

湖北野生天麻的遗传分化及栽培天麻种质评价

吴会芳 李作洲* 黄宏文*

(中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 采用7条ISSR引物对天麻(*Gastrodia elata*) 8个自然居群和6个人工栽培居群共483个样本的居群遗传多样性进行了初步检测, 共检测出清晰、重复性好的DNA带77条, 其中64条为多态性带, 总多态位点百分比 $PPB=83.12\%$ 。遗传多样性分析结果表明: 天麻自然居群的遗传多样性参数分别为: 多态位点百分比 $PPB=59.09\%$, 有效等位基因数 $A_e=1.29$, Nei's遗传多样性 $H=0.176$, Shannon's多态信息指数 $I=0.270$, 明显高于人工栽培居群($PPB=35.71\%$, $A_e=1.16$, $H=0.100$, $I=0.155$), 揭示出栽培居群存在明显的遗传基础狭窄和遗传均质性问题。UPGMA聚类分析表明, 自然居群与栽培居群存在明显的分化而分别聚为两大类群。自然居群间基因分化系数 $G_{ST}=0.2558$, 与AMOVA分析所揭示的居群间遗传变异量占总变异的27.25%的结果相近, 说明天麻自然居群间亦存在一定程度的遗传分化; 居群间基因流(N_m)为1.4547, 相对较弱, 可能对自然居群的遗传分化有一定影响。自然居群聚类结果显示出一度度的地理区域聚类趋势, 但Mantel检验表明自然居群间遗传距离与地理距离并不存在显著相关($r=0.1669$, $P=0.2110$), 揭示出天麻自然居群的分化现状可能是其生活史特性、地理隔离与人为破坏综合作用的结果。栽培居群的遗传均质化趋势, 揭示了引种驯化的瓶颈效应和长期无性繁育所导致的遗传多样性丧失, 也反映出栽培天麻种质的遗传基础狭窄。而栽培居群与自然居群间存在着明显的遗传分化, 反映天麻栽培居群与自然居群间可能存在基因流的阻断。

关键词: *Gastrodia elata*, 自然居群, 栽培居群, ISSR, 遗传多样性, 居群遗传分化

Genetic differentiation among natural populations of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) in Hubei and germplasm assessment of the cultivated populations

Huifang Wu, Zuozhou Li*, Hongwen Huang*

Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074

Abstract: *Gastrodia elata* (Orchidaceae) is a rare and endangered medicinal plant. Seven ISSR primers were used to examine population genetic parameters of 483 samples across eight natural populations and six cultivated populations of *G. elata*. The seven primers amplified a total of 77 unambiguous and reproducible bands, among which 64 bands were polymorphic and the percentage of polymorphic loci was $PPB=83.12\%$. The results showed that genetic variation in the natural populations was significantly higher than that in the cultivated populations ($PPB=59.09\%$ vs. $PPB=35.71\%$, $A_e=1.29$ vs. $A_e=1.16$, $H=0.176$ vs. $H=0.100$ and Shannon's $I=0.270$ vs. $I=0.155$), suggesting that the cultivated populations are narrowly genetic-based and genetically uniform. UPGMA cluster analysis showed that natural populations and cultivated populations were distinctly separated into two groups. Coefficient of genetic differentiation among eight natural populations was 0.2558 (G_{ST}) which was well in accordance with the result by AMOVA analysis (27.25% of the total genetic variation resided among populations), indicating that natural populations were genetically differentiated to a certain extent. Gene flow among natural populations was relatively weak ($N_m=1.4547$), which might have caused the genetic differentiation among the populations. It is interesting to note that natural populations tended to cluster by geographical locations as revealed in UPGMA dendrogram, while the Man-

收稿日期: 2006-03-13; 接受日期: 2006-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(30370145)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: hongwen@wbgcas.cn; lizz@rose.whiob.ac.cn

tel test showed no significant correlation between genetic and geographic distances among natural populations($r=0.1669$, $P=0.2110$). This incongruence suggested that the current genetic differentiation among natural populations might have resulted from combined effects, including those of life history traits, geographical isolation and human disruption. The genetic uniformity found in cultivated populations might reflect the loss of genetic diversity caused by a genetic bottleneck during human domestication and clonal reproduction over generations. The narrow genetic base as revealed in cultivated *G. elata* and the genetic differentiation between cultivated and natural populations might have resulted from a cutoff of gene exchange when domestication began.

Key words: *Gastrodia elata*, natural population, cultivated population, ISSR, genetic variation, population genetic differentiation

天麻(*Gastrodia elata*)属兰科天麻属多年生异养型草本植物(陈心启等, 1999), 在其生命过程中必须先后与小菇属(*Mycena*)和蜜环菌属(*Armillariella*)两类真菌建立共生关系, 才能完成整个生活史(徐锦堂和牟春, 1990; 范黎等, 1999a; 徐锦堂等, 2001)。天麻共生体对研究植物与真菌的相互作用和生物间的协同进化有着重要的科研价值。同时天麻还是我国名贵的传统药用植物, 主治头晕目眩、肢体麻木, 具镇静、平肝熄风等功效(杨世林等, 2000), 具有极高的药用价值。野生天麻主要分布在我国西南、东北及华中地区, 多生长在海拔1000–1800 m的山地上空气湿度较大的凉爽环境中。

尽管天麻的人工驯化栽培经过30年的发展已取得了长足进步, 在一定程度上缓解了需求增长与资源危机的矛盾, 但因药材道地性观念的影响而造成的野生天麻与栽培天麻市场价格的悬殊, 导致了人们对野生天麻的过度采挖, 野生天麻已濒于灭绝, 被列入国家珍稀濒危保护植物名录(Fu & Jin, 1992), 野生天麻种质资源的有效保育已刻不容缓。此外, 栽培天麻长期的人工无性繁育和有限的有性杂交繁育, 可能会导致栽培天麻种质资源的遗传均质性, 给天麻产业带来潜在的危机。因此, 开展天麻野生资源的遗传多样性研究和栽培天麻种质的遗传评价, 对天麻种质资源科学保育及良种繁育策略制定有着重要的理论和现实意义。

近30年来, 我国学者在天麻的药理、药效成分分析和栽培技术等方面开展了大量的研究(徐锦堂, 1993; 杨世林等, 2000), 同时也进行了天麻与共生真菌相互作用的显微镜和电镜观察(兰进等, 1994, 1996; 范黎等, 1999b; 徐锦堂和范黎, 2001), 而且分离出了天麻抗真菌蛋白(GAFP), 并进行了测序

与基因克隆(胡忠和黄清藻, 1994; 胡忠等, 1988, 1999; 王晓晨等, 1999; Sa *et al.*, 2003)。但在天麻的居群遗传学研究方面, 尚未见相关报道。

ISSR(inter-simple sequence repeats)即简单重复间隔序列标记方法, 是近年来在微卫星技术上发展起来的一种新型的分子标记技术。它与RAPD一样具有操作简单, 可快速、高效地检测出基因组DNA的多态性的优点(谢佳燕和张知彬, 2004), 用其检测多态性更为灵敏, 反应系统更为稳定, 且具有良好的可重复性(钱韦等, 2000; Ge *et al.*, 2003), 已广泛地用于居群遗传学研究、品种鉴定、物种亲缘关系以及遗传图谱构建等多个领域(王建波, 2002; 李海生, 2004)。

本研究采用ISSR标记技术对天麻的8个自然居群及6个人工居群进行了初步研究, 其目的在于对湖北天麻自然居群和栽培居群的遗传多样性进行评价, 为天麻居群遗传学研究和保育策略的制定提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

2004年6–7月对湖北省境内的宜昌、五峰、神农架、咸丰、利川、恩施、鹤峰及巴东8个天麻自然居群进行资源调查及取样(表1), 采集地上幼茎或地下块茎(当地上茎已老并衰败时)作为样本, 并用全球定位系统(GPS)记录各居群的经纬度信息。采集样品放入透气性保鲜袋, 于4℃冰箱保存并及时提取DNA。2004年11月对湖北的宜昌、五峰、神农架、利川及河南省西峡, 陕西省商南6个人工栽培居群取样, 并提取DNA。

1.2 DNA提取

选用地上茎幼嫩组织、块茎芽端内层或新生白

表1 实验中野生天麻8个居群及栽培天麻6个居群的采样情况
Table 1 The eight natural and six cultivated populations of *Gastrodia elata* sampled in the study

	代号 Code	样本数 Sample size(N)	经度 Longitude(E)	纬度 Latitude(N)	海拔 Altitude(m)
自然居群 Natural population					
宜昌 Yichang	YYC	35	110°56′	31°03′	1,420
五峰 Wufeng	YWF	61	110°22′	31°12′	1,740
神农架 Shennongjia	YSNJ	31	110°21′	31°28′	1,980
咸丰 Xianfeng	YXF	32	108°49′	29°43′	1,540
利川 Lichuan	YLC	23	108°52′	30°05′	1,520
恩施 Enshi	YES	23	109°16′	30°28′	1,950
鹤峰 Hefeng	YHF	29	109°52′	29°57′	1,310
巴东 Badong	YBD	23	110°18′	30°51′	1,580
人工居群 Cultivated population					
河南西峡 Xixia	RXX	25	111°16′	33°30′	604
陕西商南 Shaanxi	RSX	43	110°56′	33°25′	595
五峰 Wufeng	RWF	31	110°19′	30°15′	1,820
宜昌 Yichang	RYC	35	110°57′	31°03′	1,280
神农架 Shennongjia	RSNJ	48	110°36′	31°45′	1,052
利川 Lichuan	RLC	44	108°43′	30°12′	1,446

芽, 采用改良的CTAB法 (Doyle & Doyle, 1987)提取基因组DNA。并加以改进, 即采取苯酚/氯仿/异戊醇(体积比25/24/1)抽提2次, 氯仿/异戊醇(24/1)抽提1次直接沉淀DNA, 然后将提取的DNA用1×TE溶解并用RNA酶除去RNA, 用该方法提取DNA快速简便。

总DNA采用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测质量, 并用紫外分光光度计(Brim-IOA-004)测DNA浓度, 然后稀释至10 ng/μL用于ISSR-PCR反应。

1.3 PCR反应及电泳检测

PCR扩增反应体系总体积为15 μL。其中*Taq* polymerase及其反应缓冲液(10×PCR Buffer)均购自Fermentas (Lithuania)公司, ISSR引物选自于加拿大哥伦比亚大学所提供的序列(http://www.biotech.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers.pdf, UBC primer set No.9, No.801.–870.), 并由上海博亚生物技术有限公司合成。反应体系各成分含量先通过优化筛选, 选用最佳者用于样本的PCR扩增。

扩增反应在PTC-200型PCR仪(梯度PCR仪, MJ-Research, USA)上进行。先采用反应程序(94℃预变性2 min 30 s; 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35个循环; 72℃终延伸5 min; 4℃终止反应)进

行引物反应体系的优化。优化后的PCR反应体系为: 15 μL反应体系中, DNA模板含量为20 ng, 引物浓度为0.3 μM, Mg²⁺浓度为1.5 mM, dNTP浓度为0.20 mM, *Taq*酶为0.375 U(酶活力单位)。再通过退火温度梯度PCR, 确定适合各引物的最佳退火温度(表2)。各引物样本至少重复扩增一次。

扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶在1×TBE缓冲液中电泳分离, 选用大连宝生物工程公司(Takara产品)的100 bp DNA Ladder Marker(100–1,500 bp)作标记估算扩增片段大小, 溴化乙锭(EB, 0.1 mg/mL)染色后在计算机凝胶成像系统(Alpha Innotech Corporation)上成像, 观察并记录。

1.4 数据分析

从筛选出的引物中选择7条扩增带谱清晰、重复性好的引物, 对所采样品进行ISSR扩增, 并重复一次, 将引物在样品中扩增出的清晰稳定、重复性好的每条DNA带谱作为一个位点, 按引物号-DNA片段长度(参照100 bp DNA Ladder Marker(100–1,500 bp)记录位点, 并依据带谱在样本中的有无分别记为“1”, “0”。由于天麻为二倍体植物, 将显性标记ISSR的二元数据等同看待为同一遗传位点的不同等位形式, 构建二态数据矩阵。遗传多样

性参数: 多态位点百分比(*PPB*), 每个位点的观察等位基因数(*A_o*), 有效等位基因数(*A_e*), Nei (Nei, 1973)的遗传多样性 (*H*), Shannon's多态信息指数 (*I*), 居群遗传分化系数(*G_{ST}*)与基因流(*N_m*), Nei's 遗传距离 (Nei, 1972)等用POPGENE 1.31 (Yeh *et al.*, 1999)软件进行分析, 用NTSYSpc 2.1(Rohlf, 2000) 进行 UPGMA 聚类分析, 并用 ARLEQUIN 2.000(Schneider *et al.*, 2000)对自然居群进行遗传结构的分子方差(AMOVA)(Excoffier *et al.*, 1992)分析。应用TFPGA(Miller, 1997)软件对自然居群间地理距离与遗传距离之间的相关性进行Mantel (Mantel, 1967)检验。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

7条ISSR引物共扩增出77条带(表2), 平均每条引物扩增出11条带, 在种的水平上有64条带呈现多态性, 即种水平上多态位点百分比为83.12%。其中, 引物807所扩增的13条带全部为多态, 多态性最高(100%); 其次为引物808; 引物812扩增的条带数最多, 为16条; 而引物830扩增的条带数最少, 为5条, 多态位点百分比也较低, 仅为60.00% (表2)。

2.2 天麻自然居群的遗传多样性

8个自然居群257个样本的遗传多样性分析表明, 天麻自然居群拥有较高水平的遗传多样性(表

3): 物种水平的遗传多样性相对较高, 多态位点百分比(*PPB*)达81.82%, Nei's遗传多样性(*H*)为0.236, Shannon's多态信息指数(*I*)为0.367; 居群水平略低, 居群平均多态位点百分比为59.09%, 平均有效等位基因数(*A_e*)为1.29, 平均Nei's 遗传多样性(*H*)为0.176, Shannon's多态信息指数(*I*)为0.270。

从多态位点百分比看, 各自然居群间相差不大, 神农架居群(YSNJ)最高(*PPB*=62.34%), 五峰居群(YWF)、利川(YLC)和巴东居群(YBD)最低(*PPB*=57.14%)。从其他指数看, 鹤峰居群(YHF)的遗传多样性最高, 恩施居群(YES)次之, 巴东居群与神农架居群相当, 而五峰居群最低(表3)。

2.3 自然居群的遗传分化

天麻自然居群间存在一定程度的遗传分化。由POPGENE分析8个自然居群的基因分化系数 *G_{ST}*=0.2558(表6), 与AMOVA分析的结果 *F_{ST}* = 0.2725基本一致(表4), 即居群间遗传变异量占总遗传变异量的27.25%, 而居群内遗传变异量占总变异量的72.75%。说明天麻的遗传多样性主要分布在自然居群内, 但居群间的遗传分化也达到了显著性水平(*P* <0.001)(表4)。基于 *G_{ST}*值估算基因流公式 *N_m*=0.5(1-*G_{ST}*)/*G_{ST}* (McDermott & McDonald, 1993; Yeh *et al.*, 1999)所计算的居群间基因流 *N_m*为1.4547 (表6), 说明自然居群间存在着一定的基因流。

五峰居群(YWF)与神农架居群(YSNJ)间的Nei's

表2 天麻ISSR引物扩增信息
Table 2 Amplification information of ISSR primers for *Gastrodia elata*

引物 Primer	序列 Sequence	Tm值 Temp. (°C)	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size range of bands (bp)	扩增条带数目 No. of bands amplified		多态位点百分比 Percentage of polymorphic bands
					总数 Total	多态 Polymorphic	
807	(AG) ₈ T	49.8	54.8	250–1,200	13	13	100.00
808	(AG) ₈ C	52.2	52.0	250–1,100	13	12	92.31
811	(GA) ₈ C	52.2	54.8	320–1,200	9	7	77.78
812	(GA) ₈ A	49.8	48.7	370–1,250	16	14	87.50
830	(TG) ₈ G	52.2	52.0	300–1,100	5	3	60.00
836	(AG) ₈ YA	50.3	53.4	280–1,300	9	7	77.78
855	(GA) ₈ YT	50.3	54.8	310–1,000	12	8	66.67
总计 Total					77	64	83.12

Y=C/T

表3 ISSR分析的天麻的遗传多样性(括号内为标准差)
Table 3 Genetic variability of *Gastrodia elata* detected by ISSR (standard deviation in parentheses)

居群 Population	N	A _o	A _e	H	I	PPB(%)
自然居群 Natural population						
宜昌 YYC	35	1.58 (0.496)	1.30 (0.355)	0.180 (0.192)	0.275 (0.274)	58.44
五峰 YWF	61	1.57 (0.498)	1.22 (0.294)	0.138 (0.169)	0.217 (0.249)	57.14
神农架 YSNJ	31	1.62 (0.488)	1.31 (0.365)	0.186 (0.192)	0.286 (0.272)	62.34
咸丰 YXF	32	1.61 (0.491)	1.25 (0.306)	0.161 (0.173)	0.253 (0.252)	61.04
利川 YLC	23	1.57 (0.498)	1.25 (0.315)	0.158 (0.176)	0.248 (0.255)	57.14
恩施 YES	23	1.58 (0.496)	1.33 (0.359)	0.195 (0.195)	0.295 (0.280)	58.44
鹤峰 YHF	29	1.61 (0.491)	1.35 (0.393)	0.201 (0.205)	0.301 (0.289)	61.04
巴东 YBD	23	1.57 (0.498)	1.33 (0.385)	0.191 (0.205)	0.286 (0.290)	57.14
居群水平平均 Mean at population level	32	1.59	1.29	0.176	0.270	59.09
物种水平 Total at species level	257	1.82 (0.388)	1.38 (0.342)	0.236(0.173)	0.367 (0.238)	81.82
人工栽培居群 Cultivated population						
西峡 RXX	25	1.40 (0.494)	1.21 (0.328)	0.124(0.180)	0.190 (0.261)	40.26
陕西 RSX	43	1.46 (0.501)	1.24 (0.349)	0.140(0.190)	0.212 (0.272)	45.45
五峰 RWF	31	1.38 (0.488)	1.16 (0.279)	0.100(0.159)	0.157(0.236)	37.66
宜昌 RYC	35	1.23 (0.426)	1.09 (0.219)	0.059(0.130)	0.093 (0.196)	23.38
神农架 RSNJ	48	1.36 (0.484)	1.13 (0.261)	0.082(0.147)	0.132 (0.218)	36.36
利川 RLC	44	1.31 (0.466)	1.16 (0.296)	0.095(0.167)	0.145 (0.244)	31.17
居群水平平均 Mean at population level	38	1.36	1.16	0.100	0.155	35.71
栽培居群总体 Total of cultivated populations	226	1.61 (0.491)	1.20 (0.286)	0.128 (0.165)	0.205 (0.242)	61.04

居群代号同表1。N: 居群的样本数; A_o: 平均观察等位基因数; A_e: 平均有效等位基因数; H: Nei的遗传多样性; I: Shannon的多样性指数; PPB: 多态位点百分比

Population codes are the same as in Table 1. N, Sample size; A_o, Mean observed number of alleles; A_e, Mean effective number of alleles; H, Nei's genetic diversity; I, Shannon's information index; PPB, Percentage of polymorphic loci.

表4 8个自然居群与6个栽培居群间的AMOVA分析
Table 4 AMOVA analysis of eight natural populations and six cultivated populations of *Gastrodia elata*

变异来源 Source of variation	自由度 d.f.	离差平方和(SSD) Sum of squared deviations	方差分量 Variance component	方差分量比率 Percentage of variation (%)	固定指数 Fixation index (F _{ST})	P *
自然居群与栽培居群组间 Between groups	1	752.08	2.807	27.28	0.2728	<0.001
组内居群间 Among populations within groups	12	831.72	1.877	18.25	0.2509	<0.001
居群内 Within population	469	2,628.85	5.605	54.47	—	<0.001
总和 Total	483	4,212.64	10.290	100.00	—	—
自然居群组 Natural population group						
居群间 Among populations	7	547.67	2.289	27.25	0.2725	<0.001
居群内 Within population	249	1,521.88	6.112	72.75	—	<0.001
总和 Total	256	2,069.55	8.401	100.00	—	—
人工栽培居群组 Cultivated population group						
居群间 Among populations	5	176.36	0.865	22.56	0.2256	<0.001
居群内 Within population	220	653.45	2.970	77.44	—	<0.001
总和 Total	225	829.81	3.835	100.00	—	—

* 显著性检验经过1,023次模拟 Significance tests through 1,023 permutations

遗传距离最大(0.1653), 分化程度相对较高; 巴东居群(YBD)与恩施居群(YES)间的遗传距离最小(0.0336), 分化程度相对较低(表5)。基于Nei's 遗传距离的UPGMA聚类分析结果表明(图1), 天麻自然居群可以明显分为三大组, 其中五峰居群(YWF)单为一组; 宜昌居群(YYC)和神农架居群(YSNJ)组成长江北岸居群组; 其他居群聚为长江南岸鄂西居群组。长江南岸鄂西居群组进一步分为两小组: 恩施居群(YES)、巴东居群(YBD)和鹤峰居群(YHF)聚为一组; 咸丰居群(YXF)与其相邻的利川居群(YLC)聚为一组。共表征相关系数的Mantel检测显示聚类结果与遗传距离矩阵的吻合度较好($r=0.8190$, $P=0.0003$), 聚类图比较真实地反映了各居群间的遗传关系, 揭示天麻自然居群的分化有一定的地域性。但基于居群地理距离和遗传距离(表5)的Mantel检测表明, 天麻的8个自然居群间的遗传距离与地理距离之间并不存在显著的相关性($r=0.1669$, $P=0.2110$), 暗示天麻自然居群遗传分化不太符合Wright(1943)的地理距离分化模式。

2.4 人工栽培天麻居群的遗传多样性与种质评价

对天麻的6个人工栽培居群的遗传多样性检测表明, 人工栽培居群具有较低的遗传多样性, 尽管总体多态位点百分比(PPB)达61.04%, 而Nei's遗传多样性(H)仅为0.128, Shannon's多态信息指数(I)为0.205; 在居群水平上各参数更低, 仅为 $PPB=35.71\%$, $I=0.155$, 相应的 A_e 值为1.16, H 平均为0.100(表3)。在各人工栽培居群中, 以陕西(商南)居群(RSX)的遗传多样性最高($H=0.140$); 其次为河南西峡居群(RXX)($H=0.124$); 湖北宜昌人工居群(RYC)的遗传多样性最低($H=0.059$); 而湖北的五峰(RWF)、神农架(RSNJ)和利川(RLC)3个人工栽培居群的遗传多样性相差不大, 居中等水平(表3)。可见, 天麻人工栽培居群的遗传多样性一般都远低于自然居群, 在人工栽培居群中, 仅遗传多样性最高的陕西居群(RSX)的遗传多样性参数与自然居群中遗传多样性最低的五峰居群(YWF)基本相当。栽培居群间的 G_{ST} 为0.2317, 基因流 N_m 为1.6582(表6), 说明栽培居群间也存在一定的遗传分化, 但比自然居群

表5 8个自然居群间Nei's遗传距离(对角线下方)与地理距离(km) (对角线上方)
Table 5 Nei's genetic distance (below diagonal) and geographical distance (km) (above diagonal) among eight natural *Gastrodia elata* populations

居群 Population	YYC	YWF	YSNJ	YXF	YLC	YES	YHF	YBD
YYC	***	109.496	73.203	252.609	225.287	172.388	159.183	65.376
YWF	0.1244	***	141.546	159.582	144.656	109.611	55.149	73.340
YSNJ	0.0551	0.1653	***	244.295	208.668	151.776	174.335	68.724
YXF	0.0716	0.1072	0.0646	***	41.579	94.268	105.620	190.616
YLC	0.0950	0.1082	0.1032	0.0470	***	56.893	97.096	160.908
YES	0.1032	0.1039	0.0999	0.0699	0.0610	***	80.509	107.100
YHF	0.1231	0.1008	0.1253	0.0998	0.0895	0.0529	***	107.742
YBD	0.1005	0.0972	0.0963	0.0645	0.0571	0.0336	0.0402	***

地理距离由各采样点经纬度进行转换(<http://www.infoairports.com/freeservices/worlddistance.html>), 居群代号同表1
Geographic distance was obtained from latitude and longitude of each sampling location based on a software (<http://www.infoairports.com/freeservices/worlddistance.html>). Population codes are the same as in Table 1.

表6 同域自然居群与人工栽培居群间的遗传分化及基因流
Table 6 Genetic differentiation and gene flow between natural and cultivated populations of *Gastrodia elata* in sympatric location

居群 Population	宜昌 (自然—人工) YYC-RYC	五峰 (自然—人工) YWF-RWF	神农架(自然—人工) YSNJ-RSNJ	利川(自然—人工) YLC-RLC	自然居群 Natural population	人工居群 Cultivated population
Nei's G_{ST}	0.4508	0.3512	0.4132	0.3371	0.2558	0.2317
基因流 Gene flow (N_m)	0.6091	0.9239	0.7100	0.9833	1.4547	1.6582

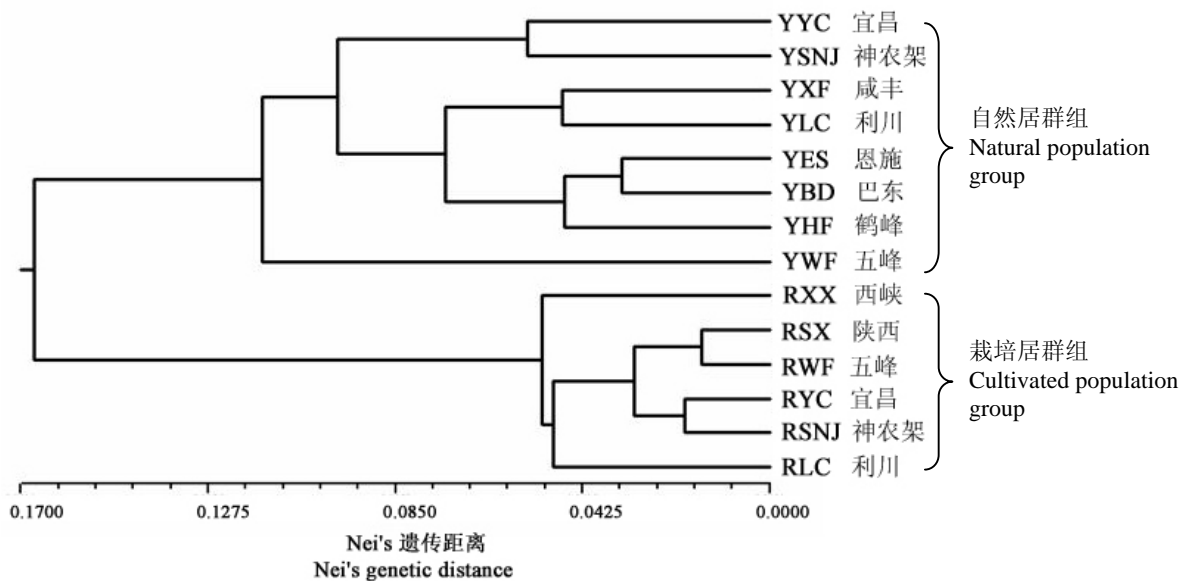


图1 天麻14个居群的UPGMA聚类图
Fig. 1 A dendrogram of 14 *Gastrodia elata* populations based on Nei's genetic distance using UPGMA clustering analysis

间的分化程度略低。

基于Nei's遗传距离的UPGMA聚类分析表明,自然居群与人工栽培居群分别聚为两大类(图1),地理上同一位置的自然居群与人工居群并未聚在一起,而是所有人工栽培居群相聚于较小遗传距离(约0.05)内,说明天麻在人工驯化栽培过程中可能存在遗传均质化的问题,而且人为的跨地区引种也可能造成了栽培居群与当地自然居群在遗传结构上的差异。

自然居群组与人工栽培居群组的AMOVA分析结果见表4。两个组之间方差分量比率为27.28%,高于组内居群间的变异比率18.25%,说明两组之间的遗传变异占相当大的比例。组间遗传分化系数,即Slatkin (1991)修正的Wright固定指数(F_{ST})为0.2728(表4),而组间居群间的遗传分化系数为0.4553(数据未列出),表明遗传分化均达到了显著水平($P<0.001$)。

在4对同域的自然居群与人工栽培居群之间,遗传分化(G_{ST})的范围为0.3371–0.4508(表6),均大于各自然居群之间的遗传分化($G_{ST}=0.2558$)和各人工栽培居群之间的遗传分化($G_{ST}=0.2317$),而基因流(0.6091–0.9833)远远低于各自然居群之间(1.4547)和各人工栽培居群之间(1.6582)(表6)。说明

人工驯化栽培的天麻与当地的自然居群间在一定程度上是存在遗传隔离的。

3 讨论

3.1 天麻自然居群的遗传多样性

天麻居群水平的遗传多样性($H=0.176$)(表3)明显低于Nybom(2004)所统计的多种植物居群水平遗传多样性(基于RAPD、AFLP、ISSR等显性标记)的平均值($H=0.22$ 或 0.23),仅高于一年生($H=0.13$)或自交物种($H=0.12$) RAPD检测的居群遗传多样性的平均值(Nybom & Bartish, 2000),揭示出天麻居群内部遗传多样性的明显不足。相对而言,天麻在物种水平上还保存着较高的遗传多样性($PPB=81.82\%$, $H=0.236$),存在明显的居群遗传分化(表3、4),这与兰科其他植物的遗传结构相类似(Sun & Wong, 2001; Li *et al.*, 2002; 高丽和杨波, 2006)。与其他兰科植物相比,天麻的遗传多样性仅低于春兰(*Gymbidium goeringii*)的ISSR遗传多样性($H=0.2628$)(高丽和杨波, 2006)和高斑叶兰(*Goodyera procera*)的RAPD遗传多样性($H=0.293$)(Wong & Sun, 1999),但明显高于硬叶兜兰(*Paphiopedilum micranthum*)($H=0.217$)、麻栗坡兜兰(*P. malipoense*)($H=0.117$)、独花兰(*Changnienia amoena*)(H

=0.194)、毛鞘线柱兰(*Zeuxine gracilis*)($H=0.165$)和美冠兰(*Eulophia sinensis*)($H=0.202$)等的RAPD多样性(Sun & Wong, 2001; Li *et al.*, 2002), 这说明天麻的遗传多样性在兰科植物中属于中等偏高水平。

植物的生活史特征特别是繁育方式对物种遗传多样性的高低有着重要影响。一般来说, 远交、晚期演替类的植物拥有较高的居群遗传多样性(Hamrick & Godt, 1989, 1996; Nybom & Bartish, 2000; Nybom, 2004)。天麻为虫媒传粉远交、种子风力散布植物(徐锦堂, 1993), 理论上应具有较高的居群遗传多样性。但天麻具有较低的居群水平的遗传多样性和相对较高的物种水平的遗传多样性(表3)。这可能是多方面因素影响的结果。首先, 主导因素可能还是天麻的特殊繁育方式。一方面, 天麻的种子萌发必须依赖与小菇属等真菌的共生, 而且萌发后形成的原球茎生长还需依赖于蜜环菌属真菌的共生(徐锦堂, 1993), 这可能降低了远交繁育的实际效率; 另一方面, 尽管天麻地上茎为一年生, 但其地下茎通过无性克隆繁殖延续, 类似于多年生宿根植物, 有利于维持居群奠基者效应。另外, 天麻在形态上存在着红天麻、乌天麻等多种变型(陈心启等, 1999), 野外调查中也发现, 天麻花梗颜色呈现出红、乌、乌红中间色及绿色等, 花色也呈现出红、绿等色, 这些形态上的多种表型可能是天麻遗传多样性较高的反映。然而, 由于天麻各变型的生态位存在差异, 因此尽管天麻多为同域分布, 但在不同海拔上各变型的分布比例不同, 花期也存在差异, 基因交流主要还是在同一变型间, 这也可能是造成居群内遗传多样性较低的因素之一。

天麻作为名贵中药材, 所遭受的人为干扰破坏程度比其他植物类群要严重得多, 这也导致其居群遗传多样性的迅速丧失。各自然居群的遗传多样性水平存在很大差异(H 在0.138–0.201之间), 这在一定程度上可能是由人为采挖方式和破坏程度的差异所造成。在目前研究的8个自然居群中, 鹤峰居群的多样性最高($H=0.201$), 当地居民对野生天麻的采挖程度也最轻, 而且该地区居民在采挖野生天麻时, 一般只取较大的商品麻, 而保留小米麻和白麻, 对生境破坏不太大。而遗传多样性最低的五峰居群($H=0.138$)所在的五峰县, 是天麻栽培与产业化相对活跃的地区之一, 当地居民对野生天麻竞相进行

大规模采挖。他们除了将大麻挖回销售外, 还往往将小米麻或白麻挖回用于栽培, 采挖后的窝穴很少有复苏的可能。如在过去野生天麻较丰富的五峰县高峰村, 这次调查仅采集到5个样品, 可见当地天麻资源被破坏得相当严重。而野生资源破坏也很严重的神农架居群的遗传多样性($H=0.186$)明显高于五峰居群, 这可能与该居群样品中有相当一部分采自神农架自然保护区有关。

除以上主要因素外, 物种的地理分布特征也可能影响其遗传多样性水平。一般而言, 广布种比狭域分布的物种具有更高的遗传多样性(Hamrick & Godt, 1996), 天麻与春兰、高斑叶兰等在兰科植物中表现出较高遗传多样性, 可能与它们地理分布相对较广有关(Wong & Sun, 1999; 高丽和杨波, 2006)。

3.2 天麻自然居群间的遗传分化

尽管天麻遗传分化系数($G_{ST}=0.2558$) (表6)低于Nybom(2004)所统计的植物ISSR遗传分化系数的平均值($G_{ST}=0.34$, 统计的植物类群案例太少, 缺乏比较意义), 但却明显高于远交物种和种子风力散布物种RAPD遗传分化系数的平均值($G_{ST}=0.22$ 和0.17), 也高于硬叶兜兰($F_{ST}=0.2031$)的RAPD遗传分化系数(Li *et al.*, 2002)、肯塔基兜兰($F_{ST}=0.182$)的同工酶遗传分化系数(Case *et al.*, 1998), 揭示出天麻自然居群间存在相当程度的遗传分化, 表明天麻自然居群间可能已经形成异质居群结构。这与天麻自然资源的野外调查相一致: 野生天麻表现出斑块状分布, 例如, 红天麻与乌天麻在一定的区域内有同一变型呈相对集中的分布趋势, 不同海拔区域各变型分布比例不同, 乌天麻一般较红天麻分布的海拔高。而某些居群样本的形态特征与其他居群样本有着明显不同, 如利川居群的天麻大多形态较小(当地称药天麻)等。

居群的遗传结构从一定意义上说是基因流和遗传漂变两种力量相互作用的结果(Hutchison & Templeton, 1999)。一般认为, 基因流 $N_m=1$ 时即可防止因遗传漂变而产生的居群遗传分化(Slatkin, 1987)。但由遗传分化系数估算出的基因流包含着历史基因流的积累, 而非当前基因流。天麻自然居群间基因流的不足可能是导致居群间遗传分化的重要原因之一。导致天麻基因流低下的主要原因可能与其特殊的繁育方式有关, 天麻果实开裂后并非所有的种子都能落在适合萌发的地面湿润叶层中, 也

不是所有的树叶都有紫萁小菇等腐生真菌,因而能发芽的种子只有少数(徐锦堂, 1993), 萌发形成的原球茎能否及时接种蜜环菌而成功生长也存在不确定因素。因此, 随机遗传漂变可能主导了天麻自然居群的遗传分化, 而居群遗传距离与地理距离之间的Mantel检验不存在显著的相关性恰恰说明了这一点。

生物地理学相关研究表明, 高山或河道的物理隔离对生物居群间的遗传分化有一定的影响(Gascon *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003)。本实验中的8个自然居群分别采自长江的南北两岸, 基于遗传距离的UPGMA聚类结果表明, 天麻自然居群聚类具有一定的地理区域性: 除五峰居群外, 长江南北两岸居群分别优先聚类(图2), 反映出长江对南北两岸天麻自然居群间的基因交流存在一定的阻断作用。然而, 基于居群地理距离和遗传距离的Mantel检测表明, 天麻自然居群的遗传分化不太符合Wright的地理距离分化模式, 说明除随机遗传漂变与地理隔离外, 其遗传分化可能还与各地区的人为破坏程度等因素有关。

3.3 栽培天麻遗传种质评价

物种的驯化是在人工介导的选择作用下使动植物沿着适合人类需要的方向进化的过程, 迄今已有10,000年的历史(Otero-Arnaiz *et al.*, 2005a)。动植物的栽培驯化会导致遗传多样性的丧失(Zhou *et al.*, 2005; Skaala *et al.*, 2005)。自20世纪70年代发展了天麻无性繁殖人工栽培技术(徐锦堂, 1993)以来, 天麻的人工栽培已历经30余年, 栽培天麻种质是否存在遗传退化或遗传均质性? 这一问题的解答对制定天麻产业的长远发展策略有重要意义。本实验结果表明, 人工栽培天麻的遗传多样性明显低于野生天麻, 而居群水平的遗传多样性更低(表3), 而且聚类分析表明所有栽培居群聚于较低遗传距离水平(约0.05)内(图1), 说明栽培天麻存在明显遗传均质化趋势, 同时地域间的引种事件使得这些栽培居群与当地的自然居群间产生了明显遗传分化(表6)。

各栽培居群的多样性也存在着明显的差异, 其变化趋势与聚类所揭示的栽培居群间遗传关系相一致(图1), 反映了人工栽培居群引种种质的流向和栽培历史的影响, 与我国人工天麻栽培历程相符合(徐锦堂, 1993), 揭示出引种瓶颈效应和长期无性繁育所导致引种居群的遗传均质化后果。栽培天麻的

原始种质起源较为单一(徐锦堂, 1993), 野生天麻的栽培试验始于湖北利川和四川南川, 并于20世纪70年代在陕西商洛等地区首先推广, 然后普及到其他产区(徐锦堂, 1993), 陕西商洛(含商南)和其邻近区域(如河南西峡)成为其他人工栽培天麻产区的早期引种的种源地之一, 种质的遗传多样性自然可能高于其他人工栽培居群; 同时陕西和河南的天麻产区相对较早地开展了天麻有性繁殖技术的推广与应用, 有利于增加和保持遗传多样性, 从而减缓其遗传均质化。而湖北宜昌、神农架到20世纪90年代中后期才开始才从湖北五峰引种栽培(根据对栽培者的访问), 可能因引种瓶颈导致其遗传多样性低下。湖北五峰于20世纪80年代开始引种栽培天麻, 根据聚类分析可知其原始种源可能引种于陕西, 也曾历经引种瓶颈, 使其遗传多样性降低至栽培居群的中等水平($H=0.100$)。虽然当地居民常常采挖野生种麻(米麻或白麻)补充到栽培种质中, 但由于野外采挖的种麻多处于生长季节, 难以成功地接种蜜环菌, 因而其遗传多样性依旧明显低于陕西商南和河南西峡(表3)。

来自自然居群的基因流可在一定程度上提高栽培居群遗传多样性(Otero-Arnaiz *et al.*, 2005b), 而栽培居群通过杂交也可与自然居群产生基因渐渗, 如大豆(Nakayama & Yamaguchi, 2002)和高粱(Morrell *et al.*, 2005)。本实验揭示天麻栽培居群与自然居群之间存在着相当大的遗传分化(表4, 6), 同域自然居群与栽培居群间的基因流明显不足(表6), 这与驯化栽培过程中强烈的人工选择作用密切相关。人工栽培天麻一般为无性繁育, 通过米麻人工接种蜜环菌进行营养生长, 其箭麻成为天麻产业的商品麻, 不再繁殖生长, 通常与自然居群不进行基因交流, 因此天麻的人工驯化极有可能完全阻断了与自然居群的基因流而沿着人为干预的方向进化, 从而与自然居群产生了分化。

3.4 野生天麻致濒原因与保育策略

总体而言, 天麻自然居群的遗传多样性水平低下, 遗传基础薄弱, 可能存在近交衰退或发生地方居群灭绝事件的潜在危机。天麻濒危现状形成的主导原因还是人为的挖采破坏行为。野外调查中发现, 野生天麻的窝穴常被采挖殆尽, 即使有少数米麻遗漏, 也因与其共生蜜环菌菌索连接被打断而衰亡。因此保护策略首先应加强天麻自然资源的就地保

护, 严格限制人工采挖野生天麻, 特别是采挖米麻或白麻的行为; 其次要加强天麻知识的科普教育, 如向当地药农阐明生长季节采集的种麻是不能成功栽培的, 从而减少对野生资源的采挖; 最后, 应选择适宜的地点建立专门的长期资源圃和育种基地, 为栽培天麻提供优良种质和及时进行野生种质复壮工作, 以提高栽培质量。建议各天麻产区适当推广有性繁殖技术, 有技术条件和能力的产区可进行天麻变型间的人工杂交研究培育杂交良种, 新产区引种时应避免单一区域引种, 采取多区域引种防止种质均化危机, 并建议不同产区间相互适当交换种质防止衰退。同时要开展与其共生的蜜环菌的相关研究, 防止菌种的退化及菌种多样性的丧失所引起的天麻多样性的丧失。

致谢: 本实验在采样过程中得到了五峰县林业局及大花坪林场、宜昌大老岭林场、神农架国家级自然保护区管理局、利川市林业局及红椿林场、咸丰县活龙乡林业站、鹤峰县五里乡林业站与中营乡林业站、巴东县绿葱坡镇林业站等单位的大力支持。本实验室暴朝霞博士和王静博士、三峡大学的王传华老师与田东朝同学参与了野外调查和样本采集; 实验过程中得到了本实验室康明博士的指导及实验室全体老师同学的帮助, 在此一并表示感谢!

参考文献

- Case MA, Mlodozienec HT, Wallace LE, Weldy TW (1998) Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **85**, 1779–1786.
- Chen SC (陈心启), Tsi ZH (吉占和), Lang KY (郎楷永), Zhu GH (朱光华) (1999) *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (Tomus 18) (中国植物志, 第十八卷), pp. 29–33. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G, Musacchio A, Widmer A (2003) Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology*, **12**, 2783–2792.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11–15.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction sites. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fan L (范黎), Guo SX (郭顺星), Xu JT (徐锦堂) (1999a) Interaction between protocorms of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) and *Mycena dendrobii* in symbiotic germination. *Mycosystema* (菌物系统), **18**, 219–225. (in Chinese with English abstract)
- Fan L (范黎), Guo SX (郭顺星), Xu JT (徐锦堂) (1999b) Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Gastrodia elata* associated with *Mycena orchidicola*. *Mycosystema* (菌物系统), **18**, 431–435. (in Chinese with English abstract)
- Fu LK, Jin JM (1992) *China Plant Red Data Book: Rare and Endangered Plants* (Vol.1), pp. 494–495. Science Press, Beijing.
- Gao L (高丽), Yang B (杨波) (2006) Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis. *Biodiversity Science* (生物多样性), **14**, 250–257. (in Chinese with English abstract)
- Gascon C, Malcom JR, Patton JL, Silva MNF, Bogart JP, Lougheed SC, Peres CA, Neckel S, Boag PT (2000) Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **97**, 13672–13677.
- Ge XJ, Yu Y, Zhao NX, Chen HS, Qi WQ (2003) Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation*, **111**, 427–434.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), pp. 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **351**, 1291–1298.
- Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻) (1994) Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **16**, 169–177. (in Chinese with English abstract)
- Hu Z (胡忠), Huang QZ (黄清藻), Liu XZ (刘小烛), Yang JB (杨俊波) (1999) Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-I from *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **21**, 131–138. (in Chinese with English abstract)
- Hu Z (胡忠), Yang ZM (杨增明), Wang J (王均) (1988) Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata* corm. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **10**, 373–380. (in Chinese with English abstract)

- stract)
- Hutchison DW, Templeton AR (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, **53**, 1898–1914.
- Lan J (兰进), Xu JT (徐锦堂), Li JS (李京淑) (1994) Study on symbiotic relation between *Gastrodia elata* and *Armillariella mellea* by autoradiography. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **13**, 219–222. (in Chinese with English abstract)
- Lan J (兰进), Xu JT (徐锦堂), Li JS (李京淑) (1996) Studies on the infecting progress of labelled *Armillariella mellea* to *Gastrodia elata*. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica* (核农学报), **10**, 123–125. (in Chinese with English abstract)
- Li A, Luo YB, Xiong ZT, Ge S (2002) A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchid species. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **44**, 250–252.
- Li HS (李海生) (2004) ISSR markers and their application in plant genetic variation analysis. *Bulletin of Biology* (生物学通报), **39** (2), 19–21. (in Chinese)
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- McDermott JM, McDonald BA (1993) Gene flow in pathosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **31**, 353–373.
- Miller MP (1997) *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA)*, Version 1.3. Northern Arizona University, Flagstaff.
- Morrell PL, Williams-Coplin TD, Lattu AL, Bowers JE, Chandler JM, Paterson AH (2005) Crop-to-weed introgression has impacted allelic composition of johnsongrass populations with and without recent exposure to cultivated sorghum. *Molecular Ecology*, **14**, 2143–2154.
- Nakayama Y, Yamaguchi H (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*, **2**, 25–30.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**, 283–292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321–3323.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, **13**, 1143–1155.
- Nybom H, Bartish I (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **3**, 93–114.
- Otero-Arnaiz A, Casas A, Hamrick JL (2005a) Direct and indirect estimates of gene flow among wild and managed populations of *Polaskia chichipe*, an endemic columnar cactus in Central Mexico. *Molecular Ecology*, **14**, 4313–4322.
- Otero-Arnaiz A, Casas A, Hamrick JL, Cruse-Sanders J (2005b) Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in Tehuacan Valley, Central Mexico. *Molecular Ecology*, **14**, 1603–1611.
- Qian W (钱韦), Ge S (葛颂), Hong DY (洪德元) (2000) Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPDs and ISSRs. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **42**, 741–750. (in Chinese with English abstract)
- Rohlf FJ (2000) *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York.
- Sa QL, Wang YQ, Li WB, Zhang LM, Sun YR (2003) Isolation of a genomic DNA for *Gastrodia* antifungal protein and analyses of its promoter in transgenic tobacco. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **45**, 229–233.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN: A Software for Population Genetic Data Analysis*, Version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Skaala Ø, Taggart JB, Gunnes K (2005) Genetic differences between five major domesticated strains of Atlantic salmon and wild salmon. *Journal of Fish Biology*, **67** (Suppl. A), 118–128.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787–792.
- Slatkin M (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research Cambridge*, **58**, 167–175.
- Sun M, Wong KC (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany*, **88**, 2180–2188.
- Wang JB (王建波) (2002) ISSR markers and their applications in plant genetics. *Hereditas* (遗传), **24**, 613–616. (in Chinese with English abstract)
- Wang XC (王晓晨), Willson AD, Guy B, Xu Q (徐庆), Marc VM, Chen ZL (陈章良), Willy D (1999) Molecular cloning of GAFP-I, an antifungal protein from *Gastrodia elata*. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **41**, 1041–1045. (in Chinese with English abstract)
- Wong KC, Sun M (1999) Reproductive biology and conserva-

- tion genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 1406–1413.
- Wright S(1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114–138.
- Xie JY (谢佳燕), Zhang ZB (张知彬) (2004) Inter-simple sequence repeat and application in the research of genetic diversity. *Acta Theriologica Sinica* (兽类学报), **24**, 71–77. (in Chinese with English abstract)
- Xu JT (徐锦堂) (1993) *The Cultivation of Gastrodia elata Blume in China* (中国天麻栽培学), pp. 1–87. Associated Press of Peking Medical University & Peking Union Medical College, Beijing. (in Chinese)
- Xu JT (徐锦堂), Fan L (范黎) (2001) Cytodifferentiation of the seeds (protocorms) and vegetative propagation corms colonized by mycorrhizal fungi. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **43**, 1003–1010. (in Chinese with English abstract)
- Xu JT (徐锦堂), Guo SX (郭顺星), Fan L (范黎), Na R (娜仁) (2001) Symbiotic germination between *Gastrodia elata* and fungal species of *Mycena. Mycosystema* (菌物系统), **20**, 137–141. (in Chinese with English abstract)
- Xu JT (徐锦堂), Mu C (牟春) (1990) The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), **32**, 26–31. (in Chinese with English abstract)
- Yang SL (杨世林), Lan J (兰进), Xu JT (徐锦堂) (2000) Progress in *Gastrodia elata* research. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), **31**, 66–69. (in Chinese)
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) *POPGENE, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Zhou SL, Xiong GM, Li ZY, Wen J (2005) Loss of genetic diversity of domesticated *Panax notoginseng* FH Chen as evidenced by ITS sequence and AFLP polymorphism: a comparative study with *P. stipuleanatus* HT Tsai et K M Feng. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**, 107–115.

(责任编辑: 时意专)