

## 国产石斛属植物亲缘关系的 AFLP 分析

白 音<sup>1,2\*</sup>, 包英华<sup>1</sup>, 王文权<sup>2</sup>, 姜丽丽<sup>3</sup>, 阎玉凝<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>韶关学院英东生物工程学院, 广东韶关 512005; <sup>2</sup>北京中医药大学中药学院, 北京 100102; <sup>3</sup>中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘 要:** 采用 AFLP 技术对我国 38 种石斛属植物进行亲缘关系分析, 从 64 对选择性引物中筛选出 8 对引物组合, 共扩增出 1 644 个位点, 其中多态性位点 1 639, 占总扩增位点的 99.7%, 说明我国石斛属植物遗传多态性水平很高。聚类分析结果表明, 石斛组和黑毛组并没有形成独立的分支; 剑叶组和圆柱叶组植物共同构成一个分支, 并与其它组之间的相似度较低, 说明该两组与其它组之间的亲缘关系较远; 禾叶组、草叶组和叉唇组均形成独立的分支, 有向各自的演化方向发展的趋势。国产石斛属植物亲缘关系比较复杂, 并非是一个单系类群, 可能存在一些并系类群或多系类群。

**关键词:** 石斛属; 亲缘关系; AFLP

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 06-1569-06

## Analysis of the Phylogenetic Relationship of *Dendrobium* in China by AFLP Technique

BAI Yin<sup>1,2\*</sup>, BAO Ying-hua<sup>1</sup>, WANG Wen-quan<sup>2</sup>, JIANG Li-li<sup>3</sup>, and YAN Yu-ning<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Yingdong College of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005, China; <sup>2</sup>School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; <sup>3</sup>Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Thirty-eight species of *Dendrobium* were analyzed phylogenetically using AFLP technique. Eight pairs of primers combination were screened from 64 pairs of primers combination and generated 1 644 amplified loci, 1 639 of which were polymorphic loci which accounted for 99.7% in the total amplified loci. It showed that the generation diversity standard of *Dendrobium* was very high in our country. Cluster analysis showed that Sect. *Dendrobium* and Sect. *Formosae* did not form an independent branch, Sect. *Aporum* and Sect. *Strongyle* were consisted of a common branch. They had a lower similarity with another section. Sect. *Grastidium*, Sect. *Stachyobium* and Sect. *Stuposa* formed an independent branch. They had a different evolution direction. Genetic relationship in domestic *Dendrobium* was much more complicated, and they were not a monophyletic group in nature, but a paraphyletic or polyphyletic group.

**Key words:** *Dendrobium*; Phylogenetic relationship; AFLP

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 为兰科中比较大的一个家族, 全球约有 1 000 余种, 我国共有 74 种 2 变种, 主要分布于秦岭—淮河以南, 云南、广西、广东、贵州、台湾为国产本属植物的分布中心 (吉占和, 1980; 中国科学院植物志编委会, 1999)。

石斛属植物既是名贵的观赏花卉, 亦是常用的传统中药材。根据其植物形态特征, 我国 76 种石斛属植物共划分为 12 组, 其中石斛组 Sect. *Dendrobium* 的种类最多, 共 36 种; 其次是黑毛组 Sect. *Formosae*, 共 7 种 (中国科学院植物志编委会, 1999)。利用分子标记对石斛属植物种间的亲缘关系

收稿日期: 2007-05-31; 修回日期: 2007-08-24

基金项目: 科技部国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21004); 韶关市科技计划项目 (韶科 2005-10)

\* E-mail: baiyin7346@126.com

和系统进化的研究已有一些报道 (Yukawa et al., 1992, 1996; 丁小余 等, 2002a, 2002b, 2002c)。据报道, 石斛属植物 rDNA ITS 序列的系统分类学研究结果与传统分类结果并非完全吻合, 同一组植物分布在不同的分支中或不同组的植物集中形成同一个分支 (徐红 等, 2001), 有些学者甚至提出将禾叶组 Sect. *Grastidium* 从石斛属中分出来, 另建立一个属的观点 (Tsai et al., 2004)。

作者利用 AFLP 技术对 38 种石斛属植物的亲缘关系进行分析, 为揭示我国石斛属植物的亲缘关系和系统分类提供更多的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料采自于云南、贵州、广西、海南和安徽等石斛主产区 (表 1)。

表 1 试验材料及其采集地

Table 1 Experiment materials and their collect location

编号 No.	种名 Name of species	采集地 Collect location
S01	竹枝石斛 <i>D. salaccense</i>	海南儋州 Danzhou, Hainan
S02	聚石斛 <i>D. lindleyi</i>	云南思茅; 贵州兴义, 则戎 Simao, Yunnan; Xingyi, Zerong, Guizhou
S03	小黄花石斛 <i>D. jenkinsii</i>	云南西双版纳, 屏边 Xishuangbanna, Pingbian, Yunnan
S04	鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i>	云南思茅, 文山 Simao, Wenshan, Yunnan
S05	长苏石斛 <i>D. brymerianum</i>	云南思茅, 屏边 Simao, Pingbian, Yunnan
S06	球花石斛 <i>D. thysiflorum</i>	云南思茅, 西双版纳 Simao, Xishuangbanna, Yunnan
S07	细叶石斛 <i>D. hancockii</i>	贵州兴义; 云南文山 Xingyi, Guizhou; Wenshan, Yunnan
S08	罗河石斛 <i>D. lohohense</i>	云南文山; 贵州兴义 Wenshan, Yunnan; Xingyi, Guizhou
S09	密花石斛 <i>D. densiflorum</i>	海南白沙; 广西玉林 Baisha, Hainan; Yulin, Guangxi
S10	杓唇石斛 <i>D. moschatum</i>	云南思茅; 贵州兴义 Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou
S11	苏瓣石斛 <i>D. harveyanum</i>	云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan
S12	流苏石斛 <i>D. fimbriatum</i>	云南思茅; 贵州兴义; 广西靖西 Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou; Jingxi, Guangxi
S13	束花石斛 <i>D. chrysanthum</i>	广西玉林; 贵州兴义, 龙广 Yulin, Guangxi; Xingyi, Longguang, Guizhou
S14	尖刀唇石斛 <i>D. heterocarpum</i>	云南思茅 Simao, Yunnan
S15	串珠石斛 <i>D. falconeri</i>	云南思茅, 文山 Simao, Wenshan, Yunnan
S16	大苞鞘石斛 <i>D. wardianum</i>	云南思茅, 文山 Simao, Wenshan, Yunnan
S17	杯鞘石斛 <i>D. gratiosissimum</i>	云南思茅, 西双版纳 Simao, Xishuangbanna, Yunnan
S18	肿节石斛 <i>D. pendulum</i>	云南思茅, 西双版纳 Simao, Xishuangbanna, Yunnan
S19	美花石斛 <i>D. loddigesii</i>	云南思茅; 贵州兴义, 安龙 Simao, Yunnan; Xingyi, Anlong, Guizhou
S20	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	云南思茅; 贵州兴义; 广西玉林 Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou; Yulin, Guangxi
S21	兜唇石斛 <i>D. aphyllum</i>	贵州龙广; 云南思茅, 文山 Longguang, Guizhou; Simao, Wenshan, Yunnan
S22	报春石斛 <i>D. primulinum</i>	云南西双版纳, 思茅; 贵州兴义 Xishuangbanna, Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou
S23	晶帽石斛 <i>D. crystallinum</i>	云南思茅, 文山; 贵州龙广 Simao, Wenshan, Yunnan; Longguang, Guizhou
S24	玫瑰石斛 <i>D. crepidatum</i>	云南思茅, 文山; 贵州兴义 Simao, Wenshan, Yunnan; Xingyi, Guizhou
S25	金钗石斛 <i>D. nobile</i>	云南思茅; 贵州赤水, 兴义 Simao, Yunnan; Chishui, Xingyi, Guizhou
S26	细茎石斛 <i>D. moniliforme</i>	云南思茅; 贵州兴义; 广西靖西 Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou; Jingxi, Guangxi
S27	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	云南广南, 思茅; 贵州兴义 Guangnan, Simao, Yunnan; Xingyi, Guizhou
S28	霍山石斛 <i>D. huoshanense</i>	安徽霍山县 Huoshan, Anhui
S29	滇桂石斛 <i>D. guangxiense</i>	广西玉林; 贵州龙广, 兴义 Yulin, Guangxi; Longguang, Xingyi, Guizhou
S30	叠鞘石斛 <i>D. denneanum</i>	贵州龙广, 兴义; 云南思茅 Longguang, Xingyi, Guizhou; Simao, Yunnan
S31	重唇石斛 <i>D. hercoglossum</i>	贵州龙广, 兴义; 广西玉林 Longguang, Xingyi, Guizhou; Yulin, Guangxi
S32	叉唇石斛 <i>D. stuposum</i>	云南思茅 Simao, Yunnan
S33	矮石斛 <i>D. bellatulum</i>	云南思茅, 屏边 Simao, Pingbian, Yunnan
S34	翅梗石斛 <i>D. trigonopus</i>	云南思茅, 文山 Simao, Wenshan, Yunnan
S35	黑毛石斛 <i>D. williamsonii</i>	云南西双版纳, 思茅 Xishuangbanna, Simao, Yunnan
S36	梳唇石斛 <i>D. strongylanthum</i>	贵州龙广, 安龙; 云南思茅 Longguang, Anlong, Guizhou; Simao, Yunnan
S37	剑叶石斛 <i>D. acinaciforme</i>	云南文山, 西双版纳 Wenshan, Xishuangbanna, Yunnan
S38	海南石斛 <i>D. hainanense</i>	海南琼中 Qiongzong, Hainan

每种石斛取 5 ~ 10 个单株的嫩叶或成熟叶片剪碎混合, 硅胶快速干燥, -70℃ 保存, 备用。

### 1.2 DNA 提取及酶切连接

DNA 提取采用改良 CTAB 法 (包英华 等, 2007), 用 Ultrospec 2000 紫外/可见分光光度计检测 DNA 纯度和浓度, 用 *EcoR* I 和 *Mse* I 限制性内切酶对样品基因组 DNA 进行酶切, 在 *T4* Ligase 作用下酶切片段再与 *EcoR* I 和 *Mse* I 接头连接形成扩增反应的 DNA 模板。

### 1.3 PCR 扩增及电泳分析

PCR 扩增反应由预扩增和选择性扩增两个阶段组成, 采用 Gene Amp 9600 型 PCR 仪进行扩增。用 ABI377 测序仪对扩增产物进行电泳, 获得电泳扩增图谱。用 GENESCAN 3.1 软件分析扩增条带, NTSYSpc 2.11F 软件包的 SimQual 程序求遗传距离, 并采用 UPGMA 方法进行聚类分析, 通过 Tree plot 模块生成聚类图。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 AFLP 扩增结果及多态性分析

从 64 对选择性引物中共选取 8 对引物: E-AAG/M-CAC、E-AAG/M-CTC、E-AAG/M-CTG、E-ACG/M-CAC、E-ACG/M-CAG、E-ACG/M-CTA、E-ACG/M-CTG 和 E-ACG/M-CTT, 分别对 38 种石斛属植物进行 AFLP 分析 (图 1), 得到 1 644 个扩增位点, 其中多态性位点 1 639 个, 占总扩增位点的 99.7%。

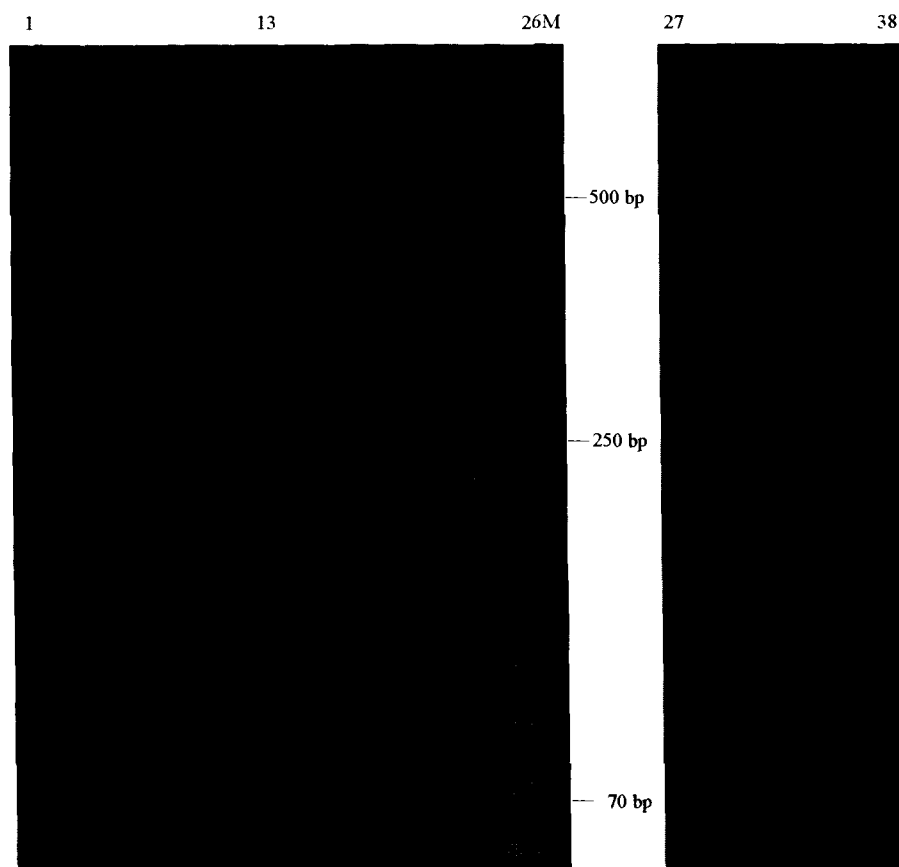


图 1 38 个石斛属植物 AFLP 扩增图

Fig. 1 AFLP pattern of 38 species of *Dendrobium* amplified by E-ACG/M-CAG

## 2.2 石斛属植物的聚类分析

本试验的聚类分析结果与传统系统分类结果并非完全吻合, 石斛组 Sect. *Dendrobium* 和黑毛组 Sect. *Formosae* 没有形成一个独立分支, 尤其是石斛组植物极其复杂; 剑叶组 Sect. *Aporum* 和圆柱叶组 Sect. *Strongyle* 共同形成一个分支, 并与其它组间的相似度较低, 亲缘关系较远; 禾叶组 Sect. *Grastidium*、叉唇组 Sect. *Stuposa* 和草叶组 Sect. *Stachyobium* 分别为单独的分支, 有向各自的演化方向发展的趋势 (图 2)。

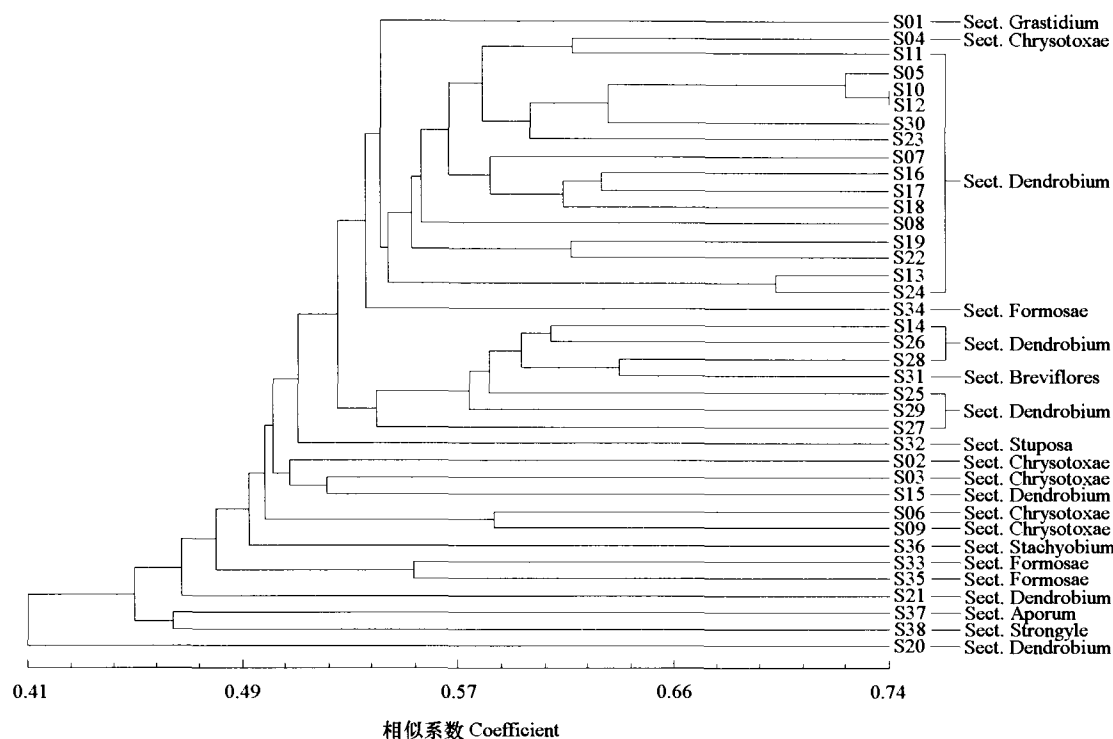


图 2 38 种石斛属植物聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 38 species of *Dendrobium*

我国 76 种石斛属植物共划分为 12 组, 禾叶组 Sect. *Grastidium*、顶叶组 Sect. *Chrysotoxae*、石斛组 Sect. *Dendrobium*、心叶组 Sect. *Distichophyllum*、瘦轴组 Sect. *Breviflores*、叉唇组 Sect. *Stuposa*、距囊组 Sect. *Pedilonum*、黑毛组 Sect. *Formosae*、草叶组 Sect. *Stachyobium*、基肿组 Sect. *Crumenatae*、剑叶组 Sect. *Aporum* 和圆柱叶组 Sect. *Strongyle* (中国科学院植物志编委会, 1999)。

本文中的 38 种石斛属植物分别隶属于 9 个组, 说明有一定的代表性。然而, 聚类分析结果与传统分类结果存在一定的差异, 按照传统分类划分的石斛组、黑毛组和顶叶组并非聚类一个独立的分支。

本研究结果与徐红等 (2001) 的研究结果比较一致。据报道, 石斛属系统发育关系复杂, 并非是一个很自然的单系类群, 而是并系类群或多系类群 (Yukawa et al., 1992, 1996)。从本研究结果来看, 上述观点有一定的道理。

产于我国台湾的 12 种石斛属植物 rDNA ITS 序列的系统分类学研究结果表明, 禾叶组与其他 3 组 (石斛组、距囊组和基肿组) 之间的遗传距离较远, 故提出将禾叶组从石斛属分开, 另作为一个独立的属 (Tsai et al., 2004)。从形态特征来看, 禾叶组与其它组植物的形态特征之间有较为明显的差别, 禾叶组植物的主要特征为茎圆柱形, 细长, 表面有光泽, 质地坚硬 (多数石斛属植物的茎质地

为肉质), 叶狭长, 禾叶状。

本试验结果表明, 禾叶组虽与石斛组形成一个分支, 但彼此相似度较低, 而且禾叶组与其它组之间的遗传距离较远。至于禾叶组植物的系统分类问题尚需进一步研究。

据报道, 石斛属植物具有丰富的遗传多样性 (张铭 等, 2001; 虞泓 等, 2004; 丁鸽 等, 2005), 这可能与石斛属植物亲缘关系和演化方向多样化有密切关系。

石斛属植物为比较特殊的类群, 属内分化复杂而多样, 因此仅依靠 AFLP 分子标记分析其亲缘关系和系统发育过程显然是不够全面的。今后应对其形态解剖学、孢粉学、生物化学和分子生物学等多方面进行深入研究, 才能客观揭示石斛属植物的亲缘关系和系统演化过程。

## References

- Bao Ying-hua, Bai Yin, Tan Qing-hui, Peng Ling, Que Sheng-quan. 2007. Comparison of methods of genomic DNA extraction from *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 15 (2): 147 - 151. (in Chinese)
- 包英华, 白 音, 谈庆辉, 彭 凌, 阙生全. 2007. 美花石斛基因组 DNA 提取方法的比较. *热带亚热带植物学报*, 15 (2): 147 - 151.
- Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. 1999. *Flora reipublicae popularis sinicae* (Tomus 19). Beijing: Science Press; 67 - 146. (in Chinese)
- 中国科学院植物志编委会. 1999. 中国植物志 (第 19 卷). 北京: 科学出版社: 67 - 146.
- Ding Ge, Ding Xiao-yu, Shen Jie, Tang Feng, Liu Dong-yang, He Jia, Li Xue-xia, Chu Bi-hai. 2005. Genetic diversity and molecular authentication of wild populations of *Dendrobium officinale* by RAPD. *Acta Pharm. Sic.*, 40 (11): 1028 - 1032. (in Chinese)
- 丁 鸽, 丁小余, 沈 洁, 唐 凤, 刘冬扬, 贺 佳, 李雪霞, 褚必海. 2005. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别. *药学学报*, 40 (11): 1028 - 1032.
- Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Hong, Xu Luo-shan, Zhou Kai-ya. 2002a. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Debdrobium* species of 'Fengdou' and authentication by analysis of their sequences. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 37 (7): 567 - 573. (in Chinese)
- 丁小余, 王峥涛, 徐 红, 徐璐珊, 周开亚. 2002a. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别. *药学学报*, 37 (7): 567 - 573.
- Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Luo-shan, Xu Hong, Zhou Kai-ya, Shi Guo-xin. 2002b. Study on sequence difference and SNP pheomenon of rDNA ITS region in F type and H type population of *Dendrobium officinale*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 27 (2): 85 - 89. (in Chinese)
- 丁小余, 王峥涛, 徐璐珊, 徐 红, 周开亚, 施国新. 2002b. F 型、H 型居群的铁皮石斛 rDNA ITS 区序列差异及 SNP 现象的研究. *中国中药杂志*, 27 (2): 85 - 89.
- Ding Xiao-yu, Xu Luo-shan, Wang Zheng-tao, Xu Hong, Zhou Kai-ya. 2002c. Molecular authentication of *Dendrobium chrysanthum* from its allied species of *Dendrobium*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 27 (6): 407 - 411. (in Chinese)
- 丁小余, 徐璐珊, 王峥涛, 徐 红, 周开亚. 2002c. 束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别. *中国中药杂志*, 27 (6): 407 - 411.
- Tsai C C, Peng C I, Huang S C, Huang P L, Chou C H. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Scientia Horticulturae*, 101: 315 - 325.
- Tsi Zhan-huo. 1980. A preliminary study of the orchid genus *Dendrobium* Sw. in China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 18 (4): 427 - 449. (in Chinese)
- 吉占和. 1980. 中国石斛属的初步研究. *植物分类学报*, 18 (4): 427 - 449.
- Xu Hong, Li Xiao-bo, Ding Xiao-yu, Wang Zheng-tao, Xu Luo-shan, Zhou Kai-ya. 2001. rDNA ITS sequencing of Herba Dendrobii (Huangcao). *Acta Pharmaceutica Sinica*, 36 (10): 777 - 783. (in Chinese)
- 徐 红, 李晓波, 丁小余, 王峥涛, 徐璐珊, 周开亚. 2001. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析. *药学学报*, 36 (10): 777 - 783.
- Yu Hong, He Rui, Ni Nian-chun, Zhang Shi-gang. 2004. Fingerprinting analysis of plant of *Dendrobium* Sw. by AFLP. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 35 (7): 808 - 810. (in Chinese)
- 虞 泓, 和 锐, 倪念春, 张时刚. 2004. 石斛属 4 种植物的 AFLP 分析. *中草药*, 35 (7): 808 - 810.
- Yukawa T, Ando T, Karasawa K, Hashimoto K. 1992. Existence of two stomatal shapes in the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) and its systemat-

- ic significance. American Journal of Botany, 79 (8): 946 - 952.
- Yukawa T, Ohba H, Cameron K M, Chase M W. 1996. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): insights from a combined analysis based on *rbcL* sequences and restriction site variation. Journal of Plant Research, 109 (1094): 169 - 176.
- Zhang Ming, Huang Hua-rong, Liao Su-mei, Gao Jiang-yun. 2001. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum*. China Journal of Chinese Materia Medica, 26 (7): 442 - 447. (in Chinese)
- 张 铭, 黄华荣, 廖苏梅, 高江云. 2001. 石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计. 中国中药杂志, 26 (7): 442 - 447.



## 《园艺学报》第七届编委会第二次扩大会议 纪 要

《园艺学报》第七届编委会第二次扩大会议在南京于中国园艺学会十届二次理事大会暨学术研讨会期间召开。2007 年 11 月 18 日编辑部主任赵华在大会上向与会理事和论文代表汇报《园艺学报》编辑出版工作,当晚主编方智远院士主持召开了编委扩大会,30 位与会编委和部分审稿专家一起就如何进一步办好《园艺学报》进行了深入讨论,在肯定成绩的基础上,大家就进一步提高论文质量和推进学报国际化等方面达成共识。

1. 《园艺学报》作为中国园艺学会的会刊,在学会的领导下,在承办单位中国农业科学院蔬菜花卉研究所的大力支持下,在 13 个协办单位的大力协助下,在广大作者、审稿专家和编辑人员的共同努力下,编辑出版工作取得了显著成绩,在及时报道园艺学科研究成果,促进人才培养,引导和促进我国园艺学科发展等方面起到了重要作用。

根据 2007 年出版的《中国学术期刊综合引证报告》,《园艺学报》被引频次由 2006 年的 2 654 次提高到 3 457 次,影响因子由 0.874 提高到 1.057。

从 2008 年起《园艺学报》将改为月刊,以进一步满足广大作者和读者的需求。

2. 《园艺学报》作为我国园艺学科学术水平最高的期刊,吸引了许多优秀稿件,但是从大量来稿中也发现,一些来稿的学术水平和写作水平有待提高,例如文章缺乏新意,信息量太少,对研究结果缺乏深入分析,文字繁琐,逻辑性不强,植物拉丁文学名有错误,参考文献不规范,英文写作水平差等等。这些问题尤以研究生投稿为更常见。编委们呼吁研究生导师严格把关,悉心指导。编辑部也将一如既往,通过指导修改、示范修改等方法提高学生的写作水平;有条件时将举办科技论文写作讲座等。

3. 《园艺学报》作为中国园艺科学家与世界园艺科学家交流的窗口,其国际化问题十分重要。编委们认为目前择优刊登英文文章是很好的办法,呼吁编委带头提供优秀的英文稿件,建议聘请外籍编辑,严把英文写作关,以推进刊物的国际化进程,扩大影响力。

4. 编委们还建议,研究简报栏目应更加突出创新性,征稿简则应更加详细、具体,审稿单内容更加细化等等。

编辑部将认真研究编委们的意见和建议,制定切实可行的措施,将《园艺学报》越办越好。

《园艺学报》编辑部

2007 年 11 月