

# 金线兰及近缘种植物遗传多样性 ISSR 分子标记分析

叶 炜<sup>1</sup>, 江金兰<sup>1</sup>, 李永清<sup>1</sup>, 雷伏贵<sup>1</sup>, 周建金<sup>1</sup>, 胡启镔<sup>2</sup>, 魏道智<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>福建省三明市农业科学研究院药用植物研究所, 沙县 365509; <sup>2</sup>福建省三明市农业局, 三明 365000;

<sup>3</sup>福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

**摘要:**利用 ISSR 分子标记技术对我国不同地区收集的金线兰及其近缘种种质资源进行亲缘关系及遗传多样性分析。结果显示:9 条 ISSR 引物在 50 份材料中共扩增条带 156 条,其中多态性条带 155 条,多态性比率达 99.36%;UPGMA 树状图分析显示,样本总体相似系数介于 0.56~0.90 之间,在相似系数 0.65 处可分 4 大类群,其中金线兰主要集中于 A 大类群。A 大类群又可分为 3 个亚类 5 个小亚类,亚类中不同地区来源的金线兰种质没有明显的界限。去除部分地区来源不明材料,46 份材料依不同地理来源分成 8 个种群,其中福建野生金线兰 4 个种群,二者 Nei's 基因多样性指数( $H$ )分别为 0.322 和 0.295,处兰科植物中等水平;种群遗传分化系数( $Gst$ )分别为 0.328 和 0.240,处兰科植物较低水平。AMOVA 分析显示样本种群内变异指数 87%,种群间变异指数 13%,表明种群间可能存在基因交流。

**关键词:**金线兰;分子标记;基因多样性;ISSR

## Analysis of Genetic Diversity in *Anoectochilus roxburghii* and Its Relative Species Using ISSR Molecular Markers

YE Wei<sup>1</sup>, JIANG Jin-lan<sup>1</sup>, LI Yong-qing<sup>1</sup>, LEI Fu-gui<sup>1</sup>, ZHOU Jian-jin<sup>1</sup>, HU Qi-bin<sup>2</sup>, WEI Dao-zhi<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>The Institute of Medicinal Plant, Sanming Academy of Agricultural Science, Shaxian Fujian, 365509;

<sup>2</sup>Sanming Agriculture Bureau, Sanming Fujian, 365000;

<sup>3</sup>College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** ISSR molecular markers were employed to assess the genetic diversity and differentiation of *Anoectochilus roxburghii* and its relative species collected from different districts of China. The results indicated that, a total of 156 bands were amplified from 50 samples by 9 ISSR primers, and 155 were polymorphic, the percentage of polymorphic bands was 99.36%. UPMGA dendrogram analysis indicated that, the similarity coefficient ranged from 0.56 to 0.90, at genetic similarity of 0.65, all the 50 samples were clustered into 4 groups, and *A. roxburghii* were mainly gathered in group A. Group A can further clustered into 3 subgroups and 5 small subgroups, and there were no significantly boundaries among *A. roxburghii* samples collected from different districts. After removed unknown source samples, based on geographic source, 46 samples were divided into 8 populations, included 4 Fujian wild *A. roxburghii* populations, the values of Nei's gene diversity ( $H$ ) of them were 0.322 and 0.295, which were in average level compared with other orchids; the coefficient of genetic differentiation among population ( $Gst$ ) were 0.328 and 0.240, which were in low level compared with other orchids. Results of AMOVA analysis indicated that genetic variation within population was 87%, variation among population was 13%, indicated there could exist gene flow among populations.

**Key words:** *Anoectochilus roxburghii*; molecular maker; genetic diversity; ISSR

收稿日期:2014-09-08 修回日期:2015-01-04 网络出版日期:2015-08-04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150804.1327.030.html>

基金项目:福建省自然科学基金项目(2014J01382);三明市农业科学研究院院立项目(2014-Y-05)

第一作者主要从事园艺植物生物技术研究。E-mail: yewei922@qq.com

通信作者:江金兰,主要从事园艺植物生物技术研究。E-mail: 420465520@qq.com

金线兰 (*Anoectochilus roxburghii*) 为兰科开唇兰属多年生草本植物, 又名金线莲、花叶开唇兰、金线金丝草等, 是我国传统的珍贵药材, 素有“金草”、“神药”及“乌人参”等美称。金线兰与台湾银线兰 (*A. formosanus*)、恒春银线兰 (*A. koshunensis*) 并称为金线莲<sup>[1]</sup>, 在保肝<sup>[2-5]</sup>、治疗糖尿病<sup>[6-7]</sup>、增强免疫力<sup>[8]</sup>、增强骨骼健康<sup>[9-11]</sup>、提高细胞抗氧化能力<sup>[12-14]</sup>以及抗肿瘤<sup>[15-16]</sup>方面具有重要生理作用。金线兰广泛分布于我国福建、浙江、江西、广东、广西、海南、云南、四川、贵州、西藏等省(自治区)<sup>[17]</sup>, 其中三明地区的明溪、永安是野生金线兰分布丰富的中心产区之一, 二者先后被中国经济林协会评定为“中国金线兰之乡”。开唇兰植物全世界约有40余种, 我国有20种, 2变种, 其中部分同属植物在外形上接近, 如台湾银线兰与恒春银线兰就很难仅通过叶片形态进行分辨<sup>[18]</sup>, 而同一野生群落内的金线兰又存在叶腹面从无金色网纹(无线)到有金色网纹(有线)的过渡类型<sup>[19]</sup>。因此, 仅通过外观形态对不同地域金线兰及同属植物进行分析鉴定存在较大的难度。此外, 由于金线兰分布广泛、资源稀少, 再加上长期过度的采集导致其生境碎片化, 不同环境间的基因交换可能切断, 从而在不同的地域环境间形成遗传差异<sup>[20]</sup>。利用分子标记技术对金线兰进行亲缘关系分析不仅可以排除环境与生长期的影响, 帮助鉴别中草药市场中的金线莲产品, 还有助于分析不同个体与种群的金线兰基因差异, 为筛选优异的金线兰种质资源提供参考。

此前有关金线兰及开唇兰属植物的分子标记研究报道较少, 仅限较少的地方品种及规模化栽培品种。如1998年, K. T. Cheng等<sup>[18]</sup>利用2条RAPD引物成功对台湾银线兰及恒春银线兰进行了鉴定分析。2000年, 胡珊梅等<sup>[21]</sup>也将RAPD应用于台湾银线兰、广西及福建产金线兰差异分析, 以及有线及无线金线兰的差异分析。2010年, F. Zhang等<sup>[22]</sup>利用ISSR标记分析了台湾银线兰5年继代苗的遗传稳定性。尽管金线兰已成为近年药用植物研究的热点, 但针对不同地域金线兰野生资源的较为全面的分子标记分析直到近两年才见报道。2012年, 吴佳溶<sup>[23]</sup>对源自10个不同地理种源的金线兰种质进行了SRAP分子标记分析, 发现台湾银线兰可与其他金线兰种质资源区分开来, 并且广西金线兰与南靖及福建其他地区金线兰种质有较大的差异。2013年, 秦朋<sup>[24]</sup>利用12条ISSR引物对源自6个地区的21份野生及组培的金线兰及近缘种资源进行了亲

缘关系分析, 发现不同材料间的亲缘关系与形态特征及地缘关系相关, 其中三明地区的野生资源被单独分在一组。

此前, 本课题组从福建、云南、江西、广西、台湾等地收集不同类型的金线兰及其近缘种资源, 通过形态特征观察发现, 仅单一地区来源的金线兰资源就在叶形、叶脉色、叶背色、叶背柔毛等方面存在丰富的类型, 而源自不同地区的资源又较难仅从外观性状上鉴别。此外, 在金线莲市场中, 对一些品种资源的来源还存在争议, 如福建主要栽培种的卵圆急尖、金红色叶脉的金线兰就存在福建来源与广西来源问题。鉴于此, 本研究通过收集福建、云南、江西、广西等地的野生金线兰以及主要栽培品种资源, 并利用ISSR分子标记通用性、重复性强、操作简单、多态性丰富的优点<sup>[25]</sup>, 对源自不同地区的野生及主要栽培种金线兰种质资源进行亲缘关系和遗传多样性分析, 为了解不同地区野生资源是否存在近缘种间的基因交换, 还加入少量同属近缘种资源。本研究旨在揭示不同地区野生及主要栽培种金线兰亲缘关系及遗传多样性差异, 为金线兰种质资源的有效保护和合理利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验所用的材料为从福建、云南、广东、广西、台湾等地收集的50份金线兰及近缘种资源(表1), 其中组培苗均由茎段诱导, 单一来源的组培苗均视为同一样本。所有材料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, 各材料对照《中国植物志》<sup>[17]</sup>描述初步确认其分类。形态特征描述参照中国植物志, 初步将叶形分为卵圆渐尖、卵圆急尖; 叶脉色分为淡红、金红、无及白色; 叶背色分为紫红、淡红及绿色; 叶背柔毛按量的多少分为光滑、少量及丰富(图1)。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组DNA的提取** 采用CTAB法提取总DNA, 具体步骤为: 取新鲜的叶片0.5g, 在液氮中迅速研磨成粉末, 转入2mL离心管中, 加入600 $\mu$ L 65 $^{\circ}$ C预热的2 $\times$ CTAB提取缓冲液(2%CTAB, W/V, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, pH=8.0, 100mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 2% B-巯基乙醇V/V), 迅速混匀, 置于65 $^{\circ}$ C水浴1h, 期间每隔10~15min摇动1次; 冷却, 4 $^{\circ}$ C 8000 r/min离心10min; 取上清液, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1),

表 1 金线兰及近缘种来源及特征描述

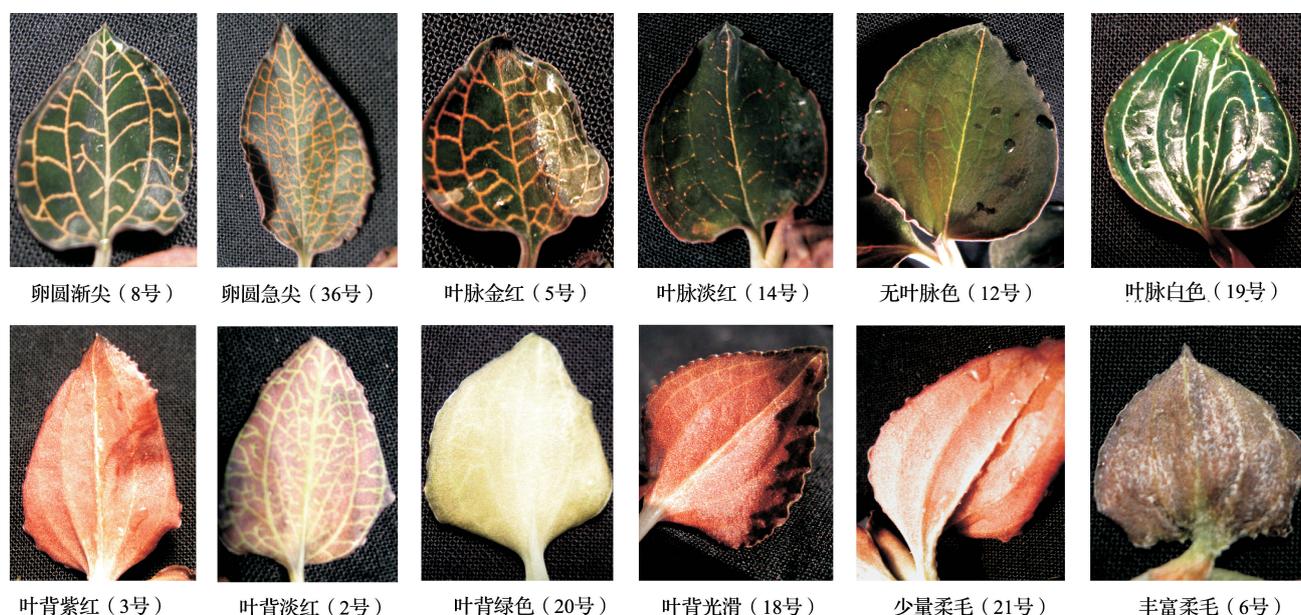
Table 1 The origin and morphological detail of *A. roxburghii* and it's related species

编号 No.	来源 Source	材料类型 Type	形态特征 Morphological detail			
			叶形 Leaf shape	叶脉色 Vein color	叶背色 Leaf back color	叶背柔毛 Leaf back puberulent
1	福建省沙县虬江街道镇头村野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	光滑
2	福建省武平县金线兰(福建省南平林业技术职业学院提供组培苗)(LY)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	少量
3	福建省沙县虬江街道镇头村野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	光滑
4	台湾银线兰(福建省南平林业技术职业学院提供组培苗)(TW)	<i>A. formosanus</i>	卵圆渐尖	白色	紫红	光滑
5	福建省德化县大铭乡野生金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
6	海南省金线兰(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供组培苗)(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	丰富
7	福建省沙县南阳乡竹山村野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	少量
8	福建省沙县南阳乡竹山村野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	少量
9	台湾银线兰(福建省永安永安市黄泥家有限责任公司提供组培苗)(TW)	<i>A. formosanus</i>	卵圆渐尖	白色	紫红	光滑
10	福建省沙县富口镇野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	淡红	紫红	光滑
11	福建省沙县富口镇野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	淡红	紫红	光滑
12	福建省沙县富口镇野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	光滑
13	福建省沙县富口镇野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	光滑
14	福建省沙县富口镇野生金线兰(SX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	光滑
15	福建省建宁县溪源乡野生金线兰(TN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	无	紫红	中等
16	福建省连城冠豸山野生金线兰(LY)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	少量
17	福建省龙岩红霞种金线兰(福建省尤溪县科技局提供组培苗)(LY)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	少量
18	福建省尤溪县梅仙镇野生金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
19	台湾银线兰(福建省尤溪县科技局提供组培苗)(TW)	<i>A. formosanus</i>	卵圆渐尖	白色	紫红	光滑
20	台湾银线兰绿色突变株(福建福建省热带作物研究所提供组培苗)	<i>A. formosanus</i>	卵圆渐尖	白色	绿	光滑
21	台湾银线兰(福建福建省热带作物研究所提供组培苗)(TW)	<i>A. formosanus</i>	卵圆渐尖	白色	紫红	光滑
22	福建南靖广西种金线兰(福建福建省热带作物研究所提供组培苗)	<i>A. formosanus</i>	卵圆急尖	金红	淡红	光滑
23	福建南靖福建种金线兰(福建省热带作物研究所提供组培苗)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	光滑
24	福建省泰宁县朱口镇金线兰(TN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	光滑
25	福建省泰宁县朱口镇金线兰(TN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	光滑
26	福建省泰宁县朱口镇金线兰(TN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	丰富
27	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	少量
28	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
29	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
30	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	少量
31	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	少量
32	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	无	紫红	丰富

表 1(续)

编号 No.	来源 Source	材料类型 Type	形态特征 Morphological detail			
			叶形 Leaf shape	叶脉色 Vein color	叶背色 Leaf back color	叶背柔毛 Leaf back puberulent
33	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
34	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	少量
35	福建省德化县大铭乡金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	紫红	少量
36	广东省惠州市金线兰(广东省惠州农业学校提供组培苗)(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	光滑
37	广西省河池市野生滇越金线兰(GX)	<i>A. chapaensis</i>	卵圆急尖	淡红	淡红	少量
38	广西省河池市野生金线兰(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	淡红	淡红	少量
39	广西省河池市野生金线兰(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	淡红	淡红	少量
40	广西省河池市野生金线兰(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	白色	紫红	光滑
41	江西省九连山野生金线兰(JX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	少量
42	江西省九连山野生金线兰(JX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	淡红	丰富
43	广西省河池市野生金线兰(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	淡红	淡红	少量
44	云南省昆明市野生金线兰(YN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	淡红	紫红	光滑
45	云南省文山市野生金线兰(YN)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	淡红	光滑
46	云南省文山市野生滇南开唇兰(YN)	<i>A. burmannicus</i>	卵圆渐尖	白色	绿	光滑
47	云南省文山市野生齿唇兰(YN)	<i>A. lanceolatus</i>	卵圆急尖	无	绿	光滑
48	广西百色市野生金线兰(GX)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆急尖	金红	紫红	光滑
49	福建省南靖县野生金线兰	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	光滑
50	福建省德化县大铭乡野生金线兰(DH)	<i>A. roxburghii</i>	卵圆渐尖	金红	紫红	少量

括号字母内用于种群分组分析。DH:福建德化;LY:福建龙岩;SX:福建沙县;TN:福建泰宁;GX:广西(广东、海南);JX:江西;TW:台湾;YN:云南  
Letters in brackets were used for population analysis. DH: Fujian Dehua, LY: Fujian Longyan, SX: Fujian Shaxian, TN: Fujian Taining, GX: Guang( Guangdong, Hainan), JX: Jiangxi, TW: Taiwan, YN: Yunnan



括号内编号同表 1, 下同

Codes in brackets as described in table 1, the same as below

图 1 金线兰及近缘种资源形态特征

Fig. 1 Morphological detail of *A. roxburghii* and its related species

振荡混匀 10 min;8000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 3/4 体积的异丙醇,混匀后 -20 °C 静置 30 min;8000 r/min 离心 5 min,70% 乙醇洗 2 次;自然风干后加 30 ~ 50  $\mu$ L 1  $\times$  TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA),室温静置 2 h,使 DNA 充分溶解;每管内加 1 mg/mL 的 RNA 酶 1  $\mu$ L,37 °C 下消化 30 min,65 °C 水浴处理 10 min 使酶失活,-20 °C 保存备用。

**1.2.2 ISSR 引物的筛选及 PCR 扩增** 随机选择 3 个金线兰样本对 100 条 ISSR 引物进行初步筛选,筛选出清晰、重复性好的 ISSR 引物,再使用所有金线兰种质资源的 DNA 样本进行进一步引物筛选,筛选出条带丰富清晰的 ISSR 引物 9 条作为正式扩增的引物。ISSR-PCR 扩增反应体系:10  $\times$  PCR buffer (plus  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L,dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5  $\mu$ L,引物 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L,*Taq* (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 19.8  $\mu$ L。PCR 反应程序:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 45 s,依照引物 *T<sub>m</sub>* 值退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,40 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,拍照。本试验所用的 100 条 ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学公布的引物,由上海生物工程有限公司合成。*Taq* DNA 聚合酶、10  $\times$  PCR Buffer、dNTP 均购自宝生物 (TAKARA) 公司。

**1.2.3 数据统计与分析** 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,利用人工方法进行统计,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 NTSYS 2.10e 软件进行分析,采用 SAHN 进行聚类分析,生成 UPGMA (un-weighted pair group method with arithmetic mean) 聚类图。利用 POPGENE 1.32 分析不同地域类群间等位基因数 (*N<sub>a</sub>*, observed number of alleles)、有效等位基因数 (*N<sub>e</sub>*, effective number of alleles)、Nei's 基因多样性 (*H*, Nei's gene diversity)、Shannon 信息指数 (*I*, Shannon Information index)、多态性位点率 (*PPL*, percentgase of polymorphic loci)、种群遗传分化系数 (*G<sub>st</sub>*, coefficient of genetic differentiation among population)。利用 GenAlEx 6.5 进行分子变异分析 (AMOVA, analysis of molecular variance)。种群的划分依据地理来源,分为福建德化 (15 份)、福建龙岩 (3 份)、福建沙县 (9 份)、福建泰宁 (3 份)、广西 (广东、海南) (8 份)、江西 (2 份)、台湾 (4

份)、云南 (4 份) 8 个类群,其中 4 个类群为福建野生种群 (表 1)。

## 2 结果与分析

### 2.1 ISSR 标记扩增结果

从 100 条 ISSR 引物中筛选出 9 条条带丰富、清晰的 ISSR 引物 (表 2)。利用这些引物对 50 份金线兰材料进行 ISSR-PCR 扩增。结果表明,9 条引物共扩增条带 156 条,其中多态性条带 155 条,多态性比率达 99.36%,单条引物扩增的多态性条带数在 12 ~ 23 之间,平均 17.3 条,其中扩增出最多条带的引物是 I36,共扩增出 23 条条带,ISSR 扩增产物的分子量大多在 200 ~ 3200 bp 之间。其中,引物 I08 能在福建、江西、广东、海南、广西百色、云南文山金线兰以及台湾银线兰种质扩增 500 bp 左右的亮带,并与广西省河池市及同属其他种质资源区分开来 (图 2)。引物 I36 能在台湾银线兰中扩增 2000 bp、1000 bp 的亮带,能与他金线兰及同属其他种质资源区分开来。二者配合可以用于金线兰资源的快速鉴定,但在针对各省各地区金线兰种质较难以通过单一引物的条带进行细分。

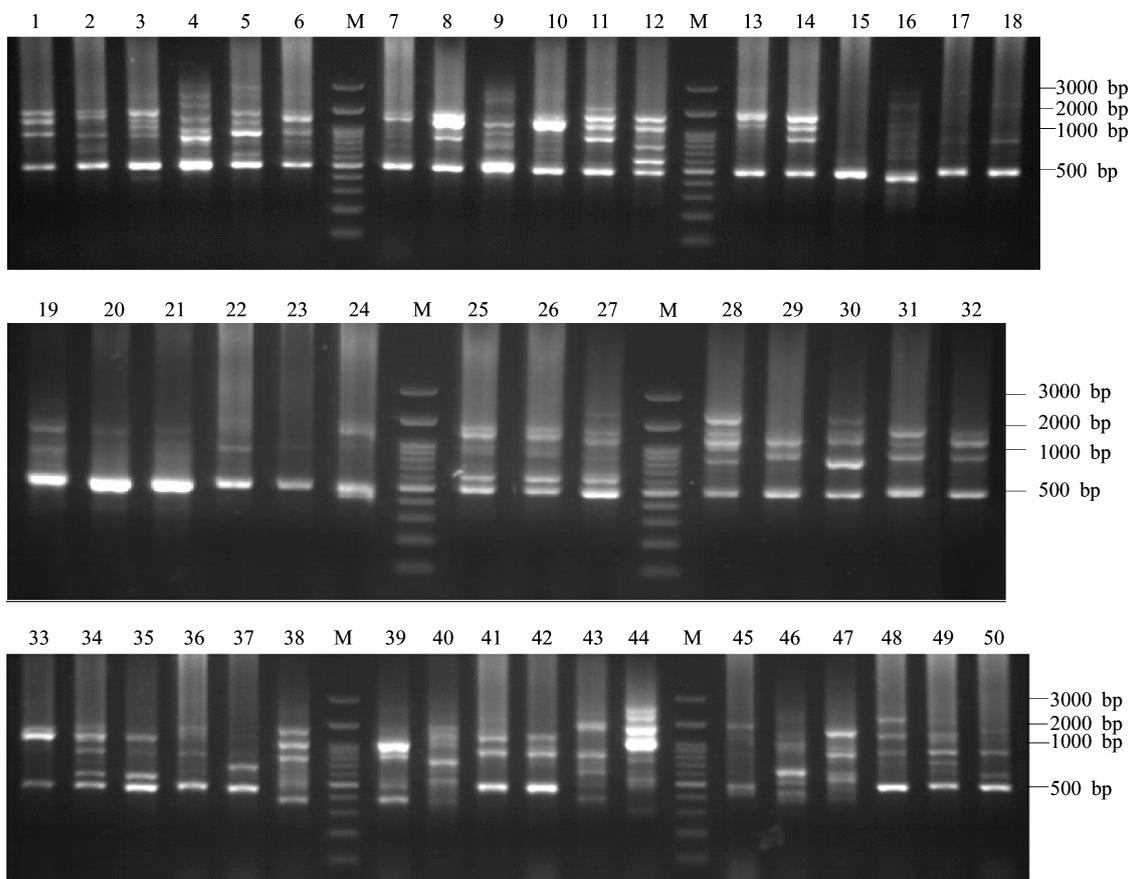
表 2 金线兰及近缘种 ISSR 引物及 PCR 扩增情况

Table 2 Results of PCR amplification of ISSR primers in *A. roxburghii* and it's related species

引物 Primer	序列(5'-3') Sequece(5'-3')	退火温度(°C) <i>T<sub>m</sub></i>	条带数 Bands	多态性率(%) Polymorphic rate
I08	(Ag)8C	54.59	15	100
I36	(Ag)8YA	53.88	23	95.6
I41	(gA)8YC	56.16	12	100
I42	(gA)8Yg	56.16	15	100
I55	(AC)8YT	53.88	19	100
I56	(AC)8YA	53.88	15	100
I66	(CTC)6	61.86	17	100
I73	(gACA)4	51.55	21	100
I80	(ggAgA)3	53.57	19	100

### 2.2 金线兰及其近缘种种质个体间聚类分析

PCR 扩增结果采用 Excel“0”、“1”记录后,使用 NTSYS 2.10e 软件分析其遗传相似性,得到 UPGMA 亲缘关系的树状图 (图 3)。结果表明,资源间相似系数介于 0.56 ~ 0.90 之间,在相似系数为 0.65 处,46 号开唇兰属植物、37 号滇越金线兰分别被单独分为 D 大类与 B 大类,源自云南文山与广西河池的资源归为 C 大类,而台湾银线兰与产自福建、江西、海南、广东、广西百色资源分为 A 大类,表明云南、广



M: DNA marker, 编号 1~50 同表 1, 下同

M: DNA marker, Code1-50 as discribed in the table 1, the same as below

图 2 引物 I08 扩增 50 份金线兰及其近缘种种质资源的 ISSR 图谱

Fig. 2 ISSR profile amplified by primer I08 on *A. roxburghii* and relative species

西金线兰资源虽在外观上与福建、江西等地金线兰较为接近,但可能存在较大的遗传距离,同时台湾银线兰与金线兰虽为不同种,但可能具有相对较近的亲缘关系。A 大类在相似系数为 0.69 处,编号为 4 号与 9 号的 2 份台湾银线兰被区分开来,同时编号为 19、20、21 号的 3 份台湾银线兰被聚类在第 III 亚类中,在相似系数为 0.71 处进一步细分,可将台湾银线兰与不同来源的金线兰种质资源区分开来,并形成 5 个小亚类。

第 I 亚类包含 1、2 小亚类,由 22 份种质资源构成。1 小亚类由源于福建沙县的 9 个野生种质、2 号福建武平、5 号德化以及 6 号的海南 12 份种质资源构成,其中沙县野生种质资源仅分布于 1 小亚类,沙县野生资源中的 7、12、14 号资源为无线类型,这 3 份资源没有单独聚为一类,而是与其他有线资源分布在聚类图末端。2 小亚类由 25、26 号福建泰宁、41、42 号江西九连山,以及 27~32 号

福建德化 11 份种质资源构成,其中,31、32 号资源为无线类型,从聚类图中可知,与源自福建沙县的种质资源不同,31、32 号无线资源与同源自德化的 27~30 号有线资源有较远的亲缘关系,并且这个距离大于 27~30 号有线资源与泰宁、及九连山有线资源的距离。

第 II 亚类包含 3、4 小亚类,由 7 份种质资源构成。3 小亚类均由叶卵圆形、叶脉金红色的 33~35 号福建德化野生单株构成。其中,33 号叶背光滑的类型与 34、35 号叶背少量柔毛的类型形成较远的亲缘关系;4 小亚类由 36、48、49、50 号资源构成,其中 49 号福建南靖及 50 号福建德化资源有较近的亲缘关系,同 36 号广东惠州、48 号广西百色资源之间相关性小。

第 III 亚类仅由 5 小亚类构成,由 8 份资源构成,其中福建建宁 15 号、福建连城 16 号以及福建红霞种 17 号资源有较近的亲缘关系;福建南靖的广西

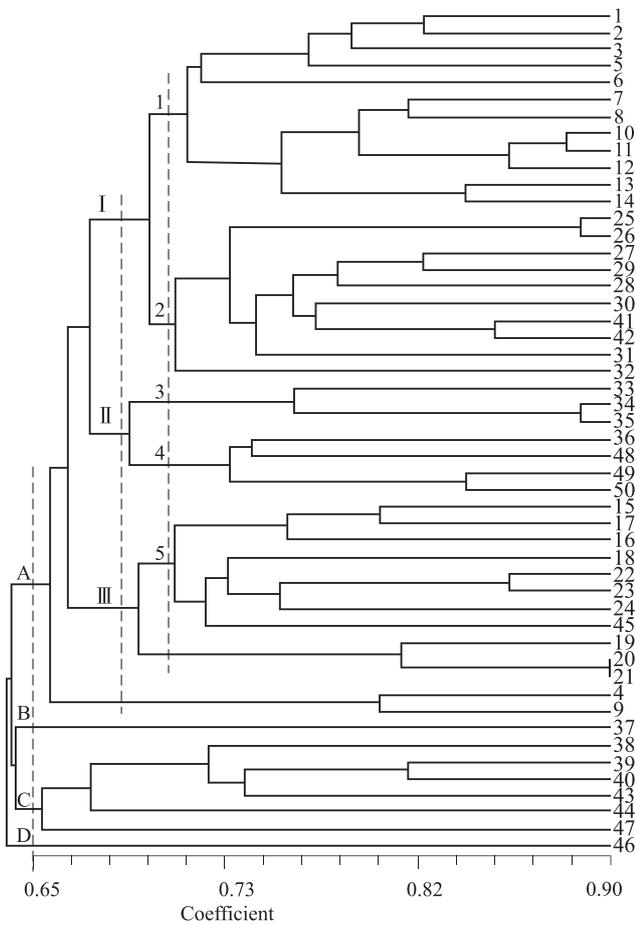


图 3 金线兰及其近缘种 UPGMA 聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of *A. roxburghii* and relative species by UPGMA method

栽培种 22 号、福建栽培种 23 号亲缘关系较近,同时与福建泰宁无线类型资源 24 号接近,而源自云南昆明的 45 号资源并没有依地理距离单独分为一类,而

表 3 金线兰及其近缘种种群内基因多样性分析

Table 3 Genetic diversity analysis within the populations of *A. roxburghii* and relative species

种群 Population	等位基因数 <i>N<sub>a</sub></i>	有效等位基因数 <i>N<sub>e</sub></i>	Nei's 基因多样性 <i>H</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>	多态性位点率 (%) <i>PPL</i>
福建德化	1.782(0.414)	1.481(0.368)	0.279(0.188)	0.417(0.259)	78.21
福建龙岩	1.455(0.500)	1.364(0.400)	0.202(0.222)	0.290(0.318)	45.51
福建沙县	1.603(0.504)	1.363(0.365)	0.215(0.197)	0.323(0.285)	59.62
福建泰宁	1.423(0.496)	1.330(0.409)	0.183(0.218)	0.263(0.311)	42.31
广西(广东、海南)	1.724(0.448)	1.455(0.358)	0.267(0.188)	0.399(0.267)	72.44
江西	1.147(0.356)	1.147(0.356)	0.0737(0.178)	0.102(0.247)	14.74
台湾	1.500(0.502)	1.372(0.397)	0.210(0.215)	0.305(0.310)	50.00
云南	1.712(0.455)	1.524(0.372)	0.297(0.196)	0.432(0.281)	71.15
总体	2.000(0.080)	1.555(0.344)	0.322(0.162)	0.484(0.205)	99.36

括号内数据代表标准差 Numbers in brace indicate *SD*

与 22、23、24 号资源较为接近。值得注意的是,5 小亚类 8 份资源中的 5 份为卵圆急尖的叶型,此外,第 C 大类均为卵圆急尖的叶型,而 1、2、3、4 小亚类各分布 1 个卵圆急尖类型,其余均为卵圆渐尖类型,台湾银线兰均为卵圆渐尖类型。

从以上结果可知,I、II、III 3 个亚类的金线兰种质资源在地理区划上没有严格的界限,福建野生资源在 3 个亚类中均有分布,并且海南资源出现在 I 亚类,广东、广西资源出现在第 II 亚类,云南资源出现在第 III 亚类,表明在这个大类中,源自不同地区金线兰种质间可能存在类似的遗传基因。值得注意的是,源自福建地区的野生资源没有出现在这 3 个亚类的之外,表明福建地区野生金线兰可能不存在与同属其他种质的交流,而有线与无线金线兰应属于同种的不同表型。同时,由于福建野生资源与海南、广西及云南资源并没有明显地区分开来,也使得“广西种”的福建来源与广西资源来源问题的解决仍有待进一步研究。同时,源自不同地区的尖叶类型金线兰倾向于聚类于第 5 小亚类和第 C 大类。

2.3 群体遗传多样性分析

为了解源自不同地区野生金线兰及其近缘种种质多态性差异,在 50 份样本中去掉突变种(20 号)及部分来源不明的组培材料(21、22 及 49 号)构成 8 个种群(其中福建野生种群 4 个,见表 1),通过 POPGENE 分析发现(表 3),种群遗传分化系数(*G<sub>st</sub>*)方面,8 个种群 *G<sub>st</sub>* = 0.328,而福建地区 4 个种群 *G<sub>st</sub>* = 0.240;Nei's 基因多态性指数(*H*)方面,8 个种群 *H* = 0.322,福建地区 4 个种群样本 *H* = 0.295。

不同地区种群中,云南种群最高, $H = 0.297$ ;福建德化种群次之, $H = 0.279$ ;江西种群最低, $H = 0.0737$ ,但不同种群所收集资源数量对数值影响较大。多态性位点比率方面,样本总体  $PPL = 99.36\%$ ,福建地区4个种群样本  $PPL = 87.18\%$ ,同时源自福建德化的种群多态性位点比率达  $78.21\%$ ,高于云南与广西的  $72.44\%$  和  $71.15\%$ 。基于 *Nei's* 基因多态性指数建立种群树状图显示(图4),种群间的划分也没有严格依照地理距离水平进行划分,福建、江西与广西种群没有区明显分开来。*AMOVA* 分析表明,样本总体种群内变异指数  $87\%$ ,种群间变异指数  $13\%$ ,进一步表明不同群体间可能存在基因交流。

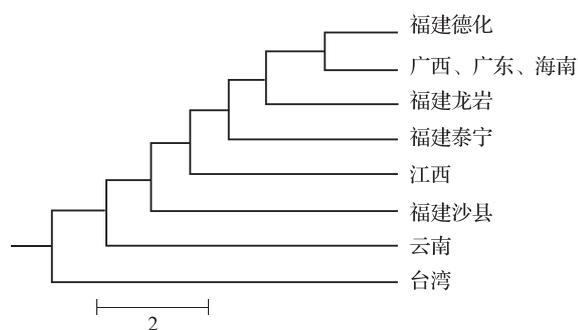


图4 金线兰及近缘种资源种群间UPGMA聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of *A. roxburghii* and relative species populations by UPGMA method

### 3 讨论

金线兰是我国珍稀药用植物,野生资源稀少,对金线兰野生资源的收集难度较大。在资源的收集过程中发现,尽管野生金线兰较为稀少,但金线兰在我国分布广泛,在不同群落及同一群落内均存在丰富的形态类型,对不同群落间及同群落内不同的亲缘关系分析将为金线兰的材料鉴定、资源保护及开发应用提供参考。此前,尽管已有关于金线兰分子标记的报道,但针对野生群落间及群落内不同形态类型间的亲缘关系分析还未见报道。本研究收集了源自不同地区不同形态的金线兰及近缘种资源,发现包括福建、广西、云南等地区收集和金线兰资源均存在不同叶脉色、不同叶背色及不同丰富程度的叶背柔毛的形态类型。

本试验利用9条ISSR引物从50份金线兰及其近缘种种质中获得156条清晰条带,其中,引物108与136配合,可以用于金线兰与其他近缘属的区分,但不同地区来源的金线兰区分难度较大。根据个体间UPMGA聚类分析发现,源自福建地区的金线兰

与江西、海南、广东、广西百色地区金线兰资源未依地理差异单独聚类,利用群体间 *Nei* 基因多样性聚类分析结果也显示,台湾种群被聚类在最外层,其次为云南、福建沙县种群,而德化种群与广西种群最为接近。在秦朋<sup>[24]</sup>分析不同地区21个的样本也发现,广西、云南与三明、永安、福州的野生个体聚在一个分支,而广东韶安野生个体与台湾银线兰聚在另一个分支,不同地区野生个体遗传差异与地理距离上的相关性较小。而胡珊梅等<sup>[26]</sup>通过RAPD发现,福建金线兰与广西金线兰遗传距离仅为0.2,而广西与台湾银线兰为0.9,福建与广西材料表现较近亲缘关系。这些现象表明,金线兰种质资源在不同地区间有可能存在较为类似的种质。由于金线兰资源稀少,生长速率慢,对环境要求严格,其野生状态下的分布为非连续的。但在本试验及其他金线兰分子标记报道中,出现了福建、云南、广西种质间较近的亲缘关系现象,而此前预期的不同地区来源的资源独立分类的现象并没有出现,表明除了因人工栽培产生的基因交流外,亦可能存在同其他兰科植物类似的因种子细小产生种群间远距离的传播<sup>[27]</sup>而导致的基因交流。

种群的多样性关系到物种生存与进化,广布物种常较濒危物种具有更高的基因多样性<sup>[28-30]</sup>。目前,有关金线兰及近缘种种群间多样性分析报道较少,仅见秦朋<sup>[24]</sup>分析显示,21份不同地区来源样本总体( $H = 0.300, PPL = 94\%$ )。本试验中,8个种群  $G_{st} = 0.328, H = 0.322, PPL = 99.36\%$ ,福建地区的4个野生种群  $G_{st} = 0.240, H = 0.295, PPL = 87.18\%$ ,其中,基因多样性指数( $H$ )是种群多样性丰富程度的重要参考指标,已知部分兰科植物多样性指数中无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana*)  $H = 0.398$ <sup>[31]</sup>、流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum*)  $H = 0.3227$ <sup>[32]</sup>、铁皮石斛(*D. officinale*)  $H = 0.269$ <sup>[27]</sup>。在本试验中,金线兰及近缘种总体多样性  $H = 0.322$ ,处于兰科植物的中等水平,其中福建地区野生金线兰多样性水平  $H = 0.295$ ,处在流苏石斛与铁皮石斛之间,具有相对较高的多样性。但本试验对云南、广西等地区的资源收集较少,且混入同属其他种质,影响了对该地区的多样性评估。种群遗传分化系数( $G_{st}$ )是评价种群遗传结构的重要指标,已知部分兰科植物种群遗传分化系数流苏石斛  $G_{st} = 0.744$ 、无距虾脊兰  $G_{st} = 0.55$ 、*Piperria yadonii*  $G_{st} = 0.42$ 、天麻  $G_{st} = 0.27$ 、铁皮石斛  $G_{st} = 0.27$ 、湖北春兰  $G_{st} = 0.22$ 。X. Qian 等<sup>[31]</sup>统计31种兰科植物平

均种群分化系数约为 0.39。本试验中,样本总体  $G_{st} = 0.328$ , 福建地区野生金线兰  $G_{st} = 0.24$ , 处于兰科植物较低的水平, 种群间分化系数较低, 这也与 UPMGA 聚类结果一致。AMOVA 分析表明, 样本总体种群内变异指数 87%, 种群间变异指数 13%, 参照其他物种试验结果<sup>[36-37]</sup>, 低的种群间变异指数进一步表明不同群体间可能存在基因交流。这可能与金线兰虽为多年生植物, 但并不通过营养生长的方式进行繁殖有关<sup>[38]</sup>。野生状态下的金线兰多以单株而非丛状的形式分布, 并较易实现开花结果, 其主要的繁殖形式可能为种子繁殖。兰科植物种群间的基因交流可以通过花粉与种子进行, 但受限于传粉昆虫的活动范围, 较难通过花粉进行远距离的传播, 同时兰科植物多具有种子多而细小的特点, 借助台风的力量可以进行较大范围的传播<sup>[27]</sup>, 这种远距离的传播有利于不同地理群落间的基因交流。但值得注意的是, 台湾银线兰在台湾及琉球地区分布, 但并未在仅 200 ~ 300 km 外的福建地区被发现, 而福建与江西、广东、广西种质资源是否能够利用种子传播进行种群间的基因交流仍有待更多试验数据的收集和探讨。

此外, 此前有关金线兰在叶腹有无金色叶脉(有线与无线)的分类上仍存在争议, 如在有无叶脉色的金线兰方面, 民间将无线类型金线兰称为公、有线金线兰称为母, 郑纯等<sup>[19]</sup>认为, 有线与无线为同一金线兰种质的不稳定表现, 在显微及理化分析方面二者存在一致性<sup>[19]</sup>。而胡珊梅等<sup>[21]</sup>通过 RAPD 分子标记发现二者存在较大差异。在本试验中, 源自同一地区的有线与无线的金线兰资源在 UPMGA 聚类分析中并没有被归为单独的类型, 而是与相同来源地的不同单株聚类在进化树末端, 表明有线与无线的金线兰基因型较为相似, 此结果亦与郑纯等<sup>[19]</sup>结果一致。值得注意的是, 有线与无线虽存在“线不明显”的过渡类型, 这些特征性状在本实验室中可以通过离体保存方式稳定保存下来。此外, 罗晓青<sup>[38]</sup>在贵州首次发现存在台湾银线兰分布, 而在《中国植物志》中<sup>[17]</sup>, 仅记载了中国台湾以及琉球地区有分布。在本试验中, 广西河池及云南文山地区发现存在白色叶脉的金线兰类型, 但分子标记显示, 本试验中所收集广西与云南白色叶脉类型的资源与台湾银线兰有较大的遗传距离。

#### 参考文献

[1] 陈泽宇. 珍稀草药金线莲[J]. 中国野生植物, 1992(2): 23-24  
 [2] Shih C C, Wu Y W, Hsieh C C, et al. Effect of *Anoectochilus for-*

*mosanus* on fibrosis and regeneration of the liver in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(9): 620-625  
 [3] Fang H L, Wu J B, Lin W L, et al. Further studies on the hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus*[J]. Phytother Res, 2008, 22(3): 291-296  
 [4] Du X M, Sun N Y, Hayashi J, et al. Hepatoprotective and antihyperlipidosis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*[J]. Phytother Res, 2003, 17(1): 30-33  
 [5] Lin C C, Huang P C, Lin J M. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*[J]. Am J Chin Med, 2000, 28(1): 87-96  
 [6] Zhang Y, Cai J, Ruan H, et al. Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(2): 141-145  
 [7] Liu Z L, Liu Q, Xiao B, et al. The vascular protective properties of kinsenoside isolated from *Anoectochilus roxburghii* under high glucose condition[J]. Fitoterapia, 2013, 86: 163-170  
 [8] Kuan Y C, Wu T J, Kuo C Y, et al. Molecular cloning of a new immunomodulatory protein from *Anoectochilus formosanus* which induces B cell IgM secretion through a T-independent mechanism [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(6): e21004  
 [9] Yang L C, Wu J B, Lu T J, et al. The prebiotic effect of *Anoectochilus formosanus* and its consequences on bone health[J]. Br J Nutr, 2013, 109(10): 1779-1788  
 [10] Masuda K, Ikeuchi M, Koyama T, et al. Suppressive effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteoclast formation in vitro and bone resorption in vivo[J]. J Bone Miner Metab, 2008, 26(2): 123-129  
 [11] Shih C C, Wu Y W, Lin W C. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 77(2-3): 233-238  
 [12] Wang L F, Lin C M, Shih C M, et al. Prevention of cellular oxidative damage by an aqueous extract of *Anoectochilus formosanus*[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1042: 379-386  
 [13] Wang S Y, Kuo Y H, Chang H N, et al. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* hayata[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(7): 1859-1865  
 [14] Shih C C, Wu Y W, Lin W C. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by the aqueous extraction of *Anoectochilus formosanus*[J]. Am J Chin Med, 2003, 31(1): 25-36  
 [15] Shyur L F, Chen C H, Lo C P, et al. Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by phytochemicals from *Anoectochilus formosanus*[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(6): 928-939  
 [16] 蔡金艳. 金线莲主要成分 kinsenoside 的体外抗瘤活性研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2444-2445  
 [17] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 117  
 [18] Cheng K T, Fu L C, Wang C S, et al. Identification of *Anoectochilus formosanus* and *Anoectochilus koshunensis* species with RAPD markers[J]. Planta Med, 1998, 64(1): 46-49  
 [19] 郑纯, 黄以钟. 金线莲文献考证, 原植物及商品调查[J]. 中草药, 1996, 27(3): 169-170  
 [20] Hou B, Tian M, Luo J, et al. Genetic diversity assessment and ex situ conservation strategy of the endangered *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using new trinucleotide microsatellite markers[J]. Plant Syst Evol, 2012, 298(8): 1483-1491  
 [21] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬, 等. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(10): 949-950  
 [22] Zhang F, Lv Y, Dong H, et al. Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a medicinal plant[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(3): 384-388  
 [23] 吴佳溶. 不同地理种源金线莲有效成分含量测定及 SRAP 标

- 记[D]. 福州:福建农林大学,2012
- [24] 秦朋. 金线莲遗传多样性和有效成分分析[D]. 福州:福建农林大学,2013
- [25] 董红霞,柯卫东,黄新芳,等. 基于 ISSR 标记的中国芋种质资源遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(02):286-291
- [26] 胡珊梅,张启国,袁文杰,等. 珍稀中草药金线莲的 RAPD 研究[J]. 中草药,2000,31(12):944-946
- [27] Li X, Ding X, Chu B, 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
- [28] Yu H H, Yang Z L, Sun B, et al. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms[J]. Biochem Syst Ecol, 2011, 39(2):71-78
- [29] 徐刚标,吴雪琴,蒋桂雄,等. 濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(02):255-261
- [30] 陈虎,颜培栋,杨章旗. 海南霸王岭南亚松天然林群落遗传多样性的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(04):706-712
- [31] Qian X, Wang C X, Tian M. Genetic Diversity and Population Differentiation of *Calanthe isoongiana*, a Rare and Endemic Orchid in China[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10):20399-20413
- [32] 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
- [33] 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 Bio China, 2007, 2:419-424
- [34] Wu H F, Li Z Z, Huang H W. Genetic differentiation among natural population of *Gastro elata* (orchidaceae) in Hubei and germplasm assessment of the cultivated populations [J]. Biodivers SCI, 2006, 14:315-326
- [35] George S, Sharma J, Yadon V L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms[J]. Am J Bot, 2009, 96(11):2022-2030
- [36] 沈登锋,薄文浩,徐放,等. 色季拉山不同海拔高度的藏川杨种群遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(4):692-698
- [37] Liu J, Shi S, Chang E, et al. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7):14860-14871
- [38] 罗晓青. 贵州药用植物野生金线莲资源调查[J]. 西南农业学报,2011,24(2):826-828

## 欢迎订阅 2016 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。《作物学报》从 2006—2015 年连续 10 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B类、学术质量建设和 TOP50)”资助。从 2002 年起连续 13 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2013 年被新闻出版广电总局评为“百强科技期刊”，2011 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”，2005 年获“第三届国家期刊奖提名奖”。2008、2011 和 2014 年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2012、2013 和 2014 年被 CNKI 评为“中国最具国际影响力学术期刊”。2009 年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国 60 年有影响力的期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览》(2004、2008 和 2011 年版)登载,《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的首位。据 2014 年 9 月中国科学技术信息研究所发布的 2014 年版《中国科技期刊引证报告-核心版》登载,《作物学报》的“综合评价总分”达 99.2 分,位列 1989 种中国科技核心期刊的首位。

本刊主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

月刊,每期定价 60 元,全年 720 元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部

邮编:100081

电话:(010)82108548

传真:(010)82105793

E-mail: zwx301@caas.cn

网址: <http://zwx.chinacrops.org/>