

## 束花石斛种质资源的 ISSR 分析

包英华<sup>1</sup>, 白音<sup>1\*</sup>, 田新波<sup>1</sup>, 王文全<sup>2</sup>

(1. 韶关学院 英东生物工程学院, 广东 韶关 512005; 2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

**摘要:** 采用 ISSR 分子标记技术对 9 个居群束花石斛的遗传多样性和亲缘关系进行分析。结果显示, 从 60 条 ISSR 引物中共筛选出的 5 条有效引物, 每个引物的扩增位点为 9~13 个, 共 56 个位点, 多态性位点 49 个 (87.90%)。束花石斛种内遗传多态性水平较高, 遗传变异较丰富, 9 个居群的总扩增条带为 242 个, 平均每个居群为 26.90 个, 其中多态性条带占 179 个 (72.90%)。野生束花石斛种质资源减少的主要原因在于人为过度采收和其赖以生长的环境被破坏, 聚类分析结果表明, 云南思茅和文山居群的遗传距离最近, 而云南景洪居群与其它居群之间的遗传距离相对较大, 说明束花石斛种内亲缘关系的远近可能与其地理分布也有一定的联系。

**关键词:** 束花石斛; 种质资源; ISSR; 遗传多样性; 亲缘关系

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)04-0447-04

## Studies on germplasm resources of *Dendrobium chrysanthum* using ISSR marker

BAO Ying-Hua<sup>1</sup>, BAI Yin<sup>1\*</sup>, TIAN Xin-Bo<sup>1</sup>, WANG Wen-Quan<sup>2</sup>

(1. Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China; 2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** *Dendrobium chrysanthum* is a traditional Chinese crude drug in China. We analyzed the genetic diversity and the genetic relationship of 9 population of *D. chrysanthum* by ISSR technique in this paper. The results showed that we sieved 5 utility primers from 60 ISSR primers and the amplified loci of every primers was 9~13, the total was 56, of which 49 were polymorphic (87.90% of all amplified loci). The level of genetic diversity in *D. chrysanthum* is higher, and the genetic variation is more abundance. A total of 242 bands with an average of 26.90 bands per population were amplified from 9 populations, in which 179 bands polymorphic (72.90%) of all amplified bands. The main endangered reasons of wild population of *D. chrysanthum* were the over-collecting and the environment which *D. chrysanthum* depended on was destroyed. Cluster analysis showed that the genetic distances of Yunnan Simao population and Wenshan population is closest, and it is farther between Yunnan Jinghong population and the others. This result indicated that the phylogenetic relationship of different population of *D. chrysanthum* is possibly relevant to their geographic distribution.

**Key words:** *Dendrobium chrysanthum*; germplasms resources; ISSR; genetic diversity; phylogenetic relationship

束花石斛 (*Dendrobium chrysanthum*) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生草本植物, 别名为水打棒或大黄草等, 分布于我国贵州、广

西和云南省等地区。束花石斛是收载于我国《药典》(2000年版) 的名贵中药材, 其主要含有多糖、生物碱、菲类和联苄类等化合物 (陈晓梅等, 2001; 杨莉

收稿日期: 2007-10-22 修回日期: 2007-12-12

基金项目: 国家科技基础条件平台工作项目 (2005DKA21004); 韶关学院科研项目 (2007) [Supported by National Facilities and Information Infrastructure Foundation for Science and Technology (2005DKA21004); Scientific Research Foundation of Shaoguan University (2007)]

作者简介: 包英华 (1973-), 女, 内蒙古通辽人, 讲师, 从事植物生理与分子生物学研究, (E-mail) byinghua@126.com.

\* 通讯作者 (Author for correspondence)

等,2004;李璽等,2005),具益胃生津和滋阴清热之功效,是“脉络宁注射液”、“石斛夜光丸”和“复方清咽宁”等复方中药的主要原料(丁小余等,2002)。笔者在研究当中发现不同居群束花石斛的形态特征、生物学特性和多糖含量均有较大差异。

ISSR (Intersimple Sequence Repeats) 是由 Ziekienlcz 根据 SSR (Simple Sequence Repeats) 的特点创建的一种简单重复区间扩增多态性的分子标记技术,该技术具有不需预知基因组任何信息、所需模板 DNA 用量少、操作简单、成本低以及多态性丰富等优点(Ziekienlcz 等,1994)。沈洁等(2006)利用 ISSR 标记技术对不同居群铁皮石斛(*D. officinale*)进行分子鉴定,结果显示在铁皮石斛种内含有丰富的 ISSR 序列,多态性水平较高(90.5%),而且 ISSR 分子标记技术能够有效鉴别不同居群铁皮石斛。沈颖等(2005)对 9 种石斛属植物进行 ISSR 分析,认为 ISSR 是用于石斛属种间鉴别的一种可靠的分子标记方法。然而,至今尚未见有束花石斛种内遗传变异的研究报道。鉴于此,本文采用 ISSR 分子标记技术对束花石斛 9 个居群的遗传多样性和亲缘关系进行研究,为束花石斛种质资源的可持续利用和保护提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

供试材料采自于我国贵州,广西和云南等地区,共 9 个居群。全部材料均由白音博士鉴定,凭证标本存放于韶关学院植物标本室和石斛种质资源圃。取新鲜叶片或嫩枝,快速干燥,置于超低温冰箱中保存备用,每个居群均取 3~6 个个体(表 1)。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法(包英华等,2007)提取样品 DNA,用 Ultrospec 2000 紫外/可见分光光度计检测其 DNA 纯度和浓度, $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.7~2.3,浓度 90~600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.2 PCR 反应体系 总反应体积为 25  $\mu\text{L}$ ,其中含 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer,2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ,0.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ISSR 引物、1.5 U Taq 酶、160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP、150 ng 模板 DNA。扩增前在 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;每循环 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 50 s,56  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,40 循环;最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。本试验共选用 60 条 ISSR 引物(上海生工合

成),所有反应均在 SUPER-PCR 仪(日本)上进行。1.2.3 扩增产物的检测 PCR 反应结束后,把扩增产物进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色后,在 Amgisham pharmacy bictech 凝胶成像系统(瑞士)下照相。

1.2.4 数据统计与分析 在琼脂糖凝胶上,每个材料的每一条电泳谱带看作为一个遗传位点,在同一个位点上如有强带者或重复出现的弱带者计为“1”,无带者或不重复出现的弱带者计为“0”,计算其总扩增条带和特异性扩增条带数量。利用 SPSS11.5 软件的两类平均链锁法,计算供试材料的欧氏距离,进行聚类分析,构建其聚类图。

表 1 不同居群束花石斛的来源及样品数量

Table 1 Origin and sampling size of nine populations of *D. chrysanthum*

居群编号 Population code	产地 Localaty	采集时间 Date of collection	样品份 数(份) Sample size
Dchr01	贵州安龙	2005 年 11 月	4
Dchr02	贵州兴义	2005 年 11 月	5
Dchr03	贵州则戎	2005 年 11 月	6
Dchr04	贵州贞丰	2005 年 11 月	4
Dchr05	广西玉林	2005 年 09 月	3
Dchr06	广西靖西	2005 年 09 月	4
Dchr07	云南思茅	2005 年 11 月	3
Dchr08	云南文山	2005 年 11 月	3
Dchr09	云南景洪	2005 年 11 月	3

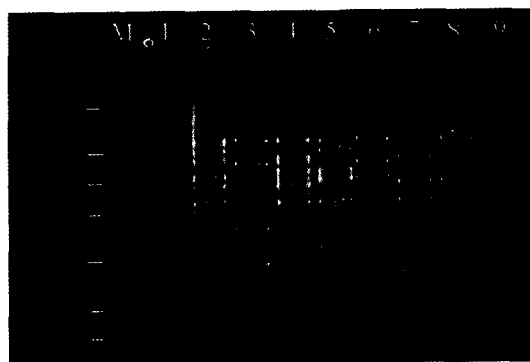


图 1 29 号引物对束花石斛 9 个居群的 ISSR 扩增结果

Fig. 1 The ISSR amplification result of primer (CCCT)<sub>4</sub> (M; DNA ladder)

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR 扩增结果

从 60(编号为 01~60)条 ISSR 引物中共筛选

出扩增条带多、清晰和稳定性好的 5 条引物(图 1 为 29 号引物的扩增结果)。利用该 5 条引物对束花石斛 9 个居群进行 ISSR 扩增。结果显示,5 条 ISSR 引物的扩增位点为 9~13 个之间,共 56 个位点,扩增位点的分子量多为 300~2 000 bp 之间,其中多态性扩增位点为 8~11 个,共 49 个,多态性位点占 76.90%~91.70%,平均为 87.90%(表 2)。

## 2.2 不同居群束花石斛的遗传多样性分析

束花石斛 9 个居群的 ISSR 总扩增条带为 18~37 个,其中多态性扩增条带占 11~30 个(平均 19.90 个位点),多态性条带比率为 61.10%~81.10%之间,平均 72.90%,说明束花石斛居群间的遗传多态性水平差异较大,遗传变异比较丰富。广西玉林居群的多态性扩增条带最多(30 个),占 81.10%;而云南文山居群的最少(11 个),仅占 61.10%(表 3)。

表 2 五个 ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplification results for nine populations of *D. chrysanthum* by five ISSR primers

编号 Primer code	序列 Sequence	总扩增 位点(个) No. of total amplified loci	多态性扩增 位点(个) No. of total polymorphic loci	多态性扩增 位点百分比 Polymorphic rate (%)
29	(CCCT) <sub>4</sub>	13	10	76.90
38	(AG) <sub>8</sub> TT	12	11	91.70
43	(GA) <sub>8</sub> CG	11	10	90.90
44	(CT) <sub>8</sub> GA	9	8	88.90
46	(CT) <sub>8</sub> GT	11	10	90.90
共计 Total		56	49	
平均 Average		11.20	9.80	87.90

表 3 不同居群束花石斛遗传多样性分析结果

Table 3 Genetic diversity in different population of *D. chrysanthum*

居群 Population	总扩增条带(个) No. of total amplified bands	多态性条 带点(个) No. of total polymorphic bands	多态性条 带百分比 Polymorphic rate (%)
Dchr01	28	21	75.00
Dchr02	25	18	72.00
Dchr03	20	13	65.00
Dchr04	29	22	75.90
Dchr05	37	30	81.10
Dchr06	28	21	75.00
Dchr07	29	22	75.90
Dchr08	18	11	61.10
Dchr09	28	21	75.00
共计 Total	242	179	
平均 Average	26.90	19.90	72.90

## 2.3 不同居群束花石斛的聚类分析

以类间平均链锁法对全部供试材料进行聚类,通过计算遗传距离来构建其聚类分析图(图 2)。结果显示,束花石斛 9 个居群比较自然地分为 3 个分支(A 支、B 支和 C 支),其中 A 支由云南思茅居群(Dchr07)、云南文山居群(Dchr08)、贵州兴义居群(Dchr02)、贵州安龙居群(Dchr01)、贵州则戎居群(Dchr03)和贵州贞丰居群(Dchr04)组成;B 支由广西玉林居群(Dchr05)和广西靖西居群(Dchr06)组成;C 支仅由云南景洪居群(Dchr09)组成。从聚类图可见,云南思茅居群和云南文山居群、贵州安龙居群和贵州则戎居群的遗传距离较小,说明两者之间的亲缘关系较近,而云南景洪居群与其它居群之间的遗传距离相对较大,其亲缘关系亦相对较远。

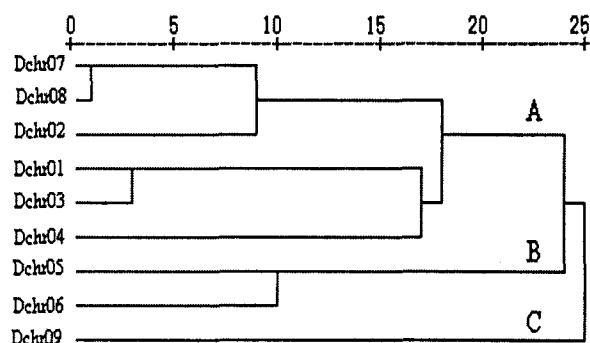


图 2 不同居群束花石斛的 ISSR 聚类分析图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis for nine population of *D. chrysanthum* based on ISSR data

## 3 讨论

束花石斛为我国传统名贵中药材,随着国内外药用石斛需求量逐年增加和开发利用程度的不断深入,我国野生束花石斛资源遭到严重破坏,有些地区甚至面临枯竭。于 1987 年出台的《国家重点保护野生药材物种名录》中,束花石斛被列为国家三级重点保护植物。本文结果显示,束花石斛种内具丰富的遗传变异,其多态性扩增位点(87.90%),介于铁皮石斛(91.35%)和美花石斛(85.95%)之间(Ding 等,2005;白音等,2007)。说明导致束花石斛资源不断减少并非是其遗传变异降低所致,而人为过度采收和赖以生存的生态环境被破坏是我国野生束花石斛资源急剧减少的主要因素。因此保护束花石斛原产地生态环境和禁止采收野生束花石斛资源是恢复野生束花石斛种群数量和蕴藏量最有效的途径。

束花石斛种质资源的标准化收集整理结果显示,不同居群束花石斛的茎直径和长度,茎形状以及花的颜色和形状均有所差异。来自云南景洪的束花石斛茎长而粗壮,茎圆柱形,两端一般不会变细,花较大,唇瓣上的两个斑点呈深紫色。而采自于广西玉林和百色地区的束花石斛茎比较短,两端逐步狭窄,呈纺锤形(与玫瑰石斛极为相似),花较小,唇瓣上的两个斑点呈浅紫色。聚类分析结果表明,云南思茅居群和云南文山居群、贵州安龙居群和贵州则戎居群的遗传距离较小,说明两者之间的亲缘关系较近。从地理位置而言,云南思茅和文山,贵州安龙县和则戎乡的地理位置都很近。相反,云南景洪居群与其它居群的亲缘关系较远,景洪位于云南省南部,在地理位置上与其它居群间隔较远,说明束花石斛居群间的亲缘关系与其地理位置有一定的联系。至于束花石斛遗传基因与其形态变异和环境因素的相关性还有待用进一步研究。

#### 参考文献:

- Bao YH(包英华), Bai Y(白音), Tan QH(谭庆辉), et al. 2007. Comparison of methods of genomic DNA extraction from *Dendrobium loddigesii* (美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较)[J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 15(2): 147-151
- Bai Y(白音), Bao YH(包英华), Wang WQ(王文全), et al. 2007. RAPD analysis on germplasm resources in different populations of *Dendrobium loddigesii* (不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析)[J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 38(5):

748-751

- Chen XM(陈晓梅), Guo SX(郭顺星). 2001. Advances in the research of constituents and pharmacology of *Dendrobium* (石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展)[J]. *Nat Product Res Development* (天然产物研究与开发), 13(1): 70-74
- Ding G, Ding X Y, Shen J, et al. 2005. Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD[J]. *Acta Pharm Sic* (药学学报), 40(11): 1 028-1 032
- Ding XY(丁小余), Xu LS(徐璐珊), Wang ZT(王峥涛), et al. 2002. Molecular authentication of *Dendrobium chrysanthum* from its allied species of *Dendrobium* (束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别)[J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 27(6): 407-411
- Li S(李璧), Wang CL(王春兰), Guo SX(郭顺星), et al. 2005. Advances in studies on chemical components and pharmacology of epiphytic type medicinal plants in the Orchid family (附生型兰科药用植物化学成分及药理活性研究进展)[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 30(19): 1 489-1 496
- Shen J, Ding XY, Liu DY, et al. 2006. Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating Populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. *Bio Pharm Bull*, 29(3): 420-422
- Shen Y(沈颖), Xu C(徐程), Wan XF(万小凤), et al. 2005. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* species (ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用)[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 36(3): 423-427
- Yang L(杨莉), Wang Y(王云), Bi ZM(毕志明), et al. 2004. Studies on chemical constituents of *Dendrobium chrysanthum* (束花石斛化学成分研究)[J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2(5): 280-282
- Ziekienlcz E, Rafashl A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 20: 176-183

(上接第 430 页 Continue from page 430)

(何立珍等, 1983; 黄济明, 1983; 宋文昌等, 1992)。多倍化后, 耐荫特征更加突出。其叶片单位面积内的气孔器数目减少, 但气孔、保卫细胞及其所组成的气孔器明显增大, 使其呼吸作用得到改善, 并更利于对 CO<sub>2</sub> 和水分的调节; 其保卫细胞中含有比二倍体更多、更大的叶绿体, 这与其光合效率和功能的提高有关。四倍体除能较好地利用直射光外, 对环境散射光或漫射光也有更好的利用。由此可见, 其形态结构特征具有较大的可塑性。因此, 四倍体高产有其良好的叶片结构基础。

#### 参考文献:

- 丁志遵, 唐世蓉, 秦慧贞, 等. 1983. 甾体激素药源植物[M]. 北京: 科学出版社
- 中国植物志编委会. 1985. 中国植物志(第 16 卷第 1 分册)

[M]. 北京: 科学出版社: 60-105

- 何立珍, 刘选明, 周朴华. 1993. 黄花菜 HAC 一大花长嘴子花同源四倍体选育[J]. *湖南农业科学*, (4): 23-24
- 徐成基. 2000. 中国薯蓣资源[M]. 成都: 四川科学技术出版社
- 黄济明. 1983. 百合组织培养和试管内诱发多倍体试验[J]. *园艺学报*, (2): 125-127
- Baranova MA. 1983. Study on the laterocytic stomtotype in angiosperms[J]. *Brittonia*, 35(1): 93-102
- Song WC(宋文昌), Zhang YH(张玉华). 1992. Rice tetraploidy and its effect on agronomic traits and nutritional constituents (水稻四倍化及其对农艺性状和营养成分的影响)[J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), (2): 137-143
- Ren FL(任凤莲), Liu Y(刘咏), Yu WF(禹文峰). 2006. Qualitative and quantitative analysis of diosgenin distilled from *Dioscorea zingiberensis* (黄姜中薯蓣皂甙元的提取及定性定量分析)[J]. *Guihaia* (广西植物), 26(6): 684-686
- Wilkinson HP. 1979. The plant surface (mainly leaf)[M]. Oxford: Clarendon Press