |
| 2241 | ACCTAGCTCATCATGCCA | 50     | 18    | 17     | 94.44  |
| 2271 | GGCTCGGATGCCA      | 48     | 18    | 16     | 88.89  |
| 2383 | GCATGGCCTCCA       | 44     | 19    | 17     | 89.47  |
| 2399 | AAACTGGCAACGGCGCCA | 57     | 24    | 23     | 95.83  |
|      | 总计                 |        | 158   | 143    | 90.51  |
|      | 平均                 |        | 19.75 | 17.88  |        |



M-Marker 1~35-35 份金钗石斛样品  
M-Marker 1—35-35 samples of *Dendrobium nobile*

图 1 引物 2399 对 35 份金钗石斛样本的扩增情况

Fig. 1 Amplifications of 35 samples of *D. nobile* by primer 2399

3.2 不同地区金钗石斛居群聚类分析

利用 NTSYS-pc 2.10e 的 UPGMA 法构建 35 份金钗石斛树状聚类图, 在相似系数为 0.70 处, 35 份金钗石斛种质可划分为 7 大类群, I 类群可划分为 2 个亚类, 第 1 个亚类为靖西居群的全部物种, 第 2

3 结果与分析

3.1 金钗石斛 iPBS 引物扩增多态性分析

利用 83 条 iPBS 引物对 35 份金钗石斛种质资源进行 PCR 扩增, 从中筛选出的多态性高、稳定性强且条带清晰的 8 条引物进行统计分析, 结果表明 (表 2): 8 条引物共扩增出 158 条条带, 其中, 多态性条带为 143 条, 多态条带百分率 (percentage of polymorphic bands, PPB) 为 90.51%; 8 条引物扩增出的条带在 18~24 条, 平均每条引物可扩增出 19.75 条条带, 多态性条带为 17.88 条, 各引物多态比率在 80.95%~100.00%。表明 iPBS 引物在 35 份金钗石斛种质的扩增多态性较高。引物 2399 对 35 份金钗石斛种质的扩增电泳图谱如下 (图 1)。

个亚类为龙州居群的 5 个植株和天等居群的 4 个植株; II 类群和 III 类群皆为那坡居群; IV 类群为天等居群另 4 个植株; V 类群和 VI 类群皆为德保居群; VII 类群为龙州居群余下的 3 个植株。聚类图 (图 2) 显示, 龙州居群与天等居群未能按照种质来源各自

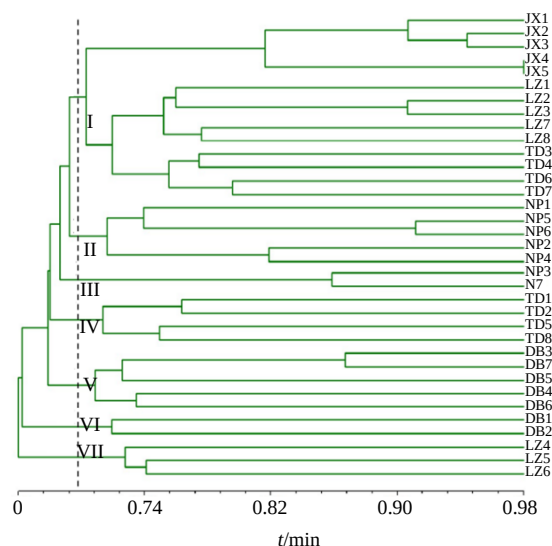


图 2 金钗石斛居群树状聚类图

Fig. 2 Tree clustering diagram of *D. nobile* populations

形成独自的类群，而是存在交叉聚集的情况。

利用 NTSYS-pc 2.10e 计算金钗石斛的遗传相似系数，35 份金钗石斛种质间的遗传相似系数变化范围为 0.559 0~0.975 9，变幅达 0.416 9，均值为 0.728 2，表明金钗石斛种质间存在较大遗传差异，遗传基础较宽。其中，靖西居群的遗传相似系数为 0.785 3~0.975 9，那坡居群的遗传相似系数为 0.640 6~0.908 0，德保居群遗传相似系数为 0.559 0~0.863 9，龙州居群遗传相似系数为 0.651 2~0.902 9，天等遗传相似系数为 0.650 6~0.792 9。从个体水平上看，遗传相似系数最大为

0.975 9，为靖西居群的 J4 和 J5 个体，说明二者亲缘关系最近；遗传相似系数最小为 0.559 0，存在于德保居群的 DB1 和 DB5 个体间，说明两者亲缘关系最远，遗传差异相对较大。

### 3.3 金钗石斛居群间遗传多样性及遗传分化分析

**3.3.1 遗传多样性分析** 采用 Popgene 1.32 计算金钗石斛居群的遗传多样性参数（表 3）。在居群水平上， $N_a$  变化范围为 1.222 0~1.721 5，平均  $N_a$  为 1.898 7； $N_e$  变化范围为 1.184 5~1.447 2，平均  $N_e$  为 1.505 0； $H_e$  变化范围为 0.106 6~0.259 6，平均值为 0.300 7； $I$  变化范围为 0.156 9~0.385 5，平均值为 0.454 2，即 5 个金钗石斛居群间的遗传多样性十分丰富。从局群内的遗传多样性来看，靖西为 0.156 9，那坡为 0.328 2，龙州为 0.385 5，天等为 0.350 4，德保为 0.377 6，龙州金钗石斛居群内的遗传多样性最高，靖西居群最低。根据  $H_e$  和  $I$ ，5 个金钗石斛居群内遗传多样性水平高低顺序依次为龙州>德保>天等>那坡>靖西。

**3.3.2 遗传分化分析** 利用 Popgene 1.32 计算金钗石斛居群相关遗传分化系数。金钗石斛 5 个居群的  $H_t$  为 0.299 8， $H_s$  为 0.214 9； $G_{st}$  为 0.283 0，说明在 5 个金钗石斛居群间，有 28.30% 的遗传变异存在于居群间，71.70% 的遗传变异存在于居群内部，局群内的遗传变异明显高于居群间的变异。 $N_m$  为 1.266 5， $N_m > 1$ ，表明居群间的基因交流的水平较高，可有效降低遗传漂变所导致的居群间遗传分化现象，居群间分化程度较低。

表 3 金钗石斛居群遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity indexes of *D. nobile* populations

| 种群 | $N_a$           | $N_e$           | $H_e$           | $I$             |
|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| JX | 1.222 0±0.446 5 | 1.184 5±0.326 7 | 0.106 6±0.181 1 | 0.156 9±0.262 8 |
| NP | 1.607 6±0.489 8 | 1.382 0±0.388 2 | 0.220 5±0.203 2 | 0.328 2±0.288 4 |
| LZ | 1.702 5±0.458 6 | 1.447 2±0.373 7 | 0.259 6±0.195 6 | 0.385 5±0.276 2 |
| TD | 1.651 9±0.477 9 | 1.410 2±0.388 9 | 0.235 8±0.203 4 | 0.350 4±0.288 6 |
| DB | 1.721 5±0.449 7 | 1.433 3±0.376 4 | 0.252 3±0.194 5 | 0.377 6±0.272 0 |

**3.3.3 遗传一致度与无偏遗传距离** 金钗石斛两两居群间遗传一致度变化范围为 0.813 2~0.956 3，均值为 0.887 0，遗传距离变化范围为 0.044 7~0.206 8，均值为 0.121 7，遗传距离数值与遗传一致度恰好相反，遗传一致度最高的 2 个居群其遗传距离最近。其中，天等居群与德保居群的遗传一致度（0.956 3）最高，且遗传距离（0.044 7）最近，这 2

个居群的最先聚在一起。靖西居群与那坡居群间的遗传一致度（0.813 2）最低，且遗传距离（0.206 8）最远，居群间差异最大，见表 4。

### 3.4 35 份金钗石斛 DNA 指纹图谱构建

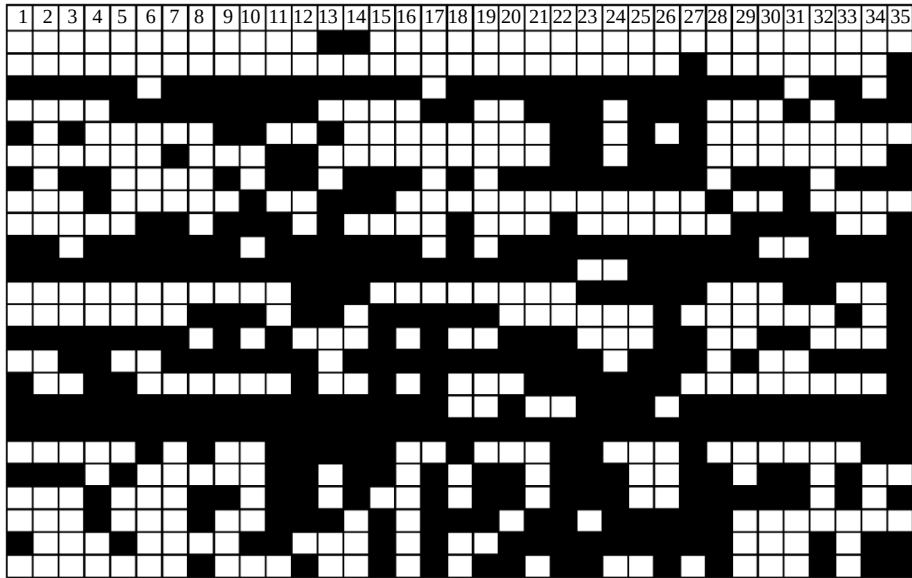
利用筛选出的 8 条引物对 35 份金钗石斛种质进行扩增并构建 DNA 指纹图谱，经过对比发现，引物 2219 和 2399 2 条引物可单独鉴别出 35 份金钗石

斛种质。选取引物 2399 构建 35 份金钗石斛品种的 DNA 指纹图谱，其中，黑方块代表“0，1”矩阵中的 1，即该位点有条带；白方块代表“0，1”矩阵中的 0，即该位点无条带。利用引物 2399 对 35 份金钗石斛构建 DNA 指纹图谱，如图 3 所示，此图谱可有效用于 35 份金钗石斛种质的鉴定与分类。

表 4 金钗石斛居群间遗传一致性与无偏遗传距离  
Table 4 genetic identity and genetic distance among *D. nobile* populations

| 居群编号 | JX      | NP      | DB      | LZ      | TD      |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| JX   | ****    | 0.813 2 | 0.832 0 | 0.820 1 | 0.839 6 |
| NP   | 0.206 8 | ****    | 0.931 2 | 0.911 0 | 0.930 6 |
| DB   | 0.183 9 | 0.071 3 | ****    | 0.908 8 | 0.956 3 |
| LZ   | 0.198 4 | 0.093 2 | 0.095 6 | ****    | 0.926 7 |
| TD   | 0.174 8 | 0.071 9 | 0.044 7 | 0.076 1 | ****    |

对角线上方为遗传一致度，对角线下方为遗传距离  
Above the diagonal is the genetic identity, below the diagonal is the genetic distance



1~35-35 份金钗石斛样品  
1—35-35 samples of *D. nobile*

图 3 基于引物 2399 扩增结果构建的 35 份金钗石斛种质的 DNA 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprints of 35 *D. nobile* germplasms were constructed based on amplification results of primer 2399

4 讨论

4.1 金钗石斛居群间遗传关系

目前，用于分析物种间遗传多样性及遗传分化的分子标记类型十分丰富，如 ISSR、SSR 和相关序列扩增多态性（sequence-related amplified polymorphism, SRAP）等。同一物种使用的分子标记不同，得到的遗传多样性结果不同，导致差异出现的原因与分子标记本身的检测特点及其灵敏性有关<sup>[14]</sup>。张明宇等<sup>[15]</sup>利用直接扩增片段长度多态性（direct amplification of length polymorphisms, DALP）标记对云南金钗石斛居群进行扩增，多态性比率为 72.86%；Bhattacharyya 等<sup>[16]</sup>利用 ISSR 和

基于聚合酶链式反应的小卫星 DNA 定向扩增（direct amplification of minisatellite region DNA, DAMD）标记对金钗石斛野生种质进行扩增，ISSR 的扩增多态性为 85.59%，DAMD 的扩增多态性为 83.67%；杨林秀等<sup>[17]</sup>利用 SSR 标记对紫茎泽兰种群进行扩增，多态百分率为 71.72%。本研究基于 iPBS 标记对广西不同地区金钗石斛种质进行扩增，各引物多态比率在 80.95%~100%，平均为 90.51%，略高于 DALP、ISSR、DAMD 和 SSR 标记的鉴定效率，iPBS 标记的扩增多态性较高。

遗传距离反映着物种种群间的系统进化，是研究种群遗传多样性的基础<sup>[18]</sup>，基于遗传距离构建聚

类图,可直观反映居群遗传结构上的差异。聚类图谱显示,35 份种质清楚地区分开,靖西、那坡和德保居群皆按照种源分散在不同的分支上,有明显地域划分。而龙州和天等 2 个居群的种质并未出现明显地域划分,不同地点的种质比同一地点的种质先聚集到一起,如 LZ1~LZ3、LZ7、LZ8 5 个种质先与 TD3、TD4、TD6、TD7 聚为一类再与余下种质聚集,证明龙州和天等样点的金钗石斛居群间基因交流较为频繁。

#### 4.2 金钗石斛的遗传多样性分析

遗传多样性是生物学研究的核心内容之一,是物种生存进化的基础<sup>[19]</sup>,研究种群遗传多样性可进一步了解该物种对于环境的适应性以及居群遗传结构,便于开展对濒危物种种质的保护。本研究中,金钗石斛居群水平上的  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $H_e$  和  $I$  分别为 1.898 7、1.505 0、0.300 7 和 0.454 2,表明金钗石斛居群间存在较高的遗传多样性。Hamrick 等<sup>[20]</sup>的研究表明,濒危物种的遗传多样性水平普遍较低,但本研究结果显示金钗石斛的遗传多样性较高,可能与其多年生、长寿命、演替和繁殖特点存在一定关联<sup>[21]</sup>。5 个居群内的遗传多样性各不相同,各居群遗传多样性依次为龙州>德保>天等>那坡>靖西。造成各居群间存在遗传多样性差异的原因可能是各样地的生境不同,虽然样点皆处于亚热带,但光照、降水、植被覆盖度等环境因子仍存在一定差距,导致同个物种在不同地区呈现不同遗传多样性<sup>[22]</sup>。通常来说,一个物种的遗传多样性越丰富,其对环境的适应力越强<sup>[23]</sup>,石斛属植物对生存环境要求较为严格,较高的遗传多样性是金钗石斛更好地适应环境的基础<sup>[24]</sup>。本研究结果进一步说明,金钗石斛野外种源锐减的原因不在遗传方面,而与人为因素有关。近年来,金钗石斛的野生种质逐年减少,遗传多样性降低,人为影响是主要原因。过度的人为挖采活动导致石斛生境被严重破坏,生境的破碎化加快物种流失,极大地影响了金钗石斛的遗传结构。应加大保护力度,加快优质种的繁殖保育工作,保护野外种源。

#### 4.3 金钗石斛居群遗传结构

遗传分化,即居群间与局群内的遗传变异分布格局,是反映居群遗传结构的重要指标<sup>[26]</sup>。Popgene 软件分析结果显示,5 个居群的  $H_t$ 、 $H_s$  和  $G_{st}$  分别为 0.299 8、0.214 9 和 0.283 0,总变异的主要来源为居群内部的遗传变异。江爱明等<sup>[27]</sup>对秦巴山区的

石斛居群进行遗传多样性研究,得到  $G_{st}$  为 0.934,遗传变异主要来源于居群间;He 等<sup>[28]</sup>对中国西南地区的金钗石斛居群遗传结构进行研究,结果显示群体内变异远大于群体间变异;Yan 等<sup>[29]</sup>对 7 个金钗石斛居群进行群体分化分析,发现主要变异成分(84.3%)位于个体内,2.3%位于群体间,13.4%存在于群体内;张明宇等<sup>[15]</sup>对云南金钗石斛居群进行遗传变异研究,居群遗传分化系数为 0.338 6,局群内变异占总变异的 66.14%;魏丹红等<sup>[30]</sup>对不同产地的金钗石斛进行遗传研究,结果表明居群内(42.21%)遗传变异略低于居群间(57.79%)。本研究结果显示居群内变异(71.70%)大于居群间(28.30%)。

$N_m$  是指基因在种群内以及种群间交流水平的高低,是影响种群遗传结构的主要因素<sup>[21]</sup>。过往研究表明,当  $N_m > 4$ ,居群间基因交流充分,遗传分化极小<sup>[31]</sup>;当  $N_m > 1$ ,居群间基因流主要发生均质化作用,基因交流频率较高,可有效防止遗传漂变带来的遗传分化现象<sup>[32]</sup>,居群间遗传分化不明显;当  $N_m < 1$  时,居群间基因交流水平较低,存在遗传漂变带来的遗传分化现象<sup>[33]</sup>。本研究金钗石斛居群间基因流  $N_m > 1$ ,群体间存在基因交换,居群间的基因交流水平较高,基因交流会增加遗传变异量从而降低居群分化程度。居群间基因交流频繁的原因可能与其繁殖方式和地理距离远近有关<sup>[34]</sup>,兰科植物的种子具有远距离传播的能力<sup>[35]</sup>,成熟的花粉会随风传播,这可能是基因交流的主要形式。

#### 4.4 金钗石斛的 DNA 指纹图谱构建

DNA 指纹图谱是通过特定分子标记技术对种质进行处理,将不同个体的特定片段显示出来<sup>[36]</sup>,以此构建物种的“数字化身份证”,便于区分同一种群的不同个体。构建物种的 DNA 指纹图谱,可以改变以往依赖表型性状鉴别种质的局面<sup>[37]</sup>,有效提高种质的利用效率。本研究基于引物 2399 构建 35 份种质的 DNA 指纹图谱,图谱显示,各个种质间皆存在位点差异,可凭借该图谱有效鉴别 35 份金钗石斛种质。研究证明,iPBS 标记可有效应用于金钗石斛种质遗传多样性和遗传分化研究中,是构建 DNA 指纹图谱的有效手段。但单一标记鉴定可能存在偏差,后续试验可将不同分子标记应用于金钗石斛的遗传多样性鉴定中,进行对比研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第三十二卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 67.
- [2] 龚建英文/图. 石斛属资源及研发概况 [J]. 广西林业, 2021(6): 22-25.
- [3] 令狐楚, 谷荣辉, 秦礼康. 金钗石斛的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7693-7708.
- [4] 中国药典 [S]. 三部. 2015: 94-97.
- [5] 唐源江, 曹雯静, 吴坤林. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1795-1806.
- [6] Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, et al. iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121(8): 1419-1430.
- [7] Amiteye S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding [J]. *Heliyon*, 2021, 7(10): e08093.
- [8] Kalendar R, Flavell A J, Ellis T H N, et al. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers [J]. *Heredity*, 2011, 106(4): 520-530.
- [9] Guo D L, Guo M X, Hou X G, et al. Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2014, 52: 27-32.
- [10] Andeden E E, Baloch F S, Derya M, et al. iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual *Cicer* species [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 2013, 22(4): 453-466.
- [11] Ruņģis D, Gaile I, Veinberga I, et al. Use of DNA markers for cereal line uniformity assessment [J]. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact Appl Sci*, 2012, 66(1/2): 21-25.
- [12] 崔学强, 唐璇, 黄昌艳, 等. 基于 iPBS 标记的石斛兰种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 热带作物学报, 2021, 42(2): 317-324.
- [13] 曾艳华, 何荆洲, 龙蕾宇, 等. 广西乐业野生春兰 iPBS 遗传多样性分析与指纹图谱构建 [J/OL]. 西南农业学报 [2023-03-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1213.S.20221212.1742.001>.
- [14] Ma Y S, Yu H, Li Y Y, et al. A study of genetic structure of *Stephania yunnanensis* (Menispermaceae) by DALP [J]. *Biochem Genet*, 2008, 46(3): 227-240.
- [15] 张明宇, 虞泓, 袁峰. 云南金钗石斛居群 DALP 遗传变异研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(22): 3866-3870.
- [16] Bhattacharyya P, Kumaria S, Tandon P. Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid [J]. *Phytochemistry*, 2015, 117: 306-316.
- [17] 杨林秀, 陈金龙, 王亚婷. 紫茎泽兰种群空间遗传结构研究 [J]. 绿色科技, 2017(5): 9-12.
- [18] Rosenberg N A, Burke T, Elo K, et al. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds [J]. *Genetics*, 2001, 159(2): 699-713.
- [19] Souza I G B, Souza V A B, Lima P S C. Molecular characterization of *Platonia insignis* Mart. ("Bacurizeiro") using inter simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5): 3835-3845.
- [20] Hamrick J L, Godt M J W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1996, 351(1345): 1291-1298.
- [21] 陈少瑜, 李江, 陈伟, 等. 云南沟谷雨林建群种绒毛番龙眼居群的遗传多样性 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(3): 850-858.
- [22] 乔亚玲, 刘政鸿, 郝文芳, 等. 陕南秦巴山区药用植物群落物种多样性研究 [J]. 植物科学学报, 2016, 34(2): 200-210.
- [23] Pauls S U, Nowak C, Bálint M, et al. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species [J]. *Mol Ecol*, 2013, 22(4): 925-946.
- [24] 滕婕华, 卫家贤, 李象钦, 等. 濒危特有种掌叶木的微卫星遗传多样性研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(11): 1471-1479.
- [25] 代国娜, 尚明越, 王嘉乐, 等. 金钗石斛多糖提取分离、结构解析及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3821-3830.
- [26] 令狐楚, 谷荣辉, 秦礼康. 金钗石斛的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7693-7708.
- [27] 江爱明, 曹俊, 蔡高磊. 秦巴山区石斛属亲缘关系及金钗石斛遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(10): 1977-1983.
- [28] He T, Ye C R, Zeng Q, et al. Genetic diversity and population structure of cultivated *Dendrobium nobile* Lindl. in southwest of China based on genotyping-by-sequencing [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2022, 69(8): 2803-2818.
- [29] Yan W J, Hou B W, Xue Q Y, et al. Different evolutionary processes in shaping the genetic composition of *Dendrobium nobile* in Southwest China [J]. *Genetica*, 2015, 143(3): 361-371.
- [30] 魏丹红, 徐红. 基于简单重复序列间扩增分子标记的金钗石斛遗传多样性研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(6): 646-655.

- [31] 王兴亚, 周俐宏. 甜菜夜蛾地理种群基因流与种群扩张历史分析 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54(14): 3460-3465.
- [32] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. *Genetics*, 1931, 16(2): 97-159.
- [33] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Gene flow among plant populations: Evidence from genetic markers [A] // *Missouri Botanical Garden, 5th International Symposium of Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics* [M]. City of Saint Louis: Missouri Botanical Garden, 1992: 215-232.
- [34] 高丽, 杨波. 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 250-257.
- [35] Cai X Y, Feng Z Y, Zhang X X, *et al.* Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers [J]. *Sci Hortic*, 2011, 129(4): 877-881.
- [36] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [37] 马小定, 崔迪, 韩冰, 等. 水稻种质资源全基因组 DNA 指纹鉴定方法研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(4): 1106-1113.

[责任编辑 时圣明]