

· 铁皮石斛种质资源专题 ·

[编者按] 铁皮石斛为名贵珍稀濒危中药,近年产业快速发展,但存在种源不清、道地性阐述不足、质量评价有待完善等问题。约1500年前,南北朝·梁陶弘景《本草经集注》中记载“今用石斛出始兴”,此处的“始兴郡”即指今天广东的韶关地区;北宋官方的《本草图经》,进一步指出石斛“今荆湖、川、广州郡及温、台州亦有之,以广南者为佳。”这里“以广南者为佳”的“广南”即指北宋的“广南路”,当时包括了广南东路(即广东),广南西路(即广西)。由此可见,早在北宋时期,广东、广西、浙江等地已是铁皮石斛的道地产区。明朝官方的《本草品汇精要》则更加明确了石斛的道地产区:“道地广南者为佳”。

在本草考证基础上,课题组近年开展广泛的实地调研,尤其对传统道地产地广东、广西、浙江、安徽、福建、云南等地的野外生境进行了考察,并对发现的野生铁皮石斛的生长习性进行了跟踪观察。通过对不同道地产地的样品 HPLC 特征图谱分析发现,结合本草文献,初步提出了铁皮石斛道地种源可以分为“丹霞铁皮种”“浙江本地种”“铁皮兰种”“云南广南种”等,并针对其中部分含量较高的黄酮苷类特征成分开展了提取、分离和鉴定,发现新西兰牡荆苷 II 可以作为共性的特征成分,体外实验研究表明其具有一定的抗氧化活性,能抑制肿瘤细胞增殖并诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡。

在中国中医科学院中药资源中心的指导下,进一步广泛收集了铁皮石斛主要产区广东、广西、浙江、安徽、福建、云南、四川、贵州等地的样品,根据不同居群的 SSR 指纹图谱初步构建了 DNA 身份证,为铁皮石斛种质资源的遗传多样性研究和道地性溯源奠定基础。

铁皮石斛种质资源 DNA 身份证的构建及遗传相似性分析

余文霞¹, 雷胃熙², 袁媛^{3*}, 吴玉林¹, 顺庆生⁴, 魏刚^{1*}, 胡柳萍¹, 胡菊婷¹, 黄璐琦³

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东省中药研究所, 广州 510006;
3. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700; 4. 上海健康医学院, 上海 200237)

[摘要] 该研究利用中国中医科学院中药资源中心筛选出的4对简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)引物对铁皮石斛主产区9个产地29个居群的铁皮石斛样品进行检测,4对SSR引物分别扩增出5,7,4,3条多态性带,根据不同居群的SSR指纹图谱构建DNA身份证。聚类分析可将来自29个居群样本分成四大类,且表现出较好的地域相关性,其中来自云南、贵州、四川的铁皮石斛样品聚为一类,来自安徽和广西的铁皮石斛单独聚为一类,来自广东丹霞、浙江永康、浙江乐清及泰宁的样品聚为一类。采用PopGene(version 1.32)软件包对29个铁皮石斛居群进行遗传相似性分析,相似系数变异在0.4034~1.0。基于遗传相似系数可将不同居群铁皮石斛的遗传一致性分成A,B,C共3个等级,地理位置相近或生长地貌相似的居群遗传相似性系数较高,表明其遗传背景较为一致。本研究为铁皮石斛的品种鉴别及优良品种选育提供参考信息。

[关键词] 铁皮石斛; DNA 身份证; 简单重复序列; 遗传相似系数

[中图分类号] R284.1;R282.5;R289;R22 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)01-0016-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190161

Establishment of DNA Fingerprints and Genetic Similarities Analysis of *Dendrobium officinale*

YU Wen-xia¹, LEI Zhou-xi², YUAN Yuan^{3*}, WU Yu-lin¹, SHUN Qing-sheng⁴, WEI Gang^{1*},
HU Liu-ping¹, HU Ju-ting¹, HUANG Lu-qi³

[收稿日期] 20180831(003)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008);中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 余文霞,在读硕士,从事中药创新药物与指纹图谱分析研究,E-mail:1250262617@qq.com

[通信作者] *袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com;

*魏刚,研究员,博士生导师,从事中药创新药物研究与指纹图谱分析、石斛类药材规范研究,Tel:020-39358519,E-mail:weigang021@163.com

- (1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Guangdong Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
4. Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 200237, China)

[Abstract] This study adopted the 4 pairs of simple sequence repeats (SSR) primers selected by National Resource Center for Chinese Meteria Medica (CACMS) to detect 29 populations of *Dendrobium officinale* samples from 9 main places of production; 5, 7, 4 and 3 polymorphism bands were amplified from these 4 pairs of SSR primers. The DNA identities of different populations were constructed by SSR. The 29 *D. officinale* populations could be divided into 4 classes. The clustering result was related to the places of production. Samples from Yunnan, Guizhou, Sichuan provinces were classified into one category, while samples from Anhui and Guangxi provinces were classified into another category. Samples from Guangdong Danxia, Zhejiang Yongkang, Zhejiang Leqing and Taining belonged to a category. PopGene (version 1.32) software was applied to calculate the genetic similarity of the 29 *D. officinale* populations. The similarities was between 0.403 4 and 1.0. Based on the genetic similarity, the genetic consistency included three classes, A, B and C. Samples with a similar geographical location and landform environment have higher genetic similarities, which indicate the same genetic background. This paper provides reference information to study the identification, selection and breeding of good varieties.

[Key words] *Dendrobium officinale*; DNA molecular identities; simple sequence repeats (SSR); genetic similarities

铁皮石斛是我国传统名贵中药,为兰科石斛属植物^[1]。主要分布于云南、广西、广东、贵州、浙江、四川、安徽等地^[2-3]。由于自然条件下铁皮石斛的种子萌发率低以及人工长期过度采挖,导致野生资源几近枯竭^[4],故人工栽培品在市场占据主流地位,但各地间引种混乱,导致种质混杂、多糖含量存在明显差异等现象^[5]。种质资源又称遗传资源,是培育和推广优良品种的重要材料,种质资源遗传特征稳定一致也是保障原药材质量及临床疗效的重要前提^[4]。故有必要对铁皮石斛的遗传多样性进行深入研究,以便更好地利用、保护铁皮石斛的种质资源。前人用不同的分子标记方法对铁皮石斛不同居群之间的亲缘关系进行研究,构建树状图和聚类图,将不同来源的铁皮石斛分成不同的类群。文献中应用目标起始密码子多态性分子标记(start codon targeted polymorphism, SCoT)对浙江的 20 个铁皮石斛样品进行分析,发现不同来源的铁皮石斛人工栽培种存在较大的遗传差异^[6];利用随机扩增微卫星多态性(random amplified microsatellite polymorphism, RAMP)分子标记技术对云南和广西的 9 个居群进行聚类分析,将其分为三大类,聚类结果表现出较好的地域相关性^[7]。徐蕾等^[8]利用 SSR

标记对来自云南、浙江、广东、广西的 36 份铁皮石斛样品进行遗传多样性分析,并将其分为三大类群;赵瑞强^[9]利用 SSR 技术对云南、福建、浙江和广西的 17 个铁皮石斛居群分为四大类;这些研究都表现出了铁皮石斛种质资源的遗传多样性和地域性的相关性,但是每个研究选取的对象都没有收集到铁皮石斛的所有主产地,导致其聚类结果不够完整。

SSR 分子标记因其重复性好、多态性高、操作方便,已经成为动物和植物中最重要的分子标记方法^[10-11],被广泛应用于农作物品种的遗传分析^[4]。本研究通过收集铁皮石斛主要产区广东、广西、浙江、安徽、福建、云南、四川、贵州等主产地的 29 个栽培居群,309 份样品,利用中国中医科学院中药资源中心筛选出来的 4 对重复性高、条带清晰易统计的引物^[12],构建铁皮石斛所有主产区的 SSR 指纹图谱和 DNA 身份证,为铁皮石斛种质资源核酸数据库建设及开展种质资源鉴定与评价奠定基础。

1 材料

1.1 植物材料 本研究收集了广东、广西、浙江、安徽、福建、云南、四川、贵州等 9 个铁皮石斛主要产地的样品。同一个产地收集,不同分布群落为不同居群,总计 29 个居群,其中 28 个居群为成熟植株,

1 个为幼苗,共计 309 份样品,单株取样,用硅胶干燥,样品由上海健康医学院顺庆生教授鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale*,详细信息见表 1。

表 1 铁皮石斛样本情况

Table 1 Information of *Dendrobium officinale* samples

No.	采集地	居群编号	样本数	海拔/m	经度	纬度
1	福建泰宁	TN-1	26	284	116°53'	26°33'
2		TN-2	7	284	116°53'	26°33'
3	广西桂平	GPL	24	50	109°41'	22°52'
4		GPH	24	50	109°41'	22°52'
5	浙江永康	YK-1	6	96	109°41'	22°52'
6		YK-2	6	96	109°41'	22°52'
7		YK-3	6	96	109°41'	22°52'
8		YK-4	6	96	109°41'	22°52'
9		YK-5	6	96	109°41'	22°52'
10		YK-6	6	96	109°41'	22°52'
11	安徽霍山	HS-A-1	6	464	115°52'	31°03'
12		HS-A-2	6	464	115°52'	31°03'
13		HS-A-3	6	464	115°52'	31°03'
14		HS-A-4	6	464	115°52'	31°03'
15		HS-A-5	6	464	115°52'	31°03'
16		HS-A-6	6	464	115°52'	31°03'
17	浙江乐清	ZJ	7	7	120°57'	28°07'
18	贵州独山	GZ	8	16.5	107°17'	25°13'
19	云南文山	YN-1	6	1259	103°43'	23°06'
20		YN-2	6	1259	103°43'	23°06'
21		YN-3	6	1259	103°43'	23°06'
22		YN-4	6	1259	103°43'	23°06'
23		YN-5	6	1259	103°43'	23°06'
24		YN-6	6	1259	103°43'	23°06'
25	四川石棉	SM	60	777.4	101°55'	28°51'
26	韶关丹霞	DX-1	5	362	113°44'42"	25°01'52"
27		DX-3	5	362	113°44'42"	25°01'52"
28		DX-4	5	362	113°44'42"	25°01'52"
29		DX	30	-	-	-

注:由于 DX 居群是组培苗,所以没有海拔和经纬度数据。

1.2 仪器 T100™ Thermal Cycler 型 PCR 仪, PowerPac Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), Neofuge 15R 型高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司),79-1 型磁力加热搅拌器(金坛市中大仪器厂),SHR-10 型数显往复摇床(广州市汇腾科学仪器有限公司),TL-420D 型电控多用恒温水箱(姜堰市天力医疗器械有限公司),BioSpec-nano 型紫外

分光光度计(日本岛津公司),BD-820 型冰柜(广州市穗凌电器有限公司)。

1.3 试剂 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),乙二胺四乙酸(EDTA),甲叉双丙烯酰胺,丙烯酰胺,甘氨酸(广州浩玛生物科技有限公司,批号分别是 20170806, 20160501, 20180508, 20170608, 20180302),硫酸铵、四乙基乙二胺、氢氧化钠、甲醛(天津市鼎盛鑫化工有限公司),异丙醇(天津市致远化学试剂有限公司,批号 20170629),Tris(美国 Sigma 公司,批号 T6060),硝酸银(国药集团化学试剂有限公司,批号 20170801),DNA Taq 聚合酶(康为世纪生物科技有限公司,批号 CW0690M),500 bp DNA Marker(TAKARA 公司,批号 A801D)。

2 方法

2.1 总 DNA 提取 样品采集后用硅胶干燥,取 20~100 mg,按照两步 CTAB 法^[12]提取样品总 DNA。取新鲜铁皮石斛或叶片 100 mg,在研钵中加入液氮研磨成细粉,置于 1.5 mL 离心管中,加入 65 °C 预热的 CTAB 沉淀液 750 μL,充分振荡混匀,65 °C 温育 40 min,低速离心 5 min,弃去上清;再加入 65 °C 预热的 CTAB 提取缓冲液 700 μL,充分振荡混匀,65 °C 温育 2 h;样品冷却至室温后加三氯甲烷-异戊醇(24:1)600 μL,缓慢颠倒混匀约 5 min;7 500 r·min⁻¹离心 10 min,转移上清液至一新离心管中;加入等体积 -20 °C 预冷的异丙醇,混匀,于温度 -20 °C 放置 30 min;1 万 r·min⁻¹离心 15 min,弃上清液;沉淀用 70% 乙醇、无水乙醇各洗涤 1 次,1 万 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清,室温挥干乙醇;无菌高纯水溶解 DNA,备用。进行 DNA 浓度和纯度测定,调整终质量浓度约为 50~100 mg·L⁻¹用于进一步研究。

2.2 PCR 扩增 采用铁皮石斛 4 对多态性高、重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增^[12],引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成,引物序列见下文。PCR 反应体系(25 μL)为 12.5 μL 2 × Taq MasterMix(Dye),10 μmol·L⁻¹引物各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;72 °C 终延伸 2 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,再进行银染检测^[13]多态性条带。

2.3 数据处理 用 Excel 软件统计整理扩增多态性条带,在相同迁移率位置上,有条带的记为“1”,无条带记为“0”。用 PopGene 1.32 软件计算 SSR 位

点的等位基因数 (number of alleles, N_a), Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity), 有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e), Nei's 遗传相似性系数、遗传距离和 Shannon 多样性指数 (Shannon's information index); 用 PIC Calc 软件分析位点多态信息含量 (polymorphism information content, PIC), PIC 计算公式为 $PIC = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 是 i 位点基因频率; 并基于非加权组平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 算法对 29 个居群所有个体进行聚类分析。

3 结果

3.1 铁皮石斛 SSR 的遗传多态性分析 应用 4 对 SSR 引物对 314 株铁皮石斛样品进行 SSR-PCR 扩增, 共检测到 19 条多态性条带, 其中引物 I 可扩增得到 5 个多态性条带, 引物 II 可获得 7 条多态性条带, 引物 III 可获得 4 条多态性条带, 引物 IV 可获得 3 条多态性条带。将相应位置条带转换成为 1/0 矩阵, 并利用 PopGene 1.32 软件进行分析。结果表明, 平均每对引物可检测到 4.75 个多态性条带; 平均有效等位基因数是 1.010 1 ~ 1.993 0, 平均数 1.453 2; Nei's 遗传多样性指数 0.010 0 ~ 0.498 2, 平均数 0.268 5; Shannon's 多样性指数 0.031 5 ~ 0.691 4, 平均数为 0.412 2, 见表 2。

表 2 SSR 引物序列信息及多态性情况

Table 2 SSR primer sequences and diversity information of *Dendrobium officinale*

引物名称	引物序列	PIC	N_a	N_e	H	I
I	F:CCGATCAGAATGCTGTAAC R:CATCTCAAATCCTGTGGC	0.13	10	6	0.149 6	0.262 2
II	F:TGTTCTCCACCCACTCG R:TGTTCCGCAATTTCCCAT	0.26	14	10.9	0.325 1	0.490 7
III	F:TTGCGGAAATCTGAACTT R:CCTCCATCACTACCACCC	0.23	8	5.8	0.276 9	0.427 3
IV	F:ACCAAGGTTGATGAAGGC R:TGAATTTCAATGCCACTTG	0.25	6	4.9	0.323 3	0.459 1

3.2 不同居群铁皮石斛 SSR 遗传多态性分析 对不同居群样品之间的 Nei's 遗传相似性与遗传距离进行计算, 发现其遗传相关系数在 0.403 4 ~ 1.0, 平均遗传相似系数为 0.754 1, 见图 1。使用 UPGMA 算法对 9 个产地, 29 个居群的铁皮石斛样品遗传相关系数进行聚类分析, 见图 2。结果显示 29 个铁皮石斛居群可聚为 4 类, 其中来自云南、贵州、四川的铁皮石斛样品可以聚为一类, 来自安徽的铁皮石斛单独聚为一类, 来自广西桂平样品单独聚为一类, 来自广东丹霞、浙江永康、浙江乐清及泰宁的样品可以聚为一类。

YN1	YN2	YN3	YN4	YN5	SM	YN6	GZ	GPH	GPL	A1	A2	A3	A4	A5	A6	TN1	TN2	DX1	DX3	DX4	DX	ZJ	YK1	YK2	YK3	YK4	YK5	YK6						
1																																		
0.9897	1																																	
0.9888	0.9955	1																																
0.9851	0.992	0.9968	1																															
0.9932	0.9917	0.9965	0.993	1																														
0.9952	0.9936	0.9982	0.9949	0.9982	1																													
0.9233	0.9326	0.9395	0.9455	0.9328	0.9362	1																												
0.9751	0.9825	0.9876	0.9936	0.9833	0.9855	0.9367	1																											
0.795	0.7583	0.7656	0.7832	0.778	0.7816	0.7923	0.77	1																										
0.7391	0.703	0.7109	0.7277	0.7224	0.7264	0.7746	0.7135	0.946	1																									
0.8208	0.8294	0.8359	0.8372	0.8295	0.8327	0.8177	0.825	0.736	0.7884	1																								
0.8254	0.8338	0.8402	0.8378	0.834	0.8371	0.8158	0.8257	0.7239	0.7761	0.9987	1																							
0.7179	0.7281	0.7331	0.7284	0.7291	0.7225	0.7291	0.739	0.8119	0.6643	0.89	0.9324	1																						
0.8213	0.8316	0.8339	0.8328	0.8274	0.8307	0.8013	0.8155	0.7016	0.7544	0.9898	0.9935	0.8866	1																					
0.8169	0.8265	0.8309	0.8248	0.8243	0.8276	0.7975	0.8122	0.6981	0.751	0.987	0.9908	0.8829	0.9894	1																				
0.8275	0.8359	0.8421	0.8366	0.8361	0.8391	0.8126	0.8247	0.7123	0.7642	0.9955	0.9991	0.8925	0.9946	0.9919	1																			
0.7073	0.7293	0.7054	0.7222	0.6966	0.701	0.8168	0.7128	0.6538	0.5999	0.5647	0.5533	0.473	0.5433	0.5327	0.5426	1																		
0.8	0.8091	0.8161	0.8345	0.8091	0.8126	0.838	0.8264	0.7512	0.6973	0.6768	0.6648	0.5908	0.6413	0.6617	0.6535	0.8457	1																	
0.6777	0.6995	0.6762	0.6925	0.6673	0.6718	0.8029	0.6777	0.611	0.5581	0.538	0.5269	0.4571	0.517	0.5065	0.5166	0.9887	0.815	1																
0.686	0.7074	0.6842	0.7005	0.6756	0.6799	0.809	0.6862	0.6199	0.5676	0.5477	0.5367	0.4365	0.527	0.5167	0.5263	0.9938	0.8161	0.9955	1															
0.6322	0.6542	0.6316	0.6471	0.6222	0.6269	0.758	0.6319	0.5666	0.5143	0.4945	0.4837	0.4897	0.4734	0.463	0.4737	0.9395	0.7818	0.9735	0.9474	1														
0.6837	0.7053	0.6821	0.6983	0.6733	0.6777	0.8069	0.6865	0.6173	0.5648	0.5448	0.5337	0.4444	0.5239	0.5135	0.5234	0.9954	0.8165	0.9948	0.9994	0.9465	1													
0.7344	0.7556	0.7317	0.7488	0.7237	0.7277	0.8065	0.735	0.6815	0.6286	0.594	0.5826	0.4814	0.5775	0.564	0.5719	0.9614	0.8664	0.9396	0.9449	0.8916	0.944	1												
0.686	0.7074	0.6842	0.7005	0.6756	0.6799	0.7661	0.6862	0.6199	0.5676	0.5477	0.5367	0.4365	0.527	0.5167	0.5263	0.908	0.8161	0.8891	0.8947	0.8421	0.8936	0.9449	1											
0.7242	0.7459	0.7219	0.7389	0.7135	0.7177	0.7968	0.732	0.6564	0.6029	0.5826	0.5712	0.5007	0.5616	0.551	0.5605	0.9382	0.8634	0.9316	0.9372	0.8834	0.9395	0.9887	0.9687	1										
0.7388	0.7606	0.7368	0.7539	0.7291	0.733	0.809	0.7405	0.6732	0.6208	0.6009	0.5896	0.4987	0.5805	0.5703	0.5789	0.9822	0.8703	0.9423	0.9474	0.8947	0.9465	0.9982	0.9474	0.991	1									
0.6552	0.6772	0.6542	0.6701	0.6449	0.6495	0.7326	0.655	0.5886	0.5358	0.5158	0.5047	0.4034	0.4945	0.513	0.4945	0.8792	0.8311	0.8609	0.867	0.8138	0.8657	0.9173	0.9735	0.941	0.9202	1								
0.752	0.7533	0.7294	0.7414	0.7254	0.8053	0.7326	0.6648	0.6119	0.5919	0.5805	0.4794	0.4741	0.5608	0.5698	0.9568	0.8639	0.937	0.9423	0.8891	0.9414	0.9934	0.9735	0.9954	0.9955	0.9462	0.9462	1							
0.6743	0.6963	0.673	0.6892	0.6638	0.6684	0.801	0.6798	0.6071	0.5538	0.5336	0.5225	0.4448	0.5124	0.5018	0.5121	0.9928	0.8112	0.9899	0.9947	0.9411	0.9966	0.9383	0.9116	0.9447	0.9411	0.8834	0.9428	1						

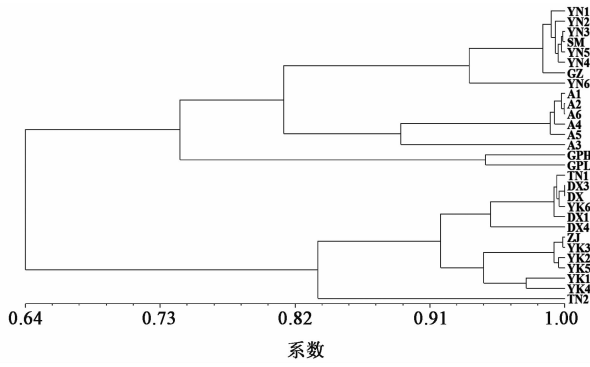
图 1 29 个铁皮石斛居群的遗传相似系数

Fig. 1 Genetic similarity of 29 *Dendrobium officinale* populations

3.3 不同居群铁皮石斛 DNA 身份证的构建 利用 4 对 SSR 核心引物对铁皮石斛 29 个居群进行 DNA 身份证构建, 广东丹霞 DX1-1 特征电泳图谱, 见图 3A 所示。依据特征图谱的条带信息, 以引物字母为开头, 以 1,0 矩阵为编码, 构建不同居群 DNA 身份证, 见表 3。从所构建的 DNA 身份证信息中可看出, 使

用 4 对引物建立的铁皮石斛 SSR 身份证分辨率及稳定性均较高。利用在线二维码软件, 得到不同居群铁皮石斛样品的身份信息, 包含居群名称、物种、产地和 SSR 指纹图谱及采集地点, 见图 3B。

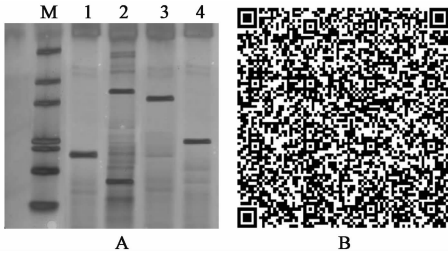
3.4 遗传相似性分析 基于遗传相似系数 GS 可将不同居群铁皮石斛的遗传一致性分成 A, B, C 共



YN. 云南;GZ. 贵州;SM. 四川石棉;A. 安徽;GPH. 桂平红杆;GPL. 桂平绿杆;TN. 泰宁;DX. 丹霞;ZJ. 浙江乐清;YK. 浙江永康

图 2 29 个铁皮石斛居群的聚类分析

Fig. 2 Cluster graph of 29 *Dendrobium officinale* populations



A. 广东丹霞 DX1-1 样品聚丙烯酰胺凝胶电泳;M. Marker;1~4. 引物 I, II, III, IV;B. 广东丹霞 DX1-1 身份证二维码

图 3 铁皮石斛 SSR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱及身份证二维码

Fig. 3 SSR band electrophoresis of *Dendrobium officinale* and QR code identity

3 个等级,其中 A 级($GS \geq 0.94$),样品来源较为均一,如云南地区的铁皮石斛居群,5 个安徽地区的铁皮石斛居群,4 个广东丹霞地区的铁皮石斛居群,其遗传相似性系数均 > 0.94 ; B 级($0.83 \leq GS < 0.94$),样品遗传背景较为相似,可能来源于同一地区或地理位置接近的地区,如云南地区与四川地区的遗传相似系数在 $0.83 \sim 0.94$,由于两地区互相毗邻,其居群较为相似;部分来源于相同地区的居群,例如安徽居群 A3 与其他安徽居群的遗传相似性系数为 $0.88 \sim 0.89$,推测与居群间引种有关; C 级($GS < 0.83$),样品的遗传背景具有一定差异,如云南居群与安徽居群,其遗传相似系数为 $0.72 \sim 0.83$,可能与其生长环境的气候差异等因素有关。见表 4。

4 讨论

铁皮石斛作为一种具有悠久药用历史的中药材,一直以来其产值在各大中药材中位居前列。但由于不同生长环境、生长年限、种质资源等方面的影

表 3 部分铁皮石斛样品 DNA 身份证

Table 3 DNA identity of parts of the *Dendrobium officinale* samples

No.	样品编号	DNA 身份证
1	YN1-3	A10100B1110000C1000D100
2	YN2-1	A10000B1110000C1010D100
3	YN3-3	A10000B1110000C1000D100
4	YN4-3	A10000B1110000C1000D110
5	YN5-2	A10000B1110000C1000D101
6	YN6-6	A10010B0010000C1100D100
7	SM-10	A10100B1110000C1000D100
8	GZ-3	A10001B1110010C1000D110
9	GPH-3	A10100B1110001C1100D110
10	GPL-11	A10100B0110001C1100D110
11	A1-2	A11000B0110001C1000D110
12	A2-1	A11000B0110001C1000D100
13	A3-1	A11000B0110111C1010D110
14	A4-2	A11000B0110001C1001D100
15	A5-3	A11000B0110001C1011D100
16	A6-1	A11000B0110001C1000D100
17	TN1-18	A10000B1000010C1010D010
18	TN2-32	A10000B1000110C1000D110
19	DX1-1	A10000B1000100C0010D010
20	DX3-1	A10000B1000000C0010D010
21	DX4-1	A10000B1000100C0010D010
22	DX4	A10000B1000010C0010D010
23	ZJ7	A10000B1000000C1111D010
24	YK1-1	A10000B1001000C1010D010
25	YK2-1	A10000B1001000C1010D010
26	YK3-2	A10000B1000000C1010D010
27	YK4-2	A00000B1001000C1010D010
28	YK5-1	A10000B1001000C1010D010
29	YK6-2	A10000B1001010C0010D010

表 4 遗传一致性评价

Table 4 Evaluation of genetic consistency

遗传相似系数	置信区间	一致性等级
$GS \geq 0.94$	0.945 ~ 1.000	A
$0.83 \leq GS < 0.94$	0.839 ~ 0.931	B
$GS < 0.83$	0.686 ~ 0.817	C

响,铁皮石斛植物的外观性状、成分含量^[14-15]均有较大差异,为了规范铁皮石斛市场,必须寻找一种快

速、准确的分子生物学手段,对铁皮石斛进行快速的种质溯源。DNA 身份证的建立对中药种质资源的保护和利用、种源追溯具有重要意义,SSR 分子标记因其具有准确、易区分、重复性好等特点,广泛应用于 DNA 身份证的构建。

本研究应用前期筛选出来的 4 对重复性好、扩增条带清晰、易于辨认的 SSR 引物,对来自 9 个产地,29 个居群的 309 份铁皮石斛样品进行 SSR 分析,并建立不同居群铁皮石斛样品的 DNA 身份证。在此基础上,基于遗传相似性系数可将 29 个居群分为三大类,即地理位置相近或生长地貌相似的居群遗传相似性系数较高,表明其遗传背景较为一致。

目前铁皮石斛常采用无性繁殖,来自某些产区的种质资源遗传一致性较高。从地理位置上看,云南与贵州均属于云贵高原地区,其遗传关系较近;安徽地区属于大别山脉,其不同居群种源也比较单纯。不同产地居群间存在一定的遗传差异,但产地间也存在引种的情况,如来自安徽的铁皮石斛居群,与云南、四川、贵州、广西所产的铁皮石斛居群遗传相似系数较大,在 0.72 ~ 0.83,而与广东丹霞、浙江乐清、浙江永康、福建泰宁地区的居群遗传相似系数较小,在 0.40 ~ 0.66。

通过建立铁皮石斛不同居群的 DNA 身份证和遗传相似性评价方法,可对铁皮石斛种源信息进行鉴定。铁皮石斛不同居群间的遗传分化与其外观性状数量分类学的研究结果基本一致,未来可将外观性状、特征性化学成分图谱、种植条件、遗传相似性系数等参数相结合,为建立其溯源体系奠定基础。

[参考文献]

[1] 罗颖懿,李运容,雷霄熙,等. 铁皮石斛共性黄酮类成分新西兰牡荆苷 II 的体外抗氧化与诱导 HepG2 细胞凋亡的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):1-8.
[2] 包英华. 铁皮石斛种质资源的鉴定与评价研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.

[3] 金琰琰,方成武,杨启清,等. 安徽野生铁皮石斛资源分布与生态环境调查[J]. 中国中药杂志,2013,38(23):4024-4027.
[4] 包英华,潘超美,白音,等. 铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(5):349-353,367.
[5] 赵俊凌,王云强,李学兰,等. 几种人工栽培“枫斗类”石斛的多糖含量分析[J]. 中华中医药杂志,2011,26(9):2001-2005.
[6] 徐旭栋,蒋瑞彬,蓝小明,等. 人工栽培铁皮石斛种质资源遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 中华中医药杂志,2013,28(7):2123-2125.
[7] 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]. 药学学报,2011,46(9):1156-1160.
[8] 徐蕾,刘莉,彭少丹,等. 利用 SSR 标记研究铁皮石斛的遗传多样性[J]. 分子植物育种,2015,13(7):1616-1622.
[9] 赵瑞强. 基于分子标记的铁皮石斛种质资源遗传多样性研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2012.
[10] Röder M, Wendehake K, Korzun V, et al. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties[J]. Theor Appl Genet,2002,106(1):67-73.
[11] 曹玲亚,谷聪,孙海峰,等. 基于 SSR 标记的党参属部分药用植物的遗传多样性和遗传结构评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24):45-52.
[12] 董晓曼,袁媛,查良平,等. 滇皖产区铁皮石斛居群 SSR 分子身份证的构建[J]. 中国现代中药,2017,19(5):617-624.
[13] 高东,杜飞,朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法[J]. 遗传,2009,31(6):668-672.
[14] 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等. 铁皮石斛居群差异的研究(I)——植物体形态结构的差异[J]. 中草药,2001,32(9):63-66.
[15] 张鹏博,章静钢,韩晓霞,等. 野生铁皮石斛主要表型性状和多糖含量[J]. 浙江农业科学,2015,56(9):1406-1408.

[责任编辑 顾雪竹]