

福建泰宁野生铁皮石斛种群的 ISSR 亲缘关系分析

江金兰¹, 叶炜^{1*}, 李永清¹, 范志敏², 雷伏贵¹, 张锐¹, 周建金¹

(1. 三明市农业科学研究院药用植物研究所, 福建 沙县 365509; 2. 福建泰宁红石山生态农业科技有限公司, 福建 泰宁 354400)

摘要: 为了解铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)种质间的亲缘关系, 利用 ISSR 技术对 34 份铁皮石斛种质资源进行亲缘关系和遗传多样性分析。结果表明, 9 条 ISSR 引物在 34 份种质中共扩增出 78 条带, 多态位点百分率达 100%。UPGMA 聚类分析表明, 种质的相似系数为 0.61~0.92, 在相似系数 0.626 处, 福建省泰宁的野生铁皮石斛与栽培铁皮石斛分为两大类。泰宁野生铁皮石斛种群的 Nei's 基因多样性(H)和遗传分化系数(G_{st})分别为 0.3111 和 0.4609, 均高于栽培种群(0.3056 和 0.4204), 表明泰宁野生铁皮石斛具有较丰富的多样性和较高的种群分化系数。AMOVA 分析表明, 铁皮石斛种群内变异指数为 74%, 种群间变异指数为 26%, 表明不同种群间可能存在基因交流。这些为不同地域的野生铁皮石斛资源的有效保护及利用提供理论依据及技术参考。

关键词: 铁皮石斛; 亲缘关系; ISSR; 遗传多样性

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.03.003

Genetic Relationships among Wild *Dendrobium officinale* Populations in Taining, Fujian by ISSR

JIANG Jin-lan¹, YE Wei^{1*}, LI Yong-qing¹, FAN Zhi-min², LEI Fu-gui¹, ZHANG Rui¹, ZHOU Jian-jin¹

(1. Institute of Medicinal Plants, Sanming Academy of Agricultural Science, Shaxian 365509, Fujian, China; 2. Taining Hongshishan Ecological Agriculture Science and Technology LTD Co. in Fujian, Taining 354400, Fujian, China)

Abstract: In order to understand the genetic relationships among germplasms of *Dendrobium officinale*, the genetic relationships and genetic diversity of 34 germplasms of *D. officinale* were analyzed by ISSR. The results showed that total 78 bands were amplified by 9 ISSR primers with percentage of polymorphic loci at 100%. UPGMA cluster analysis indicated that the similarity coefficient ranged from 0.61 to 0.92, and wild and cultivated *D. officinale* were divided into 2 groups at level of 0.626. The Nei's gene diversity (H) and coefficient of gene differentiation (G_{st}) of wild *D. officinale* from Fujian Taining was 0.3111 and 0.4609, respectively, which were higher than those of cultivated *D. officinale* (0.3056 and 0.4204, respectively), indicated that there were high diversity and gene differentiation among Taining *D. officinale* populations. AMOVA analysis showed that variation coefficients between populations and within populations were 24% and 76%, respectively, which indicated that there was gene flow among different populations. These would provide theoretical basis and reference for efficient protect and utilization of wild *D. officinale* germplasms.

Key words: *Dendrobium officinale*; Genetic relationship; ISSR; Genetic diversity

收稿日期: 2015-07-13 接受日期: 2015-09-11

基金项目: 国家级星火计划项目(2014GA720032); 福建省种业创新与产业化工程项目(FJZZZX-1540); 福建省三明市科技计划项目(2014-N-3); 三明市农业科学研究院院立项目(2013-Y-01)资助

This work was supported by the China Spark Program (Grant No. 2014GA720032), the Seed Industry Innovation and Industrialization Project in Fujian Province (Grant No. FJZZZX-1540), the Sanming Science and Technology Plan Projects in Fujian Province (Grant No. 2014-N-3), and the Program of Sanming Institute of Agricultural Science (Grant No. 2013-Y-01).

作者简介: 江金兰(1973~), 女, 高级农艺师, 主要从事园艺植物生物技术研究。E-mail: 420465520@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yewei922@qq.com

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)又名黑节草,是兰科(Orchidaceae)多年生附生草本植物,为我国名贵中药材,主要含多糖、生物碱、多种人体必需的微量元素和氨基酸,另外还有酮类、酯类、芪类、酚、醇等,具有益胃生津、滋阴清热的功效^[1]。野生的铁皮石斛主要分布于我国安徽、浙江、福建、广西、四川、云南等地^[2]。福建省作为铁皮石斛的原产地之一,野生资源丰富,已在纵跨境内的武夷山脉多处发现野生的铁皮石斛资源,泰宁位于武夷山脉中段的杉岭支脉东南侧,海拔落差大,境内大量丹霞地貌以丘陵及山地形式分布,蕴藏丰富的野生铁皮石斛群落,并在外观上与现有铁皮石斛栽培品种呈现丰富的多样性。了解福建泰宁野生铁皮石斛的生物多样性,对该地区野生铁皮石斛资源的保护和利用具有重要的理论和现实意义。

铁皮石斛分布广泛,生存环境复杂,其形态特征易受环境影响,DNA 分子标记具有受环境因素影响小,可直接反映基因组的差异性特点。简单重复序列(Inter-simple sequence repeats, ISSR)有较好的稳定性和多态性,且操作简单、高效,已在石斛的遗传多样性^[3-5]、种类鉴定^[6-10]和野生居群分析^[11-15]等方面得到广泛应用。福建是铁皮石斛的原产地之一^[2],泰宁县分布有大量的野生铁皮石斛,其民间采集与利用历史悠久,近年来由于破坏性采集,野生资源日渐稀少,对其多样性研究与保护迫在眉睫,但目前对该区铁皮石斛的种质资源调查和分析还未见报道。本研究以福建省泰宁野生铁皮石斛和其他地区人工栽培铁皮石斛为试验材料,利用 ISSR 分子标记技术进行遗传多样性及亲缘关系分析,探讨泰宁野生铁皮石斛多样性以及与人工栽培铁皮石斛的亲缘关系,为泰宁野生铁皮石斛资源的保护及品种选育提供理论支持及技术参考。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

材料 从福建泰宁采集野生铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)种质 19 份,人工栽培铁皮石斛种质 15 份收集自福建、江西、湖北、浙江、云南、广西等地(表 1),所有材料均保存于三明市农业科学研究院药用植物研究所实验室及种质资源圃。

生化试剂 *Taq* DNA 聚合酶和 Marker 购自上海宝生物工程技术有限公司,琼脂糖、SDS、ISSR 引

物购自上海生工生物工程技术服务公司。

1.2 DNA 的提取

采用改良 CTAB 小量法提取铁皮石斛叶片总 DNA。取幼嫩叶片 0.1 g,加液氮研磨至粉末状,转移至 2 mL 离心管中;加 800 μ L 70 $^{\circ}$ C 预热的提取缓冲液,振荡混匀,于 70 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min,期间不时轻摇;加入 400 μ L 氯仿,颠倒混匀 3~5 min;在 4 $^{\circ}$ C 下 12000 \times g 离心 5 min,弃上清,用 75%预冷的乙醇漂洗 2 次;晾干,加入 50 μ L ddH₂O,常温下溶解;于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 ISSR 引物筛选及扩增

随机选取 3 个铁皮石斛样品混合,对 100 条随机 ISSR 引物进行初步筛选,选出清晰、重复性好的 ISSR 引物,再用所有铁皮石斛的 DNA 样品进一步筛选,最终筛选出条带丰富、清晰的 9 条 ISSR 引物(表 2)。

ISSR-PCR 扩增反应体系共 20 μ L,包含 ddH₂O 9 μ L,2 \times *Taq* MasterMix 9 μ L,引物 1 μ L,模板 DNA 1 μ L。ISSR-PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,51 $^{\circ}$ C~62 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。2%琼脂糖凝胶电泳分离扩增电泳产物,EB 染色,凝胶成像系统观察并拍照。

1.4 数据统计和分析

ISSR 扩增产物经成像仪拍照,同一引物扩增、电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,将扩增产物在相同迁移位置清晰的条带赋值为 1,没有或不易分辨的条带赋值为 0,用 Excel 建立原始数据矩阵。

数据采用 NTSYS2.10e 软件进行分析,采用 SAHN 进行聚类分析,生成 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean)聚类图。利用 POPGENE 1.32 分析不同种群间等位基因数(Observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性(Nei's gene diversity, H)、Shannon 信息指数(Shannon information index, I)、多态性位点百分率(Percentage of polymorphic loci, PPL)、遗传分化系数(Coefficient of gene differentiation, G_{st})。利用 GenAlEx 6.5 进行分子变异分析(Analysis of molecular variance, AMOVA)。

表 1 供试的 34 份铁皮石斛种质

Table 1 34 germplasm of *Dendrobium officinale* tested

编号 No.	种群号 Population code	来源 Location	类型 Type	叶形 Leaf shape	叶色 Leaf color	茎色 Stem color
1	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
2	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
3	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
4	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
5	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
6	1	福建泰宁江家坊 Jiangjiafang, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
7	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	绿色 Green	绿色 Green
8	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	绿色 Green	绿色具紫色斑点 Green with purple spots
9	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	绿色 Green	绿色 Green
10	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	深绿 Dark green	绿色 Green
11	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	深绿 Dark green	紫色 Purple
12	2	福建泰宁洋川 Yangchuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	绿色具紫色斑点 Green with purple spots
13	1	福建泰宁寨下大峡谷 Zaixiadaxiagu, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
14	3	福建泰宁蛤蟆岩 Hamayan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	绿色具紫色斑点 Green with purple spots
15	3	福建泰宁蛤蟆岩 Hamayan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	绿色具黑节 Green with black joints
16	3	福建泰宁蛤蟆岩 Hamayan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	绿色具黑节 Green with black joints
17	3	福建泰宁蛤蟆岩 Hamayan, Taining, Fujian	野生 Wild	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	绿色 Green
18	4	福建泰宁大金湖野趣源 Dajinhu Yequyuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	深绿具紫色斑点 Dark green with purple spots	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots
19	4	福建泰宁大金湖野趣源 Dajinhu Yequyuan, Taining, Fujian	野生 Wild	椭圆形 Oval	深绿具紫色斑点 Dark green with purple spots	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots
20	5	云南文山 Wenshan, Yunnan	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots
21	5	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	绿色具紫色斑点 Green with purple spots
22	5	福建连城冠豸山 Guanzaishan, Liancheng, Fujian	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	绿色 Green	绿色具紫色斑点 Green with purple spots
23	5	广西桂平 Guiping, Guangxi	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
24	5	湖北恩施 Enshi, Hubei	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
25	5	福建武夷山 Wuyishan, Fujian	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
26	5	江西龙虎山 Longhushan, Jiangxi	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	绿色 Green	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
27	5	广西容县 Rongxian, Guangxi	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	深绿 Dark green	紫红色具紫色斑点 Green with purple spots
28	5	浙江天目山 Tianmushan, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	深绿 Dark green	绿色 Green
29	5	浙江天目山 Tianmushan, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	深绿具紫色斑点 Dark green with purple spots	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
30	5	浙江乐清 Leqing, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots
31	5	浙江乐清 Leqing, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	绿色 Green	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots
32	5	浙江乐清 Leqing, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
33	5	浙江乐清 Leqing, Zhejiang	栽培 Cultivar	长椭圆形 Oblong	紫色 Purple	紫红色具紫色斑点和黑节 Aubergine with purple spots and black joints
34	5	浙江雁荡山 Yandangshan, Zhejiang	栽培 Cultivar	椭圆形 Oval	绿色 Green	紫红色具紫色斑点 Aubergine with purple spots

表 2 ISSR 引物

Table 2 Primers for ISSR

引物 Prime	序列 (5'~3') Sequce	退火温度 (°C) Annealing temperature	条带数 Number of bands	多态性位点百分率 % of polymorphic loci
I08	(Ag) ₈ C	54.59	9	100
I10	(GA) ₈ T	52.18	7	100
I35	(AG) ₈ YC	56.16	11	100
I41	(GA) ₈ YC	56.16	9	100
I42	(GA) ₈ YG	56.16	10	100
I66	(CTC) ₆	61.86	9	100
I73	(gACA) ₄	51.55	10	100
I78	(GGAT) ₄	51.55	8	100
I80	(GGAGA) ₃	53.57	5	100
总和 Total			78	100
平均 Mean			8.67	100

依据地理位置和来源将种质分为 5 个种群, 种群 1 是福建省泰宁县杉城镇江家坊和寨下大峡谷的 7 份野生种质, 种群 2 是福建省泰宁县杉城镇洋川的 6 份野生种质, 种群 3 是福建省泰宁县朱口镇蛤蟆岩的 4 份野生种质, 种群 4 是福建省泰宁县梅口乡野趣源的 2 份野生种质, 种群 5 是云南、福建、广西、江西、广西、浙江的 15 份人工栽培种质(表 1)。

2 结果和分析

2.1 ISSR 扩增

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 9 条扩增条带丰

富清晰的 ISSR 引物(表 2), 对铁皮石斛 5 个种群 34 份种质进行 ISSR-PCR 扩增。结果表明, 9 条引物共扩增条带 78 条, 多态性位点百分率达 100%, 每条引物扩增的多态性条带为 5~11 条, 平均 8.67 条, 其中引物 I41 扩增出的条带最清晰, 共扩增出条带 9 条, ISSR 扩增条带大小为 100~2000 bp (图 1)。

2.2 聚类分析

使用 NTSYS 2.10e 软件对遗传相似性进行分析构建亲缘关系 UPGMA 树状图(图 2)。结果表明, 种质间的相似系数为 0.61~0.92, 在相似系数为 0.626

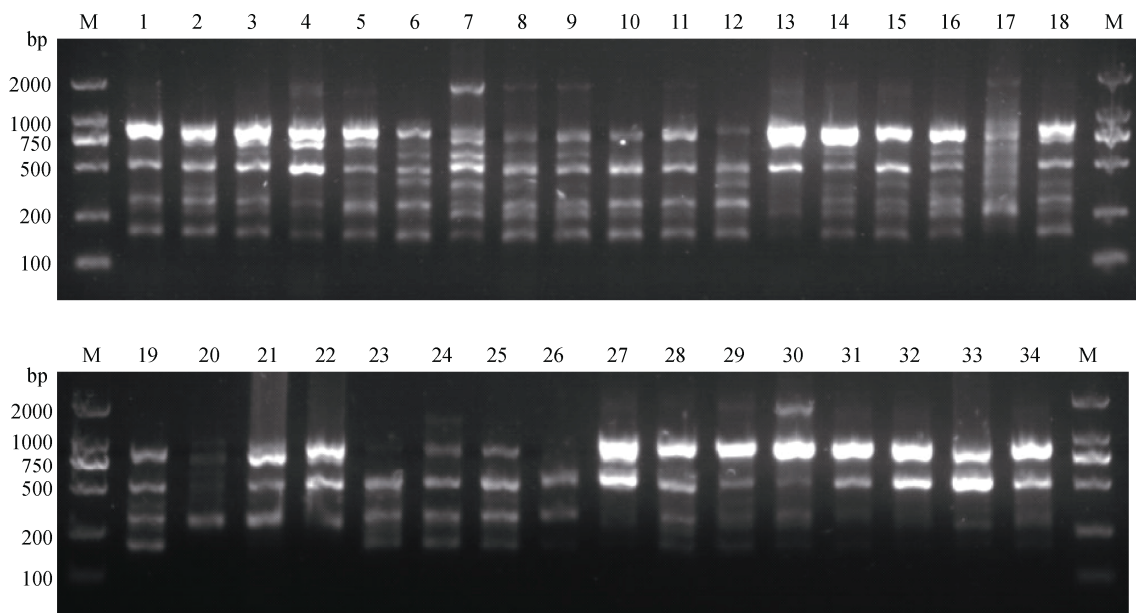


图 1 引物 I41 的 PCR 扩增。M: 标准分子量; 1~34 见表 1。

Fig. 1 PCR amplification by primer I41. M: DL 2000 bp standard Marker; 1~34 see Table 1.

处, 可将 34 份铁皮石斛种质分成 2 大类, 第 I 大类包含 1~19 号, 均为从福建泰宁采集的野生铁皮石斛, 第 II 大类包含 20~34 号, 为从福建、浙江、云南等地收集的人工栽培铁皮石斛。其中, 源自福建

武夷山及冠豸山的栽培种与源自云南、湖北及江西的栽培种的遗传距离较近, 而源自浙江的栽培种则聚在一起。这说明福建泰宁野生铁皮石斛与人工栽培铁皮石斛的亲缘关系较远, 存在较大的遗传距离。

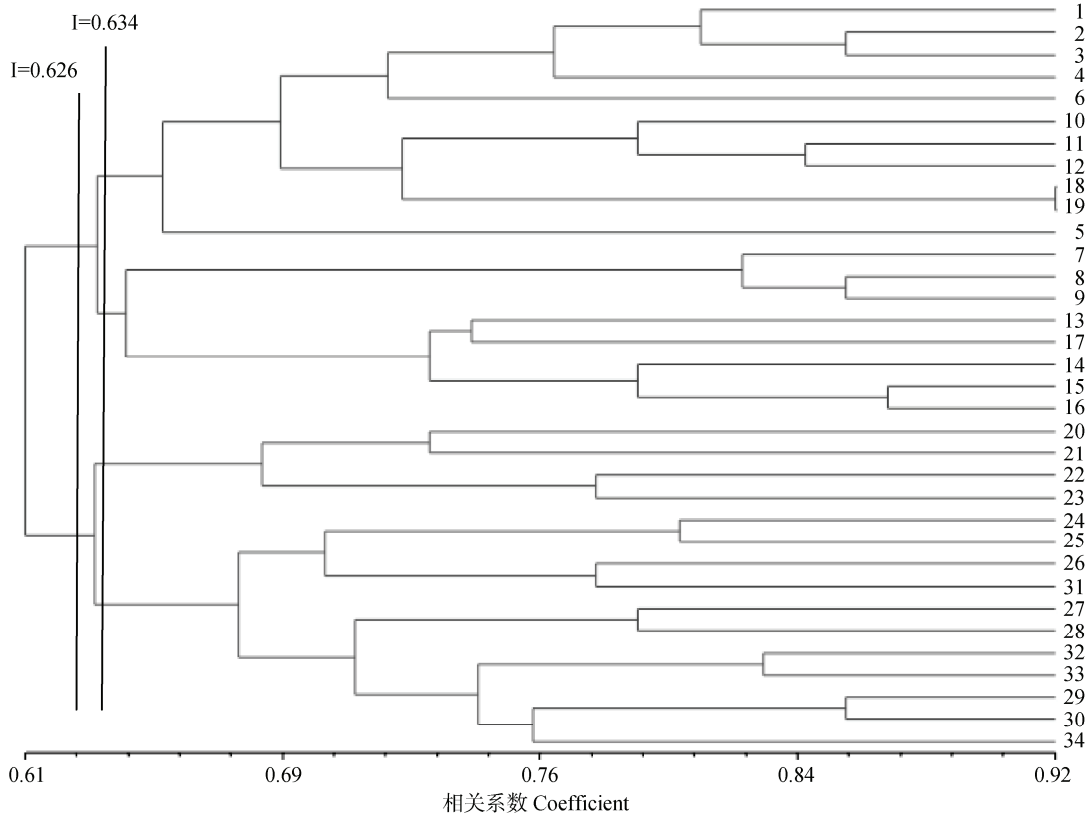


图 2 铁皮石斛的 UPGMA 聚类分析。1~34 见表 1。

Fig. 2 UPGMA polygenetic tree of *Dendrobium officinale*. 1~34 see Table 1.

在相似系数为 0.634 处可将 19 份野生铁皮石斛分为 2 个亚组, 第 1 亚组由 1~4、6 (杉城镇江家坊)、10~12 (杉城镇洋川村) 和 18~19 号(梅口乡大金湖野趣源) 共 11 份种质构成; 第 2 亚组由 7~9 (杉城镇洋川村)、13 (寨下大峡谷)、14~17 (朱口镇蛤蟆岩) 共 8 份种质构成, 从采集地来分析(图 3), 源自不同地理位置的泰宁野生铁皮石斛种质倾向于聚在独立的分支上。

2.3 种群间的遗传多样性分析

为了解铁皮石斛野生种群和人工栽培种群间的遗传多样性差异, 将 34 份种质材料依据地理来源划分为 5 个种群(表 1)。通过 POPGENE 分析(表 3), 多态性最高为人工栽培种群 5 (样本数 15 份), 种群内

多态性位点百分率为 89.74%, Nei's 基因多样性 $H=0.3056$ 。值得注意的是, 4 个泰宁野生铁皮石斛种群(样本数 19 份)总体的基因多样性($H=0.3111$)与人工栽培种群 5 极为接近, 这表明泰宁野生铁皮石斛具有较为丰富的遗传多样性。而 4 个野生种群内的 Nei's 基因多样性指数为 0.0385~0.2376, 最高的是种群 1, 最低的是种群 4。种群的遗传分化系数(G_{st})是评价种群遗传结构的重要指标, 5 个种群的 G_{st} 为 0.4204, 而 4 个野生种群的 G_{st} 为 0.4609, 显示泰宁野生铁皮石斛具有较高的种群分化系数, 这与进化树的结果相符。

为了解铁皮石斛野生种群与人工栽培种群间的基因交流情况, 利用 GenAlEx 6.5 进行 AMOVA 分析, 结果表明, 种群内的变异指数为 74%, 种群间的变异指数为 26%, 表明不同群体间可能存在基



图 3 福建省泰宁野生铁皮石斛种群的地理分布

Fig. 3 Distribution of wild populations of *Dendrobium officinale* in Taining, Fujian

表 3 铁皮石斛种群的基因多样性

Table 3 Genetic diversity among 5 populations of *Dendrobium officinale*

种群 Population	N_a	N_e	H	I	PPL (%)	G_{st}
1	1.6538±0.4788	1.4011±0.3635	0.2376±0.1934	0.3557±0.2772	65.38	
2	1.5128±0.5031	1.3615±0.3929	0.2058±0.2117	0.3012±0.3037	51.28	
3	1.4103±0.4951	1.2923±0.3713	0.1683±0.2063	0.2458±0.2990	41.03	
4	1.0769±0.2682	1.0769±0.2682	0.0385±0.1341	0.0533±0.1859	7.69	
小计 Subtotal	1.8590±0.3503	1.5423±0.3630	0.3111±0.1772	0.4621±0.2388	85.90	0.4609
5	1.8974±0.3054	1.5144±0.3329	0.3056±0.1600	0.4616±0.2127	89.74	
总和 Total	2.0000±0.0000	1.6069±0.3156	0.3507±0.1411	0.5228±0.1725	100	0.4204

N_a : 等位基因数; N_e : 有效等位基因数; H : Nei's 基因多样性; I : Shannon 信息指数; PPL: 多态性位点百分率; G_{st} : 基因分化系数。

N_a : Observed number of alleles; N_e : Effective number of alleles; H : Nei's gene diversity; I : Shannon information index; PPL: Percentage of polymorphic loci; G_{st} : Coefficient of gene differentiation.

因交流。而基于 Nei's 基因多态性指数建立的种群树状图表明(图 4), 泰宁铁皮石斛不同种群间有较大的基因差异, 其中, 种群 POP3、POP4 与 POP1、POP2 的遗传距离大于与 POP5 的距离。这表明泰宁野生铁皮石斛种群间虽然存在一定的基因交流, 但种群间仍有较大的基因差异。

3 讨论

福建泰宁县境内分布大量丹霞地貌, 而野生铁皮石斛在泰宁地区的分布区域狭窄, 仅生长在丹霞地貌岩壁上, 但该地区铁皮石斛个体间的外观仍呈现较为丰富的多样性。我们曾对源自福建泰宁地区

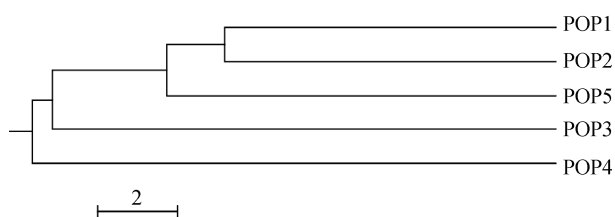


图 4 基于 Nei's 遗传距离对铁皮石斛 5 个种群的聚类分析。POP1~POP5 分别为种群 1~5。

Fig. 4 Dendrogram of 5 populations of *Dendrobium officinale* based on Nei's gene distance. POP1~POP5 was population 1 to 5, respectively.

的 158 株野生铁皮石斛(由福建泰宁红石山生态农业科技有限公司采集)进行了 ISSR 分子标记分析, 个体间的遗传距离为 0~0.58, 多态性位点百分率为 91.7%, 表明泰宁地区可能存在基因多样性丰富的铁皮石斛种群。

为进一步了解福建泰宁不同区域野生铁皮石斛的种群多样性, 本研究收集了来自泰宁 4 个主要丹霞地貌区域的 19 份野生铁皮石斛和 15 份主要栽培种铁皮石斛进行 ISSR 分析。结果表明, 所筛选的 9 条 ISSR 引物可以在铁皮石斛野生和栽培种群中扩增出丰富清晰的条带, 且多态性条带百分率分别为 85.90%和 89.74%, 而在物种水平上的多态性位点百分率为 100%。曾淑华等^[15]对云南文山 8 个种群 55 份材料进行分析, 物种水平的多态性条带百分率仅为 74.0%, 表明泰宁地区可能存在基因多态性更为丰富的种质资源。4 个泰宁野生铁皮石斛种群的 Nei's 基因多样性(H)为 0.3111, 也高于云南文山地区的($H=0.240$)^[15]和 Li 等报道的 12 个铁皮石斛种群($H=0.269$)^[16], 体现了泰宁地区野生铁皮石斛资源的丰富程度。而与其他兰科植物野生种群相比, 泰宁地区野生铁皮石斛资源多样性指数小于无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana*, $H=0.398$)^[17]、云南西双版纳的流苏石斛(*D. fimbriatum*, $H=0.3227$)^[14], 但高于湖北的春兰(*Cymbidium goeringii*, $H=0.263$)^[18]和天麻(*Gastrodia elata*, $H=0.176$)^[19], 在兰科植物中具有较高的多样性水平。同时, AMOVA 分析表明泰宁野生种群间的变异指数为 26%, 表明泰宁野生铁皮石斛不同群落间虽存在一定的基因交流, 但种群间仍有较大的基因差异, 这与 Li 等^[16]的研究结果相似。本研究中, 泰宁野生铁皮石斛 4 个种群具有较高的种群分化系数($G_{st}=0.4609$), 这可解释进化树中 19 份泰宁野生铁皮石斛样本虽独立聚在同一

分支, 但种质间呈现较远的相关性。

此前有研究指出, 福建地区森林覆盖率高, 地理气候条件多样性程度大, 其分布的兰科植物具有明显的热带特征, 兰科植物资源较其周边的浙江与江西更为丰富^[20-21]。在石斛属方面, 中国植物志记载福建分布的石斛属植物有剑叶石斛(*D. acinaciforme*)、细茎石斛(*D. moniliforme*)、铁皮石斛和广东石斛(*D. wilsonii*)^[2], 而林建丽等报道福建还有霍山石斛(*D. huoshanense*)分布^[22]。这表明, 福建地区可能蕴含丰富的野生石斛资源还有待发掘, 福建泰宁地区野生铁皮石斛种质资源分布广泛、基因多样性丰富, 可作为福建及周边地区的野生铁皮石斛种质中心进行保护和利用。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia, Part 1 [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 265-266.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 265-266.
- [2] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 19 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 1-117.
中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 19 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1-117.
- [3] YANG C Y, LI X L, WANG Y Q, et al. ISSR Analysis of cultivated medicinal species of *Dendrobium* Sw. [J]. Chin Agri Sci Bull, 2011, 27(4): 148-152.
杨春勇, 李学兰, 王云强, 等. 人工栽培石斛的 ISSR 标记分析 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 148-152.
- [4] LI X, HE T, CHUN Z. Detecting genetic diversity of *Dendrobium* tissue culture seedlings with ISSR method [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2013, 19(2): 249-254. doi: 10.3724/SP.J.1145.2013.00249.
李霞, 何涛, 淳泽. 石斛组培苗遗传差异性 ISSR 检测 [J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(2): 249-254. doi: 10.3724/SP.J.1145.2013.00249.
- [5] JIANG J L, YE W, LI Y Q, et al. Growth and polysaccharides accumulation in autotetraploid *Dendrobium officinale* [J]. Plant Physiol J, 2014, 50(4): 519-526.
江金兰, 叶炜, 李永清, 等. 同源四倍体铁皮石斛的生长及多糖积累 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 519-526.
- [6] SHEN Y, XU C, WAN X F, et al. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2005, 36(3): 423-427. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2005.03.041.
沈颖, 徐程, 万小凤, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 423-427. doi: 10.3321/j.issn:0253-2670.2005.03.041.

- [7] SHEN J. The applications of DNA sequences and inter-simple sequence repeats for authenticating herbs [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2005: 44–54.
沈洁. DNA 序列、ISSR 标记在药用植物种质鉴别中的应用 [D]. 南京: 南京师范大学, 2005: 44–54.
- [8] SHEN Y. Studies of ISSR molecular marker and ITS sequences analysis in *Dendrobium* plants [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004: 56–61.
沈颖. 石斛类 ISSR 标记研究与 ITS 序列分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004: 56–61.
- [9] LU J S, BU Z Y, LÜ W L, et al. Analysis on genetic diversity of 20 plants of Orchidaceae by ISSR molecular marker [J]. SW China J Agri Sci, 2012, 25(6): 2252–2257. doi: 10.3969/j.issn.1001-4829.2012.06.060.
卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 20 份兰科植物的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2252–2257. doi: 10.3969/j.issn.1001-4829.2012.06.060.
- [10] LU J S, BU Z Y, LÜ W L, et al. ISSR analysis on genetic diversity of germplasm resources in *Dendrobium* Sw. from different habitats [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2013, 44(1): 96–100. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.018.
卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96–100. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.018.
- [11] SHEN J, DING X Y, DING G, et al. Studies on population difference of *Dendrobium officinale*: II. Establishment and optimization of the method of ISSR fingerprinting mark [J]. China J Chin Mat Med, 2006, 31(4): 291–294. doi: 10.3321/j.issn:1001-5302.2006.04.006.
沈洁, 丁小余, 丁鸽, 等. 铁皮石斛居群差异的研究: II. ISSR 指纹标记方法的建立与优化 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 291–294. doi: 10.3321/j.issn:1001-5302.2006.04.006.
- [12] SHEN J, XU H J, YUAN Y H, et al. Evaluation of genetic diversity of *Dendrobium officinale* wild population based on RAMP markers [J]. Acta Pharmac Sin, 2011, 46(9): 1156–1160.
沈洁, 徐慧君, 袁英惠, 等. 铁皮石斛野生居群基于 RAMP 标记的遗传多样性评价 [J]. 药学报, 2011, 46(9): 1156–1160.
- [13] SHEN J, DING X Y, LIU D Y, et al. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(3): 420–422. doi: 10.1248/bpb.29.420.
- [14] MA J M, YIN S H. Genetic diversity of *Dendrobium fimbriatum* (Orchidaceae), an endangered species, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. Acta Bot Yunnan, 2009, 31(1): 35–41. doi: 10.3724/SP.J.1143.2009.08076.
马佳梅, 殷寿华. 西双版纳地区流苏石斛遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 云南植物研究, 2009, 31(1): 35–41. doi: 10.3724/SP.J.1143.2009.08076.
- [15] ZENG S H, XIAO F H, ZHA Y H, et al. Preliminary evaluation among *Dendrobium officinale* populations in Yunnan wenshan [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2012, 23(2): 468–470. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2012.02.097.
曾淑华, 萧凤回, 查应洪, 等. 云南文山铁皮石斛居群的初步评价 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 468–470. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2012.02.097.
- [16] LI X X, DING X Y, CHU B H, et al. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP [J]. Genetica, 2008, 133(2): 159–166. doi: 10.1007/s10709-007-9196-8.
- [17] QIAN X, WANG C X, TIAN M. Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 20399–20413. doi: 10.3390/ijms141020399.
- [18] YAO X H, GAO L, YANG B. Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on inter-simple sequence repeats analysis [J]. Front Biol China, 2007, 2(4): 419–424. doi: 10.1007/s11515-007-0064-9.
- [19] WU H F, LI Z Z, HUANG H W. Genetic differentiation among natural population of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) in Hubei and germplasm assessment of the cultivated populations [J]. Biodiv Sci, 2006, 14(4): 315–326. doi: 10.1360/biodiv.060053.
吴会芳, 李作渊, 黄宏文. 湖北野生天麻的遗传分化及栽培天麻种质评价 [J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 315–326. doi: 10.1360/biodiv.060053.
- [20] LÜ Y L, CHEN Z, ZHUANG X Q. A floristic analysis of Orchidaceae in Fujian Province, China [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci), 2009, 33(6): 162–165.
吕月良, 陈璋, 庄西卿. 福建省野生兰科植物区系研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2009, 33(6): 162–165.
- [21] Editorial Board of Fujian Flora, Science and Technology Commission in Fujian Province. Flora Fujian [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1995: 613–614.
福建省科学技术委员会《福建植物志》编辑委员会. 福建植物志 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1995: 613–614.
- [22] LIN J L. Studies on distribution and habitat investigation of wild *Dendrobium* in Fujian [J]. For Prosp Des, 2009(2): 13–16. doi: 10.3969/j.issn.1004-2180.2009.02.004.
林建丽. 福建省野生石斛属植物分布及生境调查研究 [J]. 林业勘察设计, 2009(2): 13–16. doi: 10.3969/j.issn.1004-2180.2009.02.004.