

铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD分析与鉴别

丁 鸽, 丁小余*, 沈 洁, 唐 凤, 刘冬扬, 贺 佳, 李雪霞, 褚必海

(南京师范大学 生命科学学院 江苏省资源生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 采用 RAPD分子标记技术,对铁皮石斛 8个野生居群的遗传多样性、亲缘关系以及分子鉴别等进行研究。方法 筛选随机引物进行 RAPD分析,通过 UPGMA聚类,研究铁皮石斛各居群间的遗传关系,构建居群亲缘关系的分子系统树;利用特异性条带对铁皮石斛野生居群进行指纹分析鉴别。结果 共筛选出 10个有效引物,在 8个野生居群材料的 RAPD扩增中共得到 439个位点,平均每个引物扩增出 43.9个位点,每个居群扩增出 54.9个位点;在所获得的 104条可重现谱带中,9条是单态的,95条是多态的,多态性程度达 91.35%,遗传距离在 0.590 ~ 0.727之间,平均为 0.686。结论 铁皮石斛居群间遗传差异明显,具有较丰富的遗传多样性;RAPD可以作为铁皮石斛野生居群遗传多态性、居群亲缘关系和分子鉴别研究的有效手段;引物 S412可以有效鉴别铁皮石斛的 8个野生居群。

关键词: 铁皮石斛; 居群; 遗传多样性; RAPD; 鉴别

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)11 - 1028 - 05

Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD

DING Ge, DING Xiao-yu*, SHEN Jie, TANG Feng, LIU Dong-yang, HE Jia,
LI Xue-xia, CHU Bi-hai

(Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Aim** Genetic diversity, relationship and molecular authentication of total 8 wild populations of *Dendrobium officinale* were investigated using RAPD markers. **Methods** 10 random decamer primers were screened for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fragments. A DNA molecular dendrogram was established based on cluster analysis by UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average), and the relationship of the wild populations were analyzed, and all the wild populations were authenticated. **Results** A total of 439 loci with an average of 43.9 loci per primer and 54.9 loci per population were amplified from 8 wild populations by 10 effective primers. In the total 104 amplified bands, 95 were polymorphic, corresponding to 91.35% genetic polymorphism. The genetic distances were 0.590 to 0.727, with an average of 0.686. **Conclusion** Distinct genetic differences and extensive genetic diversity were presented among the wild populations. RAPD markers were an informative and useful tool for the genetic diversity, evaluation and authentication of wild populations of *Dendrobium officinale*. Primer S412 could be used to authenticate 8 wild populations completely.

Key words: *Dendrobium officinale*; population; genetic diversity; RAPD; authentication

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et

Migo)为兰科 (Orchidaceae)石斛属 (*Dendrobium*)珍稀濒危植物,仅分布于我国南方诸省(浙江、广西、福建、贵州、云南、河南、安徽等地)原始森林,有养阴生津、润肺明目、抗癌防老等功效,早在《神农本草经》中就被列为上品。为此,国内外学者对铁皮

收稿日期: 2005-03-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370144).

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 83598215,

E-mail: dingxynj@263.net

石斛的化学成分、活性成分的药理作用均进行了大量的研究^[1-3]。

RAPD(random amplified polymorphic DNA)是20世纪90年代发展起来的一种快速便捷的分子标记技术,已被证明是研究植物遗传多样性及分子鉴别的有效手段,被广泛应用于药用植物种内、种间乃至近缘属间系统学研究^[4-8]。目前,用传统的形态学方法很难将铁皮石斛的野生居群严格鉴别开来^[9],而有关RAPD用于铁皮石斛居群差异的分析及鉴别尚未见报道。本文拟采用RAPD技术分析铁皮石斛居群间的亲缘关系及遗传多样性差异,并进行居群的分子鉴别,为铁皮石斛的保护与可持续性利用提供理论依据。

材料和方法

材料 实验所用材料采自我国石斛主产区:云南、广西、贵州、福建、浙江等省区的原始森林,共8个野生居群(表1)。现被保存于南京师范大学生命科学院组织培养室,以便及时取材和观察。各居群测试3~5个个体,居群种质由丁小余教授鉴定。

Table 1 Origin and sampling size of *Dendrobium officinale* used in the present study

Population codes	Taxon	Locality	Sample size
P1	<i>D. officinale</i>	Chenzhou-1, Hunan	5
P2	<i>D. officinale</i>	Chenzhou-2, Hunan	3
P3	<i>D. officinale</i>	Tiane, Guangxi	5
P4	<i>D. officinale</i>	Guangnan, Yunnan	4
P5	<i>D. officinale</i>	Yandangshan, Zhejiang	3
P6	<i>D. officinale</i>	Shaowu, Fujian	3
P7	<i>D. officinale</i>	Shunchang, Fujian	3
P8	<i>D. officinale</i>	Nanfeng, Jiangxi	3

基因组DNA的提取 取各居群样品新鲜的叶片或茎0.1g,或采用硅胶干燥材料,用无菌水冲洗干净,在液氮中研成粉末。利用德国QIAGEN试剂盒提取高质量的模板DNA。

模板DNA纯度和质量的检测 0.8%的琼脂糖凝胶电泳,经EB(溴化乙锭)染色后,在凝胶成像系统(UVP GDS-8000)上观察其纯度并判断DNA分子的大小及一致性。

引物及筛选 本实验所用引物购自上海生工,共120条,分别标记为S80-100, S121-140, S161-180, S341-380, S401-420。以广西天峨居群为模板,对引物进行初步筛选,获得10个扩增条带多且条带

清晰的有效引物^[10](表2)。

扩增反应 PCR反应总体积为25 μL。组成如下:10 × Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, dNTP 2.5 μL(各2.5 mmol·L⁻¹),模板DNA 30 ng,高品质的Taq DNA聚合酶1.5 U,随机引物12 pmol, ddH₂O 14.2 μL。PCR反应缓冲液、Taq酶及dNTP均为上海Promega公司产品。反应在PTC-200扩增仪上进行,扩增程序:94℃预变性3 min, 94℃变性50 s, 38℃复性1 min, 72℃延伸2 min,循环40次,最后72℃延伸5 min^[10]。

PCR结果检测 PCR产物用含有0.5 mg·L⁻¹ EB的1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。5 V·cm⁻¹稳压电源,0.5 × TBE缓冲液,稳压电泳2.5 h。电泳结果在紫外分析仪上观察,扩增片断通过凝胶成像系统(UVP GDS-8000)观察记录。其中特征性条带的存在或缺失,作为分子鉴别的依据。RAPD标记以引物后加谱带编号来表示,如S94(1)表示引物S94的第一个标记。

数据的统计分析 按琼脂糖凝胶同一位置上DNA条带的有无进行统计,有带(包括弱带)记为“1”,无带记为“0”。根据公式 $D = 1 - F$ 来计算任意两个样本之间的遗传距离,其中 $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, N_{XY} 是个体X和个体Y的PCR扩增后分子量大小相同的DNA条带数, N_X 、 N_Y 分别是样本X、样本Y的PCR扩增产物的DNA条带总数。采用类平均法(unweighted pair-group method with arithmetic average, UPGMA)构建铁皮石斛居群亲缘关系的分子系统树。

结果

1 RAPD扩增结果

从120个10 bp随机引物中筛选出63个有扩增条带产生的引物,又从中挑选出10个重复性好、条带清晰且多态性丰富的引物,对铁皮石斛8个居群进行了RAPD扩增,并对这10个引物的扩增结果进行统计(表2)。在供试材料中共获得104条扩增条带,各引物的扩增带数为7~14,扩增DNA片段长度介于200~2000 bp(图2),平均每个引物扩增的DNA条带为10.4条;其中9条带(约占9.65%)在所分析的铁皮石斛8个居群都存在,95条为多态性带,约占总数的91.35%。每个引物扩增的多态性条带,从7~12条不等,平均为9.5条。

2 居群遗传多样性比较

在湖南郴州-2居群(P2)中,10个引物检测到

64条带,其中多态性带 54条,占 84.38%;浙江雁荡山居群(P5)中,总带数 39条,多态性带 29条,多态性比率为 74.36%。根据各居群 RAPD多态性比率值,可知各居群遗传多样性变异由高向低排序为: P2 > P7 > P6 > P1 = P4 > P8 > P3 > P5(P加阿拉伯数字为居群编号)。在铁皮石斛的 8个居群中,湖南郴州-2居群(P2)的多态性比率最高,而浙江雁荡山居群(P5)的多态性比率则最低(表 3)。

Table 2 Primers of RAPD and results

Primer	Sequence (5' - 3')	Number of total loci	Number of polymorphic loci	Percentage of polymorphic loci /%
S94	GGATGAGACC	8	8	100
S96	AGCGTCTCC	10	8	80
SI 34	TGCTGCAGGT	12	12	100
SI 69	TGGAGAGCAG	7	7	100
SI 73	CTGGGGCTGA	9	9	100
S344	CCGAACACGG	13	11	84.62
S350	AAGCCCAGG	8	8	100
S359	GGACACCACT	13	11	84.62
S366	CACCTTTCCC	10	9	90
S412	GGGACGTTGG	14	11	78.57
Total		104	95	
Average		10.4	9.5	91.35

Table 3 Genetic diversity in different populations of *Dendrobium officinale*

Population codes	Number of total bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands /%
P1	55	45	81.82
P2	64	54	84.38
P3	50	40	80.00
P4	55	45	81.82
P5	39	29	74.36
P6	60	50	83.33
P7	62	52	83.87
P8	51	41	80.39

3 居群遗传距离分析

根据每个引物对铁皮石斛 8个居群的基因组 DNA的扩增结果以及公式 $D = 1 - F$,可以计算得到遗传距离矩阵。遗传距离越大,居群间亲缘关系也就越远。所有供试材料的平均遗传距离为 0.686。铁皮石斛的 8个居群中,亲缘关系最近的两个居群为福建邵武居群(P6)和福建顺昌居群(P7),平均遗传距离为 0.590;亲缘关系最远的为浙江雁荡山居群(P5)和福建邵武居群(P6),平均遗传距离为 0.727。铁皮石斛的 8个居群在遗传距离上有明显

的差异,各居群间的遗传距离详见表 4。

Table 4 Genetic distances in different populations of *Dendrobium officinale*

Population codes	1	2	3	4	5	6	7	8
P1	0							
P2	0.633	0						
P3	0.657	0.713	0					
P4	0.673	0.683	0.629	0				
P5	0.670	0.673	0.719	0.702	0			
P6	0.652	0.670	0.666	0.635	0.727	0		
P7	0.658	0.646	0.643	0.620	0.703	0.590	0	
P8	0.664	0.684	0.657	0.636	0.681	0.625	0.614	0

4 居群间亲缘关系的聚类分析

在表 4的基础上,以 UPGMA法进行聚类,构建了居群间亲缘关系的分子系统树。图 1为全部供试材料的聚类图。从聚类图可以看出,铁皮石斛 8个居群分为两个大支: I和 II。I支分为 a和 b两支,其中,a支由 c和 d两支组成:福建邵武(P6)和福建顺昌(P7)居群聚为一小支,该小支然后与江西南丰居群(P8)聚为 c支;c支与 d支聚在一起构成 a支;b支由湖南两个居群(P1和 P2)聚在一起构成。a和 b两支聚在一起构成 I支;II支由浙江雁荡山居群(P5)单独构成。

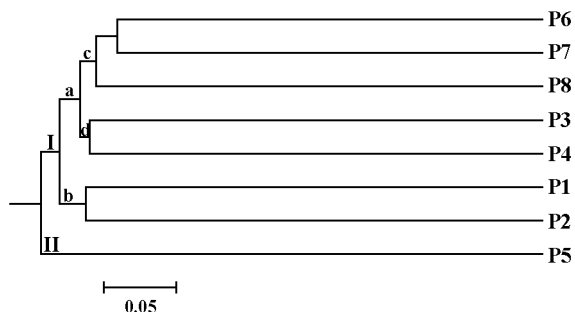


Figure 1 Dendrogram of 8 populations based on RAPD data with cluster analysis

5 居群的分子鉴别

经过大量的引物筛选,作者发现引物 S412可将铁皮石斛 8个野生居群较好地鉴别开来,并且具有较好的重现性(图 2),引物 S412对各居群的扩增条带的统计结果见表 5。

在扩增谱带中存在 6条特征性条带: 3条为湖南郴州-2居群(P2)所特有,分别约有 250 bp,1 100 bp,1 500 bp大小; 1条为云南广南居群(P4)所特

有,约在 850 bp处;1条为浙江雁荡山居群(P5)所特有,约在 650 bp处;1条为福建邵武居群(P6)特有,约在 350 bp处。这些特征性条带分别标记为 S412/1500(表示引物 S412所扩增的约 1 500 bp大小的条带,以下类同)、S412/1100, S412/250, S412/850, S412/650, S412/350(表 6)。

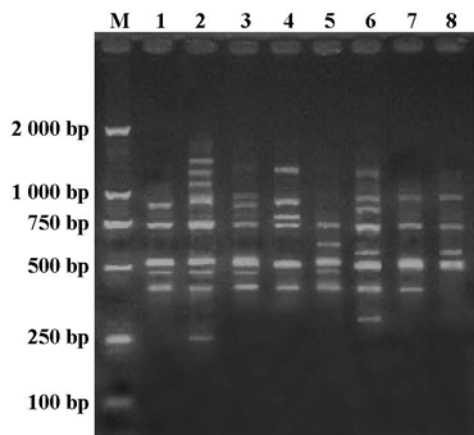


Figure 2 RAPD fingerprints of DNAs from 8 populations with primer S412. M: 2 000 bp DNA marker ladder

Table 5 Bands of each population by primer S412

Population codes	RAPD identification markers														Identification code
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
P1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	00001010011100
P2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	11110010011101
P3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	00011010011100
P4	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	01010110010100
P5	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	00000011011100
P6	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	01011010110110
P7	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	00010010010100
P8	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	00010010110000

Table 6 Unique bands obtained from S412

Population codes	Unique bands					
	250 bp	350 bp	650 bp	850 bp	1 100 bp	1 500 bp
P2	+	-	-	-	+	+
P4	-	-	-	+	-	-
P5	-	-	+	-	-	-
P6	-	+	-	-	-	-

+: Absence; -: Presence

讨论

1 铁皮石斛居群的 RAPD鉴别

RAPD分子标记具有数量多、显性或共显性,简单易行、容易标准化操作等优点^[11],被广泛应用于药用植物的居群鉴别乃至种间鉴别^[4-8,11-15]。在药用植物种间鉴别方面,前人曾利用 RAPD方法成

功鉴别了三七及其混淆品^[4]、黄芩属 3 种药用植物^[6]、铁皮石斛及其同属相似种^[7];在药用植物居群鉴别方面,前人曾利用 RAPD方法成功地鉴别了不同产地的瓣蕊唐松草^[13]、不同产地的党参^[14]和不同产地的黄连^[15]。然而,有关 RAPD用于铁皮石斛的居群鉴别尚未见报道。作者曾对铁皮石斛野生居群的形态结构进行了研究,并划分为 F型、H型居群,但 F型、H型内部各居群的形态差异并不明显,用传统的形态学方法很难将铁皮石斛的野生居群严格鉴别开来^[9],所以,在 DNA分子水平上对铁皮石斛的居群进行准确鉴别,有利于人们准确鉴别铁皮石斛居群,选择理想优质的居群进行集约化培育。

本文共筛选了 10个引物对铁皮石斛 8个野生居群进行了分子指纹图谱研究,确定了铁皮石斛 RAPD反应的最佳条件,保证了在此条件下 RAPD的稳定性和重复性^[10]。实验表明 S412引物可以准确鉴别出铁皮石斛的 8个野生居群,有 6条特征性谱带分别为湖南郴州-2(P2)、云南广南(P4)、浙江雁荡山(P5)、福建邵武居群(P6)所特有。在实验中,高品质的 QIAGEN试剂盒保证了模板 DNA的质量,高品质的 DNA聚合酶和稳定的反应条件等均保证了 RAPD的重现性^[10]。本文中采用的铁皮石斛野生居群的个体材料经过重复、稳定的实验体系的验证,基本保持一致,与葛颂等研究中国疣粒野生稻时提出的观点一致,当在研究在略为低估遗传变异的情况下,混合样品可以作为个体样品的代表,对整个居群的遗传多样性进行评价。同时该方法可以节省大量的实验工作量,有利于对材料进行快速的遗传多样性评价^[16]。

2 铁皮石斛居群的地理位置与亲缘关系的相关性

从铁皮石斛居群间的遗传距离来看,遗传距离较小的居群有:福建邵武居群(P6)与福建顺昌居群(P7)(遗传距离为 0.590),湖南郴州-1居群(P1)与湖南郴州-2居群(P2)(遗传距离为 0.633);遗传距离较大的居群有:广西天峨居群(P3)与浙江雁荡山居群(P5)(遗传距离为 0.719),浙江雁荡山居群(P5)和福建邵武居群(遗传距离为 0.727)。通过分析发现:地理位置毗邻的居群,其遗传距离相对较小,亲缘关系较近;地理距离较远的居群,其遗传距离相对较大,亲缘关系较远,说明铁皮石斛居群地理分布的远近与居群间的遗传关系的亲疏呈良好的相关性。

3 铁皮石斛居群的遗传多样性与保护

遗传多样性是物种长期进化的产物,是确保其

生存发展的前提。本文利用筛选出的 10 个引物对 8 个铁皮石斛野生居群所进行的 RAPD 研究表明: 各居群的多态位点比率为 91.35% (表 2), 略高于石斛属种间的多态比率 (91.2%)^[7], 而远高于其他濒危植物, 如: 银杉 (21.5%)^[17]、望天树 (48.22%)^[18]、版纳青梅 (53.68%)^[19]、海南粗榧 (85.1%)^[20] 等, 说明铁皮石斛虽然濒危, 但却具有较为丰富的遗传多样性。铁皮石斛多生于悬崖峭壁上, 自然繁殖能力较低, 居群间的基因交流少, 是造成铁皮石斛居群间存在较大的遗传分化的原因。

然而, 丰富的居群遗传多样性并未阻止铁皮石斛居群濒危的严重性, 说明铁皮石斛的濒危与人类毁灭性的采集密切相关。铁皮石斛野生居群自身可能并不存在濒危的遗传基础, 数十年来人为毁灭性的采集以及环境的破坏才是导致铁皮石斛濒危的真正原因。目前, 铁皮石斛已被纳入我国特有的急需重点保护的珍稀濒危药用植物, 只有对铁皮石斛的资源及生境进行卓有成效的保护, 对铁皮石斛野生居群的利用进行严格控制, 不断扩大铁皮石斛优质地道性居群的人工培育, 才能保护好珍稀濒危铁皮石斛的野生资源。

References

- [1] Hua YF, Zhang M, Fu CX, *et al.* Structural characterization of a 2-O-ace-tylglucosylmannan from *Dendrobium officinale* stem [J]. *Carbohydr Res*, 2004, **339**(13): 2219 - 2224.
- [2] Yang H, Wang SC, Wang ZT, *et al.* Structural analysis of polysaccharides from *Dendrobium candidum* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2004, **39**(4): 254 - 257.
- [3] Shao H, Zhang LQ, Li JM, *et al.* Advances in research of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, **35**(1): 109 - 113.
- [4] Cui XM. Authentication of *Panax notoginseng* by 5S-rRNA spacer domain and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis [J]. *Planta Med*, 2003, **69**(6): 584 - 586.
- [5] Park SY, Yook CS, Nohara T, *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of genetic relationships among *Acanthopanax* species [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, **27**(12): 1270 - 1274.
- [6] Hosokawa K, Minami M, Kawahara K, *et al.* Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers [J]. *Planta Med*, 2000, **66**(3): 270 - 272.
- [7] Zhang M, Huang HR, Liao SM, *et al.* Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, **26**(7): 442 - 447.
- [8] Wang AM, Ji S. Experiment briefing of two officinal *Dendrobium* by RAPD [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, **25**(5): 324 - 325.
- [9] Ding XY, Xu LS, Wang ZT, *et al.* Studies on population difference of *Dendrobium officinale* I. Differences in morphological structure [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, **32**(9): 828 - 831.
- [10] Ding G, Ding XY, Shen J, *et al.* Studies of wild populations of *Dendrobium officinale* (IV). establishment and optimization of RAPD reaction system [J]. *J Nanjing Norm Univ* (南京师范大学学报), (in press).
- [11] Chen L, Yang YJ, Yu FL. Genetic diversity, relationship and molecular discrimination of elite tea germplasm [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] revealed by RAPD markers [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2004, **2**(3): 385 - 390.
- [12] Ma XJ, Wang XQ, Sun SS, *et al.* A study on RAPD fingerprints of wild mountain *Ginseng* (*Panax Ginseng*) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, **34**(4): 312 - 316.
- [13] Xie L, Li LQ, Zhang DM. Assessment of genetic variation and distribution pattern of *Thalictrum petaloideum* detected by RAPDs [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, **46**(2): 165 - 170.
- [14] Zhang YB, Ngan FN, Wang ZT, *et al.* Radom primed polymerase chain reaction differentiates *Codonopsis pilosula* from different localities [J]. *Planta Med*, 1999, **65**: 157 - 160.
- [15] Cheng KT, Chang HC, Su CH, *et al.* Identification of dried rhizomes of *Coptis* species using radom amplified polymorphic DNA [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1997, **38**: 241 - 244.
- [16] Qian W, Ge S, Hong DY. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Acta Bot Sin*, 2000, **42**(7): 741 - 750.
- [17] Wang XQ, Zou YP, Zhang DM, *et al.* Genetic diversity of *Cathaya argyrophylla* by RAPD [J]. *Sci Sin C* (中国科学 C 辑), 1996, **26**(5): 436 - 441.
- [18] Li QM, He TH, Xu ZF, *et al.* Genetic diversity and population genetic structure of endangered *Pamshorea chinensis* [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2003, **1**(5/6): 819 - 820.
- [19] Li QM, X ZF, H TH. A preliminary study on conservation genetics of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, **44**(2): 246 - 249.
- [20] Du DL, Su J, Fu YC, *et al.* Genetic diversity of *Cephalotaxus mannii*, a rare and endangered plant [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, **44**(2): 193 - 198.